

УДК 577.123.2

И.В. Волкова, аспирант;
Т.В. Трухачева, нач.лаб.;
Т.М. Ермоленко, инженер;
Н.В. Гриц, доцент

О ПЕРСПЕКТИВАХ СОЗДАНИЯ ПРОМЫШЛЕННОЙ ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ РИБОНУКЛЕОЗИДОВ ПУТЕМ ГИДРОЛИЗА РНК

The analysis of literary facts about the creation of industrial technology of individual ribonucleosides preparation by hydrolysis of RNA is given. The use of immobilized ferments or cells of microorganisms as hydrolyzing agents is the most perspective method of enzymic hydrolysis of RNA.

Индивидуальные нуклеозиды являются исходным сырьем для синтеза ценных лекарственных препаратов. Это препараты сердечно-сосудистого действия, противовирусные, противоопухолевые, противомикробные средства, иммуностимуляторы, антидепрессанты, противоболевые агенты [1]. В странах с развитой биотехнологией и фармацевтической промышленностью налажен выпуск большинства препаратов нуклеозидной природы, и они широко применяются в клинической практике.

Нуклеозиды можно получать разными путями: экстракцией нуклеиновых компонентов из мышц животных; химическим синтезом; микробиологическим синтезом; гидролизом РНК.

Экстракцией из сырья животного происхождения (из мышц молодняка крупного рогатого скота) получают аденозин и его фосфорные эфиры [2]. Этот способ достаточно трудоемкий, многостадийный, малоэффективный; кроме того, в качестве сырья при этом используются пищевые продукты.

Химический синтез достаточно сложен и чаще используется для получения менее доступных нуклеозидов из более доступных. Так, разработана технология получения аденозина путем химического аминирования инозина (рибоксина) [3].

Перспективным представляется получение нуклеозидов путем направленного микробного синтеза. Однако реализация такой технологии связана с необходимостью проведения ферментации в условиях строгой стерильности, использования многокомпонентных питательных сред с комплексом биологически активных составляющих. Процесс синтеза требует существенных энергозатрат. Кроме того, невозможно одновременное получение четырех индивидуальных рибонуклеозидов. Путем направленного синтеза получают аденозин, уридин [4], цитидин [5], гуанозин [6].

Наиболее удобным и доступным методом промышленного получения индивидуальных рибонуклеозидов является гидролиз РНК, в результате чего могут быть получены одновременно четыре нуклеозида. Разработаны различные химические и ферментативные методы гидролиза. В качестве химических агентов для гидролиза РНК используют ацетат аммония, формиат аммония, тетраацетат свинца, окиси кальция и магния.

Химический гидролиз проводят в достаточно жестких условиях (при повышенных температуре и давлении), что вызывает дезаминирование нуклеозидов, образование значительных количеств окрашенных примесей, которые в дальнейшем затрудняют выделение нуклеозидов из гидролизата.

В Республике Беларусь с нашим участием разработана и реализована в промышленных условиях схема выделения всех четырех рибонуклеозидов из гидролизата РНК, полученного химическим гидролизом с окисью кальция [7]. Схема приведена на рис.

По данной схеме гуанозин выделяется путем кристаллизации из осветленного путем фильтрования охлажденного гидролизата. Цитидин, аденозин и уридин разделяются методом ионообменной хроматографии на мелкодисперсном анионите. При этом цитидин и аденозин элюируются дистиллированной водой в виде слабоокрашенных элюатов и затем кристаллизуются с достаточно высоким выходом. Элюирование уридина осуществляется раствором уксусной кислоты, который элюирует также соединения, придающие окраску. В результате уридинсодержащая фракция содержит примеси, и кристаллизация уридина без дополнительной очистки затруднена.

Ряд преимуществ по сравнению с химическим имеет ферментативный гидролиз. Он позволяет получать нуклеозиды с гораздо более высоким выходом. Ферментативный гидролиз отличается высокой специфичностью и мягкими условиями проведения (температура 30-50°C; давление атмосферное). В результате этого получают более чистые, с меньшим количеством окрашенных веществ гидролизаты. Выделение из них нуклеозидов, в частности, по схеме, разработанной для химического гидролизата, приведенной на рис., не вызывает осложнений.

В общем случае схема получения индивидуальных рибонуклеозидов путем гидролиза РНК включает следующие основные стадии: гидролиз РНК; остановка гидролиза и осветление гидролизата; кристаллизация и выделение гуанозина; выделение нуклеозидов из раствора с последующей их кристаллизацией.



Рис. Принципиальная схема выделения индивидуальных рибонуклеозидов

Для создания высокоэффективной технологии получения индивидуальных рибонуклеозидов важен выбор экономичного метода ферментативного гидролиза РНК.

Гидролиз РНК до нуклеозидов осуществляется под действием двух групп ферментов: нуклеаз и фосфатаз. Такие препараты выделяют из ядов змей [8], а чаще получают путем микробного синтеза. В качестве продуцентов этих ферментов используются различные штаммы бактерий [9-10] и грибов [11-12]. В литературе описаны физиологические особенности и условия культивирования различных штаммов-продуцентов РНК-гидролизующих ферментов, методы выделения нуклеаз и фосфатаз.

Для проведения гидролиза РНК используют очищенные ферментные препараты [13], интактные клетки микроорганизмов [14] и культуральные жидкости, содержащие РНК-гидролизующие ферменты [15].

