

Т. С. Савинова¹, Н. Т. Диеп², Н. Е. Войшвилло³, В. А. Андрияшина³,
Н. В. Карпова³, И. П. Белецкая¹, Луу Д. Нуу²

ИЗВЛЕЧЕНИЕ СМЕСИ ФИТОСТЕРИНОВ ИЗ ОТХОДОВ ПЕРЕРАБОТКИ СОЕВЫХ БОБОВ И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЕЁ В ПРОИЗВОДСТВЕ 9 α -ГИДРОКСИАНДРОСТ-4-ЕН-3,17-ДИОНА

¹ Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия,
e-mail: tatiana.savinova@rambler.ru;

² Вьетнамская академия науки и технологии, Институт химии, Hoang Quoc Viet, Cau Giay, Ханой,
Вьетнам, e-mail: ldhuy@netman.vn;

³ Центр "Биоинженерия" РАН, Москва, Россия

9 α -Гидроксиандрост-4-ен-3,17-дион получен из смеси фитостеринов с применением микробиологических методов деградации боковой цепи стеринов до андростендиона и последующего его 9 α -гидроксилирования. Показано, что фитостерины могут быть извлечены из отстоя дистиллята дезодоризации соевого масла с низким содержанием стеринов (5,2 %) со степенью извлечения более 96 % и содержанием суммы стеринов не менее 90 %. Выход 9 α -гидроксиандрост-4-ен-3,17-диона из смеси фитостеринов составил 38 %.

Ключевые слова: фитостерины, соевое масло, отстой дезодоризации, *Mycobacterium*, андростендион, *Rhodococcus*, 9 α -гидроксилирование.

9 α -Гидроксиандрост-4-ен-3,17-дион (9-ОН-АД) — ключевой интермедиат в синтезе физиологически активных соединений не только прегнановой серии (гидрокортизона, преднизолон, дексаметазон, триамцинолон, б α -метилпреднизолон и др.), но и стероидных препаратов ряда андростана. 9-ОН-АД может быть использован, например, для производства 9 α -фтор-11 β ,17 β -дигидрокси-17-метиландрост-4-ен-3-она (флуоксиместерона) — андрогенного препарата, известного под торговыми названиями Halotestin (компания Upjohn, США) и Stenox (Atlantis Laboratories, Мексика).

9-ОН-АД может быть получен из природных стеринов методом одностадийной микробиологической трансформации [1–4]; одностадийным двухступенчатым микробиологическим процессом, состоящим в последовательном использовании стеринтрансформирующего штамма и 9 α -гидроксилирующей культуры без выделения промежуточно-образованного продукта деградации боковой цепи андростендиона (АД) из культуральной жидкости [5]; или двухстадийным биотехнологическим процессом, включающим стадию трансформации стеринов в АД и стадию 9 α -гидроксилирования выделенного АД с применением известных методов ([6–8] и [9–12] соответственно).

В настоящей работе мы сообщаем о синтезе 9-ОН-АД из смеси фитостеринов, извлечённых из отстоя дистиллята дезодоризации соевого масла низкого содержания (5,2 %), с применением двухстадийного биотехнологического процесса (схема).

Извлечение смеси фитостеринов

Источник фитостеринов в Юго-Восточной Азии практически не ограничен, стоимость соевого фитостерина невелика и определяется практически лишь затратами на его извлечение и очистку. Фитостерины не только используются как предшественники в производстве стероидных гормональных препаратов (гестагенов, андрогенов, эстрогенов, кортикоидов и др.), но и сами являются

важными биологически активными соединениями, проявляя гипохолестеринемическую активность [13] и противораковые свойства [14]. Они также используются в косметических средствах [15, 16] и пищевой промышленности [17]. Вьетнам, являющийся сельскохозяйственной страной, производит несколько сотен тысяч тонн сои в год. В настоящее время Вьетнам импортирует 80–85 % биоактивных соединений, необходимых для фармацевтической промышленности, включая стероидные лекарственные средства. Поэтому изучение возможности использования отходов производства соевого масла для создания во Вьетнаме сырьевой базы для промышленного синтеза стероидных соединений медицинского назначения является важной задачей.

