

## Занятие семинарского типа № 11

**ТЕМА ЗАНЯТИЯ:** Получение витаминов и коферментов биотехнологическими методами

### УЧЕБНЫЙ МАТЕРИАЛ

#### 1. Классификация продуктов биотехнологических производств

Биотехнологические производства основаны на использовании жизнедеятельности микроорганизмов. Для того, чтобы управлять микробиологическим процессом, необходимо знать физиологию применяемых культур микроорганизмов. Это позволит контролировать процессы, протекающие в клетке, условия культивирования и влияние основных факторов окружающей среды на направленный биосинтез.

Продуктами биотехнологических производств являются природные макромолекулы – белки, ферменты, полисахариды, полиэферы, выделенные из клеток микроорганизмов, тканей и органов растений и животных.

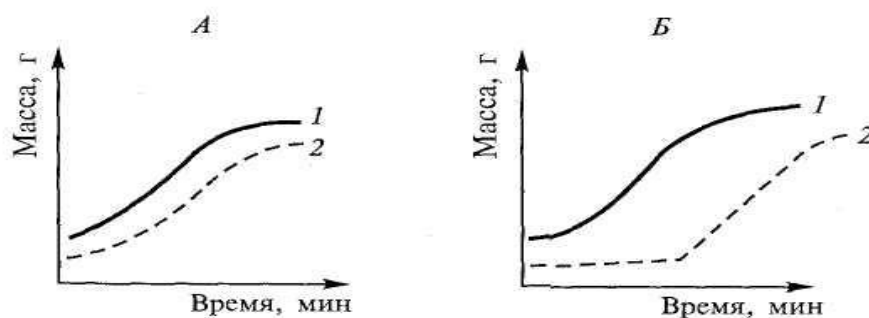


Рис. 1. Динамика изменения биомассы и образования первичных (А) и вторичных (Б) метаболитов в процессе роста организма (1 – биомасса; 2 – продукт)

По отношению к процессам роста низкомолекулярные продукты метаболизма живых клеток классифицируют на первичные и вторичные метаболиты.

Первичные метаболиты – низкомолекулярные соединения (мол. масса менее 1500 Да), необходимые для роста микроорганизмов. Одни из них являются строительными блоками макромолекул, другие участвуют в синтезе коферментов. Среди наиболее важных для промышленности первичных метаболитов можно выделить: аминокислоты, органические кислоты, пуриновые и пиримидиновые нуклеотиды, растворители и витамины. Первичные метаболиты, как правило, накапливаются в логарифмической фазе роста микроорганизмов-продуцентов. Многие первичные метаболиты представляют ценные для практики вещества. Первичные метаболиты синтезируются природными микроорганизмами в количествах, необходимых лишь для удовлетворения их потребностей. В этой связи задача промышленной биотехнологии состоит в создании мутантных форм микроорганизмов – сверхпродуцентов соответствующих веществ. Так, получены микроорганизмы, синтезирующие аминокислоты до концентрации 100 г/л, тогда как дикие штаммы микроорганизмов накапливают аминокислоты в количествах, исчисляемых мг.

Вторичные метаболиты – низкомолекулярные соединения, не требующиеся для роста в чистой культуре. К ним относятся: антибиотики, алкалоиды, гормоны роста растений и токсины.

## 2. Механизмы регуляции биосинтеза первичных метаболитов

Микробные клетки, как и клетки других живых организмов, не производят избыточного количества первичных метаболитов, что было бы расточительно и уменьшало их способность к выживанию, но созданы и создаются штаммы с нарушением регуляции синтеза этих метаболитов, которые и являются основой для биотехнологических производств.

Одним из важнейших путей интенсификации биотехнологического получения первичных метаболитов является совершенствование применяемого биообъекта.

Основными путями нарушения регуляции обменных процессов, протекающих в клетке, являются: изменения генетической программы организма и нарушения регуляторных систем организма.

Спонтанные изменения генетической природы продуцента основаны на рекомбинации генетического материала *in vivo*. Для выделения из природных популяций высокопродуктивных штаммов микроорганизмов применяют методы селекции. Методы слепого многоступенчатого отбора случайных мутаций очень длительны. Для возникновения мутаций нужный ген должен удвоиться  $10^6 - 10^8$  раз. В этой связи более эффективен метод искусственного повреждения генома, к которому относится индуцированный мутагенез, основанный на применении мутагенов. Несмотря на трудоемкость, методы селекции и в настоящее время не утратили своей актуальности для создания высокопродуктивных штаммов продуцентов. Достижения в области молекулярной биологии и молекулярной генетики позволили биотехнологам, начиная с 70-х гг. XX в. перейти от слепого отбора штаммов мутантов к сознательному конструированию геномов, применяя технологию рекомбинантных ДНК (рДНК).

Каждое из веществ образуется в клетке в строго необходимом для ее роста количестве в результате ферментативных реакций. Координация химических превращений, обеспечивающая экономичность метаболизма, осуществляется у микроорганизмов в соответствии с 3 основными механизмами:

- ✓ регуляция активности ферментов, в том числе путем ретроингибирования;
- ✓ регуляция объема синтеза ферментов (индукция и репрессия биосинтеза ферментов);
- ✓ катаболитная репрессия.

В процессе ретроингибирования (ингибирование по принципу обратной связи) активность фермента, стоящего в начале многоступенчатого превращения субстрата, тормозится конечным метаболитом. Таким путем низкомолекулярные метаболиты передают информацию об уровне своей концентрации и состоянии обмена веществ ключевым ферментам метаболизма. С помощью данного механизма конечные продукты саморегулируют свой биосинтез. Ретроингибирование – способ точного и быстрого регулирования образования продукта. На обмен веществ, аналогичный конечным метаболитам, оказывают эффект и их аналоги.

Среди многих тысяч ферментов, присущих микроорганизмам, одни, например, ферменты гликолиза, синтезируются постоянно и их образование не зависит от состава питательной среды (конститутивные ферменты), а другие ферменты (адаптивные или индуцибельные) возникают только в ответ на появление в питательной среде индукторов, т.е. субстратов или их структурных аналогов. Регуляция объема биосинтеза ферментов осуществляется на опероном уровне путем изменения количества иРНК, образующихся в процессе транскрипции. В процессе индукции низкомолекулярный метаболит-индуктор, соединяясь с репрессорным белком (продукт гена-регулятора), инактивирует его и, тем самым, препятствует взаимодействию белка-репрессора с зоной оператора, что обеспечивает возможность присоединения к промотору РНК-полимеразы и, следовательно, начало синтеза. Изучение механизмов регуляции новообразования ряда аминокислот у микроорганизмов показало, что конечные продукты метаболических путей

не только ингибируют активность ферментов первых стадий процесса, но и тормозят биосинтез ферментов последних стадий, т.е. помимо аминокислот у микроорганизмов регулируется новообразование многих первичных метаболитов. Обнаруженный феномен назван репрессией, а ферменты, биосинтез которых тормозится под влиянием низкомолекулярных метаболитов, переводящих репрессорный белок в активную форму, способную оккупировать зону первоначального связывания РНК-полимеразы (оператор), называется репрессибельным (глутаминсинтетаза, триптофансинтетаза, орнитинкарбамилтрансфераза, уреазы и др.). Проведенные исследования продемонстрировали, что репрессия биосинтеза ферментов обеспечивает более грубую в сравнении с ретроингибированием регуляцию образования анаболических ферментов. Если концентрация конечного продукта уменьшается до определенного очень низкого уровня, то происходит депрессия фермента, т.е. скорость его биосинтеза возрастает до необходимой величины. Бактериальные клетки продуцируют большое разнообразие низкомолекулярных эффекторов в ответ на изменение факторов окружающей среды, каждый из которых, взаимодействуя по аллостерическому механизму с определенными регуляторными белками, моделирует промоторную специфичность РНК-полимеразы, запуская, экспрессию определенного набора генов. Таким образом, ведущими механизмами, обеспечивающими экономичность образования продукта в клетках микроорганизмов, является ретроингибирование и репрессия, базирующиеся на принципе обратной связи.

Если в питательной среде присутствуют несколько различных источников углерода, клетка микроорганизма вырабатывает ферменты для усвоения, лишь одного, наиболее предпочтительного субстрата. Данное явление получило название катаболитной репрессии. Оно заключается в подавлении биосинтеза ферментов, обеспечивающих метаболизм одного источника углерода другим. Экспрессия ферментов регулируется белком-репрессором, пространственно удаленным от гена-оператора. Белок-репрессор, будучи присоединен к гену-оператору, препятствует транскрипции структурных генов.

