

## Занятие семинарского типа № 5

**ТЕМА ЗАНЯТИЯ:** Биотехнология получения витаминных препаратов

### УЧЕБНЫЙ МАТЕРИАЛ

#### 1. Классификация продуктов биотехнологических производств

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

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

Первичные метаболиты – это низкомолекулярные соединения (мол. м. менее 1500 Да), необходимые для роста и развития микроорганизмов.

Одни из первичных метаболитов являются строительными блоками макромолекул, другие участвуют в биосинтезе коферментов.

Среди наиболее важных для производства первичных метаболитов выделяют: аминокислоты, органические кислоты, пуриновые и пиримидиновые нуклеотиды, растворители и витамины.

Первичные метаболиты, как правило, накапливаются в логарифмической фазе роста микроорганизмов. При этом 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 первичных метаболитов.

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

#### 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. Однако в настоящее время созданы и создаются штаммы с нарушением регуляции биосинтеза данных метаболитов, являющиеся основой для биотехнологических производств.

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

Основными путями нарушения регуляции обменных процессов, протекающих в клетке, являются:

- ✓ изменения генетической программы организма;
- ✓ 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 традиционные 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. Несмотря на трудоемкость, в настоящее время методы селекции не утратили своей актуальности при создании высокопродуктивных штаммов продуцентов.

Достижения в области молекулярной биологии и 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 тремя основными механизмами:

- ✓ регуляция активности ферментов, в том числе и путем ретроингибирования;
- ✓ регуляция объема биосинтеза 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 является способом точного и быстрого регулирования образования продукта.

Следует отметить, что на обмен веществ, аналогичный конечным метаболитам, оказывают эффект и их аналоги.

Среди многих тысяч ферментов, присущих микроорганизмам, одни (ферменты гликолиза) синтезируются постоянно и их образование не зависит

от состава среды (конститутивные ферменты), а другие ферменты (адаптивные или индуцибельные) возникают только в ответ на появление в среде индукторов (субстратов или их структурных аналогов).

Регуляция объема биосинтеза ферментов осуществляется на оперонном 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 препятствует взаимодействию белка-репрессора с зоной оператора, что обеспечивает возможность присоединения к промотору РНК-полимеразы и, следовательно, начало биосинтеза.

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, уреазы и др.).

Проведенные исследования продемонстрировали, что репрессия биосинтеза ферментов обеспечивает более грубую, в сравнении с ретроингибированием, регуляцию образования анаболических ферментов.

В случае, 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.

В этой связи, ведущими механизмами, обеспечивающими экономичность образования продукта в клетках микроорганизмов, является ретроингибирование и репрессия, базирующиеся на принципе обратной связи.

Если в среде присутствуют несколько разных источников углерода, клетка 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 (лат. *vita* – жизнь) – группа низкомолекулярных органических соединений относительно простого строения и разнообразной химической природы.

Витамины участвуют во множестве биохимических реакций, выполняя каталитическую функцию в составе активных центров большого числа различных ферментов, или выступая информационными регуляторными посредниками, выполняя сигнальные функции экзогенных прогормонов и гормонов.

Витамины не являются для организма поставщиком энергии.

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 счет деятельности бактерий, и витамин В<sub>3</sub>, синтезируемый бактериями кишечника из триптофана.

С нарушением поступления витаминов в организм связаны три принципиальных патологических состояния:

- ✓ недостаток витамина – гиповитаминоз;
- ✓ отсутствие витамина – авитаминоз;
- ✓ избыток витамина – гипервитаминоз.

В настоящее время 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, причем их депо являются жировая ткань и печень.

Водорастворимые витамины в больших количествах не депонируются и при избытке выводятся с водой.

Все это объясняет то, что гиповитаминозы довольно часто встречаются относительно водорастворимых витаминов, а гипервитаминозы чаще наблюдаются относительно жирорастворимых витаминов.

## Классификация витаминов

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

Представители жирорастворимых витаминов, выполняя функцию индукторов биосинтеза белков, проявляют сходство со стероидными гормонами. Все жирорастворимые витамины являются структурными компонентами клеточных мембран, проявляя антиоксидантное действие.

Широкое распространение полигиповитаминозов, снижение резистентности организма к болезнетворным микроорганизмам, сопровождающееся вредными экологическими факторами – повышает роль витаминов в профилактической и лечебной работе врачей, поэтому в экономически развитых странах стали реализовываться государственные программы искусственной витаминизации пищевых продуктов.

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 реакционноспособные 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 и 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-фосфоэтаноламина и др.). Уридиловые 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 никотинамидрибонук-

леотида, 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 ими важной биологической функции в процессе клеточного дыхания. Окислительно-восстановительные реакции, протекающие с участием никотинамидных коферментов, могут быть изображены в виде общего уравнения:



где  $\text{АН}_2$  – восстановленная форма субстрата;

$\text{А}$  – окисленная форма субстрата.

Обнаружено около 350 НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ, 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), а 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. Определение данных коферментов производят обычно спектрофотометрически (по характерному поглощению окисленных форм при длинах волн 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. В окисленном состоянии флавиновые коферменты имеют интенсивный желтый цвет, в восстановленном состоянии они бесцветны. ФМН и ФАД 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. Определение флавиновых коферментов проводят спектрофотометрически или флюориметрически в характерных для них областях поглощения.

Кофермент А (КоА, коэнзим А) – соединение аденозин-3',5'-фосфорной кислоты и  $\beta$ -меркаптоэтиламида пантотеновой кислоты, образующее с остат-

ками органических кислот (R) тиоэферы типа R-CO-SKoA. 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, биосинтезе стероидов. Для нормального биосинтеза 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>) –  $\alpha$ -(5,6-диметилбензимидазолил)-кобаламинцианид является коферментом ферментов, участвующих в переносе одноуглеродных фрагментов, обмене метионина и др. Недостаток в рационе витамина В<sub>12</sub>, вызывающий в организме дефицит кофермента В<sub>12</sub>, клинически проявляется мегалобластной гиперхромной анемией, ее нутритивной В<sub>12</sub>-дефицитной формой. Эндогенная недостаточность витамина В<sub>12</sub>, вследствие нарушения его всасывания в кишечнике, 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 (реакции 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, представляет собой производное витамина В<sub>1</sub> (тиамина).

Менее распространены коферменты пептидной природы, важнейшим представителем которых является глутатион – *v*-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 двух молекул восстановленного глутатиона (Г—S—S—Г). 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 заболеваний, в том числе и наследственные гемолитические анемии. Определение глутатиона осуществляют колориметрически и ферментативными методами с участием глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы.

Липоевая (тиоктовая) кислота – насыщенная серосодержащая жирная кислота, входящая в качестве одного из коферментов в состав мультифер-



ментных комплексов, осуществляющих декарбоксилирование  $\alpha$ -кетокислот (пировиноградной и  $\alpha$ -кетоглутаровой кислот). Она выполняет роль промежуточного акцептора водорода и кислотных остатков за счет способности к обратимому восстановлению (переход  $S-S \rightarrow SH$ ).