Основным отходом производства соевого масла, содержащим экономически значимое количество фитостеринов, является погон дезодоризации (или дистиллят), получаемый на стадии очистки масла от примесей методом перегонки с водяным паром. Отстой дистиллята (ОД) (deodorizer sludge), который получают после отделения конденсата пара, представляет собой смесь, содержащую ценные побочные продукты: жирные кислоты, токоферолы, стерины, эфиры стеринов. Содержание стеринов в смеси может варьировать от 5 до 25 % [18] в зависимости от сорта масличной культуры и способа производства масла. Промышленные методы извлечения фитостеринов детально описаны в обзоре [19]. Одним из наиболее известных является метод омыления-подкисления [18].

Химическая модификация ОД омылением в присутствии алифатического спирта (как правило, метанола или этанола) с последующей стадией подкисления, на наш взгляд, является простой и привлекательной, так как позволяет не только высвободить жирные кислоты из ацилглицеридов, но и стерины из их эфиров. При этом фитостерины получают с высокой степенью чистоты (более 90 %) и с высоким выходом. Однако этот метод был применен авторами патента [18] для отходов, обогащённых смесью фитостеринов (содержание стеринов

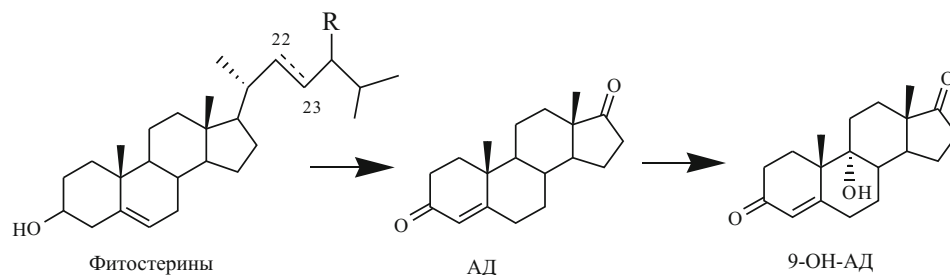


Схема синтеза 9-ОН-АД из фитостеринов: R=C₂H₅ — β-ситостерин; R=CH₃ — кампестерин; R=C₂H₅ и Δ²²⁽²³⁾ — стигмастерин.

19,2 %). Мы провели изучение применимости этого способа к ОД с низким содержанием стерина (5,2 %), производящегося во Вьетнаме, без использования в процессе омыления алифатических спиртов.

Использовали ОД компании по производству растительных масел “Vegetable Oils Stock Joint CAI LAN” (Quang Ninh, Viet Nam). Для извлечения стерина из ОД последний подвергали омылению в водной щелочной среде (гидроксид натрия или калия) при температуре кипения для расщепления эфиров жирных кислот. Полученную смесь, содержащую глицерин, обрабатывали серной кислотой, в результате образовались свободные жирные кислоты и глицеринсодержащая водная фаза, и стеринсодержащая масляная фаза. Дальнейшая обработка стеринсодержащей фазы путем растворения её в смеси метанол — ацетон — вода при нагревании, охлаждение полученного раствора приводило к селективной кристаллизации из него стерина. Анализ полученной смеси стерина проводили по [20, 21]. Для дальнейшей очистки технического продукта (90 %) его подвергали обработке щелочью в метаноле при температуре кипения с последующим разбавлением водой и кристаллизацией.

Содержание фитостеринов в продукте оценивали методом ИК-спектроскопии в сравнении со стандартным образцом β-ситостерина. ИК-спектр полученной смеси стерина содержал следующие характеристические полосы (см⁻¹): 3433 (ОН), 2936 (С-Н) и 1640 (С=С), 1374 (частоты колебаний концевых метильных групп боковой цепи молекулы стерина).

