

На правах рукописи

ДАВЛЕТБАЕВ ИГОРЬ МАРАТОВИЧ

**БИОСИНТЕЗ ПОЛИНЕНАСЫЩЕННЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ
И ИХ ПРОИЗВОДНЫХ**

Специальность 03.00.23 – “Биотехнология”

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата технических наук

УФА - 2002

Работа выполнена в Уфимском государственном нефтяном техническом университете.

- Научные руководители:** доктор химических наук, профессор
Зорин Владимир Викторович;
- кандидат биологических наук, доцент
Петухова Надежда Ивановна.
- Официальные оппоненты:** доктор биологических наук, профессор
Мелентьев Александр Иванович;
- кандидат биологических наук
Гилязетдинов Шамиль Ямилович.
- Ведущая организация** Институт органической химии Уфимского научного центра РАН.

Защита состоится “18” декабря 2002 года в 16⁰⁰ на заседании диссертационного совета Д 212.289.06 при Уфимском государственном нефтяном техническом университете по адресу: 450062, Республика Башкортостан, г. Уфа, ул. Космонавтов, 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Уфимского государственного нефтяного технического университета.

Автореферат разослан “ ” ноября 2002 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета

Самойлов Н. А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования: Полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК) представляют собой уникальный класс органических веществ, играющих важную роль в биологических системах. Исследования последних трех десятилетий вскрыли широкий спектр их функций в живых организмах. ПНЖК подвергаются биотрансформации липоксигеназами или циклооксигеназами, что приводит к образованию многочисленных низкомолекулярных регуляторов процессов, протекающих в клетках, тканях и организме в целом. Одной из самых важных ПНЖК является арахидоновая кислота (АК), которая выступает в роли непосредственного предшественника серии простагландинов, лейкотриенов и тромбоксанов. Основными областями применения АК являются: фармакология (предшественник различных лекарственных и профилактических препаратов применяемых при заболеваниях сердечно-сосудистой системы, печени и др.); косметическая промышленность (средства по уходу за кожей); пищевая промышленность (обогащение различных продуктов питания, в том числе искусственных детских молочных смесей и др.); сельское хозяйство (высокоэффективный стимулятор роста и защитных реакций растений) и др. В настоящее время основным источником получения АК являются липидные экстракты из печени свиньи и других органов животных, что делает их крупномасштабное производство неэффективным (содержание АК оставляет не более 0,2% в пересчете на сухую массу). В течение последних двадцати лет значительные успехи были достигнуты в области биотехнологического получения АК с помощью низших грибов и морских водорослей, которые в ряде случаев позволили осуществить ее промышленное производство. Однако существующие на сегодняшний день биотехнологии получения АК далеки от совершенства, поскольку ее выход в лабораторных условиях в лучших случаях составляет 13 г/л (Япония), а в среднем у различных исследователей около 6÷10 г/л (Россия, США, Польша и др.). В связи с этим актуальным является поиск и создание отечественных продуцентов АК и эффективных биотехнологий ее получения на их основе. Данная работа была выполнена по планам важнейших НИР Уфимского государственного нефтяного технического университета (УГНТУ) в соответствии с федеральной целевой программой “Государственная поддержка интеграции высшего образования и фундаментальной науки” на 1997-2001 гг. и 2002-2006 гг.

Цель работы: Получение новых высокоэффективных продуцентов АК, поиск условий их эффективного культивирования с целью повышения выхода целевого продукта. Совершенствование биотехнологии получения АК. Создание методов биосинтеза практически важных веществ на ее основе.

В соответствии с поставленной целью решались следующие задачи:

- скрининг микроорганизмов потенциальных продуцентов АК;
- исследование морфологических, физиолого-биохимических и патогенных свойств найденных перспективных продуцентов;
- исследование влияния условий культивирования перспективных штаммов на выход биомассы, липидов и АК;

- поиск условий биосинтеза сложных эфиров АК и глицерина с помощью липолитических микроорганизмов;
- обоснование принципиальной схемы получения АК с использованием найденных перспективных штаммов.

Научная новизна: Проведен скрининг микроорганизмов, в результате которого выделен и идентифицирован новый высокоэффективный штамм - продуцент АК – *Mortierella alpina* 18-1. Впервые исследовано влияние условий культивирования гриба *Mortierella alpina* 18-1 на скорость и селективность биосинтеза АК. Найденны параметры осуществления эффективного биосинтеза АК с выходом 10,8 г/кг среды при температуре 20÷25 °С, рН_{нач.}=6,5÷7,0 и времени культивирования 19 суток на базе штамма *Mortierella alpina* 18-1. На основе исследования промежуточных метаболитов, зависимости их выхода от условий культивирования предложена гипотетическая схема биосинтеза ПНЖК у исследуемой культуры гриба *Mortierella alpina* 18-1. Установлены условия синтеза сложного эфира АК и глицерина с помощью липолитических микроорганизмов.

Практическая значимость: Разработан высокоэффективный метод получения АК с помощью выделенного продуцента *Mortierella alpina* 18-1 и научно обоснована биотехнология ее получения. Доказана эффективность разработанной биотехнологии, обеспечивающей возможность получения АК с выходом до 10,8 г/кг среды. Разработан метод биосинтеза сложного эфира АК и глицерина, используемого в фармакологии, косметике. Результаты научных исследований легли в основу создания новых лабораторных работ и используются в учебном процессе подготовки специалистов по специальности “Биотехнология”.

Апробация работы: Результаты исследований доложены на: научно-практической конференции “Биотехнология в ФЦП ”Интеграция” (Санкт-Петербург, октябрь, 1999); республиканской научной конференции «И.П. Павлов и современные проблемы биологии и медицины» (Уфа, октябрь, 1999); Международной научно-практической конференции, посвященной 425-летию г. Уфы, “Сервис большого города” (Уфа, май, 1999); II Международной конференции молодых ученых «Актуальные тенденции в органическом синтезе на пороге новой эры» (Санкт-Петербург, июнь, 1999); XIII Международной научно-технической конференции “Химические реактивы, реагенты и процессы малотоннажной химии” (Тула, май, 2000); 51 научно-технической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых (Уфа, апрель, 2000); XXXIX Международной научной студенческой конференции “Студент и научно-технический прогресс” (Новосибирск, май, 2001); 52 научно-технической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых (Уфа, апрель, 2001); XIV Международной научно-технической конференции “Химические реактивы, реагенты и процессы малотоннажной химии” (Уфа, июнь, 2001); научно-практической конференции “Химия и технология применения регуляторов роста растений” (Уфа, декабрь, 2001); школе-семинаре “Химическая экология” (Уфа, октябрь, 2001); конференции “Химия и технология применения регуляторов роста растений” (Уфа, декабрь, 2001); Всероссийской конференции “Катализ в биотехнологии, химии и химических технологиях” (Тверь, май, 2002).

Публикации: По материалам диссертации опубликовано 13 научных работ, в том числе 1 статья и тезисы 12 докладов.

Структура и объём работы: Диссертация включает введение, обзор литературы (глава 1), описание объектов и методов исследования (глава 2), экспериментальную часть и обсуждение результатов (глава 3), выводы и список цитируемой литературы, содержащий 128 наименований. Работа изложена на 102 страницах машинописного текста и содержит 29 рисунков и 10 таблиц.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Скрининг продуцентов арахионовой кислоты

Поиск новых штаммов продуцентов АК осуществлялся среди фикомицетов, у которых к настоящему времени обнаружены самые активные синтетики АК. Обширный скрининг грибов проводился из различных почв Башкортостана и осуществлялся в два этапа (рис. 1).

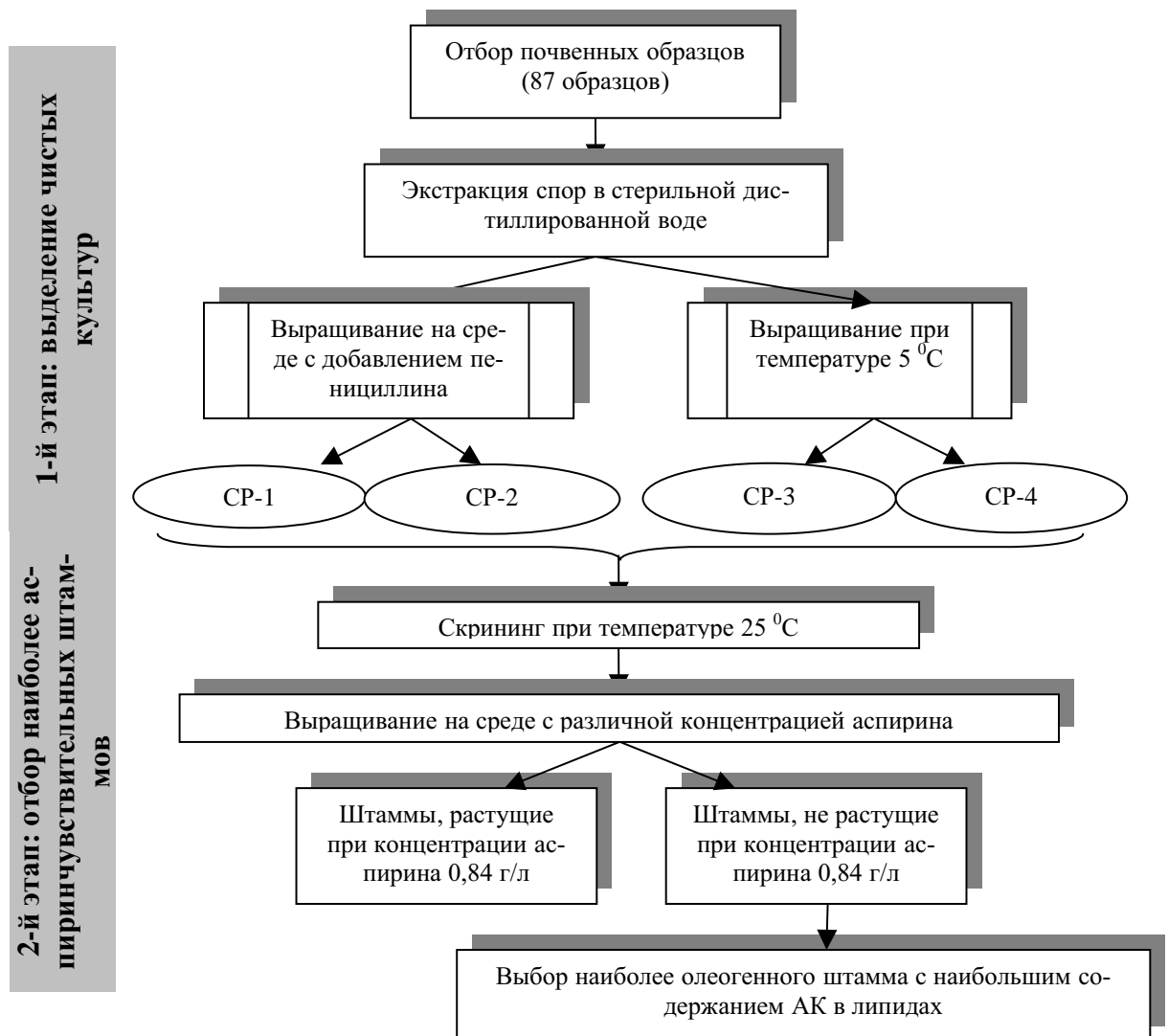


Рис. 1. Общая схема скрининга грибов – потенциальных продуцентов АК: питательные среды CP-1, CP-2, CP-3 и CP-4 соответственно сахарозо-картофельная, глюкозо-картофельная, сусло+сахароза, сусло+глюкоза.