Витамины К – жирорастворимые соединения, производные нафтохинона, выполняющие роль коферментов в реакциях системы свертывания крови. Их водорастворимый аналог (викасол) применяют 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 биосинтеза 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 способами:

✓ Экстракция витаминов из растительного и животного сырья. С этого направления начиналась витаминное производство. Так, витамин В<sub>12</sub> получали из сырой печени крупного рогатого скота, каротин – из моркови и т.п. Однако, в настоящее время количество витаминов, получаемых данным способом, незначительно в виду очень низкого их содержания в природном сырье и ограниченности сырьевых ресурсов.

✓ Химический синтез витаминов. Производство синтетических витаминов занимает ведущее место в современном витаминном производстве, т.к. основная номенклатура витаминов представлена веществами, полученными химическим синтезом из химического сырья или сочетанием химического и биологического синтеза. Однако, такой способ производства витаминов представляет собой сложный, многоступенчатый процесс, сопряженный со значительными производственными затратами, что удорожает стоимость конечных продуктов.

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

Следует отметить условность приведенной классификации основных способов получения витаминов. Производство некоторых витаминов (например, аскорбиновой кислоты) включает химические стадии и стадии био-

трансформации. Витамин рибофлавин получают синтетическим и микробиологическим путями. Некоторые витамины (например, 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 их крупномасштабного производства, поэтому возникла необходимость в более доступных способах их получения. Таким способом оказался микробиологический синтез витаминов.

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

Продукцию микроорганизмами отдельных витаминов можно увеличить, изменяя состав среды культивирования. Так, например, количество витамина В<sub>12</sub> в биомассе дрожжей зависит от интенсивности аэрации и содержания железа в питательной среде. Кроме того, 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 В<sub>6</sub>.

## 5. Биотехнология витамина В<sub>2</sub>

Витамин В<sub>2</sub> (рибофлавин) 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, биосинтезе белков и липидов, регулировании состояния нервной системы, функции печени.

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

В<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, главным образом, получали из природного сырья. В наибольшей концентрации он присутствует в моркови и печени трески. Так, из 1 т моркови можно выделить лишь 1 г рибофлавина, а из 1 т печени – 6 г.

В 1935 г. обнаружен активный продуцент рибофлавина – *Eremothecium ashbyii*, способный при выращивании на 1 т питательной смеси синтезировать 25 кг витамина.

Сверхсинтеза рибофлавина добиваются воздействием на дикие штаммы мутагенов, нарушающих механизм ретроингибирования биосинтеза витамина флавиновыми нуклеотидами, а также изменением состава культуральной

среды. Отбор мутантов проводят по устойчивости к аналогу витамина В<sub>2</sub> – розеофлавиону.

Для получения витамина В<sub>2</sub> можно также использовать культуру дрожжей, ацетобутиловые бактерии, продуцент лизина *Brevibacterium* и др.

Технология получения кормового препарата витамина В<sub>2</sub> микробиологическим способом довольно проста. При реализации данной технологии в качестве продуцента обычно используют *E. ashbyii*. В целом технологический процесс производства кормового препарата витамина В<sub>2</sub> микробиологическим способом включает три основные стадии:

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

Посевной материал и стерильный воздух получают по типовой для многих микробиотехнологических 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>). Кроме того, продуцент витамина В<sub>2</sub> выращивают и на средах, в которых источником углерода является глюкоза, сахароза, крахмал или 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.

Культивирование продуцента витамина В<sub>2</sub> проводят поверхностным или глубинным способами. Витамин В<sub>2</sub> накапливается в клетках продуцента в виде предшественника – флавинадениннуклеотида или в свободном состоянии. Время культивирования составляет 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 его систематический рассев на плотные питательные среды и отбирать колонии, наиболее интенсивно окрашенные в оранжевый цвет, так как яркая окраска колоний коррелирует с высокой способностью к биосинтезу рибофлавина.

В инокуляторе культуру продуцента выращивают в течение 21–26 ч, затем ее переводят в биореактор со средой, содержащей кукурузную и соевую муку, кукурузный экстракт, свекловичный сахар, КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub>, СаСО<sub>3</sub>, NaCl и технический жир.

Среду стерилизуют в смесителе при температуре 120–122 °С в течение 1 ч. Культивирование в биореакторе проводят до начала лизиса клеток и появления спор. Температура культивирования составляет 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.

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

Кормовой концентрат витамина В<sub>2</sub> представляет собой обработанную, высушенную, размолотую или гранулированную биомассу продуцента *E. ashbyii*, содержащую не менее 15 мг рибофлавина на 1 г вещества. Помимо витамина В<sub>2</sub> концентрат содержит 0,3–0,5% других витаминов группы В (В<sub>1</sub>, В<sub>6</sub>, В<sub>12</sub>), 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 В<sub>2</sub> иллюстрируют следующие цифры: из 1 т моркови получают 1 г, из 1 т тресковой печени – 6 г, а из 1 т культуральной жидкости *E. ashbyii* – 25 кг целевого продукта (витамина В<sub>12</sub>).

Кроме того, разработан и другая схема получения витамина В<sub>2</sub>, согласно которой в качестве посевного материала используются споры *E. ashbyii*, выращенные на пшенице. 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 сут. инкубируют при температуре 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 температуре 28–30 °С в течение 72 ч. При этом через каждые 8 ч отбирают пробы для контроля за развитием продуцента, составом питательной среды и накоплением целевого продукта. Культуральная жидкость после окончания ферментации содержит 1,4 мг/мл рибофлавина.

В целях стабилизации витамина В<sub>2</sub>, в процессе его сушки культуральную жидкость подкисляют соляной кислотой до значения рН 4,5–5,0. 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 биосинтез рибофлавина. Клонированием генов рибофлавинового оперона в одной из созданных плазмид был получен производственный штамм продуцента 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 С

Витамин С (аскорбиновая кислота) представляет собой группу соединений – производных L-(+)-гулоновой кислоты.

Витамин С обнаружен у всех высших растений и животных, только человек и микроорганизмы его не синтезируют. Он необходим человеку для нормальной 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. Стадия биотрансформации D-сорбита в L-сорбозу реализуется с помощью ацетатных бактерий.

Для получения сорбозы используют глубинную ферментацию, при которой культуру продуцента *Gluconobacter oxydans* выращивают в ферментере с периодическим режимом культивирования, снабженного с мешалкой и барботером для усиления аэрации и массообмена, в течение 20–40 ч. При этом результат по выходу сорбозы до 98% исходного количества сорбита в среде. Обычно для достижения такого высокого выхода целевого продукта в среду вносят кукурузный или дрожжевой экстракт в количестве 20%.

По окончании процесса ферментации сорбозу выделяют из культуральной жидкости.

Кроме оптимизации питательной среды можно совершенствовать и технологическую аппаратуру. Так, переход от периодического режима 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 технологию получения аскорбиновой кислоты, сокращая многоэтапные и дорогостоящие химические стадии. Так, синтез витамина С осуществляют енолизацией его важнейшего промежуточного продукта – 2-кето-L-гулоновой кислоты, которую 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% 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 поверхностно-активные вещества (ПАВ), что позволяет значительно сократить потери при получении гулоновой кислоты.