Состав смеси определяли с помощью метода ЖХ/МС. В спектре ЖХ/МС присутствовали 3 основных молекулярных пика (414, 412 и 400), соответствующие по молекулярному весу β-ситостерину, стигмастерину и кампестерину соответственно. Результаты анализа смеси стерина в очищенном продукте представлены в табл. 1. Состав ОД определен методом ИК-спектроскопии омыленного образца (табл. 2).

Таким образом, мы показали применимость известного метода [18] для извлечения смеси фитостеринов из ОД

с их низким содержанием — отхода производства соевого масла, производящегося во Вьетнаме. Показано, что, несмотря на низкое содержание стерина в исходной смеси (5,2 %), применение модификации этого способа позволяет проводить процесс со степенью извлечения более 96 % и содержанием суммы стерина не менее 90 %. Кондиционированный фитостерин, помимо сырья для АД, может быть использован как биологически активный ингредиент в производстве лекарств, косметических средств, а также в пищевой промышленности.

Микробиологическая трансформация смеси фитостеринов

Биотехнологическая деградация боковой цепи стерина с образованием 3,17-дикетоандростанов является полиферментным процессом, проводимым клетками бактерий в период роста. Поэтому эффективность этого процесса существенно зависит не только от компонентного состава смеси фитостеринов, но и, в большей степени, от присутствия в смеси жирных кислот, могущих оказывать положительное влияние на процесс роста [22], и наличия микроколичеств примесей, например, металлов, присутствующих в сыром масле и способных ингибировать ферментные реакции.

Поэтому мы провели сравнительное тестирование извлеченной смеси фитостеринов (до и после кондиционирования) в процессе её микробиологической трансформации в АД с тем, чтобы в дальнейшем использовать последний в процессе бактериального 9α-гидроксилирования. В качестве биокатализаторов микробиологической трансформации использовали культуры промышленных микроорганизмов из коллекции Центра “Биоинженерия” РАН (Россия). Деградацию боковой парафиновой цепи фитостеринов с образованием АД осуществляли с помощью микобактерии *Mycobacterium neoaurum* ВКПМ Ас-1634 в оптимальных условиях, описанных ранее [7], а последующее 9α-гидроксилирование проводили клетками актинобактерии *Rhodococcus erythropolis* ВКПМ АС-1740 [11].

В табл. 3 приведены сравнительные результаты трансформации 2 смесей фитостеринов, полученных до и после кондиционирования, которые показывают, что кондиционированная смесь фитостеринов не имеет преимуществ перед техническим продуктом. Установлено, что смесь фитостеринов, выделенная из ОД вьетнамского производства, без дополнительного кондиционирования трансформируется в АД с селективностью не менее 64 %, при этом степень извлечения продукта из культуральной жидкости составляет 98 %.

Таблица 1
Результаты анализа смеси стерина в очищенном продукте

Стерин	Молекулярная масса	Время удерживания, мин	Содержание, %
β-Ситостерин	414	39,257	39,50
Стигмастерин	412	36,145	29,56
Кампестерин	400	34,499	24,68
Суммарное содержание стерина			93,74

Состав исходного материала (ОД)

Таблица 2

Наименование компонента смеси	Масс. %
Ацилглицериды	≈ 25
Свободные жирные кислоты	≈ 21
Токоферолы	10
Стерины	5,2
Различные органические и неорганические вещества	9,8

Полученный АД использован на стадии микробиологического α -гидроксилирования. Трансформацию проводили в условиях, аналогичных описанным ранее [12].

Экспериментальная часть

ИК-спектры сняты на ИК-Фурье спектрометре “FTIR Impact-410” (“Nicolet Instrument Corporation”, США) в таблетках KBr. В качестве стандартного образца использован β -ситостерин 97 % чистоты компании Sigma, CAS 83-46-5. ЖХ/МС хроматография проведена на оборудовании Agilent (США) в следующих условиях: растворитель $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{CN}$, детектор МС-инжектор 6890n, температура накачки образца 250 °С, температура инжектора 28 °С, скорость потока гелия 1 мл/мин, объем образца 1 мкл, исходная температура 60 °С. ТСХ анализ проведен на пластине “Сорбфил ПТСХ UV-254” (Россия) с использованием систем: гексан — ацетон, 10:3, и гептан — этилацетат — изопропиловый спирт, 5:4:1. Проявление — 1 % раствором ванилина в 10 % водном растворе хлорной кислоты. ВЭЖХ анализ проведен на приборе Gilson (США) на колонке с “Silasorb” С 18 (4,0 × 250 мм), зернение 10 мкм, УФ-детектор при 254 нм, при комнатной температуре. Скорость потока 0,8 мл/мин, подвижная фаза MeOH-H₂O (7:3). Время выхода АД — 8,0 мин.