На первом этапе из накопительных культур было выделено более 840 штаммов низших почвенных грибов. В качестве селективного фактора, для подавления сопутствующей бактериальной флоры, в начале работы использовался пенициллин. Позже добавление пенициллина в среду было заменено на выращивание при пониженной температуре, поскольку в этом случае происходит подавление сопутствующей грибной и бактериальной флоры, не содержащей каких-либо значительных количеств ПНЖК в своих цитоплазматических мембранах и, следовательно, не способной расти в подобных условиях (Альфред Ботха и др. 1999).

На втором этапе для скрининга продуцентов АК был использован метод, предложенный Ерошиным В. К. с соавторами, которые при работе с фикомицетами рода *Mortierella* обнаружили корреляцию между уровнем синтеза АК и чувствительностью роста грибов к низким концентрациям аспирина (около 0,84 г/л).

В результате исследования были отобраны 22 штамма почвенных грибов, образующих характерный для фикомицетов несептированный мицелий, обладающих повышенной чувствительностью к аспирину. Исследование липидобразующей активности этих штаммов показало, что наиболее высоким суммарным содержанием жирных кислот (ЖК) характеризуются штаммы 50-21к2, 51-202к и 18-1 (рис. 2).

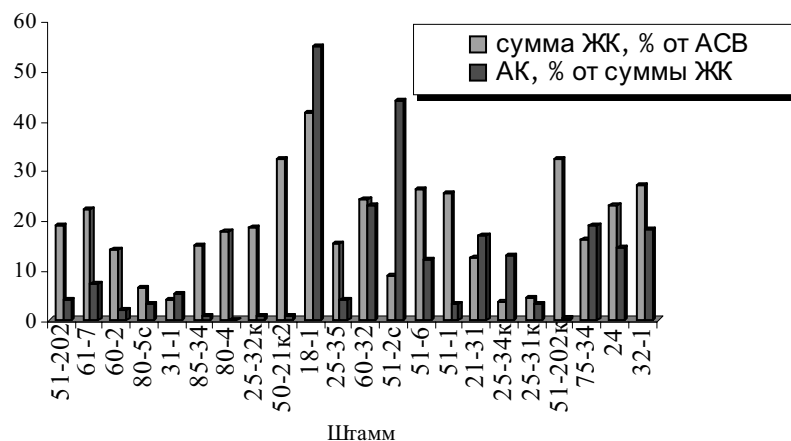


Рис. 2. Содержание ЖК и АК у аспириновосприимчивых штаммов

Анализ состава полученных липидов методами ЯМР и хроматомасс-спектрометрии (полученные спектры сравнивались со спектрами из международных баз данных по липидам www.lipid.co.uk и <http://lipid.bio.m.u-tokyo.ac.jp>) показал, что содержание АК от суммы ЖК составляло у штамма 18-1 - 55%, в остальных случаях ее содержание не превышало 15% от суммы ЖК (штамм 24). Также следует отметить, что штамм 67-1 (предварительно идентифицированный как фикомицет, относящийся к роду *Mortierella*) накапливал до 27% дигомо-γ-линоленовой кислоты от суммы ЖК, однако, с учетом его низкой липогенной активности, практическое применение данного штамма для промышленного использования нецелесообразно. Таким образом, в результате обширного скрининга микроорганизмов был выделен новый штамм, способный накапливать до 41% ЖК от АСВ, 55% из которых приходится на АК.

2. Идентификация штамма 18-1. Проверка его патогенности

Основные морфологические характеристики гриба, необходимые для его идентификации, объединены в табл. 1.

Таблица 1

Основные морфологические характеристики штамма 18-1

Признак	Описание
Происхождение	Ризосфера озимой пшеницы РБ, Иглинский район.РБ
Внешний вид колонии	Розетка из мелких лопастей.
Воздушный мицелий	Прозрачный в мелких лопастях.
Субстратный мицелий	Белый ватообразный, обильный, преобладает. В зонах, шириной около 1 см. В мицелии много анамостозов.
Длина спорангиеносцев	50÷100 мкм
Диаметр: - оснований спорангиеносца - вершин спорангиеносца	4÷5 мкм 1,2÷2 мкм
Размеры: - спорангия - спор - стилоспор	8÷10 мкм 2×3÷4 мкм 35÷40 мкм
Стилоспоры	Обычные, толстостенные, округлые

Особые признаки: запах прогорклого жира, отмечено свойство распространять мицелий за стенки сосудов, в которых гриб выращивается, или за пределы субстрата при росте во влажной среде – ”признак Бахмана”. Таким образом, по сумме морфологических признаков данный микроорганизм был отнесен к роду *Mortierella* и виду – *alpina*.

В результате исследований патогенности в Уфимском НИИ медицины труда и экологии человека установлено, что исследуемая культура *Mortierella alpina* штамм 18-1 авирулентна для млекопитающих, не проявляет инфекционность, инвазивность и токсигенность.

3. Изучение влияния условий культивирования *Mortierella alpina* 18-1 на биосинтез полиненасыщенных жирных кислот

С целью поиска наиболее эффективных условий культивирования для получения максимального выхода целевого продукта – АК изучалось влияние начального значения рН среды, температуры и времени выращивания, отношения площади к объему среды, количества инокулята и его вида на рост и синтез липидов гриба *Mortierella alpina* 18-1. Статистическую обработку результатов осуществляли на персональном компьютере с использованием программы MathCAD 2000.

3.1. Влияние начальной кислотности среды на выход жирных кислот и биомассы *Mortierella alpina* 18-1

Полученные результаты показывают (рис. 3), что изменение начального

значения pH значительно влияет как на выход биомассы, так и на содержание в ней ЖК.

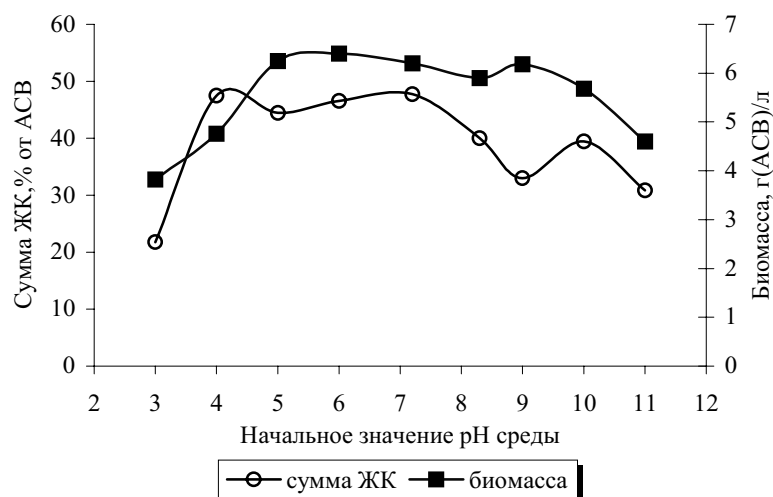


Рис. 3. Выход биомассы и суммы жирных кислот в зависимости от начального значения pH среды

Наибольшее количество ЖК образовывалось при $pH_{нач.}=6,5\div 7,0$. В то же время значительные изменения наблюдались в жирно-кислотном составе липидов исследуемого микроорганизма (рис. 4). Так, наибольшее количество ненасыщенных ЖК образовывалось при $pH_{нач.}=6,5\div 8,5$.