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

## 7. Биотехнология витамина D

Витамины группы D представляют собой группу родственных соединений, обладающих антирахитичным действием, основы химической структуры которых составляет эргостерин, обнаруженный в клеточных мембранах эукариот.

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 воздействием окислителей и минеральных солей.

Витамин D<sub>2</sub> производят путем микробиологического синтеза при выращивании микроорганизмов на углеводородном сырье. Предшественником жирорастворимого витамина D<sub>2</sub> является эргостерин. При УФ обработке дрожжевой суспензии или сухих дрожжей 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.

Производственными продуцентами эргостерина являются дрожжи и плесневые грибы. Наибольшее количество эргостерина присутствует в пекарских дрожжах (до 10%). Обнаружено, что полиеновые антибиотики, действующие на клеточную мембрану дрожжей, заметно стимулируют их со-

держание в биомассе. В табл. 2 представлены основные микроорганизмы – продуценты эргостерина.

Таблица 2

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 gluinis</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 получения эргостерина в основном используют дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*. В анаэробных условиях культивирования происходит накопление в клетках дрожжей сквалена (предшественника эргостерина).

Индукция биосинтеза эргостерина начинается при строго определенной концентрации кислорода (0,03–2%). При этом питательная среда должна содержать избыток углеводов и небольшое количество азота. По окончании спиртового брожения дрожжи отделяют от барды и вносят в среду необходимое количество источников углерода, азота и фосфора. Ферментацию осуществляют в аэробных условиях в течение 12–20 ч.

После ее завершения клетки дрожжей отделяют от культуральной жидкости, добавляют антиоксиданты и сушат. Обычно в полученной биомассе содержание эргостерина достигает 1,5%. При дальнейшем облучении эргостерина УФ светом получают витамин D<sub>2</sub>, который используется в качестве пищевой добавки 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. При этом полученная липидная фракция называется «микробный жир» и является побочным продуктом микробиологического производства. Данная фракция может быть использована в качестве источника получения не только эргостерина, но и убихинона, а также других жирорастворимых соединений.

Для грибов рода *Candida* характерно, что при переходе от периодического способа культивирования на углеводородах к непрерывному режиму в клетках сохраняется 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 ферментативным путем (автолиз). Гидролиз осуществляется при температуре 105 °С в течение 20–30 мин. Полученный гидролизат обрабатывают спиртом при температуре 75–78 °С в течение 40–50 мин. в коагуляторе. Полученную массу охлаждают до температуры 10–15 °С и фильтруют. Фильтрат концентрируют, отделяя спирт и часть воды, получают концентрат витаминов группы В, содержащий 50% сухих веществ.

Осадок после фильтрования промывают водой, отгоняют спирт и воду. Полученную пасту сушат до остаточной влажности 2% и измельчают.

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. Концентрат омыляют щелочью. Затем раствор кристаллизуют при температуре 0 °С. Выпавший осадок с целью дополнительной очистки растворяют в спирте или бензоле. Выпавшие кристаллы сушат в эфире. Чистый препарат эргостерина облучают УФ лучами с целью получения витамина D<sub>2</sub>.

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

## 8. Биотехнология витамина Н

Витамин Н является кофактором большого числа ферментов. Это означает, что только в соединении с биотином белковые молекулы ферментов обретают каталитическую активность и получают возможность реализовывать свою каталитическую функцию. При его отсутствии многие важные процессы в клетке прекращаются.

Человека обеспечивают определенным количеством биотина микроорганизмы, обитающие в кишечнике. Кроме того, он поступает в организм человека вместе с пищей (яичный желток, дрожжи, цветная капуста). Однако, при нарушении естественной микрофлоры кишечника (в результате 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, связывающий 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.

Биотин необходим некоторым видам микроорганизмов, не способным его самостоятельно вырабатывать. К ним, в частности, относится *Corinebac-*



*terium*, широко применяющаяся в микробиологическом производстве для биосинтеза незаменимой аминокислоты лизина.

Промышленное производство данного витамина в нашей стране пока не налажено. В этой связи, практическое применение биотина сильно ограничено. Получать биотин из природных источников невыгодно, т.к. для выделения 1 мг витамина необходимо переработать почти 230 кг сухого яичного желтка.

Кроме того, разработаны методы его химического синтеза. Однако, данным способом удается получить всего несколько сотен граммов витамина в год, а потребность в нем в тысячи раз выше. Помимо этого, при химическом синтезе образуется смесь изомеров, которую приходится разделять для получения активного D-биотина.

Остается еще один путь получения биотина – микробиологический синтез. Основным ограничением данного способа его получения является 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 исследовано большое количество штаммов плесневых грибов, дрожжей, грибов, актиномицетов. Однако большинство из них оказались неподходящими продуцентами: бактерии ведут очень экономный образ жизни, строго контролируют свои затраты, поэтому лишнего биотина почти не производят. В этом отношении более перспективными оказались грибы, особенно те растущие 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 культуральной среды и большую его часть выделяет в среду.

Следующей проблемой, связанной с получением биотина микробиологическим способом, является проблема масштабирования. В ходе отбора продуцентов было обнаружено, что многие штаммы микроорганизмов активно поглощают биотин из окружающей среды, накапливая его в своих клетках. Особенно в этом отношении выделяются дрожжи рода *Trichosporon*. Даже их небольшое количество за 1 ч аккумулирует 60% биотина, содержащегося в культуральной жидкости. Кроме того, дорогостоящий процесс концентрирования сильно разбавленного раствора биотина данные дрожжи осуществляют очень быстро. К тому же их биомасса нетоксична и может использоваться в качестве кормовой добавки. В этой связи, казалось бы, достаточно насытить дрожжи биотином и проблема создания кормового препарата витамина решена. Однако, все оказалось не так просто. Выяснилось, что дрожжи не только поглощают биотин, но еще и его разрушают, 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 его не синтезируя, нуждаются в его поступлении извне (ауксотрофы). Для этой цели были выбраны метилотрофные дрожжи, выращиваемые на метаноле. Они применяются в качестве белковой добавки к кормам животных. Данные дрожжи поглощают биотин лучше, чем дрожжи *Trichosporon*: 95% биотина, находящегося в культуральной среде, переходит в их клетки всего за 20–30 мин. При этом биотин ими не разрушается. Таким образом, метилотрофные дрожжи стали вторым компонентом биотинового препарата.

В целом схема получения биотина выглядит следующим образом: на питательной среде, оптимизированной по составу, выращивают грибы рода *Rhizopus* (продуцент биотина). Затем биомассу гриба отфильтровывают, а в 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 в комплексе представляет собой биотиновый препарат.

Первая партия продукта, полученная по описанной технологии на Серебрянопрудском биохимическом заводе, была испытана на одной из подмосковных птицефабрик. Цыплята, получившие корм с добавкой биотинового препарата, быстрее росли и меньше болели.