### **3. Характеристика витаминов и коферментов**

Витамины (от лат. *vita* – жизнь) – группа низкомолекулярных органических соединений относительно простого строения и разнообразной химической природы. Витамины представляют собой сборную по химической природе группу органических веществ, объединенную по признаку их абсолютной необходимости для гетеротрофного организма в качестве составной части пищи. Автотрофные организмы также нуждаются в витаминах, получая их путем синтеза или из окружающей среды. Витамины содержатся в пище (или в окружающей среде) в очень малых количествах, и поэтому относятся к микронутриентам.

Витамины участвуют во множестве биохимических реакций, выполняя каталитическую функцию в составе активных центров большого количества разнообразных ферментов, или выступая информационными регуляторными посредниками, выполняя сигнальные функции экзогенных прогормонов и гормонов. Они не являются для организма поставщиком энергии. Однако, витаминам отводится важнейшая роль в обмене веществ. Концентрация витаминов в тканях и суточная потребность в них невелики, но при недостаточном их поступлении в организм наступают характерные и опасные патологические изменения. Большинство витаминов не синтезируются в организме человека, поэтому они должны регулярно и в достаточном количестве поступать в организм с пищей или в виде витаминно-минеральных комплексов и пищевых добавок. Исключения составляют витамин К, достаточное количество которого в норме синтезируется в толстом кишечнике человека за счёт деятельности бактерий, и витамин В<sub>3</sub>, синтезируемый бактериями кишечника из триптофана. С нарушением поступления витаминов в организм связаны 3 принципиальных

патологических состояния: недостаток витамина – гиповитаминоз, отсутствие витамина – авитаминоз, избыток витамина – гипervитаминоз.

Известно около полутора десятков витаминов. Исходя из растворимости, их классифицируют (табл. 1) на жирорастворимые (А, D, Е, К) и водорастворимые – все остальные (В, С и др.). Жирорастворимые витамины накапливаются в организме, причём их депо являются жировая ткань и печень. Водорастворимые витамины в больших количествах не депонируются и при избытке выводятся с водой. Это объясняет то, что гиповитаминозы довольно часто встречаются относительно водорастворимых витаминов, а гипervитаминозы чаще наблюдаются относительно жирорастворимых витаминов. Для жирорастворимых витаминов не свойственна коферментная функция (кроме витамина К).

Таблица 1

### Классификация витаминов

Буквенное обозначение	Химическое название	Активная форма витаминна	Лечебный эффект
Водорастворимые витамины			
В <sub>1</sub>	Тиамин	Тиаминпирофосфат (ТПФ), кокарьюоксилаза, тиаминтрифосфат (ТТФ)	Антиневритный
В <sub>2</sub>	Рибофлавин	ФМН, ФАД	Витамин роста
В <sub>3</sub>	Пантотеновая кислота	КоА-SH, дефосфоКоА, 4-фосфопантетеин	Антидерматитный
В <sub>5</sub> (РР)	Ниацин	НАД <sup>+</sup> , НАДФ <sup>+</sup>	Антипеллагрический
В <sub>6</sub>	Пиридоксин	Пиридоксальфосфат, пиридоксаминофосфат	Антидерматитный
В <sub>12</sub>	Кобаламин	Метилкобаламин, дезоксиаденозинкобаламин	Антианемический
С	Аскорбиновая кислота	Аскорбиновая и дегидроаскорбиновая кислоты	Регулятор метаболических процессов, иммуностимулятор
Жирорастворимые витамины			
А	Ретинол	Ретинол/ ретиналь	Антиксерофтальмический
D	Кальциферол	Эргокальциферол	Антирахитический
Е	Токоферол	$\alpha$ -, $\beta$ -, $\gamma$ -, $\delta$ -токоферолы, токотриенолы	Антиоксидантный
К	Филлохинон	Дифарнезилнафтохинон	Антигеморрагический

Представители жирорастворимых витаминов, выполняя функцию индукторов синтеза белков, проявляют сходство со стероидными гормонами, особенно это имеет отношение к витамину D. Все жирорастворимые витамины являются структурными компонентами клеточных мембран, проявляя антиоксидантное действие.

Витамины отличаются от других органических пищевых веществ тем, что не включаются в структуру тканей и не используются организмом в качестве источника энергии (не обладают калорийностью).

В современных социально-экономических условиях вследствие индустриализации и достижений цивилизации человек изменил характер питания и стал употреблять много рафинированных и консервированных продуктов, обладающих меньшей витаминной ценностью. Для стран со слабо развитой экономикой дефицит витаминов приобретает массовое явление вследствие достаточно низкого прожиточного минимума для

большинства населения этих стран, одновременно с этим снижается качество питания из-за отсутствия в нем свежих овощей, фруктов, мяса, рыбы.

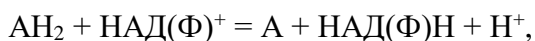
Широкое распространение полигиповитаминозов, снижение резистентности организма к болезнетворным микроорганизмам, сопровождающееся вредными экологическими факторами (радиацией, канцерогенами, промышленными токсинами) – все это повышает роль витаминов к профилактической и лечебной работе врачей, поэтому в экономически развитых странах стали реализовываться государственные программы искусственной витаминизации пищевых продуктов (суки, хлеба, молока, соков и др.).

Коферменты – органические соединения небелковой природы, необходимые для осуществления каталитического действия многих ферментов. Коферменты, соединяясь с белковой частью молекулы фермента (апоферментом), образуют каталитически активный комплекс (холофермент). Коферменты, прочно связанные с белками, называются простетическими группами. Многие коферменты легко отделяются от ферментного белка и служат переносчиками электронов, отдельных атомов или групп атомов субстрата, превращение которого катализирует данный фермент, т.е. функционируют в качестве промежуточных акцепторов. Они могут участвовать в активировании молекул субстратов, образуя с ними реакционно-способные соединения, которые затем подвергаются ферментативному превращению. Некоторые метаболиты, выступающие в ферментативных реакциях, как обычные субстраты, в определенных условиях могут выполнять роль коферментов. Многие коферменты являются производными витаминов, поэтому нарушение обмена веществ при витаминной недостаточности опосредовано через понижение активности определенных ферментов.

Коферменты, как правило, термостабильны, разнообразны по химическому строению и механизму действия. Наиболее распространенную группу составляют соединения нуклеотидной природы, а также коферменты, содержащие остатки фосфорной кислоты. Адениловые нуклеотиды наряду с их ключевой ролью в обмене энергии в качестве коферментов участвуют в реакциях переноса и активации орто- и пирофосфатных остатков, аминокислотных групп, остатков неорганических кислот. В группу адениловых нуклеотидов входят аденозинфосфорные кислоты — нуклеотиды, содержащие аденин, рибозу и остатки фосфорной кислоты (АДФ и АМФ). В качестве коферментов в подобных реакциях могут участвовать также производные инозин-5'-фосфорной и гуанозин-5'-фосфорной кислот. Гуаниловые рибонуклеотиды (гуанозин-5'-моно-, ди- и трифосфорные кислоты) выполняют роль коферментов в реакциях переноса сукцинилной группы, при биосинтезе рибонуклеопротеинов в микросомах, биосинтезе адениловой кислоты из инозиновой кислоты и др. Цитидиловые рибонуклеотиды (цитидил-5'-моно-, ди- и трифосфорные кислоты) играют роль коферментов при биосинтезе фосфолипидов, участвуя в переносе остатков, образующих полярные «головки» молекул фосфолипидов (0-фосфоэтанолхолина, 0-фосфоэтанолamina и др.). Уридилловые рибонуклеотиды (уридин-5'-моно-, ди- и трифосфорные кислоты) участвуют в качестве коферментов в процессах трансгликозилирования (переноса остатков простых сахаров и их производных) при биосинтезе ди- и полисахаридов, гликозаминогликанов и реакциях взаимопревращения сахаров.

К важнейшим коферментам нуклеотидной природы относятся никотинамидные коферменты – никотинамидадениндинуклеотид (НАД) и его фосфорилированное производное никотинамидадениндинуклеотидфосфат (НАДФ). Никотинамидные коферменты входят в состав ряда дегидрогеназ – катализаторов ключевых окислительно-восстановительных реакций энергетического и пластического обмена. Молекула НАД представляет собой динуклеотид, построенный из аденинрибонуклеотида и никотинамидрибонуклеотида (отвечает за проявление каталитической активности НАД), связанных фосфоангидридным мостиком, а НАДФ имеет третий остаток фосфорной кислоты в положении 2' рибозы аденилового нуклеотида. Способность НАД и НАДФ

переносить электроны и протоны от окисляемого субстрата к другому акцептору обеспечивает выполнение этими коферментами важной биологической функции в процессе клеточного дыхания. Окислительно-восстановительные реакции, протекающие с участием никотинамидных коферментов, могут быть изображены в виде общего уравнения:



где  $\text{AH}_2$  – восстановленная форма субстрата,  $\text{А}$  – окисленная форма субстрата.