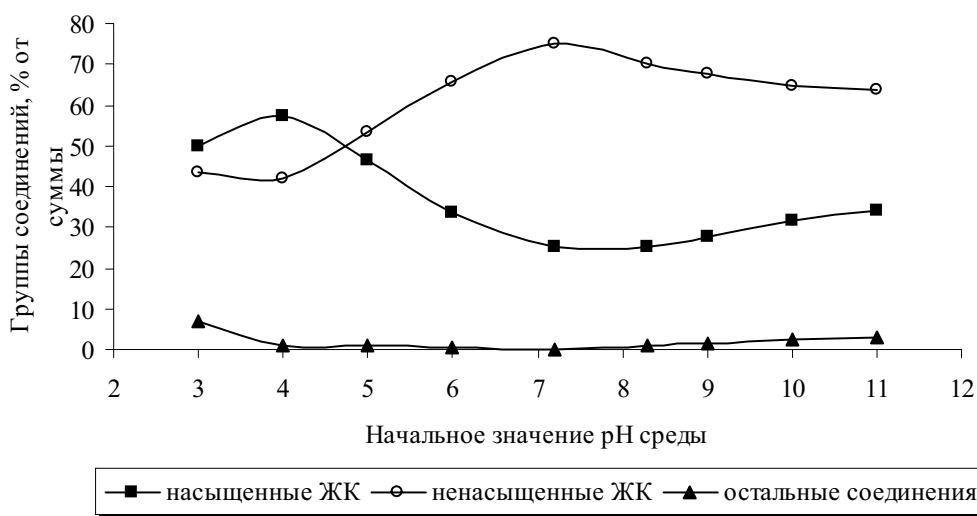
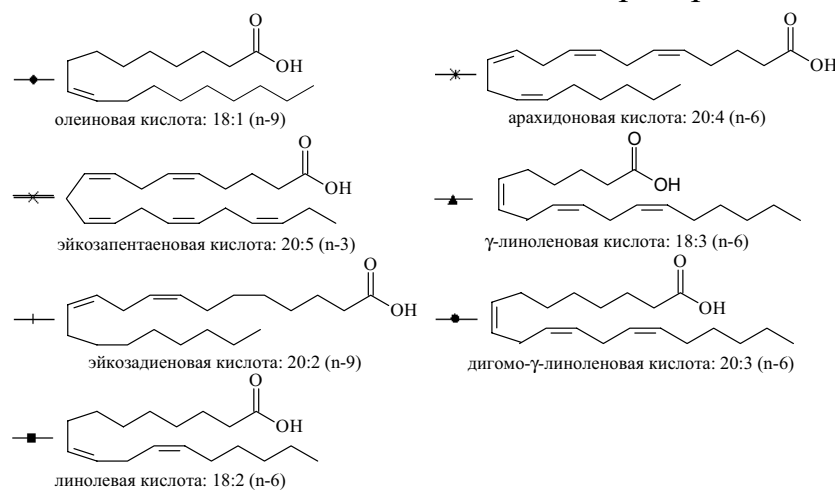


Рис. 4. Соотношение групп соединений в зависимости от начального значения pH среды

Следует отметить, что в интервале изменения $pH_{нач.}=3,0\div 4,0$ среди ЖК, синтезируемых данным штаммом, были обнаружены 2-гидроксигексадекановая и Z9 - гексадекамоноеновая кислоты, $pH_{нач.}=8,3\div 11,0$ - 2-гидроксигексадекановая кислота, а при $pH_{нач.}=3,0$ - E9-октадекамоноеновая кислота. В интервале $pH_{нач.}=3,0\div 6,0$ среди ЖК была обнаружена также Z9 - гексадекамоноеновая кислота. Наличие этих соединений в составе ЖК исследуемого гриба, вероятно, отражает адаптивную реакцию мембранных липидов к экстремальным условиям существования.



Рис. 5. Изменение состава ненасыщенных жирных кислот в зависимости от начального значения pH среды:



Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что увеличение доли ненасыщенных ЖК в основном происходит за счет накопления АК, причем максимальное количество последней приходится на интервал изменения $\text{pH}_{\text{нач.}} = 7,0 \div 8,0$ (рис. 5). Из насыщенных кислот в наибольших количествах накапливалась гексадекановая кислота (до 33% от суммы ЖК при $\text{pH}_{\text{нач.}} = 3,0$), содержание октадекановой кислоты плавно изменялось от 8,4% ($\text{pH}_{\text{нач.}} = 3,0$) до 15,8% от суммы ЖК ($\text{pH}_{\text{нач.}} = 11,0$).

3.2. Влияние температуры выращивания на выход жирных кислот и биомассы *Mortierella alpina* 18-1

В результате исследования влияния температуры на рост и синтез ПНЖК грибом *Mortierella alpina* 18-1 было установлено, что с ростом температуры в интервале $7 \div 30$ °C увеличивается выход биомассы (рис. 6). Эта зависимость имеет экстремальный характер с максимумом при $20 \div 30$ °C. В этом же интервале наблюдается максимальный выход ПНЖК, хотя в целом селективность их образования среди суммы ЖК возрастает с понижением температуры.

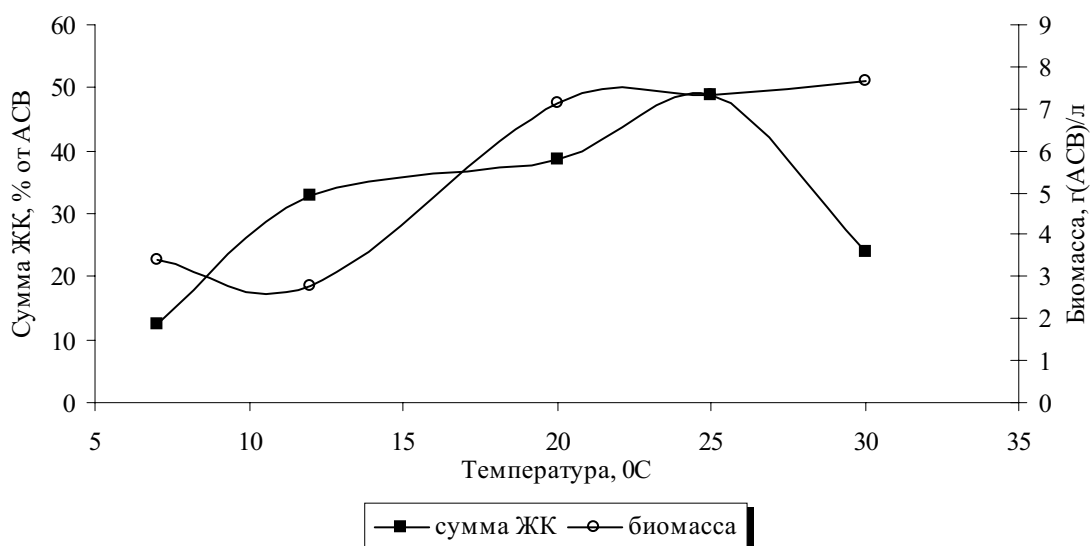


Рис. 6. Выход биомассы и суммы жирных кислот в зависимости от температуры выращивания

Жирно-кислотный состав значительно зависит от температуры выращивания (рис. 7). Так, с повышением температуры культивирования увеличивается селективность образования насыщенных ЖК, тогда как при ее понижении возрастает селективность образования ненасыщенных ЖК. Подобные изменения жирно-кислотного состава являются одним из способов регуляции текучести липидного бислоя и обычно осуществляются, в зависимости от микроорганизма, различными десатуразами. Следует отметить, что при пониженной температуре выращивания (7°C) среди жирных кислот данного микроорганизма были обнаружены ЖК изоостроения (C_{12} , C_{14} и C_{16}), 2-гидроксигексадекановая кислота, Z9 - гексадекамоноеновая кислота и некоторые другие короткоцепочечные ненасыщенные соединения, точную структуру которых пока не удалось установить.

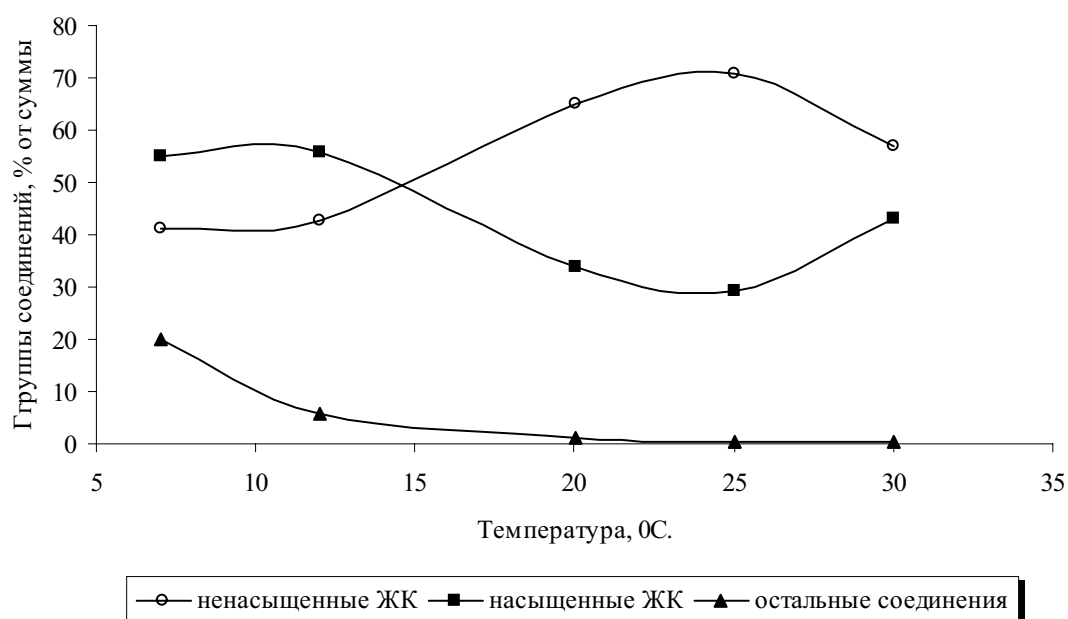


Рис. 7. Соотношение групп соединений в зависимости от температуры выращивания

Причем текучесть липидного бислоя *Mortierella alpina* 18-1 при низких температурах в основном регулируется путем уменьшения длины ЖК, а также увеличением степени ненасыщенности длинноцепочечных ЖК (рис. 8). При повышении температуры выращивания с 25 до 30 °С среди ЖК, синтезируемых данным грибом, уменьшается доля ненасыщенных ЖК (в основном за счет АК), при этом увеличивается доля ее предшественника, дигомо-γ-линоленовой кислоты, с 4,9 (25 °С) до 6,1 % от суммы ЖК (30 °С). Одновременно с этим возрастает содержание насыщенных длинноцепочечных ЖК (% от суммы ЖК) - эйкозановой (от 1,2 до 1,5), докозановой (от 3,0 до 4,3) и тетраэйкозановой (от 5,3 до 9,3).