При использовании растворимых ферментов [13] метод очень эффективен, однако для промышленного получения индивидуальных нуклеозидов не используется вследствие дороговизны и проблем последующего разделения нуклеозидов. Аналогичные недостатки также имеют способы гидролиза РНК с использованием культуральной жидкости, содержащей нуклеазы и фосфатазы [15].

При использовании интактных клеток микроорганизмов удается получать более чистые гидролизаты нуклеиновых кислот, поскольку биомасса удаляется из реакционной среды после окончания процесса гидролиза [14]. Однако получение биомассы, содержащей набор необходимых ферментов, направленным микробиологическим синтезом - процесс весьма энергоемкий и трудноконтролируемый.

Наиболее перспективным среди методов ферментативного гидролиза РНК представляется использование в качестве гидролизующего агента ферментов или клеток микроорганизмов, иммобилизованных на твердых носителях [16]. При этом возможно многократное использование биоагента в непрерывном режиме при высокой скорости потока, создание высокой регулируемой концентрации биоагента в реакторе, использование более концентрированных растворов субстрата. В результате можно получать гидролизаты с более высокой концентрацией нуклеозидов, что упрощает процессы выделения конечных продуктов.

Таким образом, задача эффективного проведения процесса гидролиза РНК до нуклеозидов разрешима в связи с тем, что: 1) изучены физиологические особенности и условия культивирования различных штаммов микроорганизмов-продуцентов РНК-гидролизующих ферментов; 2) разработаны методы иммобилизации клеток и ферментов с сохранением активности.

Задача выделения нуклеозидов из гидролизата РНК может быть решена с использованием несложных приемов, разработанных для выделения нуклеозидов из гидролизата, полученного химическим методом.

Все это создает предпосылки для создания высокоэффективных технологических процессов получения индивидуальных нуклеозидов из РНК и их реализации в промышленном масштабе.

Таким образом, анализ имеющихся литературных данных позволяет сделать вывод о том, что к настоящему времени решены некоторые вопросы, важные для создания промышленной технологии получения нуклеозидов, найдены концептуальные и методические подходы к созданию эффективного во всех отношениях метода ферментативного гидролиза и его реализации в промышленном масштабе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Заявка 2688003 Франция, МКИ⁵ С 07 Н 19/04, А 61 К 31/70. Derives du nucleosides, leur preparation et leurs application biologiques.
2. А.с. 963263 СССР, МКИ С 07 Н 19/20, А 61 К 35/60. Способ получения аденозина и его фосфорных эфиров.
3. А.с. 915445 А СССР, МКИ С 07 Н 19/16. Способ получения аденозина.
4. А.с. 969034 А СССР, МКИ С 12 N 15/00, С 12 Р 19/38. Штамм *Penicillium balolum* ЛИА-Т-192 - продуцент нуклеозидов.
5. Asahi S., Tsunemi Y., Izawa M., Doi M. Cytidine production by mutants of *Bacillus subtilis* // *Biosci., Biotechnol. and Biochem.*- 1994.- Vol. 58, N 8.- P. 1399-1402.
6. Пат. 4452889 США, МКИ С 12 N 1/00. Method of producing inosine and/or guanosine.
7. Трухачева Т.В., Волкова И.В., Гриц Н.В. Исследование процесса выделения и очистки уридина при получении индивидуальных рибонуклеозидов путем гидролиза РНК // Материалы конференции "Разработка импортозамещающих технологий и материалов в химико-лесном комплексе". Минск, 27-28 октября 1997.- С. 264-267.
8. Комарова Н.И. и др. Выделение нуклеаз из яда среднеазиатской кобры *Naja naja oxiana* // *Биотехнология.* -1992.-№3. -С. 35-38.
9. А.с. 1661214 СССР, МКИ⁵ С 12 N 9/14, 9/22. Штамм бактерий *Serratia marcescens* - продуцент эндонуклеазы.
10. А.с. 1356462 СССР, МКИ⁶ С 12 N 9/14, С 12 R 1/465. Штамм *Streptomyces coelicolor* - продуцент ферментного комплекса 5'-эксонуклеазы и щелочной фосфатазы.
11. Иванова Г.С., Грунина Л.К. Выделение и некоторые свойства неспецифичной внеклеточной рибонуклеазы *Aspergillus clavatus* // *Прикладная биохимия и микробиология.*- 1975.- Т.11, №5.- С. 746-751.
12. Заика А.И., Тяглов Б.В. Выделение термофильных нуклеаз из гриба *Spiraea violacea* // *Биотехнология.*- 1996.- №1.- С. 23-27.
13. Заявка 47-27037 Япония, МКИ С 12 d 13/06. Способ получения нуклеозидов.
14. А.С. 1321065 А СССР, МКИ С 12 Р 19/40. Способ получения нуклеозидов.
15. А.С. 947186 СССР, МКИ С 12 Р 19/38, С 12 R 1/04. Способ получения нуклеозидов.
16. Манолов Р.Ж., Тавобиллов И.М., Лозинский В.И. и др. Изучение иммобилизованных клеток *Aspergillus clavatus*, продуцирующих рибонуклеазу // *Прикладная биохимия и микробиология.*- 1988.- Т.24, № 4.- С. 514-519.