Эти реакции состоят в обратимом переносе двух восстановительных эквивалента от субстрата к окисленному никотинамидному коферменту. Один восстановительный эквивалент присутствует в восстановленном коферменте в виде атома водорода, другой – в виде электрона, при этом катион второго атома водорода переходит в среду а виде свободного  $\text{H}^+$ . Обнаружено около 350 НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ, как правило, специфичных в отношении НАД или НАДФ. Обычно связь никотинамидных и других нуклеотидных коферментов с белками легко диссоциирует. НАД-зависимые дегидрогеназы преимущественно участвуют в процессах катаболизма (в клеточном дыхании), в НАДФ-зависимые – главным образом, в анаболических процессах (восстановительных биосинтетических реакциях). Содержание никотинамидных коферментов, соотношение между их окисленными и восстановленными формами (НАДН и НАДФН), к также величине отношения НАД/НАДФ являются показателями активности метаболических процессов в ткани, характеризуют ее функциональное состояние. В организме НАД и НАДФ синтезируются из никотиновой кислоты (ниацина или витамина РР) или никотинамида, поэтому недостаточность ниацина ведет к нарушению биосинтеза никотинамидных коферментов. Определение этих коферментов производят обычно спектрофотометрически (по характерному поглощению окисленных форм при 260 нм восстановленных форм или при 340 нм), флюориметрически (длина волны возбуждения 340 нм, флюоресценции 480 нм) или потенциометрически.

Флавиновые нуклеотиды или флавиновые коферменты (флавиномононуклеотид (ФМН), флавинадениндинуклеотид (ФАД)), являются коферментами флавопротеинов – ферментов, широко распространенных в живых клетках, принимающих участие в обмене основных классов органических соединений и играющих важную роль в процессе биологического окисления. К флавиновым коферментам относится рибофлавин (витамин В<sub>2</sub>), недостаточность которого приводит к нарушению нормального функционирования флавинозависимых ферментов. В окисленном состоянии флавиновые коферменты имеют интенсивный желтый цвет, в восстановленном состоянии они бесцветны. ФМН и ФАД, как правило, прочно связаны с соответствующими белками-апоферментами. Флавопротеины принадлежат к дыхательным ферментам класса оксидоредуктаз. Механизм окислительно-восстановительных реакций, катализируемых ими, обусловлен последовательным окислением и восстановлением флавиновых коферментов. Ряд ферментов (монооксигеназы) наряду с флавиновыми используют и никотинамидные коферменты. Определение флавиновых коферментов проводят спектрофотометрически или флюориметрически в характерных для них областях поглощения при определенных длинах волн.

Кофермент А (КоА, коэнзим А) – соединение аденозин-3',5'-фосфорной кислоты и β-меркаптоэтиламида пантотеновой кислоты, образующее с остатками органических кислот (R) тиоэфиры типа R-CO-SКоА. Кофермент играет роль в переносе и активировании кислотных остатков в реакциях ацилирования, конденсации, оксидоредукции или гидратации органических кислот. КоА участвует в клеточном дыхании, биосинтезе и окислении жирных кислот, синтезе стероидов. Для нормального синтеза КоА необходимо адекватное поступление в организм пантотеновой кислоты, входящей в состав КоА.

Кофермент В<sub>12</sub> (КоВ<sub>12</sub>, витамин В<sub>12</sub>) – α-(5,6-диметилбензимидазол)-кобаламинцианид является коферментом ферментов, участвующих в переносе

одноуглеродных фрагментов, обмене метионина и других соединений. Недостаток в рационе витамина В<sub>12</sub>, вызывающий в организме дефицит кофермента В<sub>12</sub>, клинически проявляется мегалобластной гиперхромной анемией, ее нутритивной (алиментарной) В<sub>12</sub>-дефицитной формой. Эндогенная недостаточность витамина В<sub>12</sub>, вследствие нарушения его всасывания в кишечнике также приводит к дефициту кофермента В<sub>12</sub>, клинически проявляющемуся одной из форм мегалобластной гиперхромной анемии – пернициозной (В<sub>12</sub>-дефицитной) анемией или анемией Аддисона – Бирмера.

Пиридоксальфосфат и его производные являются простетическими группами ряда ферментов, участвующих в обмене аминокислот (реакциях трансаминирования, декарбоксилирования и др.), а также фермента гликогенфосфорилазы. При недостаточном поступлении в организм пиридоксальфосфата (производного витамина В<sub>6</sub>) нарушаются функции пиридоксальзависимых ферментов.

Дифосфотиамин является коферментом кетолаз и транскетолаз – ферментов, участвующих в декарбоксилировании  $\alpha$ -кетокислот и расщеплении углеродной цепи фосфорилированных сахаров, и представляет собой производное витамина В<sub>1</sub> (тиамина).

Менее распространены коферменты пептидной природы, важнейшим представителем которых является глутатион – *l*-L-глутамил-L-цистеинил-L-глицин, принимающий активное участие во многих окислительно-восстановительных реакциях и обеспечивающий функционирование ряда SH-зависимых ферментов. Наиболее важной функциональной группой восстановленной формы глутатиона является сульфгидрильная группа (SH-), легко подвергающаяся ферментативному или неферментативному окислению с образованием дисульфидной (окисленной) формы глутатиона, состоящей из 2 молекул восстановленного глутатиона (Г—S—S—Г). Таким образом, глутатион функционирует как переносчик водорода. Он принимает прямое участие в некоторых реакциях цис-транс-изомеризации, является коферментом системы глиоксилазы, формальдегид-дегидрогеназы, глутатионпероксидазы. С генетически обусловленным нарушением обмена глутатиона связан ряд наследственных болезней, в том числе наследственные гемолитические анемии. Определение глутатиона осуществляют колориметрически и ферментативными методами с применением глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы.

Липоевая (тиоктовая) кислота – насыщенная серосодержащая жирная кислота, входящая в качестве одного из коферментов в состав мультиферментных комплексов, осуществляющих декарбоксилирование  $\alpha$ -кетокислот (пировиноградной,  $\alpha$ -кетоглутаровой кислот). Липоевая кислота выполняет роль промежуточного акцептора водорода и кислотных остатков за счет способности к обратимому восстановлению (переход S—S→SH).

Витамины К – жирорастворимые соединения, производные нафтохинона, выполняющие роль коферментов в реакциях системы свертывания крови. Их водорастворимый аналог (викасол) применяют в медицине в качестве лекарственного средства.

Биотин (витамин Н) – водорастворимый витамин, выступающий в качестве кофермента в составе ряда ферментов, катализирующих реакции карбоксилирования – декарбоксилирования некоторых органических кислот, например пируваткарбоксилазы и ацетил-КоА-карбоксилазы – ферментов начальных этапов глюконеогенеза и синтеза липидов, соответственно. В активном центре молекулы карбоксилаз биотин прочно связан амидной связью с  $\epsilon$ -аминогруппой остатка лизина фермента.

#### **4. Способы получения витаминов**

Производство витаминов осуществляется следующими основными способами:

✓ экстракция витаминов из растительного и животного сырья: с этого направления начиналась витаминная промышленность, поскольку первые витамины были получены именно таким путем. Так, витамин В<sub>12</sub> получали из сырой печени крупного рогатого

скота. каротин – из моркови. Однако в настоящее время количество витаминов, получаемых данным способом, незначительно ввиду очень низкого их содержания в природном сырье и ограниченности сырьевых ресурсов;

✓ химический синтез витаминов: производство синтетических витаминов занимает ведущее место в современной витаминной промышленности, поскольку основная номенклатура витаминов представлена веществами, полученными химическим синтезом из химических видов сырья или сочетанием химического синтеза с биосинтезом. Однако такой способ производства витаминов представляет собой сложный, многоступенчатый процесс, сопряженный со значительными производственными затратами, что удорожает стоимость конечных продуктов;

✓ Биосинтез витаминов: некоторые витамины, имеющие сложное строение, химический синтез которых в крупномасштабном производстве невозможен или экономически нецелесообразен, получают исключительно биосинтезом, с применением микроорганизмов, способных к сверхсинтезу и накоплению определенных витаминов. Микробиологический синтез применяется и в производстве витаминных концентратов, предназначенных для сельского хозяйства, поскольку в данном случае обычно витамины не выделяют в индивидуальном чистом виде.

Необходимо отметить условность такой классификации способов получения витаминов. Производство некоторых витаминов включает химические стадии и стадии биотрансформации с применением микроорганизмов (производство аскорбиновой кислоты). Витамин рибофлавин получают синтетическим и микробиологическим путями. Некоторые витаминные препараты (витамин D<sub>2</sub>) получают путем химической модификации провитаминов или витаминов, выделенных из растительных клеток или органов животных.

Применение витаминов в качестве добавок в корма животных требует крупномасштабного производства, поэтому возникла необходимость в более доступных способах изготовления витаминов. Таким способом оказался микробиологический синтез витаминов.