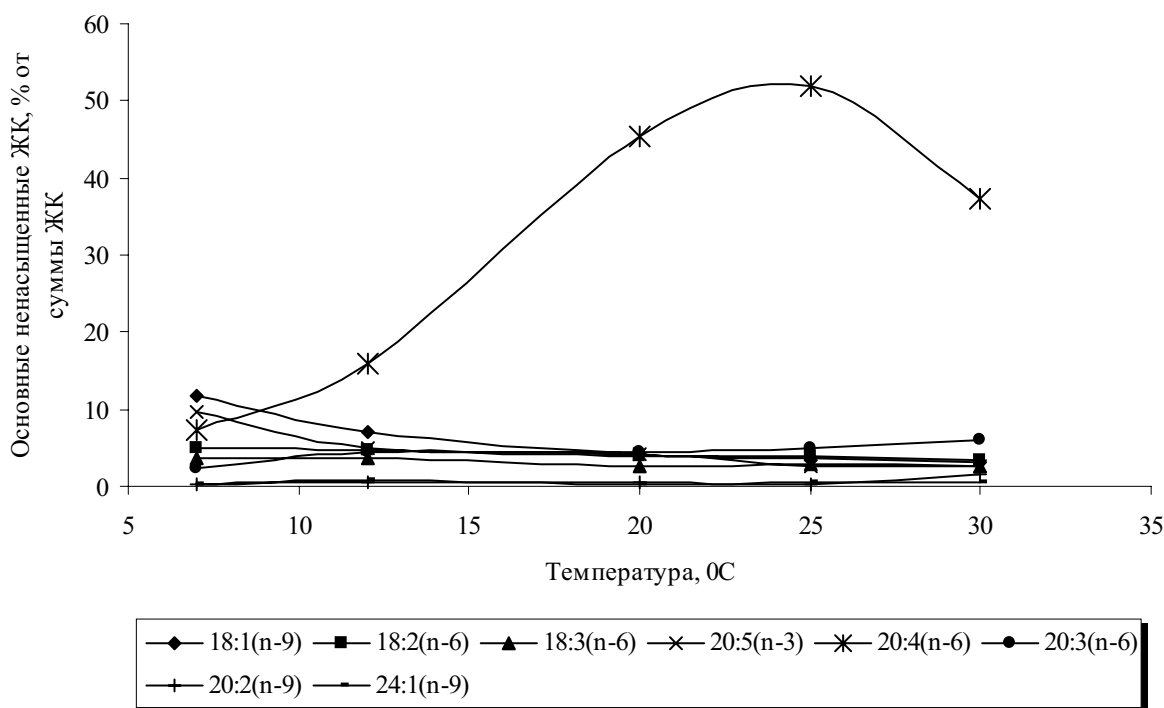


Рис. 8. Изменение состава ненасыщенных жирных кислот в зависимости от температуры выращивания

Наибольший выход АК обеспечивается при выращивании гриба *Mortierella alpina* 18-1 в интервале изменения температуры выращивания 20÷25 °С.

3.3. Влияние времени культивирования на выход биомассы и жирных кислот *Mortierella alpina* 18-1

Из полученных данных по динамике накопления биомассы и липидов во времени (рис. 9) видно, что кривая накопления биомассы имеет типичный для периодической культуры характер. Наибольшее количество ЖК исследуемая культура *Mortierella alpina* 18-1 накапливает в фазе линейного роста. В дальнейшем, во время фазы стационарного роста, суммарное содержание ЖК практически не изменяется и начинает плавно снижаться на восьмые сутки до ~42% от АСВ.

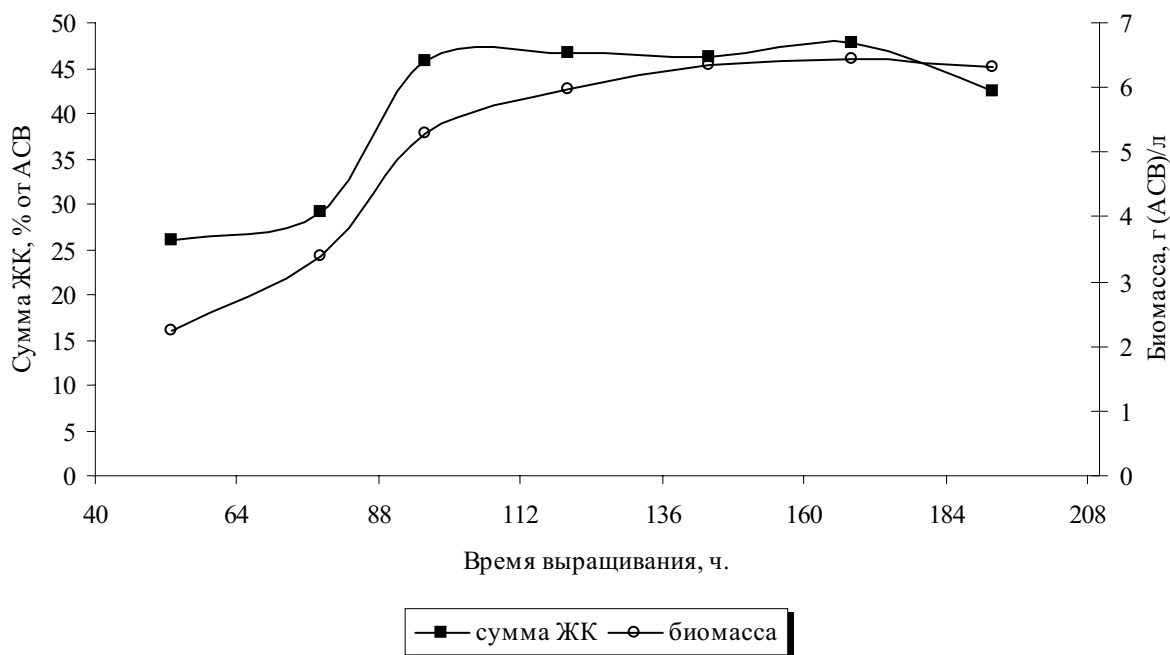


Рис. 9. Динамика накопления биомассы и ЖК *Mortierella alpina* 18-1 во времени

Следует отметить, что возрастание общего уровня суммарных ЖК происходит за счет накопления ненасыщенных ЖК и уменьшения доли насыщенных (рис. 10).

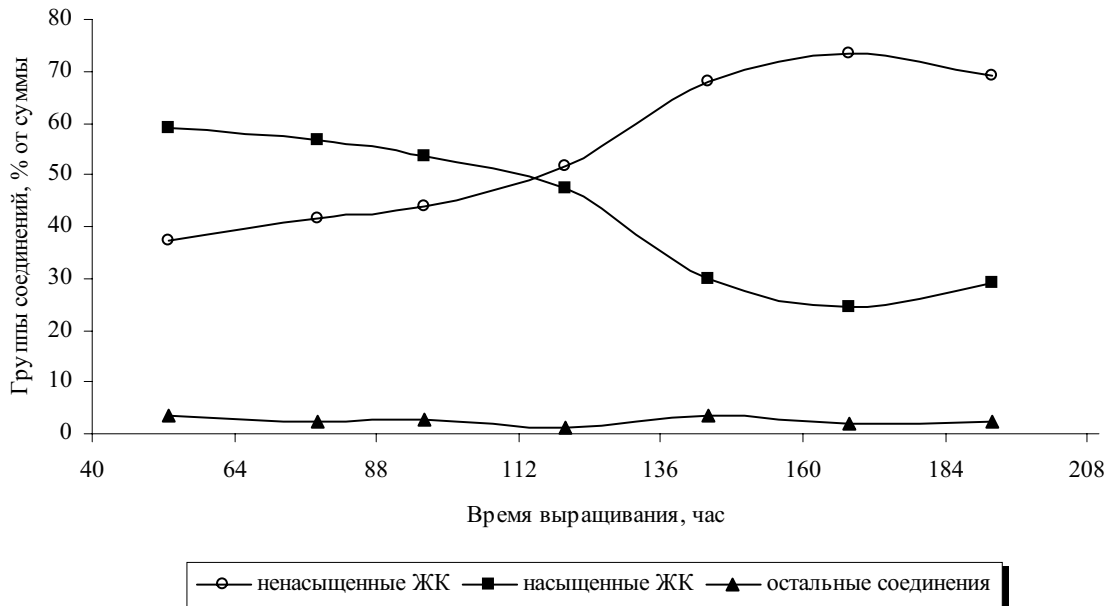


Рис. 10. Динамика изменения групп соединений *Mortierella alpina* 18-1 во времени

Важно отметить, что увеличение уровня суммарных ЖК в процессе роста гриба в основном происходит за счет увеличения содержания в них АК (рис. 11).

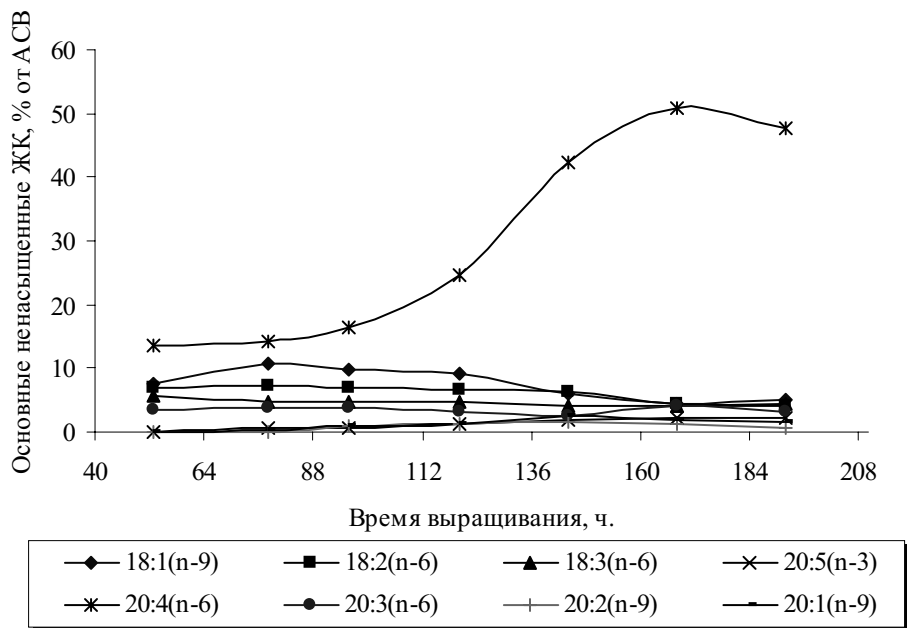


Рис. 11. Динамика накопления основных ненасыщенных ЖК *Mortierella alpina* 18-1 во времени

При этом содержание АК превышает содержание каждой отдельной ненасыщенной ЖК и на седьмые сутки роста преобладает среди ненасыщенных ЖК *Mortierella alpina* 18-1, причем максимум ее накопления приходится на максимум накопления суммы ЖК (рис. 9, 11).