Кроме того, данный препарат был испытан и в 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 весьма эффективно введение в корм биотинового препарата.

Таким образом, можно сделать вывод, о том, что разработанный биотиновый препарат найдет широкое практическое применение, но для получения чистого биотина, его пока еще нельзя использовать. Точнее, невыгодно, потому, что для налаживания экономичного 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 воздействием мутагенов. Однако в данном случае имеется одно труднопреодолимое препятствие. Для подобных манипуляций продуцент грибного происхождения 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. В этой связи, обычный способ отбора мутантов не подходит. Нельзя применить к *Rhizopus* и методы генетической инженерии, поскольку его генетика совсем не изучена.

В этой связи, в поисках пути получения чистого биотина ученые сосредоточили свое внимание на другом биологическом объекте – *E. coli*, хорошо изученной в генетическом отношении. В настоящее время обнаружены несколько перспективных штаммов кишечной палочки, у которых в результате мутации изменен и нарушен механизм управления биосинтезом биотина. Данные штаммы лишены внутренних тормозов, заставляющих обычные бактерии производить биотин очень экономно, и синтезирующих его бесконтрольно. Однако для того, чтобы довести выработку биотина бактериями до нужного уровня, предстоит очень большая работа.

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

В условиях промышленного производства пантотеновую кислоту получают методом химического синтеза. Наиболее важной коферментной формой витамина В<sub>3</sub> является коферментацетилированная (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.

## **10. 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 питательных средах с предшественниками биосинтеза 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.

## 11. Общая характеристика каротиноидов

Каротиноиды представляют собой желтые, оранжевые, красные или коричневые пигменты, сильно поглощающие в сине-фиолетовой области. Обычно они «замаскированы» зелеными хлорофиллами. Они хорошо выявляются перед листопадом, т.к. хлорофиллы в листьях распадаются первыми. Каротиноиды содержатся также в хромопластах некоторых цветов и плодов, яркая окраска которых служит для привлечения насекомых, птиц и других организмов, участвующих в опылении цветов или распространении семян.

По химической природе каротиноиды относятся к группе тетратерпенов. Они имеют в своей структуре изопреновую цепь, состоящую из четырех бутadiеновых остатков, разделенных в середине  $\text{CH}=\text{CH}$  – группой, и одного или двух циклогексеновых  $\beta$ -иононовых кольца на концах цепи.

Каротиноиды подразделяются на каротины (ненасыщенные углеводороды) и ксантофиллы (кислородсодержащие каротиноиды, содержащие гидроксид-, метокси-, кето-, карбокси- и эпоксигруппы).

Каротиноиды синтезируются многими пигментными микроорганизмами из рода *Aleuria*, *Blakeslea*, *Corynebacterium*, *Flexibacter*, *Fusarium*, *Halobacterium*, *Phycomyces*, *Pseudomonas*, *Rhodotorula*, *Sarcina*, *Sporobolomyces*, а также грибами, бактериями, высшими растениями, тогда как животные их не образуют. Всего в настоящее время описано около 500 каротиноидов.

Природные источники каротиноидов очень разнообразны: травы и зеленые листья, пыльца цветковых растений, лепестки цветов, водоросли, корни, зерна и плоды растений, микроорганизмы и некоторые виды рыб. Многие из них могут быть использованы, а некоторые уже довольно широко используются, для получения разных пищевых добавок и препаратов с А-витаминной активностью.

В странах с тропическим климатом источником получения каротиноидсодержащих продуктов служат красное пальмовое масло и клубни батата. Довольно богаты каротиноидами плоды цитрусовых, абрикосы, хурма.

Из источников, присущих средним широтам, можно выделить плоды моркови, тыквы, томатов, сладкого перца, облепихи, шиповника, рябины. Значительный интерес для создания профилактических и лекарственных средств на основе природного сырья, богатого каротиноидами, представляют плоды шиповника (*Rosa canina*).

Отечественной фармацевтической промышленностью выпускается масло шиповника, содержащее не менее 60 мг% каротиноидов. Однако источником его получения служат семена, а богатая каротиноидами мякоть плодов используется только для получения сиропа, содержащего комплекс гидрофильных БАВ и богатого аскорбиновой кислотой. При этом липофильные вещества, к которым относятся и каротиноиды, остаются в неиспользованном отходе. В связи с этим, представляется целесообразным комплексный подход к переработке данного вида растительного сырья.

Кроме того, ценным каротиноидсодержащим препаратом является масло из плодов облепихи (содержит не менее 180 мг% каротиноидов). Однако, как

и масло из семян шиповника, оно легко подвергается окислению при контакте с кислородом воздуха, а разлитое во флаконы не всегда удобно для дозирования.

Плоды рябины, и прежде всего рябины черноплодной (*Aronia melanocarpa*), как богатый каротиноидами природный сырьевой источник, используются незначительно.

Определенные сложности в разработке лекарственных форм с каротиноидами вызывает их лабильность. Под воздействием неблагоприятных факторов окружающей среды (кислород воздуха, свет, перепады температур, химические реагенты) они легко окисляются и разрушаются. Создание каротиноидсодержащих препаратов в такой лекарственной форме, как желатиновые капсулы, позволяет свести к минимуму данную проблему. Данная лекарственная форма удобна с учетом того, что каротиноиды относятся к липофильным соединениям, растворимым в маслах, проявляя в масляных растворах наибольшую фармакотерапевтическую активность.

Каротиноиды локализуются в виде сложных эфиров и гликозидов в клеточной мембране микроорганизмов или в свободном состоянии – в липидных гранулах в цитоплазме.

Для растений фундаментальное значение имеет функция каротиноидов, связанная с процессом фотосинтеза, ставшим основой жизни на Земле. Растения абсорбируют энергию солнечного света, благодаря чему синтезируют из углекислого газа и воды органические вещества, которые являются основой как животной, так и человеческой пищевой цепи. В процессе фотосинтеза производится кислород, образующий кислородную атмосферу, в которой большинство органических молекул могли быстро разрушаться, если бы не были защищены от подобных побочных эффектов. Ключевая роль в предотвращении негативных проявлений таких процессов (например, индуцирование энергии и защита органических молекул от разрушения окислением) принадлежит каротиноидам. Каротиноиды, как светопоглотители, разделяют с хлорофиллом ключевую роль в энергетическом метаболизме высших растений. Они, поглощая свет, трансформируют захваченную световую энергию в реакционные центры пигментов, в которых она преобразуется в электрическую, а затем в химическую в форме АТФ, пригодную для биосинтеза различных соединений.

Не менее значима и мембраностабилизирующая функция каротиноидов, что исключительно важно для жизни в кислородной атмосфере.

Каротиноиды вовлекаются в различные защитные механизмы:

✓ благодаря наличию сопряженных двойных связей, они могут связывать синглетный кислород и ингибируют образование свободных радикалов, предупреждая их негативное воздействие на организм;

✓ обеспечивают защиту от УФ излучения, т.к. могут трансформировать энергию УФ излучения в видимый свет, что проявляется в явлении флуоресценции (свечение пыльцы некоторых цветковых растений, спор грибов и водорослей и т.д.);

✓ выступают в роли антиоксидантов, защищая чувствительные ткани и лабильные соединения от окисления.