Микробиологическая промышленность России выпускает кормовые препараты витаминов B<sub>2</sub> и B<sub>12</sub>. Кроме того, микробиологическим можно считать и производство витамина D<sub>2</sub>, который образуется из эргостерина при облучении УФ светом кормовых дрожжей.

Продукцию микроорганизмами отдельных витаминов можно увеличить, изменяя состав питательной среды. Так, количество витамина B<sub>12</sub> в биомассе дрожжей зависит от интенсивности аэрации и содержания железа в среде. На содержание витаминов в клетках дрожжей заметное влияние оказывают микроэлементы. Так, небольшие добавки марганца способствуют накоплению в клетках дрожжей инозита, а повышенные дозы кобальта приводят к увеличению содержания витамина B<sub>6</sub>.

## **5. Биотехнология витамина B<sub>2</sub> (рибофлавина)**

Витамин B<sub>2</sub> по химической природе представляет собой азотистое основание (6,7-диметилизоаллоксазин), соединенное с остатком спирта D-рибита. Он входит в структуру многих ферментов, в составе которых участвует в клеточном дыхании, синтезе белков и жиров, регулировании состояния нервной системы, функции печени и т.д. Суточная потребность в витамине B<sub>2</sub> составляет для птиц 3–4 г (кристаллического препарата) на 2 т корма, а для свиней 10–15 мг на 100 кг живой массы.

Рибофлавин химически не устойчив, легко разрушается при кипячении и на свету. Рибофлавин способен легко окисляться и восстанавливаться, что лежит в основе его биологического действия.

B<sub>2</sub>-авитаминоз у человека сопровождается остановкой роста, выпадением волос, поражением слизистых оболочек, быстрой утомляемостью зрения, понижением



работоспособности, нарушением нормального синтеза гемоглобина, патологическими изменениями в нервной системе.

Вплоть до 30-х гг. XX в. рибофлавин выделяли из природного сырья. В наибольшей концентрации он присутствует в моркови и печени трески. Так, из 1 т моркови можно изолировать лишь 1 г рибофлавина, а из 1 т печени – 6 г. В 1935 г обнаружен активный продуцент рибофлавина – гриб *Eremothecium ashbyii*, способный при выращивании на 1 т питательной смеси синтезировать 25 кг витамина В<sub>12</sub>. Сверхсинтеза рибофлавина добиваются действием на дикие штаммы мутагенов, нарушающих механизм ретроингибирования синтеза витамина В<sub>2</sub>, флавиновыми нуклеотидами, а также изменением состава культуральной среды. Отбор мутантов ведут по устойчивости к аналогу витамина В<sub>2</sub> – розеофлавину. Для получения витамина В<sub>2</sub> можно также использовать культуру дрожжей, ацетобутиловые бактерии, продуцент лизина *Brevibacterium* и др. (табл. 2).

Таблица 2

Микроорганизмы – продуценты рибофлавина

Микроорганизмы – продуценты	Выход витамина, мг%
<i>Clostridium acetobytylicum</i>	97
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	58
<i>Mycocandida riboflavina</i>	200
<i>Candida flaveri</i>	567
<i>Eremothecium ashbyii</i>	2480 – 6000
<i>Ashbyii gossypii</i>	6420

Технология получения кормового препарата витамина В<sub>2</sub> микробиологическим способом проста. В качестве микроорганизма-продуцента обычно используют *E. ashbyii*. Технологический процесс производства данного витамина состоит из 3 основных стадий:

1. аэробная ферментация;
2. термолиз и концентрирование;
3. сушка, размол, гранулирование и упаковка.

Посевной материал и стерильный воздух получают по типовой, для многих микробиологических производств, схеме. Ферментация осуществляется в типовых биореакторах объемом 63–100 м<sup>3</sup> в стерильных условиях при температуре 28–30 °С.

Основными ингредиентами питательной среды являются соевая мука, меласса, технический жир и минеральные соли (СаСО<sub>3</sub>, КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub>). Продуцент витамина В<sub>2</sub> также выращивают на средах, в которых источником углерода является глюкоза, сахароза, крахмал, пшеничная мука. В качестве источника азота используют молочную сыворотку, рыбную и кукурузную муку или экстракт, казеин. Развитие продуцента стимулируется добавлением ненасыщенных жирных кислот, биотина, тиамин, инозита, ростовых веществ, содержащихся в зародыше пшеницы, картофельном соке и дрожжевом автолизате. В некоторых случаях в технологии витамина В<sub>2</sub> допустимо использование питательной среды следующего состава: 1–3 % мелассы, гидрола или глюкозы; 3–8 % кукурузного экстракта или дрожжевого автолизата; добавки N, Mg, Zn.

Культивирование продуцента проводят поверхностным или глубинным способом. Витамин накапливается в клетках продуцента в виде предшественника – флавина дениннуклеотида или в свободном состоянии. Время культивирования длится 60–80 ч до начала лизиса мицелия гриба и образования спор (определяется микроскопически). При этом содержание рибофлавина в культуральной жидкости достигает 1200 мг/л.

Для сохранения штамма *E. ashbyii* в активном состоянии рекомендуется производить систематический его рассев на твердые питательные среды и отбирать

колонии, наиболее интенсивно окрашенные в оранжевый цвет. Яркая окраска колоний коррелирует с высокой способностью к синтезу рибофлавина.

При подготовке инокулята продуцент пересевают последовательно по схеме:

посев на скошенную агаризованную среду в пробирке → жидкая среда → колба →  
→ бутылка → инокулятор

В инокуляторе культуры выращивают в течение 21–26 ч, затем ее переводят в биореактор с питательной средой, содержащей кукурузную и соевую муку, кукурузный экстракт, свекловичный сахар,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{CaCO}_3$ ,  $\text{NaCl}$  и технический жир.

Среду стерилизуют в смесителе при 120–122 °С в течение 1 ч. Культивирование в биореакторе ведут до начала лизиса клеток и появления спор (определяют микроскопически). Температура культивирования 28–30 °С, давление воздуха в биореакторе  $(1-2) \cdot 10^4$  Па, расход воздуха 1,5–2,0 л в мин. на 1 л культуральной жидкости. Выход рибофлавина около 1200 мг/л.

После окончания ферментации культуральную жидкость вместе с мицелием передают в вакуум-выпарные аппараты, в которых ее нагревают до 80 °С с целью разрушения (термолиза) клеточных структур и одновременно ведут процесс концентрирования (упаривания) до содержания сухих веществ 30–40 %. Концентрат, полученный после упаривания, в виде сиропообразной биомассы высушивают в распылительной сушилке до содержания влаги не более 8 %. В результате получают смесь биомассы мицелия *E. ashbyii* и сухих остатков питательной среды. Для получения однородного товарного продукта смесь размалывают и просеивают. На предприятиях концентрат гранулируют, т.к. порошкообразный продукт сильно пылит, что создает неудобства работы с ним и приводит к его потерям.

Кормовой концентрат витамина  $\text{B}_2$  представляет собой обработанную, высушенную, размолотую или гранулированную биомассу продуцента *E. ashbyii*, содержащую не менее 15 мг рибофлавина на 1 г вещества. Помимо витамина  $\text{B}_2$  концентрат содержит 0,3–0,5 % других витаминов группы В ( $\text{B}_1$ ,  $\text{B}_6$ ,  $\text{B}_{12}$ , никотинамид), около 20 % белковых веществ, а также полисахариды, липиды, минеральные соли.

Для животноводства можно получить кормовой рибофлавин как отход при производстве ацетона. При этом продуцентами витамина являются ацетобутиловые бактерии.

Преимущество и рентабельность микробного синтеза витамина  $\text{B}_2$  иллюстрируют следующие цифры: из 1 т моркови получают 1 г витамина, из 1 т тресковой печени – 6 г, а из 1 т культуральной жидкости *E. ashbyii* – 25 кг.

Предложена также другая схема получения витамина  $\text{B}_2$ , согласно которой в качестве посевного материала используются споры *E. ashbyii*, выращенные на пшене. Промытое пшено выдерживают в течение 30–35 мин. в молочной сыворотке для набухания. Затем его подсушивают, расфасовывают по 50–60 г в простерилизованные флаконы и подвергают трехкратной стерилизации. После этого производят его засев водной суспензией спор *E. ashbyii*. Флаконы с засеянной культурой в течение 7–8 суток инкубируют при 29–30 °С. Затем подсушивают в вакуум-сушильной установке и направляют для приготовления жидкого посевного материала, который после стерилизации подается в производственный ферментер.

Культивирование продуцента осуществляют при 28–30 °С в течение 72 ч. При этом через каждые 8 ч отбирают пробы для контроля за развитием продуцента, составом среды и накоплением целевого продукта. Культуральная жидкость после окончания ферментации содержит 1,4 мг/мл рибофлавина.