3.4. Влияние отношения площади к объему среды на выход биомассы и ЖК *Mortierella alpina* 18-1

Установлено, что с увеличением отношения площади поверхности к объему питательной среды происходит интенсификация процесса накопления биомассы и содержания в ней ЖК (рис. 12), что может быть объяснено относительным увеличением скорости массообменных процессов.

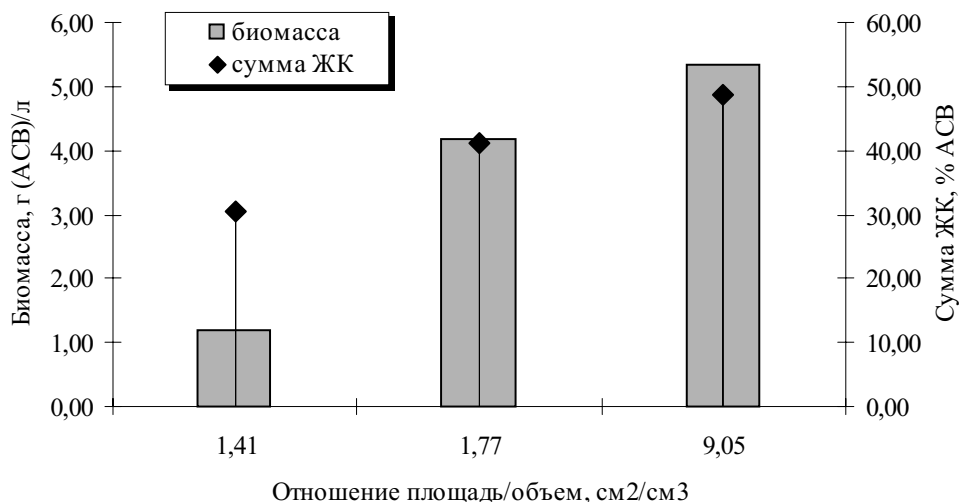


Рис. 12. Влияние отношения площади поверхности к объему питательной среды на рост и накопление ЖК *Mortierella alpina* 18-1

Полученные результаты показывают, что изменение жирно-кислотного состава в зависимости от отношения площади поверхности к объему питательной среды незначительно, и содержание основных ненасыщенных ЖК также практически не изменяется (рис. 13).

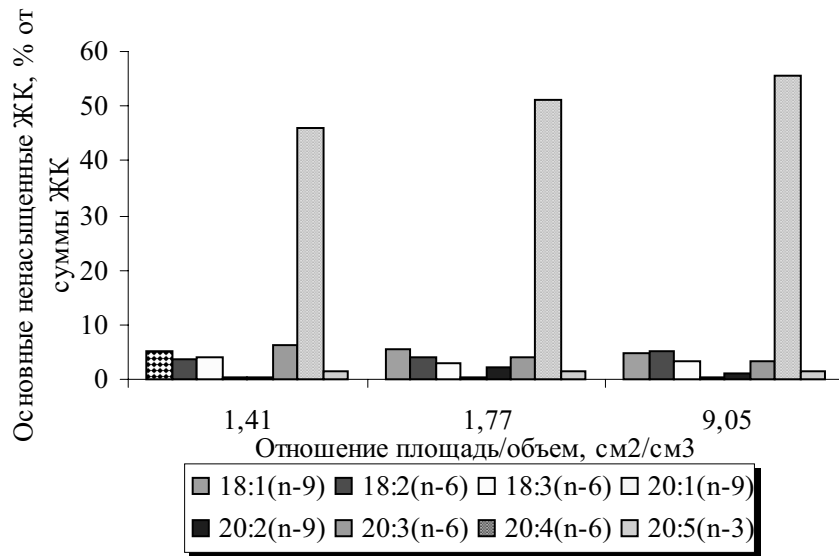


Рис. 13. Изменение жирно-кислотного состава *Mortierella alpina* 18-1 в зависимости от отношения площади поверхности к объему питательной среды

3.5. Влияние количества инокулята и его вида на рост продуцента и синтез жирных кислот

При исследовании влияния количества и вида инокулята на рост продуцента и синтез ЖК было установлено, что наибольшее количество биомассы образуется в случае использования в качестве инокулята суспензии спор и фрагментов мицелия, полученного смывом стерильной водопроводной водой со скошенной в пробирках среды Чапека (рис. 14) в количестве 2,5 % от объема питательной среды.

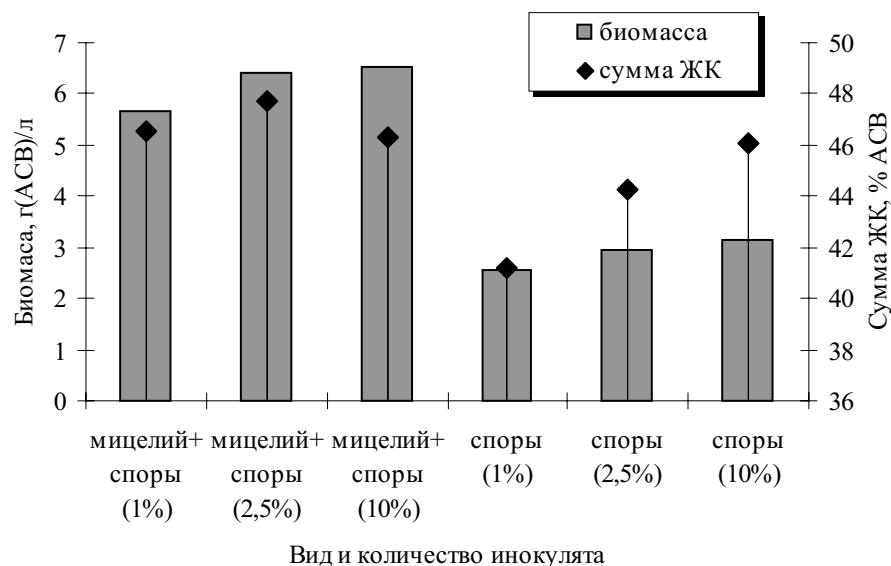


Рис. 14. Влияние вида и количества инокулята на рост и образование ЖК *Mortierella alpina* 18-1

Относительно большее накопление как биомассы, так и ЖК в этом случае может объясняться сокращением продолжительности лаг-фазы роста гриба.

3.6. Поиск стимуляторов роста продуцента и синтеза арахидоновой кислоты

Известно, что такие соединения как кинетин, индолилуксусная кислота (ИУК), эргостерин, оказывают стимулирующее действие на рост и развитие растений и микроорганизмов. В результате проведенных исследований было обнаружено, что в случае использования кинетина и эргостерина увеличивается выход суммарных ЖК, по сравнению с контрольным опытом, и составляет соответственно 103,7 и 134,4 % (рис. 15). Полученные результаты показывают, что в случае использования ИУК выход биомассы повышается (127,9 % от контроля), а выход суммарных ЖК снижается и составляет 76,7 % от контроля.

В случае внесения в питательную среду кинетина и эргостерина относительное изменение прироста биомассы соответственно составляет 108,6 и 91,4% от контроля.

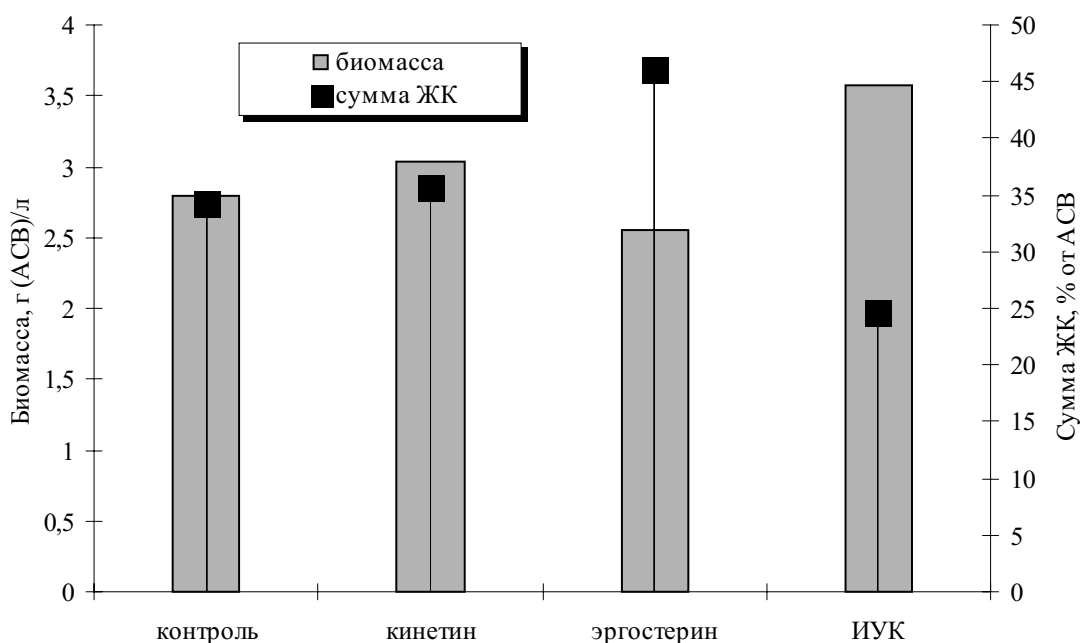


Рис. 15. Выход биомассы и суммы ЖК при культивировании *Mortierella alpina* 18-1 на средах с различными стимуляторами

При исследовании способа интенсификации синтеза суммы ПНЖК, в том числе АК, у гриба *Mortierella alpina* 18-1 установлено, что в случае применения всех указанных стимуляторов увеличивается абсолютное содержание АК в расчете на единицу объема среды (рис. 15, 16). При этом абсолютное увеличение выхода АК достигает максимального значения в случае применения кинетина и составляет 158 % от контроля. Аналогичный показатель для эргостерина и ИУК составил соответственно 121,4 и 136,4 % от контроля.