Извлечение смеси фитостеринов и ее кондиционирование

Кипятят 2,5 кг ОД в течение 1 ч с 132,5 кг воды и 0,46 кг 50 % водного раствора NaOH. После этого для расщепления полученного мыла в реакционную смесь добавляют 1,32 кг 25 % H₂SO₄, нагревают до температуры кипения и выдерживают до разделения реакционной смеси на масляный и водный слои. Затем добавляют 11,3 л горячей воды, водно-глицериновый слой отделяют в делительной воронке. Слой жирных кислот, содержащий фитостерин, промывают 8,0 л горячей воды, затем растворяют при кипении в смеси растворителей, состоящей из ацетона, метанола и воды (41:8:1 об.). Получен-

ный раствор охлаждают до 5 °С и выдерживают при этой же температуре в течение 15 ч. Осадок отфильтровывают, промывают той же смесью, предварительно охлажденной до 5 °С, сушат в вакууме при 60 – 80 °С. Получают 0,125 кг смеси фитостеринов содержания 90,3 % с выходом 96,15 %.

Для кондиционирования к суспензии 10 г смеси стеринов (содержания 0,3 %) в 100 мл метанола добавляют 2 г КОН. Суспензию перемешивают 15 мин при комнатной температуре, затем кипятят в течение 1 ч. После этого через холодильник медленно добавляют 34 мл воды (до концентрации метанола ≈ 70 %) и кипятят еще 10 мин. После медленного охлаждения массы до комнатной температуры выдерживают 1 ч без перемешивания. Осадок отфильтровывают, промывают на фильтре 70 % водным метанолом и водой до pH ≈ 7. Получают 9,45 г (выход 94,5 %) смеси стеринов (содержания 93,74 %), т. пл. 128 – 132 °С.

Получение андрост-4-ен-3,17-диона (АД)

Выращивание посевного материала для проведения трансформации фитостеринов осуществляют на среде, описанной ранее [22, 23]. Трансформацию проводят в конических колбах с отбойниками (объем 750 мл), содержащих 100 мл среды следующего состава (г/л): соевая мука — 15 (обезжиренная — 5,0; 18 % жирности — 10); глюкоза — 40; лимонная кислота — 2,2; мочевины — 0,5; (NH₄)₂HPO₄ — 1,5; MgSO₄ — 0,5; FeSO₄ — 0,05; CaCO₃ — 3,0, pH 7,0 – 7,2. Посевной материал в возрасте 4 сут вносят в количестве 10 – 20 об. % (1,2 – 3,0 · 10¹⁰ КОЕ/мл).

В качестве трансформируемого субстрата используют техническую смесь, содержащую 90,3 % фитостеринов, или очищенную смесь, содержащую 93,74 %. Фитостерин измельчают в шаровой мельнице до частиц размером не более 15 мкм в присутствии 0,3 – 0,5 % твина-80. Стероидный субстрат загружают в среду в количестве 11,07 или 10,67 г/л соответственно, что соответствует истинному содержанию стеринов в среде — 10 г/л. Концентрацию остаточных стеринов (г/л) определяют полуколичественным методом ТСХ [22], для этого пробу культуральной жидкости экстрагируют этилацетатом (1:5 об.). Количество АД (г/л) в пробах определяют с помощью ТСХ и ВЭЖХ, для чего ее разбавляют метанолом (1:4 об.). По окончании трансформации культуральную жидкость, содержащую АД и остаточный стерин, подкисляют 20 % H₂SO₄ до pH 2 – 3. Биомассу отделяют на центрифуге (4600 об/мин, 1 ч, 5 – 7 °С) и экстрагируют 60 % водным ацетоном. Экстракт обрабатывают активированным углем и упаривают до прекращения погона. Полу-