В целях стабилизации витамина  $\text{B}_2$ , в процессе высушивания культуральную жидкость подкисляют соляной кислотой до значения рН 4,5–5. Затем ее концентрируют в вакуум-выпарной установке, проводят дополнительную очистку с помощью ионообменной установки. При этом элюат концентрируют путем упаривания, а

полученный целевой продукт (концентрат рибофлавина) высушивают на распылительной сушилке.

В 1983 г. во ВНИИ генетики микроорганизмов сконструирован рекомбинантный штамм продуцента *Bacillus subtilis*, характеризующийся увеличенной дозой оперонов, которые контролируют синтез рибофлавина. Клонированием генов рибофлавинового оперона в одной из созданных плазмид был получен производственный штамм продуцент витамина В<sub>2</sub>, способный синтезировать в 3 раза больше по сравнению с *E. ashbyii* количество рибофлавина всего за 40 ч ферментации.

## **6. Биотехнология витамина В<sub>12</sub>**

Витамин В<sub>12</sub> открыт в 1948 г. одновременно в США и Англии. В 1972 г. в Гарвардском университете был осуществлен химический синтез корриноидного предшественника витамина В<sub>12</sub>. Химический синтез корнестерона – структурного элемента корринового кольца витамина, включающий 37 стадий, в крупных масштабах не воспроизведен из-за сложности процесса.

Среди неполимерных БАВ витамин В<sub>12</sub> имеет сложное строение. Его химическое название  $\alpha$ -(5,6-диметилбензимидазол)-кобамидцианид. Это единственный витамин, в структуру которого входит кобальт.

Витамин В<sub>12</sub> хорошо растворим в воде, спиртах, низших органических кислотах жирного ряда и фенолах, но не растворяется в бензоле, хлороформе и ацетоне. На свету он теряет свою активность, но в темноте может долго храниться и представляет собой очень устойчивое вещество. Витамин В<sub>12</sub> оптически активен.

Организм животных не способен к самостоятельному синтезу витамина В<sub>12</sub>. Этот витамин полностью отсутствует в растительных кормах и в относительно небольших количествах содержится в кормах животного происхождения (рыбной и мясо-костной муке, молочных отходах). Среди растительного мира витамин В<sub>12</sub> был обнаружен лишь у нескольких видов высших растений (горох, фасоль, побеги бамбука), причем его происхождение в этих растениях окончательно не установлено.

Цианкобаламин обладает высокой биологической активностью с широким спектром действия. Витамин В<sub>12</sub> регулирует углеводный и липидный обмен, участвует в метаболизме незаменимых аминокислот, пуриновых и пиримидиновых оснований, стимулирует образование предшественников гемоглобина в костном мозге; применяется в медицине для лечения злокачественной анемии, лучевой болезни, заболеваний печени, полиневрита и т.п. Для медицинских целей субстанцию витамина В<sub>12</sub> получают в виде кристаллического темно-красного порошка, содержащего не менее 99 % основного вещества. Из данной субстанции готовят различные лекарственные формы, из которых наиболее широкое применение находят цианкобаламин в изотоническом растворе хлорида натрия для инъекций, и таблетки, содержащие цианкобаламин и фолиевую кислоту.

Важное значение витамин В<sub>12</sub> имеет для животноводства. Его недостаток тормозит рост животных и приводит к серьезным заболеваниям. Цианкобаламин повышает усвояемость белка растительных кормов и является необходимым фактором полноценного питания животных. Для животноводства отечественной промышленностью выпускается кормовой концентрат витамина В<sub>12</sub> (КМВ-12), который по эффективности не уступает кристаллическому препарату, но является более дешевым и доступным для широкого использования в сельском хозяйстве.

Первоначально витамин В<sub>12</sub> получали исключительно из природного сырья, но из 1 т печени можно было выделить всего лишь 15 мг витамина. Полный химический синтез витамина В<sub>12</sub> был осуществлен через 25 лет после его открытия Р. Вудвордом и А. Эшенмозером с участием большой группы исследователей нескольких лабораторий университетов и научных центров США, Англии, Франции, Японии. Химический синтез витамина В<sub>12</sub> имеет чисто теоретическое значение и в настоящее время он не может

рассматриваться как вариант промышленного производства этого важного препарата. Единственным способом получения витамина В<sub>12</sub> в промышленном масштабе является его микробиологический синтез с использованием специальных штаммов микроорганизмов, способных активно продуцировать данный витамин. Обнаружение витамина в качестве побочного продукта при производстве антибиотиков в значительной степени стимулировало поиск продуцентов витамина и изучение путей его образования. Однако механизмы регуляции биосинтеза витамина В<sub>12</sub> до настоящего времени полностью не расшифрованы. Известно, что при высоких концентрациях витамин полностью репрессирует синтез ключевых ферментов.

В природе витамин В<sub>12</sub> синтезируют многие микроорганизмы (метанобразующие и пропионовокислые бактерии), а также бактерии, осуществляющие термофильное метановое сбраживание сточных вод (табл. 3).

Активно продуцируют витамин В<sub>12</sub>, представители *Propionibacterium*, природные штаммы которых образуют 1,0–8,5 мг/л цианкобаламина, а полученный искусственный мутант *P. shermanii* М-82 способен накапливать витамин В<sub>12</sub> до 58 мг/л.

Таблица 3

Характеристики микробиологических процессов получения витамина В<sub>12</sub>

Микроорганизм	Основные компоненты среды	Выход витамина В <sub>12</sub> , мг/л	Примечание
<i>Bacillus megaterium</i>	Свекольная меласса, фосфат аммония, соли кобальта, неорганические соли	0,45	Аэробный процесс, продолжительностью 18 ч
<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	Кукурузный настой, кобальтовое производное глюкозы; рН поддерживают около 7,0 добавлением NH <sub>4</sub> OH	19	Аэробная (3 сут.) и анаэробная (3 сут.) тсдии
<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	Кукурузный настой (или автолизат мицелия пенициллина), глюкоза, соли кобальта; рН поддерживают около 7,0 добавлением NH <sub>4</sub> OH	8	Непрерывный двустадийный процесс продолжительностью 33 ч
<i>Propionibacterium shermanii</i>	Кукурузный настой, глюкоза, соли кобальта; рН поддерживают около 7,0 добавлением NH <sub>4</sub> OH	23	Периодический процесс: продолжительностью 7 сут. (анаэробная стадия – 3 сут., аэробная – 4сут.)
<i>Streptomyces olivaceus</i>	Глюкоза, соевая мука, растворимые отходы спиртового производства, кобальтовые соли, неорганические соли	3,3	Продолжительность ферментации с аэрацией 6 сут.
<i>Streptomyces sp.</i>	Соевая мука, глюкоза, кобальтовая соль, K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5,7	Продолжительность ферментации с аэрацией 6 сут.

Практический интерес для микробиологического синтеза этого витамина имеют представители актиномицетов и родственных микроорганизмов. Истинный витамин В<sub>12</sub> в

значительных количествах синтезируют *Nocardia rugosa* (до 18 мг/л), а также представители рода *Micromonospora*. Высокий кобаламинсинтезирующей активностью обладают метаногенные бактерии, например, *Methanosarcina barkeri*, *M. vacuolita* и отдельные штаммы галофильного вида *Methanococcus halophilus* (до 16 мг/л).

Цианкобаламин синтезируют строго анаэробные бактерии из рода клостридий. В значительных количествах образуют витамин В<sub>12</sub> ацетогенные клостридии *C. thermoaceticum*, *C. formicoaceticum* и *Acetobacter woodi*, синтезирующие ацетат из СО<sub>2</sub>.

Известны активные продуценты витамина В<sub>12</sub> среди псевдомонад. Некоторые штаммы *Pseudomonas denitrificans* нашли применение для промышленного получения цианкобаламина. Интерес представляют также термофильные бациллы, а именно *Bacillus eirculans* и *Bacillus stearothermophilus*, которые растут при температурах 60 и 75 °С, соответственно, за 18–24 ч культивирования без соблюдения условий дают высокие выходы витамина.

В нашей стране в качестве основного продуцента витамина В<sub>12</sub>, получаемого для медицинских целей, используют культуру *P. shermanii*, а для нужд животноводства применяют смешанную культуру, содержащую термофильные метанообразующие бактерии. На большинстве зарубежных предприятий витамин В<sub>12</sub> выпускают в чистом кристаллическом виде и применяют в животноводстве большей частью в виде компонентов премиксов.

### **Биотехнология кормового концентрата витамина В<sub>12</sub>**

Типовой технологический процесс производства кормового концентрата витамина В<sub>12</sub> (КМБ-12), принятый отечественной промышленностью, включает следующие стадии:

1. Метановое брожение.
2. Стабилизация метановой бражки.
3. Концентрирование бражки.
4. Сушка кормового концентрата.
5. Фасовка и упаковка целевого продукта.