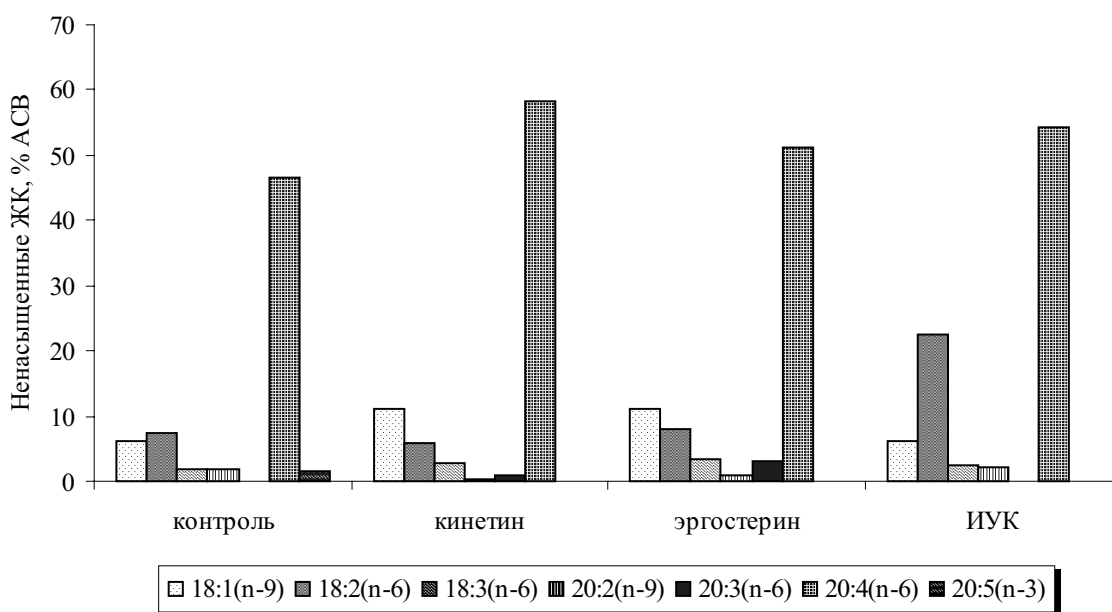


Рис. 16. Содержание основных ненасыщенных ЖК *Mortierella alpina* 18-1

Таким образом, применение указанных стимуляторов роста обеспечивает повышение уровня выхода АК в расчете на один литр питательной среды на 41% (кинетин), 35% (эргостерин) и 8% (ИУК). При этом селективность образования АК среди ЖК, синтезируемых данным микроорганизмом, увеличивается незначительно (рис. 16).

3.7. Интенсификация синтеза арахидоновой кислоты путем выращивания поверхностным способом на твердой среде

Как видно из предыдущих данных, оптимальными условиями выращивания гриба *Mortierella alpina* 18-1 поверхностным способом на глюкозо-картофельной среде являются: температура выращивания ~ 25 °С, время выращивания ~ 168 ч, начальная рН среды $\sim 6\div 7$, использование в качестве инокулята измельченного мицелия в количестве 2,5% от объема питательной среды. Однако при выращивании в этих условиях выход АК в расчете на единицу объема среды является недостаточно высоким ($\sim 1\div 1,5$ г (АК)/л). Причиной этого может служить целый ряд факторов: недостаточно большое отношение поверхности среды к ее объему (лимит по кислороду), недостаточное количество субстрата (лимит по субстрату) и, в ряде случаев, использование в качестве инокулята суспензии спор. Для устранения этих негативных факторов, культивирование осуществляли на среде, содержащей 600 г картофеля на 1 кг среды и 6% глюкозы (высота субстрата 2 мм). При этом найденный штамм в течение 19 суток накапливал 22,4 г/кг ЖК. Исследование жирно-кислотного состава показало, что среди ЖК, синтезируемых штаммом, в этих условиях преобладает АК ($\sim 48\%$) (рис. 17). Следует отметить, что из насыщенных ЖК в наибольшем количестве накапливалась стеариновая кислота (~ 19 % от суммы ЖК). Среди ЖК также были обнаружены некоторые гидрокси- производные C_{14} - C_{16} ЖК.

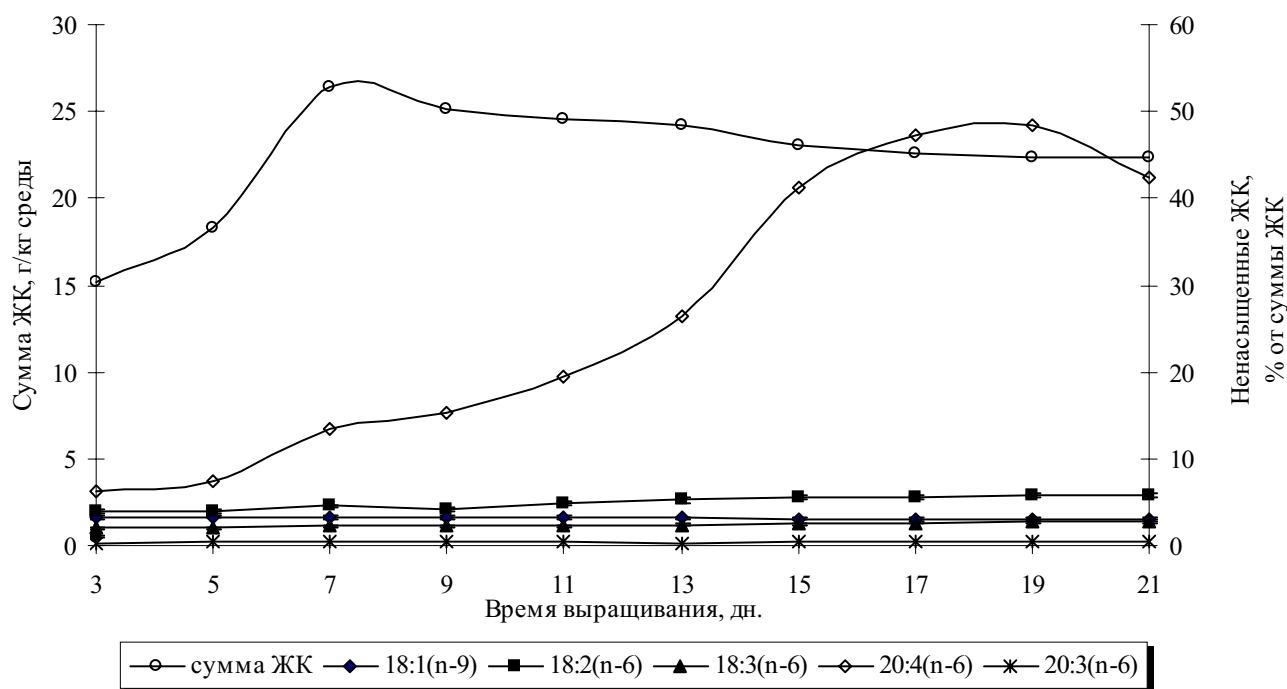


Рис. 17. Динамика накопления суммы ЖК и основных ненасыщенных ЖК грибом *Mortierella alpina* 18-1 при поверхностном культивировании

Выход АК при использовании поверхностного способа культивирования составил 10,8 г/кг питательной среды.

4. Получение производных арахидоновой кислоты

ПНЖК могут применяться как свободные ЖК, а также в виде этиловых эфиров или как моно-, ди- и триацилглицериды. Свободные ЖК более предпочтительны для лечения сердечно-сосудистых заболеваний, а сложные этиловые эфиры используются для предотвращения рака печени, многоцелевых стимуляторов защитных реакций, роста и развития растений. Так, например, установлено, что триацилглицериды - наиболее приемлемая форма арахидоновой и докозогексановой кислот для использования в питании грудных детей, поскольку обе кислоты входят в состав материнского молока именно в виде триацилглицеридов.

4.1. Получение метилового эфира арахидоновой кислоты

Получение метилового эфира АК проводили согласно известной методике метилирования ЖК с использованием ацетилхлорида и метанола, в результате чего была получена сложная смесь метиловых эфиров ЖК. Полученные метиловые эфиры ЖК были подвергнуты фракционированию с помощью мочевины для получения концентрата АК.

Полученные результаты показывают, что фракционирование метиловых эфиров ЖК *Mortierella alpina* 18-1 позволяет получать концентрат АК с ее содержанием до ~73% от суммы ЖК (табл. 2).

Таблица 2

Состав концентратов метиловых эфиров ЖК, полученных при соотношении мочевины/ЖК 4:1 из экстракта ЖК гриба *Mortierella alpina* 18-1, растворитель - метанол

ЖК	ЖК, % от суммы ЖК	
	до обработки	после обработки
14:0	4,25	0,23
15:0	0,31	0
16:0	15,56	0,28
17:0	0,21	0
18:0	5,48	0,56
20:0	0,64	0
18:1(n-9)	4,32	0,12
18:2(n-6)	4,42	2,21
18:3(n-6)	4,12	10,52
20:5(n-3)	2,15	6,75
20:4(n-6)	50,81	72,94
20:3(n-6)	4,25	6,22
20:2(n-9)	1,37	0,21
20:1(n-9)	1,99	0
∑ насыщенных	26,45	1,07
∑ мононенасыщенных	6,31	0,12
∑ АК, ЭПК, ДГЛК	57,21	85,91

Полученный концентрат АК можно использовать в технических целях, например, для создания на его основе стимуляторов роста растений. Однако для получения высокочистой АК, используемой в пищевых целях, необходима дополнительная очистка, например, с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии.

4.2. Получение сложных эфиров глицерина и арахидоновой кислоты

Разработку метода получения эфира АК и глицерина проводили в два этапа: на первом этапе был проведен скрининг микроорганизмов, обладающих ферментативной активностью по отношению к метиловому эфиру АК, на втором этапе был осуществлен подбор растворителя для проведения синтеза сложного эфира АК и глицерина.