Одной из важнейших функций каротиноидов является А-провитаминная активность. Животные и человек не способны синтезировать витамин А, являющийся незаменимым для зрения, роста, репродукции, защиты от различных бактериальных и грибковых заболеваний, нормального функционирования кожи и слизистых. Витамин А не образуется и в растительных тканях. Он может быть получен только путем преобразования провитамин А активных каротиноидов ( $\beta$ - и  $\alpha$ -каротины, криптоксантин, 3,4-дигидро- $\beta$ -каротин, астаксантин, кантаксантин и др.).

Кроме того, представляет интерес влияние каротиноидов на эндокринную систему, особенно это касается полового развития и созревания, оплодотворения, прохождения репродуктивных процессов.

Еще одной важной функцией каротиноидов является способность образовывать комплексы с протеинами. Известно, что аллостерические эффекторы изменяют агрегационное состояние протеинов, тем самым, стабилизируя их протеиновую и ферментативную активность. Данная способность также обуславливает изменения проницаемости мембран.

Каротиноиды могут косвенно поддерживать водный баланс организма, способствуют работе обонятельных рецепторов и хеморецепторов.

Считается, что каротиноиды (ксантофилы) используются в качестве запаса кислорода в нейрональной дыхательной цепочке, поэтому они важны в кислородных клетках и тканях.

Учитывая существующую взаимосвязь между высокой каротиноидной и кальциевой концентрацией, в особенности в компонентах митохондрий с каротиноидсодержащими мембранами, можно заключить, что данные липохромы играют большую роль в транспорте кальция через мембраны.

Кроме того, установлена иммуностимулирующая роль каротиноидов. Так, обнаружено, что рыбы с высоким содержанием каротиноидов значительно более устойчивы к инфекционным и грибковым заболеваниям, цыплята – устойчивы к энцефалопатии и т.д.

Каротиноиды увеличивают цитостатическую активность клеток-киллеров, замедляют рост опухоли и ускоряют процесс заживления ран.

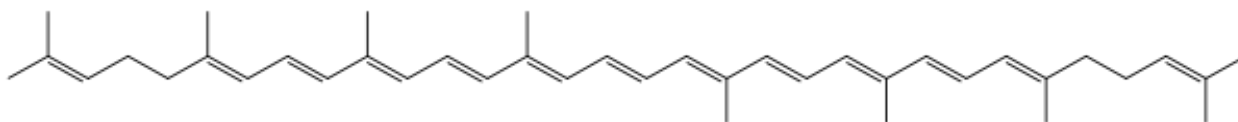
Важной функцией каротиноидов является их способность обеспечивать яркую окраску организмов, которая может выполнять сигнальную функцию, нести информацию:

- ✓ цветооповещающие реакции могут действовать как приманка, предупреждение или защита;
- ✓ могут являться выражением настроения;
- ✓ могут служить сигналом для определенного комплексного внутривидового поведения.

Отмечено, что продукты разложения каротиноидов обладают специфическими физиологическими функциями, например, они участвуют в биосинтезе фитогормонов.

## Каротины

Каротины (лат. *carota* – морковь) – углеводороды, большую часть которых составляют тетратерпены (C<sub>40</sub>-соединения).



Каротины принадлежат к биологически активным растительным пигментам желтого, оранжевого, красного цвета.

По химической природе каротины относятся к жирорастворимым полиненасыщенным углеводородам терпенового ряда (C<sub>40</sub>H<sub>56</sub>), являющиеся продуктами полимеризации изопрена.

Каротин обладает биологической активностью провитамина А, участвует в защите клеток от разрушительного воздействия света, в процессе зрения, а также в переносе энергии в процессе фотосинтеза.

В организме каротин находится в свободном виде или в виде комплекса с белками (хромопротеины).

$\beta$ -Каротин используется организмом человека для биосинтеза витамина А. Кроме того, он проявляет выраженное антиоксидантное действие, обусловленное наличием системы сопряженных двойных связей, способствует снижению риска развития онкологических и других заболеваний, возникающих в связи с повышенной экологической нагрузкой на человека, активизирует функции лейкоцитов и, тем самым, способствует профилактике инфекционных и простудных заболеваний, улучшает работу иммунной и репродуктивной систем организма, эффективен при гастрите, язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки, способствует быстрому заживлению ран и выздоровлению после оперативных вмешательств. Установлено, что  $\beta$ -каротин обладает радиопротекторными свойствами, а также усиливает терапевтическое воздействие некоторых противоопухолевых препаратов.

1 мг  $\beta$ -каротина по эффективности эквивалентен 0,17 мг витамина А, т.е. эффективность  $\beta$ -каротина в 6 раз меньше, но вместе с тем он, как уже отмечалось выше, обладает рядом специфических функций, имеющих важное значение в поддержании здоровья.

Центральной функцией каротинов в организме млекопитающих является его функция провитамина А. Все изомеры каротина ( $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -каротины) обладают активностью провитамина А. Однако,  $\beta$ -каротин наиболее эффективен в качестве провитамина А, поскольку из него образуется 2 молекулы витамина А, тогда как из  $\alpha$ - и  $\gamma$ -каротинов образуется всего лишь по одной молекуле витамина А.

Активность витамина А измеряется Международными единицами (МЕ). Биологическая активность 1 МЕ витамина А эквивалентна биологической активности 0,6 мкг  $\beta$ -каротина. Данный изомер каротина широко распространен в растениях, животных и микроорганизмах.  $\alpha$ -Каротин часто сопутствует  $\beta$ -каротину. Так, например, в моркови содержится 85%  $\beta$ -каротина и 15%  $\alpha$ -каротина.

Человек и животные не способны синтезировать каротины, однако они могут метаболизировать экзогенный каротин.

В организм человека, главным образом, поступает каротин растительного происхождения.

Превращение каротинов в витамин А осуществляется в кишечнике под действием диоксигеназы. Образующийся вначале альдегид ретиналь, затем восстанавливается в ретинол в присутствии НАД·Н или НАДФ·Н. Усвоение каротина происходит при условии достаточного количества желчи, активной липазы и антиоксидантов (витаминов Е, С и др.), предохраняющих каротины от окисления.

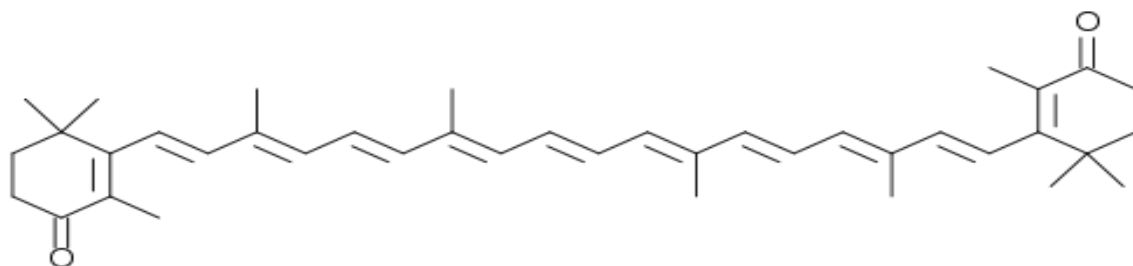
Следует отметить, что дети усваивают каротины хуже, чем взрослые.