Термофильное метановое брожение осуществляется смешанной культурой анаэробных метанообразующих бактерий. В состав смешанной культуры входят: целлюлозоразлагающие, аммонифицирующие, углеводсбраживающие, сульфитвосстанавливающие и метанообразующие бактерии. На первом этапе ферментации смешанной культуры (в течение 10–12 суток) наблюдается бурное развитие термофильных аммонифицирующих и углеводсбраживающих бактерий, которое происходит в слабокислой среде (рН 5–7). Другие группы бактерий данной культуры достигают интенсивного развития при переходе брожения в щелочную среду (рН 7–8,5). Преобладающими в данный период являются метанообразующие бактерии, синтезирующие в 4–5 раз больше витамина В<sub>12</sub>, чем другие микроорганизмы смешанной культуры. Субстратом для метанового брожения служит ацетоно-бутиловая или спиртовая барда (отход микробиологического производства ацетона и бутилового спирта).

Предварительно на меласно-спиртовой барде выращивают кормовые дрожжи. После сепарирования дрожжей получают культуральную жидкость, на которой выращивают метанообразующие бактерии. С 1 м<sup>3</sup> исходной барды получают 1,5–2 г витамина.

Ацетоно-бутиловую барду получают также в результате выращивания *Clostridium acetobutylicum*, сбраживающей паточно-мучные заторы. Из барды отгонкой удаляют образовавшиеся растворители (ацетон, бутанол), добавляют СаСl<sub>2</sub> из расчета 4 г/м<sup>3</sup> и 0,5 % метанола как стимуляторы биосинтеза цианкобаламинов. В качестве стимуляторов вносят также карбамид и диаммонийфосфат.

Производство КМБ-12 осуществляется в комплексе с производством бутанола, ацетона, этанола и других органических растворителей с использованием бродильных

процессов. При этом продукты жизнедеятельности одной группы бактерий используются в качестве питательных веществ для другой группы и, в конечном итоге, органические вещества, составляющие основу питательных сред, разлагаются до углекислого газа и метана.

Непрерывное термофильное брожение смешанной культуры проводят в биореакторах в нестерильных условиях при температуре  $56 \pm 1$  °С.

Ацетоно-бутиловая барда непрерывно подается в нижнюю часть емкости, а сверху отбирается созревшая бражка. Скорость подачи барды регулируют так, чтобы время ее пребывания в биореакторе соответствовало продолжительности брожения, которое составляет обычно 2–2,5 сут. Метановое брожение сопровождается выделением значительного количества газов (до 20 м<sup>3</sup> газов на 1 м<sup>3</sup> барды), в основном метана (65 %) и СО<sub>2</sub> (30%), что вызывает обильное пенообразование, а следовательно, требует подачи пеногасителей. В течение рабочего цикла в ферментере строго контролируют рН среды, концентрацию летучих жирных кислот, содержание аммонийного азота, поддерживают оптимальную температуру (55–57 °С).

Метановая бражка из биореактора поступает в выпарные аппараты. Предварительно перед выпариванием метановую бражку подкисляют соляной кислотой до рН 5,0–5,3 и добавляют сульфит натрия (0,07–0,1%) для стабилизации кобамидов во время упаривания и сушки. Бражку в четырехкорпусных выпарных аппаратах сгущают до содержания 20 % сухих веществ не менее 94 %. В качестве теплоносителя в распылительной сушилке используют топочные газы, полученные при сжигании газов, выделяющихся в процессе метанового брожения.

Сухой кормовой концентрат витамина В<sub>12</sub> (КМБ-12) представляет собой коричневый мелкодисперсный порошок, содержащий не менее 100 мкг/г витамина В<sub>12</sub>. Концентрат очень гигроскопичен, потому его герметически упаковывают в полиэтиленовые мешки не более, чем по 15 кг. Для того, чтобы исключить длительное хранение продукта после вскрытия упаковки.

Опытами на животных установлена высокая биологическая эффективность как кристаллического препарата витамина В<sub>12</sub>, так и его кормовых концентратов. Применение витамина В<sub>12</sub>, выпускаемого микробиологической промышленностью в кристаллическом виде или в форме, известной КМБ-12, на фоне обычных рационов кормления поросят позволяет увеличить привесы от 6 до 20 %. Еще больший эффект достигается при использовании витамина В<sub>12</sub> совместно с антибиотиком кормогризином. В этом случае удается увеличить привесы на 20–30 %. Применение витамина В<sub>12</sub> в птицеводстве повышает яйценоскость до 30 %, а также привесы цыплят на 10–30 %, обеспечивает сохранность и нормальное развитие молодняка.

### **Биотехнология кристаллического витамина В<sub>12</sub> для медицинских целей**

Витамин В<sub>12</sub> получают путем культивирования *Propionibacterium shermanii* периодическим способом в анаэробных стерильных условиях в питательной среде, содержащей кукурузный экстракт, глюкозу, соли кобальта и сульфат аммония. Величина рН среды составляет около 7,0, что достигается добавлением гидроксида аммония.

Органические кислоты, образующиеся в процессе брожения, нейтрализуют раствором щелочи, прилив которой регулируется автоматически. Процесс культивирования продолжителен – 6 суток. Через 72 ч культивирования в среду вносят 5,6-диметилбензимидазол (ДМБ) – предшественник биосинтеза витамина В<sub>12</sub> (в качестве затравки). Без введения предшественника бактерии синтезируют псевдовитамин В<sub>12</sub>, не имеющий клинического значения, в котром азотистым основанием служит аденин. После введения предшественника ферментацию продолжают еще 72 ч до содержания витамина в биомассе не менее 250 мкг/г.

Витамин В<sub>12</sub> накапливается в клетках бактерий, поэтому по окончании ферментации биомассу отфильтровывают или сепарируют и экстрагируют из нее витамин при

температуре  $85 \pm 5$  °С водой, подкисленной до рН 4,5–5,0. Экстракция длится приблизительно 1 ч. Полученный водный экстракт витамина охлаждают, доводят раствором щелочи рН до 6,8–7, к раствору добавляют сульфат аммония и раствор хлорного железа для коагуляции белков. Скоагулированные белки отделяют на фильтр-прессе, а водный экстракт витамина поступает на стадию выделения и очистки кристаллического продукта. Витамин В<sub>12</sub> из водного экстракта (после коагуляции белков) сорбируют на ионообменной смоле СГ-1 и элюируют водным раствором аммиака. Затем элюат пропускают через колонки с хроматографической окисью алюминия. При этом витамин сорбируется на Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, а примеси удаляются с маточными растворами. С окиси алюминия элюируют водным ацетоном, к водно-ацетоновому добавляют безводный ацетон до помутнения раствора и смесь выдерживают при температуре  $3 \pm 1$  °С в течение 24–48 ч, при этом происходит кристаллизация витамина В<sub>12</sub>. Выделившиеся кристаллы технического витамина отфильтровывают, промывают безводным ацетоном, эфиром и сушат в вакууме.

Для химической очистки витамина В<sub>12</sub> используют его способность образовывать аддукаты (комплексы) с фенолом, резорцином или крезолами. Для этого водный концентрат витамина обрабатывают водным раствором фенола, отделяют фильтрованием выделившийся комплекс, затем его разлагают путем обработки водным ацетоном. При этом витамин отделяется в виде осадка, а фенол и примеси уходят с водно-ацетновыми маточными растворами. Для окончательной очистки препарата осуществляют одно- и двукратное переосаждение цианкобаламина из водного раствора ацетоном.

## 7. Биотехнология витамина С (аскорбиновой кислоты)

Витамин С представляет собой группу соединений – производных L-(+)-гулоновой кислоты. Этот витамин присутствует у всех высших растений и животных, только человек и микроорганизмы его не синтезируют. Он необходим человеку для жизнедеятельности, тогда как микроорганизмы в нем не нуждаются. И, тем не менее, определенные виды уксуснокислых бактерий причастны к биосинтезу полупродукта аскорбиновой кислоты – L-сорбозы. Биологические функции витамина С связаны с участием в биосинтезе стероидов, в реакциях гидроксирования, в частности, в превращении пролина в оксипролин (биосинтез коллагена). При недостатке витамина С нарушается обмен в соединительной ткани, повышается проницаемость капилляров, что ведет к кровоизлияниям и цинге.