4.2.1. Скрининг микроорганизмов, обладающих ферментативной активностью к метиловому эфиру арахидоновой кислоты

Объектами исследования являлись микроорганизмы из коллекции кафедры биохимии и технологии микробиологических производств УГНТУ, проявляющие высокую липолитическую активность при гидролизе оливкового масла, а также штаммы, обладающие высокой активностью (в органическом растворителе – гексане) при этерификации пентанола-2 олеиновой, гексановой и декановой кислотами (табл. 3).

В результате скрининга микроорганизмов, синтезирующих ферменты которые проявляют субстратную специфичность к метиловому эфиру АК, были найдены штаммы (*Bacillus sp.* 77-1, *Pseudomonas sp.* 77-33 и *Pseudomonas sp.* 77-47), катализирующие алкоголиз указанного эфира н-бутанолом. Было установлено, что процесс преэтерификации наиболее активно осуществляет штамм *Pseudomonas sp.* 77-33 при использовании в качестве растворителя трет-бутанола.

Таблица 3

Результаты скрининга микроорганизмов, проявляющих субстратную специфичность по отношению к метиловому эфиру АК в различных органических растворителях

Растворитель	Микроорганизм							
	77-25	77-34	77-64	<i>Bacillus sp.</i> 77-1	<i>Pseudomonas sp.</i> 77-33	<i>Pseudomonas sp.</i> 77-47	79-74	77-84
1,4-диоксан	-	-	-	-	-	-	-	-
метил-трет-бутиловый эфир	-	-	-	-	-	-	-	-
трет-бутанол	-	-	-	+	++	+	-	-
гексан	-	-	-	-	-	-	-	-
трет-бутанол+1,4-диоксан (v:v=1:1)	-	-	-	-	+	+	-	-
1,4-диоксан+гексан (v:v=1:1)	-	-	-	-	-	-	-	-

Примечание:

+ - отмечено незначительное накопление продуктов реакции;
++ - отмечено значительное накопление продуктов реакции.

Незначительное накопление продукта реакции в трет-бутаноле было отмечено для штаммов *Bacillus sp.* 77-1 и *Pseudomonas sp.* 77-47 и для штамма *Pseudomonas sp.* 77-33 в двухкомпонентной системе - трет-бутанол+1,4-диоксан (v:v=1:1) (табл. 3).

4.2.2. Синтез сложных эфиров глицерина и АК

Исследование трансформации метилового эфира АК и глицерина в трет-бутаноле с помощью ацетонового порошка штамма *Pseudomonas sp.* 77-33 показало, что данная биокаталитическая система катализирует преэтерификацию указанных соединений с образованием соответствующих глицеридов. На основании хроматомасспектрометрического анализа продуктов биотрансформации выявлено, что в ходе реакции в качестве основного продукта образуется моноэфир глицерина и АК с ацилированной вторичной гидроксильной группой (конверсия метилового эфира АК ~12%).

При использовании других растворителей и их смесей (1,4-диоксан, гексан, 1,4-диоксан+гексан (v:v=1:1) и трет-бутанол+1,4-диоксан (v:v=1:1)) ни один из выбранных штаммов не катализировал данную реакцию.

5. Гипотетическая схема биосинтеза полиненасыщенных жирных кислот грибом *Mortierella alpina* 18-1

На основании анализов хроматомасс спектров метиловых эфиров ЖК и литературных данных нами была предложена гипотетическая схема биосинтеза ПНЖК грибом *Mortierella alpina* 18-1 в условиях роста при пониженной и повышенной температуре (рис. 18).

Как видно из схемы (рис. 18), в синтезе АК кислоты участвует четыре десатуразы - Δ^9 , Δ^{12} , Δ^6 и Δ^5 (катализирующие реакцию образования двойной связи Z-конфигурации регио-специфично по отношению к карбоксильной группе ЖК), одна элонгаза (катализирующая присоединение C_2 -блока к карбоксильному концу ЖК), катализирующих последовательное превращение стеариновой кислоты через олеиновую, линолевую, γ -линоленовую и дигомо- γ -линоленовую кислоты в АК.

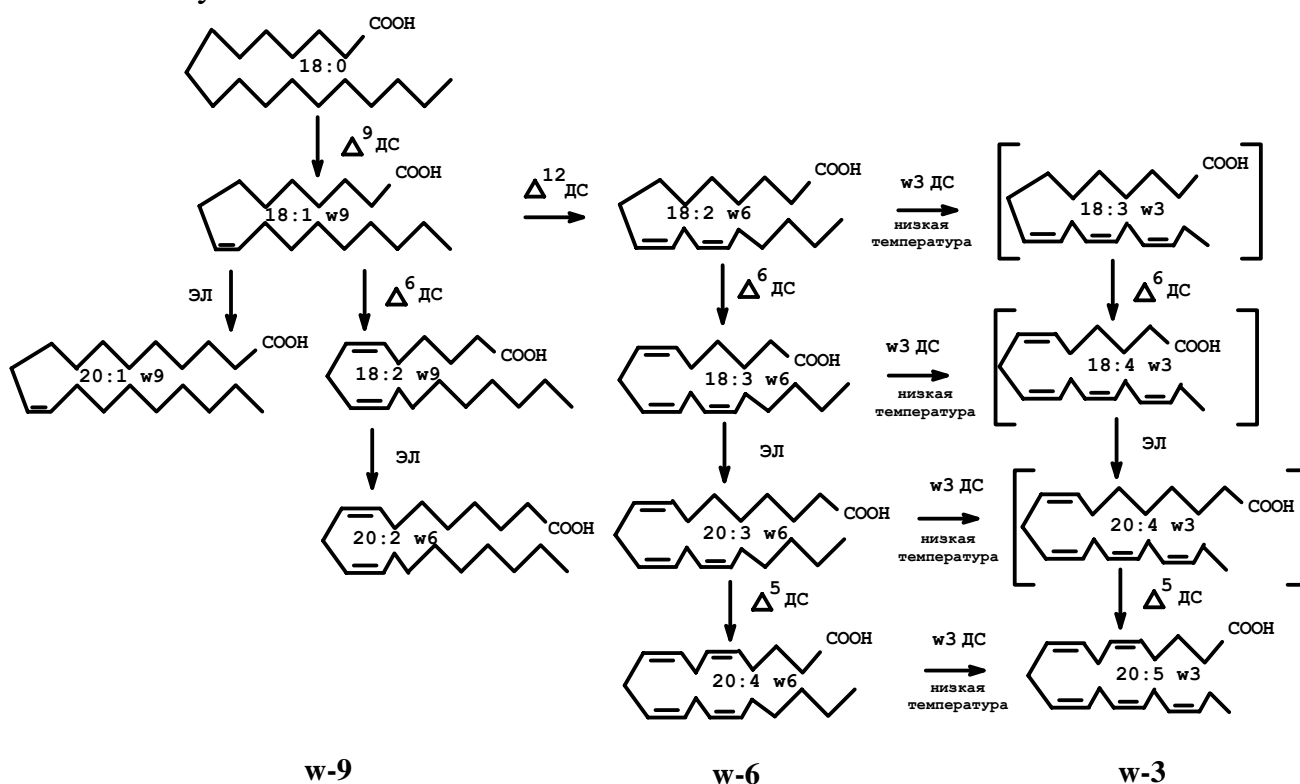


Рис. 18. Гипотетическая схема биосинтеза ПНЖК грибом *Mortierella alpina* 18-1:

Δ^x ДС - Δ^x десатураза (регио-специфична относительно карбоксильной группы), w_x – w_x – десатураза (регио-специфична относительно концевой метильной группы), ЭЛ – элонгаза.

Увеличение содержания эйкозапентаеновой кислоты (20:5 n-3) в составе липидов исследуемого штамма при пониженной температуре свидетельствует об участии в этом процессе ω_3 – десатуразы, активность которой, как правило, возрастает в этих условиях. С учетом этого возможно, предполагать образование соединений, представленных в квадратных скобках, которые нами пока что не обнаружены.

6. Принципиальная схема получения арахионовидной кислоты

На рис. 19 изображена предложенная нами принципиальная схема получения АК из биомассы гриба *Mortierella alpina* 18-1, включающая в себя: выращивание культуры *Mortierella alpina* 18-1 поверхностным способом в течение 20 дней ($pH_{нач.}=6,5$; $t=20\div 25$ °С) и отделение биомассы от остатков питательной среды (1). При необходимости отделенная биомасса может храниться при -20 °С вплоть до ее дальнейшей обработки. Экстракция ЖК проводится путем прямого омыления влажной биомассы смесью КОН+этанол (96%) (1,6 г КОН в 77 мл этанола/ грамм биомассы) (2).