Таблица 3
Параметры процесса трансформации смесей фитостеринов, полученных до и после кондиционирования (1 и 2 соответственно), с нагрузкой 10 г/л в пересчете на содержание стеринов*

№	Содержание стеринов в исходном субстрате, %	Загружено в трансформацию, г/л	Содержание АД в культуральной жидкости на конец трансформации, г/л	Селективность образования АД, %	Выход технического АД, г/л	Содержание основного вещества, %	Степень извлечения основного вещества, %
1	90,3	11,07	4,5	64,4	5,63	78,34	98,0
2	93,74	10,67	4,44	63,6	6,33	73,0	98,3

* Оценка проведена с учетом молекулярного веса стерина, за который принимали среднее значение данных количественного анализа его состава.

ченную суспензию выдерживают при 0–5 °С в течение 2 ч, осадок отфильтровывают, промывают ледяной водой, сушат до постоянного веса. Технический АД (5,63 г 78,34 % содержания) обрабатывают активированным углем в растворе дихлорметана, кристаллизуют из гексана и диэтилового эфира. Выход на очистке 4,09 г (72,6 %) 97,8 % содержания, т. пл. 173–174,6 °С (лит. [24] т. пл. 170–171 °С).

Получение 9 α -гидроксиандрост-4-ен-3,17-диона.

Биомассу актинобактерии *Rhodococcus erythropolis* ВКПМ Ас-1740 со скошенного агара [(г/л): кукурузный экстракт — 10,0, глюкоза — 10,0, K₂HPO₄ — 1,0, рН 6,8–7,2] переносят в жидкую среду того же состава (без агара) и выращивают культуру в течение 70–72 ч на качалке при 29 °С и скорости перемешивания 220 об/мин. Полученный материал используют как инокулят для второй генерации на среде того же состава. Через 24 ч роста бактериальные клетки переносят в трансформационную среду [(г/л): дрожжевой экстракт — 15,0, глюкоза — 10,0, K₂HPO₄ — 1,0, рН 6,9–7,0], содержащую (4 г/л) АД, который вносят в среду в виде раствора в ДМФА. Трансформацию проводят в течение 18–24 ч. После полной конверсии АД в 9-ОН-АД культуральную жидкость экстрагируют этилацетатом. Экстракт обрабатывают активированным углем, упаривают в вакууме при 45–50 °С (в бане) до прекращения погона. К кристаллизующемуся остатку добавляют насыщенный раствор NaHCO₃ и перемешивают в течение 30 мин при комнатной температуре. Осадок отфильтровывают, промывают на фильтре насыщенным раствором NaHCO₃ и водой до рН \approx 7, сушат при 60 °С. Из 2,0 г загруженного на трансформацию АД получают 2,1 г технического 9-ОН-АД с содержанием 88,84 % (ВЭЖХ), который повторно обрабатывают углем в растворе дихлорметана. После кристаллизации из диэтилового эфира получают 1,75 г 9-ОН-АД 98 % содержания. Выход 9-ОН-АД 82,9 %, т. пл. 218–220 °С (лит. [2] 222 °С).

Настоящая работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований и Вьетнамской академии науки и технологии (совместный проект № 09-03-90300-Вьет а — № 581/QD-

KHCNVN), а также Вьетнамского национального фонда развития науки и технологии (проект No 20/2009/HD-KHTN- 104.01.50.09).