Аскорбиновая кислота в мировом промышленном производстве витаминной продукции в целом занимает наибольшую долю – около 40 тыс. т. в год. Ее синтез был разработан швейцарскими учеными А. Грюсснером и С. Рейхштейном в 1934 г. и используется до настоящего времени. Синтез данного витамина является многостадийным химическим процессом, в котором только одна стадия представлена биотрансформацией. Эта стадия трансформации D-сорбита в L-сорбозу при участии ацетатных бактерий. Для получения сорбозы используют глубинную ферментацию, когда культуру продуцента *Glucanobacter oxydans* выращивают в ферментерах периодического режима с мешалкой и барботером для усиления аэрации и массообмена в течение 20–40 ч с результатом по выходу сорбозы до 98 % исходного количества сорбита в среде. Обычно для достижения такого высокого выхода целевого продукта в питательную среду вносят кукурузный или дрожжевой экстракт в количестве около 20 %. По окончании ферментации сорбозу выделяют из культуральной жидкости. Кроме оптимизации среды можно совершенствовать и технологическую аппаратуру. Так, переход от периодического культивирования продуцента *G. oxydans* к непрерывному в аппарате колонного типа увеличивает скорость образования сорбозы в 1,7 раз.

В настоящее время широкое использование биотехнологических процессов позволяет совершенствовать синтез аскорбиновой кислоты, сокращая многостадийные и дорогостоящие химические стадии. Так, синтез витамина С осуществляют енолизацией

его важнейшего промежуточного продукта – 2-кето-L-гулоновой кислоты, которую, в свою очередь, получают методом двухстадийного микробиологического синтеза, состоящего из окисления D-глюкозы в 2,5-дикето-D-глюконовую кислоту (2,5-ДКДГК) и биотрансформации последней в 2-кето-L-гулоновую кислоту (2-КГК).

Основными продуктивными микроорганизмами, обеспечивающими процессы окисления D-глюкозы в 2,5-ДКДГК и восстановление последней до 2-КГК, являются мутантные штаммы *Erwinia punctata* и *Corynebacterium sp.*, при использовании которых выход целевого продукта составляет около 90 % количества глюкозы. Однако данная технология имеет существенные недостатки, т.к. при совместном культивировании продуцентов происходит ингибирование синтеза 2-КГК. В этой связи культуральную жидкость после выращивания продуцента 2,5-ДКДГК стерилизуют, применяя ПАВ, что позволяет значительно сократить потери при получении гулоновой кислоты.

Существует и другой биотехнологический способ получения гулоновой кислоты, основанный на синтезе этого продукта штаммом микроорганизмов рода *Gluconobacter* из сорбозы, производство которой имеет высокую рентабельность. Способность к синтезу целевого продукта обусловлено наличием у этого микроорганизма видоспецифических дегидрогеназ

## **8. Биотехнология витамина D**

Витамин D (кальцеферол) – группа родственных соединений, обладающих антирахитичным действием, в основе которых находится эргостерин, обнаруженный в клеточных мембранах эукариот.

Витамин D<sub>3</sub> образуется на коже под действием УФ лучей и 7-дегидрохолестерина. Его физиологически активной формой является 1,25-диоксихолекальцеферол. При недостатке витамина D<sub>3</sub> у детей развивается рахит и аналог рахита у взрослых – остеопороз.

Витамин D<sub>2</sub> получают при облучении дрожжей светом. Данный витамин получают фотоизомеризацией провитамина – эргостерина и 7-дегидрохолестерина.

Физиологическая активность витаминов D<sub>2</sub> и D<sub>3</sub> равноценна.

Витамины D<sub>2</sub> и D<sub>3</sub> не растворимы в воде, хорошо растворяются в жирах и растворителях жиров. Они малостабильны и быстро разрушаются под действием окислителей и минеральных солей.

Витамин D<sub>2</sub> производят путем микробиологического синтеза при выращивании микроорганизмов-продуцентов на углеводородном сырье. Предшественником жирорастворимого витамина D<sub>2</sub> является эргостерин (эргостирол). При обработке дрожжевой суспензии или сухих дрожжей УФ лучами происходит фотохимическое превращение эргостерина в эргокальциферол.

Из дрожжей или мицелия плесневых грибов витамин D<sub>2</sub> получают в кристаллическом виде или в виде масляного концентрата.

Промышленными продуцентами эргостерина являются клетки дрожжей всех видов и плесневые грибы. Наибольшее количество эргостерина присутствует в пекарских дрожжах (до 10 %). Обнаружено, что полиеновые антибиотики, действующие на клеточную мембрану дрожжей, заметно стимулируют их содержание в биомассе. В табл. 4 представлены микроорганизмы-продуценты эргостерина.



## Содержание эргостерина у микроорганизмов

Микроорганизмы	Количество эргостерина, % (на сухое вещество)
<i>Saccharomyces carlbergensis</i>	0,49–4,3
<i>Saccharomyces ellipsoides</i>	1,2–1,5
<i>Rhodotorula glutinis</i>	0,7–0,9
<i>Candida utilis</i>	0,4–0,6
<i>Candida tropicalis</i>	0,2–0,3
<i>Aspergillus</i>	1,2–1,4
<i>Penicillium Westlingii</i>	2,2

В качестве промышленного источника эргостерина используют дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* вследствие высокого содержания в них эргостерина. В анаэробных условиях культивирования происходит накопление в клетках дрожжей сквалена (предшественника эргостерина). Индукция синтеза эргостерина начинается при строго определенной концентрации кислорода от 0,03 до 2 %. При этом среда должна содержать избыток углеводов и небольшое количество азота. По окончании процесса спиртового брожения дрожжи отделяют от барды и вносят в питательную среду необходимое количество источников углерода, азота и фосфора. Ферментацию осуществляют в аэробных условиях 12–20 ч, по окончании которой клетки дрожжей отделяют от культуральной жидкости, добавляют антиоксиданты и сушат. Обычно в такой биомассе содержание эргостерина достигает 1,5 %. При дальнейшем УФ-облучении эргостерина получают витамин D<sub>2</sub>, который используется как пищевая добавка или подвергается дальнейшей обработке с целью получения кристаллического витамина D<sub>2</sub>.

При получении эргостерина из дрожжеподобных грибов рода *Candida* сухую массу грибов экстрагируют петролейным эфиром для извлечения остаточных углеводов. Полученная таким образом липидная фракция называется микробный жир и является побочным продуктом микробиологической промышленности. Эта фракция может быть использована как источник не только эргостерина, но и убихинона, а также других жирорастворимых соединений. Для грибов рода *Candida* характерно, что при переходе от периодического культивирования на углеводах к непрерывному в клетках сохраняются как уровень образования стеринов, так и относительное содержание в них эргостерина.

Для выделения из клетки эргостерина и витаминов необходимо гидролизовать дрожжи, что осуществляют при нагревании с кислотой или ферментативно (автолиз). Для получения витамина D<sub>2</sub> из дрожжей или мицелия биомассу гидролизуют в автоклаве, используя на 100 кг дрожжей или грибного мицелия 20 л воды и 10 мл концентрированной соляной кислоты. Гидролиз осуществляется при температуре 10 °С в течение 20–30 мин. Затем гидролизованную массу обрабатывают спиртом (40–50 мин.) при 75–78 °С в специальном коагуляторе. Массу охлаждают до 10–15 °С и фильтруют. Фильтрат концентрируют, отделяя спирт и часть воды, получают концентрат витаминов группы В, содержащий 50 % сухих веществ.

Массу, оставшуюся после фильтрования, промывают водой, отгоняют спирт и воду. Полученную пасту сушат до влажности 2 % и размельчают.

Порошок дрожжей обрабатывают в экстракторе трехкратным объемом спирта-ректификата при температуре 78 °С. После отделения раствора осадок еще раз экстрагируют спиртом, который удаляют из экстракта, а остаток сгущают до 70 %-го содержания сухих веществ. Из 100 кг дрожжей получают 20–25 кг липидного концентрата. Концентрат омыляют щелочью. Затем раствор кристаллизуют при 0 °С. Выпавший осадок с целью дополнительной очистки растворяют в спирте или бензоле. Выпавшие кристаллы сушат в эфире. Чистый препарат эргостерина облучают УФ лучами

для получения витамина D<sub>2</sub>. На выход витамина D<sub>2</sub> оказывает влияние длительность облучения, температура и наличие примесей.

### 9. Биотехнология витамина Н (биотина)

Витамин Н не пользуется такой широкой известностью, как, например, витамины А, С и D, но значение его для всех живых организмов от этого ни чуть не уменьшается.

Витамин Н – кофактор не менее десяти ферментов, ведущих в клетке синтез многих жизненно необходимых веществ. Это значит, что только в соединении с биотином белковые молекулы ферментов обретают каталитическую активность и получают возможность выполнять свою функцию. В его отсутствии многие важнейшие для клетки процессы прекращаются.

Человека обеспечивают определенным количеством биотина микроорганизмы, обитающие в кишечнике. Кроме того, он поступает в организм человека вместе с пищей (особенно его много содержится в яичном желтке, дрожжах, цветной капусте). Однако при нарушении естественной микрофлоры кишечника (например, после длительного приема антибиотиков), ее производительность снижается, что может привести к дефициту биотина. К биотиновой недостаточности может привести и употребление в пищу больших количеств сырого яичного белка, т.к. в нем содержится гликопротеин, присоединяющий биотин. При этом образуется прочный комплекс, который не переваривается и не усваивается организмом.