В слизистой оболочке кишечника ретинол образует сложные эфиры с жирными длинноцепочечными кислотами, которые адсорбируясь на хиломикронах, транспортируются по лимфатической системе в печень, являющейся основным депо витамина А. Многие ткани содержат эфиры ретинола с жирными кислотами. В плазме крови человека ретинол находится в комплексе со специфическим ретинол-связывающим белком, относящимся к  $\alpha$ -глобулинам, концентрация которого в плазме крови составляет 4–5 мг/100 мл. Содержание каротина в плазме крови зависит от его поступления с пищей и составляет 80–320 мкг/100 мл, в плацентарной крови – 90 мкг/100 мл, в пуповинной крови – 90 мкг/100 мл. Содержание каротина в грудном молоке ниже, чем в крови. Концентрация каротина в крови резко снижается при родах (8–30 мкг/100 мл) и некоторых заболеваниях (спру, экземе и др.). Повышение содержания каротина в плазме крови (свыше 400 мкг/100 мл) в результате избыточного поступления каротина с пищей (каротинемия) приводит к окрашиванию плазмы крови и отдельных участков кожи в желто-оранжевый цвет. Депонирование каротинов в эпидермисе называют псевдожелтухой, каротинозом, каротинодермией и т.д. Каротинемия отмечается при острых поражениях печени, сахарном диабете и т.п.

Специфического метода определения содержания каротинов в биологических жидкостях в клинической практике не существует. Суммарно каротины и витамин А можно определить с помощью реакции Карра-Прайса: к растворенной в хлороформе пробе биологической жидкости добавляют 30%-ный раствор треххлористой сурьмы в хлороформе, и по интенсивности образовавшейся синей окраски, прямо пропорциональной содержанию каротинов в растворе, определяют их концентрацию. Для реализации данного способа определения используют колориметрический метод (совокупность методов качественного и количественного анализа по интенсивности инфракрасного, видимого и ультрафиолетового излучения).



## Ксантофиллы



Ксантофиллы – природные пигменты из группы каротиноидов, представляющие собой кислородсодержащие производные каротинов.

Известно более 50 различных ксантофиллов с различными функциональными группами (спирты, кетоны и др.), относящихся к ациклическим, моноциклическим и бициклическим каротиноидам.

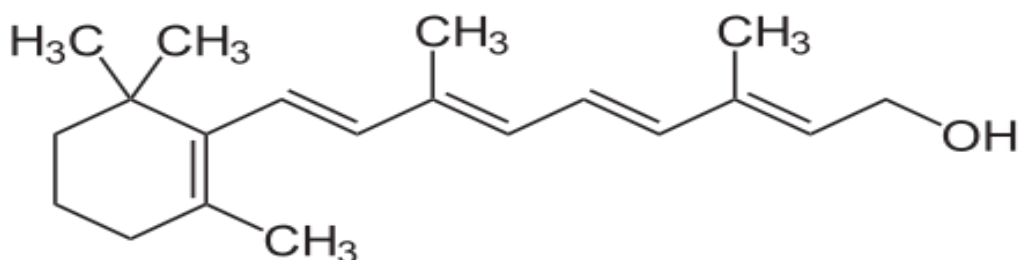
Ксантофиллы содержатся в листьях, цветах, плодах и почках высших растений, а также во многих водорослях и микроорганизмах.

Ксантофиллы в сочетании с флавоноидами определяют осеннюю окраску листьев. Они участвуют в фотосинтезе в качестве дополнительных пигментов. Получены данные о том, что ксантофиллы реализуют функцию светофильтров, защищающих чувствительные к свету ферменты от разрушения.

## 12. Витамин А

Витамин А открыт в 1913 г. двумя независимыми группами ученых (Мак-Коллут – Дэвис и Осборн).

По химической природе витамин А представляет собой группу соединений, являющихся производными  $\beta$ -иона.



Витамин А участвует в окислительно-восстановительных процессах, регуляции биосинтеза белков, способствует нормальному обмену веществ, функции клеточных и субклеточных мембран, играет важную роль в формировании костей и зубов, а также жировых отложений. Он необходим для роста новых клеток, а также замедляет процесс старения.

Витамин А поддерживает ночное зрение за счет образования пигмента, называемого родопсин, способного улавливать минимальный свет. Кроме то-

го, он способствует увлажнению глаз (особенно уголков), предохраняя их от пересыхания и травмирования роговицы.

Данный витамин необходим для обеспечения нормального функционирования иммунной системы и является неотъемлемой частью процесса борьбы с инфекцией. Его применение повышает барьерную функцию слизистых оболочек, увеличивает фагоцитарную активность лейкоцитов и других факторов неспецифического иммунитета. Витамин А защищает от простуд, гриппа и инфекций дыхательных путей, пищеварительного тракта, мочевых путей. Его наличие в крови является одним из главных факторов, ответственных за то, что дети в более развитых странах гораздо легче переносят такие инфекционные заболевания, как корь, ветряная оспа, тогда как в странах с низким уровнем жизни намного выше смертность от этих вирусных инфекций. Обеспеченность витамином А продлевает жизнь даже больным СПИД.

Ретинол нужен для поддержания и восстановления эпителиальных тканей, из которых состоят кожа и слизистые покровы. Практически во всех современных косметических средствах содержатся ретиноиды (его синтетические аналоги). Кроме того, витамин А применяется при лечении практически всех заболеваний кожи (акне, прыщи, псориаз и др.). При повреждениях кожи (раны, солнечные ожоги) он ускоряет процессы заживления, стимулирует биосинтез коллагена, улучшает качество вновь образующейся ткани и снижает опасность инфекций.

Витамин А, ввиду своей тесной взаимосвязи со слизистыми оболочками и эпителиальными клетками, благотворно влияет на функционирование легких, а также является дополнением при лечении некоторых заболеваний желудочно-кишечного тракта (язвы, колиты).

Ретинол необходим для нормального эмбрионального развития, питания зародыша и уменьшения риска осложнений беременности (малый вес новорожденного и т.п.).

Витамин А принимает участие в биосинтезе стероидных гормонов (включая прогестерон), сперматогенезе, является антагонистом тироксина (гормона щитовидной железы).

Как витамин А, так и  $\beta$ -каротин, являясь антиоксидантами, служат средствами для профилактики и лечения раковых заболеваний, в частности, они препятствуют повторному появлению опухоли после операций.

И витамин А, и  $\beta$ -каротин защищают мембраны клеток мозга от разрушительного воздействия свободных радикалов. При этом  $\beta$ -каротин нейтрализует свободные радикалы полиненасыщенных кислот и кислорода.