ЛИТЕРАТУРА

1. Патент Германии 2647895, *Chem. Abstr.*, **87**, 66595a (1977).
2. Патент Германии 298278, *Chem. Abstr.*, **117**, 46713x (1992).
3. Патент России 2077590, *Chem. Abstr.*, **127**, 148402u (1997).
4. M. V. Donova, S. A. Gulevskaya, D. V. Dovbnya, I. F. Puntus, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **67**(5), 671–678 (2005).
5. В. А. Андрияшина, Н. В. Родина, Т. С. Стыщенко и др., *Приклад. биохим. микробиол.*, **47**(3), 297–301 (2011).
6. C. Perez, A. Falero, L. H. Duc, et al., *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **33**(8), 719–723 (2006).
7. Н. В. Родина, М. А. Молчанова, Н. Е. Войшвилло и др., *Приклад. биохим. микробиол.*, **44**(1), 56–62 (2008).
8. O. V. Egorova, S. A. Gulevskaya, I. F. Puntus, et al., *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, **77**(2), 141–147 (2002).
9. Патент США 3065146, *Chem. Abstr.*, **58**, 11668g (1963).
10. B. Angelova, P. Fernandes, A. Cruz, et al., *Enzym. Microb. Tech.*, **37**(7), 718–722 (2005).
11. Н. В. Родина, В. А. Андрияшина, Т. С. Стыщенко и др., *Приклад. биохим. микробиол.*, **45**(4), 439–445 (2009).
12. Патент России 2351645, *Chem. Abstr.*, **150**, 417701 (2009).
13. P. J. Jones, D. E. MacDougall, F. Ntanos, and C. A. Vanstone, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **75**(3), 217–227 (1997).
14. P. G. Bradford and A. B. Awad, *Mol. Nutr. Food Res.*, **51**, 161–170 (2007).
15. Патент России 2020150, *Chem. Abstr.*, **123**, 173580a (1995).
16. Патент Германии 1779900 (2007).
17. Патент США 2010112185, *Chem. Abstr.*, **152**, 500183 (2010).
18. Патент США 2843610, *Chem. Abstr.*, **52**, 16423b (1958).
19. P. Fernandes and J. M. S. Cabral, *Bioresource Technology*, **98**(12), 2335–2350 (2007).
20. Ng. V. Dan and Ng. V. Tuu, *Phuong Phap Nghien Cuu Hoc Hoc Cay Thuoc. NXB Y Hoc*, pp. 348–355 (2000).
21. Copius Peereboom J. W., *Centrum voor landbouwpublikaties en landbouwdocumentatie*, Netherlands (1963), pp. 38–127.
22. N. V. Rodina, M. A. Molchanova, N. E. Voishvillo, et al., *Biotechnology, Agriculture and the Food Industry*, Nova Science Publisher, New York (2006), pp. 145–155.
23. Патент России 2231553, *Chem. Abstr.*, **141**, 294770 (2004).
24. Патент России 1612585, *Бюл. изобрет.*, **17** (1995).

Поступила 19.01.11

PHYTOSTEROL MIXTURE ISOLATION FROM BYPRODUCT OF SOYBEAN PROCESSING AND ITS USE FOR PRODUCTION OF 9 α -HYDROXYANDROST-4-ENE-3,17-DIONE

T. S. Savinova¹, N. T. Diep², N. E. Voishvillo³, V. A. Andryushina³, N. V. Lukashev¹, and I. P. Beletskaya¹, L. D. Huy²

¹ Department of Chemistry, Moscow State University, Moscow, 119991 Russia;

² Institute of Chemistry, Vietnamese Academy of Science and Technology, Hanoi, Vietnam; e-mail: ldhuy@netman.vn

³ Bioengineering Centre, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117312 Russia

* e-mail: tatiana.savinova@rambler.ru

9 α -Hydroxyandrost-4-ene-3,17-dione has been obtained from a phytosterol mixture by using of microbiological methods of sterol side chain degradation with the formation of androstenedione, followed by 9 α -hydroxylation. It is shown, that phytosterols can be isolated from deodorizer sludge of soybean oil production with the low content of sterols (5.2%) at a yield of more than 96% and a total sterol content no less than 90%. The yield of 9 α -hydroxyandrost-4-ene-3,17-dione from the phytosterol mixture was amounted to 38 %.

Key words: phytosterols, soybean oil, deodorizer sludge, Mycobacterium, androstenedione, Rhodococcus, 9 α -hydroxylation