Признаками биотиновой недостаточности у человека являются: пепельно-бледная кожа, атрофия сосочков языка, боли в мышцах, сонливость, потеря аппетита, снижение содержания эритроцитов и холестерина в крови. У животных дефицит биотина выражается в замедлении роста, появлении дерматитов, депигментации, нарушении роста волос. Особенно болезненно реагируют на недостаток биотина свиньи и птицы.

Биотин необходим и некоторым видам микроорганизмов, не способным его самостоятельно вырабатывать. К ним относятся, в частности, *Corinebacterium*, которая широко используется в микробиологической промышленности для синтеза незаменимой аминокислоты лизина (ценной добавки к кормам).

Таким образом, недостаток в потребителях биотина отсутствует. Промышленное производство данного витамина в нашей стране пока не налажено. В этой связи его практическое применение сильно ограничено. Получать биотин из природных источников очень невыгодно, т.к. для выделения 1 мг витамина необходимо переработать почти 230 кг сухого яичного желтка. Разработаны также методы его химического синтеза. Однако таким путем удастся получить всего несколько сотен граммов витамина в год, а потребность в нем в тысячи раз выше. Кроме того, химический синтез дает смесь изомеров, которую потом приходится разделять, чтобы получить активный D-биотин. Остается еще один путь получения биотина – микробиологический синтез. Основной проблемой при его получении данным способом явилось то, что микроорганизмы синтезируют биотин в минимальных количествах. В этой связи вначале исследования были сосредоточены на поиске такого микроорганизма, который по своей производительности подходил на роль продуцента. Было обследовано большое количество штаммов плесневых грибов, дрожжей, грибов, актиномицетов. Однако большинство из них оказались неподходящими продуцентами: бактерии ведут обычно очень экономный образ жизни, строго контролируют свои затраты, поэтому лишнего биотина почти не производят. Более перспективными в этом отношении оказались грибы, особенно те из них, которые растут на богатых органических субстратах. В итоге исследователи остановили свой выбор на грибах рода *Rhizopus delemar*, являющихся настоящими «рекордсменами» среди микроорганизмов: образуют около 1 мг биотина на 1 л среды и большую его часть выделяют в культуральную среду.

Следующей проблемой, связанной с получением витамина Н микробиологическим путем, является проблема масштабирования. В ходе отбора продуцентов было

обнаружено то, что многие штаммы микроорганизмов активно поглощают биотин из внешней среды, накапливая его в своих клетках. Особенно выделяются в этом отношении дрожжи рода *Trichosporon*. Даже небольшое их количество за 1 ч аккумулировало 60 % биотина, содержащегося в культуральной жидкости. Кроме того, дорогостоящий процесс концентрирования сильно разбавленного раствора биотина данные дрожжи осуществляли очень быстро. К тому же их биомасса нетоксична и может использоваться как кормовая добавка. В этой связи, казалось бы, достаточно насытить дрожжи биотином и проблема создания препарата решена. Однако, все оказалось не так просто. Выяснилось, что дрожжи не только поглощают биотин, но еще и разрушают его, поэтому часть витамина теряется. На первый взгляд казалось странным, что в природе существуют организмы, разрушающие столь ценное и достаточно химически стойкое соединение, но позже было установлено, что это вовсе не редкое явление. Так, одни штаммы разрушают биотин, если получают его в слишком большом количестве, потому что в высоких концентрациях он может быть для них токсичен, другие используют его не по назначению, а в качестве источника углерода и азота.

Таким образом, дрожжи рода *Trichosporon* на роль поглотителя биотина явно не подходили, поэтому пришлось продолжить поиск. Предположили, что более бережно будут относиться к витамину организмы, которые, сами не синтезируя витамина, нуждаются в его поступлении извне (ауксотрофы). Для этой цели были выбраны метилотрофные дрожжи, которые микробиологическая промышленность выращивает на метаноле. Они применяются в качестве белковой добавки к кормам животных. Эти дрожжи поглощают биотин лучше, чем дрожжи *Trichosporon*: 95 % биотина, находящегося в среде, переходит в их клетки всего за 20–30 мин. и при этом биотин остается в целостности и сохранности. Таким образом, метилотрофные дрожжи стали вторым компонентом биотинового препарата.

Схема получения биотина: на питательной среде, оптимизированной по составу, выращивают грибы рода *Rhizopus* (продуцент биотина). Затем биомассу гриба отфильтровывают, а к культуральной жидкости, в которую *Rhizopus* выделяет большое количество биотина, добавляют метилотрофные дрожжи, за короткое время поглощающие почти весь имеющийся в среде витамин. Смесь биомассы *Rhizopus* и дрожжей, богатая биотином, и представляет собой биотиновый препарат.

Первая партия продукта, полученная по описанной технологии на Серебрянопрудском биохимическом заводе, была испытана на одной из подмосковных птицефабрик. Цыплята, получившие здесь корм с добавкой биотинового препарата быстрее росли и меньше болели. Кроме того, данный препарат был испытан и в совсем другой области – при искусственном выкармливании личинок тутового шелкопряда специально составленными кормами. В результате было установлено, что в таких кормах при наличии, казалось бы, всех питательных веществ содержится очень мало биотина. Биотиновая недостаточность у шелкопряда приводит к тому, что у него нарушается липидный обмен, снижается содержание C<sub>18</sub>– жирных кислот, насекомые болеют и погибают. Поэтому в данном случае введение в корм биотинового препарата приносит немалую пользу.

Таким образом, можно сделать вывод, о том, что созданный биотиновый препарат найдет широкое применение, но для получения чистого биотина, его пока еще нельзя использовать. Точнее, невыгодно, потому, что для налаживания экономического биотехнологического производства чистого биотина необходимо, по крайней мере, в 100–150 раз увеличить выход целевого продукта, а это за пределами возможностей разработанного штамма продуцента. В этой связи, требуется изменение его генетики, что обычно достигается действием мутагенов. Однако в данном случае имеется одно трудно преодолимое препятствие. Для подобных манипуляций гриб (продуцент) не подходит, т.к. после отработки мутагеном популяцию микроорганизмов рассеивают на плотную питательную среду, чтобы получить отдельные колонии и отобрать среди них те, в

которых произошли нужные мутации, но *Rhizopus* не растет в виде отдельных колоний, а быстро занимает всю поверхность плотной среды, так, что обычный способ отбора мутантов в данном случае не подходит. Нельзя применить к *Rhizopus* и методы генетической инженерии, поскольку его генетика совсем не изучена.

В этой связи, в поисках пути получения чистого препарата биотина ученые сосредоточили свое внимание на другом биообъекте – бактерии *E. coli*, хорошо изученной в генетическом отношении. В настоящее время обнаружены несколько ее перспективных штаммов, у которых в результате мутации изменен и нарушен механизм управления синтезом биотина. Эти штаммы лишены внутренних тормозов, заставляющих обычные бактерии производить биотин очень экономно, и синтезирующих его бесконтрольно. Однако для того, чтобы довести выработку биотина бактериями до необходимого уровня, предстоит очень много работы, но уж очень заманчива эта цель: ведь микробиологического производства чистого биотина, так необходимого в медицинской практике, пока нигде в мире нет.

#### **10. Биотехнология витамина В<sub>3</sub>**

В основном в условиях промышленного производства пантотеновую кислоту получают методом химического синтеза. Наиболее важной коферментной формой витамина В<sub>3</sub> является коферментацелирование (КоА). Способностью продуцировать в значительных количествах КоА обладают многие микроорганизмы, в частности, актиномицеты. Активно внедряются в промышленное производство способы получения пантотеновой кислоты и ее структурных компонентов из  $\beta$ -аланина и пантотеата калия с помощью иммобилизованных клеток бактерий, а также достигнуты существенные успехи при получении КоА с использованием мутантных штаммов *Brevibacterium ammoniagenes*, которые позволяют КоА в количестве до 3 г на 1 л.

#### **11. Биотехнология витамина РР (никотиновая кислота)**

Одним из наиболее распространенных биотехнологических способов получения коферментной формы никотиновой кислоты – никотинамидадениндинуклеотида (НАД) является его выделение (экстракция) из микроорганизмов, как правило, из пекарских дрожжей. Для повышения содержания НАД в дрожжевых клетках культивирование проводят на средах с предшественниками синтеза никотиновой кислоты. Так, при добавлении в среды культивирования аденина или самой никотиновой кислоты получают до 12 мг НАД на 1 г клеток (по сухой массе). Использование мутантных штаммов *Brevibacterium ammoniagenes* с одновременным изменением проницаемости мембраны клеток микроорганизмов (коферменты через биомембраны не проникают) с помощью ПАВ (цетилсульфата натрия, цетилпиридина хлорида) позволяет получать НАД до 6 г/л.