Антиоксидантное действие  $\beta$ -каротина играет важную роль в предотвращении заболеваний сердца и артерий (стенокардия и т.п.).

Витамин А в основном содержится в продуктах животного происхождения. В организме человека он не синтезируется, его основными источниками являются каротины и среди них, главным образом,  $\beta$ -каротин, который в печени подвергается окислительному расщеплению с образованием витамина А.

Витамин А способен накапливаться в клетках печени, поэтому его ярко выраженный дефицит регистрируется у взрослого населения очень редко. Вместе с тем, у жителей индустриально развитых стран проблема дефицита витамина А присутствует, т.к. снижение потребления животных жиров с целью профилактики атеросклероза и формирования избыточной массы тела приводит к снижению поступления витамина А в организм. Кроме этого, отмечается низкий уровень содержания в рационе растительных масел – основного источника получения  $\beta$ -каротина. Для населения таких стран актуально дополнительное потребление витамина А и его предшественника  $\beta$ -каротина в виде добавок к пище.

Избыток потребления синтетических препаратов витамина А может вызывать нежелательные токсические явления (рвоту, мелкоточечные кровоизлияния на коже, высокую температуру), которые наиболее ярко проявляются у детей.

### **13. Биотехнологическое получение каротиноидов**

Во многих странах, включая Россию, каротин используется в качестве лечебно-профилактического средства в терапии различных заболеваний человека и животных, а также как пищевая добавка к хлебу, маслам и другим пищевым продуктам.

Широкая область применения  $\beta$ -каротина предопределяет необходимость его производства в промышленных масштабах. Мировое производство данного препарата от 1000 до 10000 т, включая каротин в чистом виде и в виде различных концентратов или смесей с другими витаминами.

Каротиноиды синтезируются растениями и микроорганизмами, но не синтезируются в клетках животных (кроме рыб) и человека.

Основными источниками получения  $\beta$ -каротина являются такие растения, как морковь, тыква, салат, шпинат, многие ягодные культуры (черная смородина, черника, крыжовник) и фрукты (персики, абрикосы и др.).

До 50-х гг. XX в. промышленное производство каротина осуществлялось только путем экстракции из растительного сырья, главными из которых были морковь и тыква. Однако невысокое содержание каротиноидов в растительном сырье и значительные их потери в процессе экстракции и очистки обуславливали очень высокую стоимость данной группы препаратов и большой расход ценного пищевого сырья. Так, например, из 1 т моркови можно получить лишь 72 г 92–94%-ного каротина. В настоящее время получение каротина из растительного сырья почти повсеместно утратило свое значение.

Разработаны методы химического синтеза как самого витамина А, так и  $\beta$ -каротина. Исходным сырьем в большинстве химических синтезов данных продуктов является  $\beta$ -ионон, который получают из цитраля и ацетона по методу Тимана. Химический синтез  $\beta$ -каротина включает 12–15 стадий с общим выходом целевого продукта 25% в пересчете на  $\beta$ -ионон.

Однако в настоящее время основная масса каротина производится микробиологическим путем.

В России  $\beta$ -каротин получают исключительно путем биосинтеза с использованием микроорганизмов-продуцентов, способных к сверхсинтезу и накоплению данного провитамина.

### 13.1. Биотехнологическое получение каротиноидов

Основными продуцентами  $\beta$ -каротина являются гетероталлические микроскопические грибы. Из них наиболее широкое практическое применение нашли различные штаммы культуры *Blakeslea trispora*. Гетероталлизм грибов выражен в образовании разнополого женского (+) и мужского (-) мицелия, при слиянии клеток которых образуются зиготы.

Мицелий (+)-форма содержит больше  $\beta$ -каротина, поэтому окрашен в более желтую окраску, чем мицелий (-)-формы. Однако максимальное количество  $\beta$ -каротина синтезируется при совместном культивировании (+) и (-)-форм, а именно, в 5–17 раз больше, чем при раздельном культивировании данных форм микроорганизмов.

Созданы высокопродуктивные штаммы, способные синтезировать и накапливать до 3000–4000 мг  $\beta$ -каротина на 1 л культуральной среды (для сравнения: в 1 кг моркови содержится в среднем 60 мг  $\beta$ -каротина).

В отечественном биотехнологическом производстве каротиноидов в основном используются культуры гриба *B. trispora* штаммы (+)МБ и (-)МБ, а также (+)С и (-)С, (+)А и (-)А, способные синтезировать от 2000 до 3200 мг каротина на 1 л культуральной жидкости.

При этом продуценты каротина могут размножаться половым, бесполом и вегетативным путями. Половое размножение реализуется при совместном выращивании (+)- и (-)-форм, бесполое – спорами, а вегетативное – отростками (обрывками) мицелия.

Активность культур максимальна при совместном выращивании (+)- и (-)-форм и зависит от их соотношения, которое подбирается экспериментальным путем в микробиологической лаборатории. В среднем соотношение (+)- и (-)-форм составляет 1:15, т.е. мужской (-)-формы берется с 15-тикратным избытком.

Установлено, что интенсивный биосинтез и накопление  $\beta$ -каротина происходит в основном во второй фазе развития продуцента, которая характеризуется прекращением роста мицелия, снижением значения рН среды и снижением содержания липидов в культуральной жидкости, вследствие активной их переработки в  $\beta$ -каротин.

Технологический процесс производства  $\beta$ -каротина, реализующийся отечественной промышленностью, включает следующие стадии:

1. Подготовка посевного материала. Главной особенностью данной стадии в биотехнологическом производстве  $\beta$ -каротина является раздельное выращивание (+)- и (-)-форм микроорганизмов-продуцентов, начиная с их выращивания на скошенных средах в пробирках и заканчивая посевными аппаратами. Их слияние происходит лишь в биореакторах при совместном культивировании.

Исходные музейные культуры представляют собой споровый или вегетативный материал хранящихся раздельно (+)- и (-)-форм соответствующих штаммов продуцентов.

В микробиологической лаборатории их высевают на твердые среды в пробирках. Затем выращивание проводят на жидких питательных средах в колбах (емкостью 0,75 л) в стерильных боксах на встряхивающих устройствах. На этой стадии подготовки посевного материала увеличивают примерно в 1,5 раза количество (-)-формы по отношению к (+)-форме. В посевных аппаратах соотношение (+)- и (-)-форм достигает уже 1:10, т.е. объем аппарата с (-)-формой должен в 10 раз превышать объем аппарата с (+)-формой. При этом состав питательной среды для разных форм продуцента одинаковый, режим выращивания обеих форм в посевных аппаратах тоже практически не отличается: температура –  $28 \pm 2$  °С, время культивирования от 36 до 72 ч.