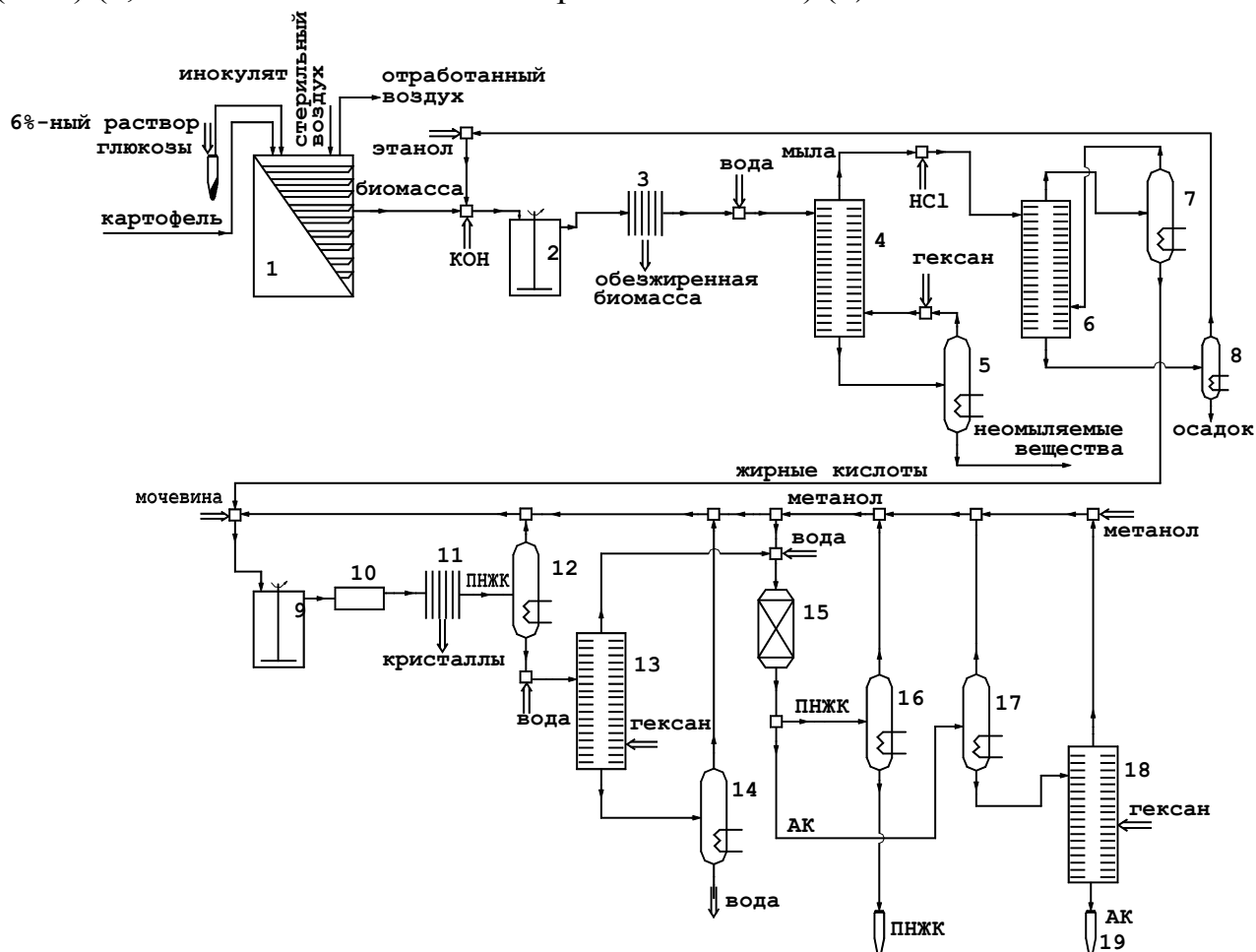


Рис. 19. Принципиальная схема получения АК с помощью *Mortierella alpina* 18-1:

1 – ферментер поверхностного культивирования; 2 - аппарат для омыления биомассы; 3,11- фильтр-пресс; 4,6,13,18 – экстрактор; 5,7,8,12,14,16,17 – вакуумный дистиллятор; 10 – кристаллизатор; 15 колонка ВЭЖХ

Далее осуществляется фильтрация смеси для отделения остатков биомассы с целью предотвращения образования эмульсии (3). Перед экстракцией неомыляемого остатка гексаном (4), для смещения равновесия в сторону гексана, в смесь добавляется вода. Гексан регенерируется выпариванием и многократно используется в процессе(5). Этанольный раствор мыл подкисляется HCl, и ЖК в свободном состоянии экстрагируются гексаном (6). Этанол реге-

нерируется и многократно используется. Раствор ЖК в гексане концентрируется путем испарения гексана под вакуумом (7). ЖК добавляются к горячему насыщенному раствору мочевины в метаноле (ЖК:мочевина 1:4), после чего происходит кристаллизация мочевины (9,10). Кристаллы отделяются на фильтре (11), а метанольный раствор ПНЖК упаривается под вакуумом (12). Метанол регенерируется и многократно используется в процессе (14), а ПНЖК экстрагируются гексаном (13). Смесь ПНЖК разделяется методом ВЭЖХ (элюэнт - подкисленный уксусной кислотой (1%) метанол: вода-80:20-w:w) (15). Фракции, содержащие АК (17) и остальные ПНЖК (16), упариваются под вакуумом. АК подвергается очистке от остатков элюэнта путем экстракции гексаном (18). Готовый продукт хранится в виде ампулированного гексанового раствора (19).

ВЫВОДЫ

1. В результате обширного скрининга микроорганизмов, способных синтезировать АК, выделен и охарактеризован штамм *Mortierella alpina* 18-1, являющийся эффективным продуцентом АК.
2. Осуществлена оптимизация основных параметров биосинтеза АК и найдены условия: температура, $pH_{нач.}$, продолжительность культивирования, позволяющие осуществить эффективный рост *Mortierella alpina* 18-1 при поверхностном культивировании на глюкозо-картофельной среде.
3. Показано, что биостимуляторы кинетин, индолилуксусная кислота и эргостерин позволяют увеличить выход АК в расчете на единицу объема питательной среды при поверхностном культивировании. При этом наибольший эффект оказывает кинетин.
4. Показано, что при выращивании на обогащенной источником углерода среде (картофель - 600 г/л, глюкоза – 6%) с отношением площади поверхности к объему питательной среды равной 12 обеспечивается максимальный выход АК на уровне 10,8 г/кг среды.
5. Идентифицированы промежуточные метаболиты (олеиновая, линолевая, γ -линоленовая и дигомо- γ -линоленовая кислоты) на пути превращения стеариновой кислоты в АК. Предложена гипотетическая схема биосинтеза основных полиненасыщенных жирных кислот у гриба *Mortierella alpina* 18-1.
6. Установлено влияние вида и количества инокулята на рост и синтез липидов штамма *Mortierella alpina* 18-1. Показано, что оптимальным видом инокулята является мицелий, вносимый в количестве 2,5% от объема питательной среды.
7. Показана возможность получения практически важного сложного эфира АК и глицерина с помощью липолитических микроорганизмов.
8. На основе проведенных исследований предложена принципиальная технологическая схема биосинтеза и выделения АК с использованием найденного штамма *Mortierella alpina* 18-1.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Давлетбаев И. М., Петухова Н. И., Зорин В. В. Скрининг микроскопических грибов – потенциальных продуцентов арахидоновой кислоты //Сервис большого города: Тез. докл. Междунар. науч.-практ. конф., посвященной 425-летию г. Уфы.: - Уфа: Изд-во УГНТУ, 1999. – С. 324.
2. Давлетбаев И. М., Петухова Н. И., Зорин В.В. Скрининг грибов – продуцентов арахидоновой кислоты //Биотехнология в ФЦП “Интеграция”: Тез. докл. заочной науч.-практ.. конф.: – СПб: Изд-во СПбГТИ(ТУ), 1999. – С. 144.
3. Давлетбаев И.М., Петухова Н.И., Зорин В.В. Скрининг низших грибов - потенциальных продуцентов незаменимых полиненасыщенных жирных кислот //Башкирский химический журнал – 2000. - Т.7.- №5.- С. 40-42.
4. Давлетбаев И. М., Ханова М. Д., Петухова Н. И. и др. Микробиологическое получение арахидоновой кислоты – экологически чистого стимулятора роста сельскохозяйственных растений //Химия и технология применения регуляторов роста растений: Материалы конф. - Уфа: Изд-во БашГУ, 2001. – С. 144.
5. Давлетбаев И. М., Ханова М. Д., Петухова Н. И. и др. Получение метилового эфира арахидоновой кислоты - экологически чистого биостимулятора роста сельскохозяйственных растений //Химическая экология: Материалы школы-семинара - Уфа: Изд-во БашГУ, 2001.- С. 198.
6. Давлетбаев И. М., Петухова Н. И., Зорин В. В. Скрининг микроорганизмов - потенциальных продуцентов арахидоновой кислоты //И. П. Павлов и современные проблемы биологии и медицины: Тез. докл. и сообщений. Секция Биотехнология, микробиология, экология, органический синтез и медицина. - Уфа: Изд-во УГНТУ, 1999. – С. 72.
7. Давлетбаев И. М., Петухова Н. И., Зорин В.В. Скрининг микроорганизмов для модификации полиненасыщенных жирных кислот антиоксидантами //Катализ в биотехнологии, химии и химических технологиях: Материалы Всероссийской заочной конф. – Тверь: ТГТУ, 2002. Вып. 4 – С. 108.
8. Давлетбаев И. М., Чебаева Т. В., Петухова Н. И. И др. Биотрансформация олеиновой кислоты микроскопическими грибами в органической фазе //Химические реактивы, реагенты и процессы малотоннажной химии: Тезисы докладов XIII Междунар. науч-техн.. конф. – Тула: Изд-во Тульского государственного педагогического университета им. Л. Н. Толстого, 2000. – С. 306.
9. Давлетбаев И. М., Кизилбаева Р. Х., Петухова Н. И. И др. Влияние источника углерода на биосинтез арахидоновой кислоты у низшего фикомицета *Mortierella* sp. 18-1 //Химические реактивы, реагенты и процессы малотоннажной химии: Тез. докл. XIV Междунар. науч-техн.. конф. – Уфа: Изд-во “Реактив”, 2001. – С. 309.
10. Давлетбаев И. М., Кизилбаева Р. Х., Зорин В. В. и др. Влияние кислотности среды на биосинтез арахидоновой кислоты грибом *Mortierella* sp. 18-1 //Студент и научно-технический прогресс: Тез. докл. XXXIX Междунар. науч. студенческой конф.: - Новосибирск: Новосибирский ГУ, 2001. – С. 203.
11. Давлетбаев И. М., Петухова Н. И., Зорин В.В. Использование микроскопических грибов для получения арахидоновой кислоты //Актуальные тенден-

ции в органическом синтезе на пороге новой эры: Тез. докл. 2 Междунар. конф. молодых ученых - СПб: С.-Петербургский ГУ, 1999. – С. 324.

12. Чебаева Т. В., Давлетбаев И. М., Петухова Н. И. И др. Метод скрининга низших почвенных грибов – продуцентов арахидоновой кислоты //Тез. докл. 51 науч.-техн. конф. студентов, аспирантов и молодых ученых. - Уфа: Изд-во УГНТУ, 2002. – С. 243.

13. Кизилбаева Р. Х., Давлетбаев И. М., Петухова Н. И. И др. Влияние условий культивирования на биосинтез арахидоновой кислоты грибом *Mortierella* sp. 18-1 // Тез. докл. 51 науч.-техн. конф. студентов, аспирантов и молодых ученых. - Уфа: Изд-во УГНТУ, 2002. – С. 223.