2. Приготовление питательной среды. Основу питательной среды для культивирования продуцентов каротиноидов составляют пшеничная или рисовая мука и растительные масла (хлопковое, кукурузное, подсолнечное). Кроме того, в питательную среду вводят пеногасители (керосин, ПАВ), антиоксиданты (бутилоксанизол, лимонную или аскорбиновую кислоту), витамины (тиамин) и стимуляторы биосинтеза  $\beta$ -каротина. В качестве стимулятора наиболее эффективным является  $\beta$ -ионон, который можно заменить на более экономически доступную цитрусовую мелассу. В качестве заменителей  $\beta$ -ионона используют изопреновые димеры и тримеры, производные циклогексана, среди которых наибольшую активность проявляет 2,6,6-триметил-1-ацетилгексан (ТАЦ).

Питательную среду стерилизуют в установках для непрерывной стерилизации или непосредственно в аппаратах (в инокуляторах, посевных аппаратах). Учитывая особую чувствительность штаммов *B. trispora* к посторонней микрофлоре, в некоторых случаях после стерилизации в питательную среду вводят антибиотики для создания гарантированных стерильных условий в процессе культивирования.

Стерильный воздух получают по типовой схеме, характерной для микробиологических аэробных процессов. Стерилизация, как правило, осуществляется в две стадии:

1. термическая стерилизация за счет подъема температуры воздуха до 200–250 °С при его сжатии в компрессоре;

2. стерилизация в индивидуальных бактериальных фильтрах, установленных на линии подачи стерильного воздуха в барботер каждого биореактора и посевного аппарата.

3. Культивирование продуцентов каротиноидов проводят в типовых биореакторах вместимостью 10–32 м<sup>3</sup>, снабженных барботажным устройством, трехрусной турбинной мешалкой, рубашкой для охлаждения и внутренними теплообменниками для отвода избыточного тепла, выделяемого грибами в процессе своего роста.

В биореактор загружают расчетное количество стерильной питательной среды, далее в стерильных условиях из посевных аппаратов переносят сначала (-)-форму, затем (+)-форму в соотношении, указанном микробиологической лабораторией (обычно 15:1). Выращивание культуры продуцента ведут при интенсивной аэрации и перемешивании. Температуру в культуральной жидкости (процесс экзотермичный) поддерживают в пределах 28±2 °С, путем подачи холодной воды в рубашку теплообменника.

Пеногашение осуществляется обычно механическим пеногасящим устройством, установленным в верхней части вала мешалки. В случае, если уровень пены превышает определенный предел, автоматически включается система подачи стерильного пеногасителя.

В процессе культивирования осуществляют постоянный контроль за ростом продуцента и содержанием β-каротина в культуральной жидкости путем отбора проб не реже, чем 2 раза в сутки.

Содержание биомассы в культуральной жидкости должно находиться в пределах 28–40 г/л, а содержание β-каротина – не менее 2000 мг/л. Если указанные показатели не достигнуты, в культуральную жидкость добавляют β-ионон или другой стимулятор, тиамин, антиоксиданты и продолжают культивирование до получения положительных результатов анализа.

4. Термолиз и фильтрование мицелия. По окончании культивирования осуществляют термическую обработку культуральной жидкости (термолиз) с целью инактивации продуцента и дезактивации ферментов. Для этого нагревают культуральную жидкость острым паром до температуры 85±5 °С и выдерживают при данной температуре не менее 15 мин. Поскольку культуральная жидкость лучше фильтруется в горячем виде, ее без охлаждения направляют на фильтр-прессы, позволяющих отделить мицелий от нативного раствора. Мицелий представляет собой труднофильтруемый слизистый осадок, поэтому для его фильтрования применяют сжатый до 3–6 МПа азот. Мицелий промывают водой и тщательно отжимают сжатым азотом до минимального содержания влаги. Применение сжатого азота или другого инертного газа предотвращает окисление β-каротина кислородом воздуха.

5. Сушка и размол биомассы. Сушку биомассы осуществляют в вакуум-барабанной сушилке с ворошителем при температуре 85±5 °С и давлении 0,02–0,01 МПа до содержания остаточной влаги не более 7%. Для получения однородного порошка, высушенную биомассу перемалывают в мельницах растирающего типа (краскотерках) и просеивают через сито. Дальнейшая переработка сухой биомассы зависит от вида выпускаемой каротинсодержащей продукции.

а) Кормовой препарат микробиологического каротина (КПМК) представляет собой мелкопластинчатую массу или сыпучий порошок от оранжево-красного до красно-коричневого цвета, содержащий не менее 1%  $\beta$ -каротина и не более 7% влаги. Высушенную, растертую и просеянную биомассу без дополнительной обработки фасуют в полиэтиленовые мешки или барабаны и отправляют потребителю.

б) Каротин в масле. В эмалированный экстрактор помещают сухую, тонко измельченную биомассу, и  $\beta$ -каротин экстрагируют подсолнечным маслом или слабой мисцеллой, образующейся после промывки биомассы на фильтр-прессах. Для интенсификации экстракции применяют роторно-пульсационный генератор.

После экстракции полученную суспензию с помощью сжатого азота подают на фильтр-пресс для отделения масляного экстракта от шрота. При этом получают концентрированную (крепкую) мисцеллу, содержащую до 1%  $\beta$ -каротина. Шрот на фильтре промывают подсолнечным маслом, тщательно отжимают сжатым азотом, при этом полученную слабую мисцеллу используют для экстракции свежих порций  $\beta$ -каротина.

Масляный экстракт (концентрированную мисцеллу) промывают этиловым спиртом. При этом извлекаются органические примеси, придающие экстракту горький привкус. Спирт отделяют от экстракта в делительной воронке и направляется на регенерацию, а экстракт для удаления остатков спирта и летучих примесей выдерживают в вакууме при температуре  $35 \pm 5$  °С и фильтруют от возможного хлопьевидного осадка.

Готовый продукт – каротин в масле – представляет собой пищевое подсолнечное масло, содержащее 2–2,2 г/кг  $\beta$ -каротина. Его фасуют в жестяные банки по 7 кг или в алюминиевые фляги по 50 кг, и направляют на предприятия пищевой промышленности для целевого использования в качестве пищевой добавки в различные продукты питания (маргарин, сливочные масла различных сортов, хлебопекарная и кондитерская продукция и т.п.).

в) Кристаллический  $\beta$ -каротин. В основе получения кристаллического препарата используется экстракция  $\beta$ -каротина из биомассы продуцента. Ранее экстракцию осуществляли подсолнечным или другими растительными маслами и, после соответствующей обработки экстракта, кристаллический  $\beta$ -каротин выделяют путем продолжительной кристаллизации. При этом выход целевого продукта был невысок и, хотя маточные растворы использовались для получения другого продукта (каротина в масле), потери данного ценного витамина были велики.

Современная технология производства кристаллического  $\beta$ -каротина основана на использовании в качестве экстрагента хладона (фреона). Данный растворитель очень избирательно и полно экстрагирует  $\beta$ -каротин из сухой биомассы, а затем легко удаляется из экстракта, образуя пересыщенные растворы  $\beta$ -каротина в смеси липидов, из которых он кристаллизуется с минимальными потерями. Для удаления органических примесей используется обработка спиртом кубового остатка после отгонки хладона и, чтобы избежать

выделение примесей, кристаллизацию  $\beta$ -каротина реализуют при температуре  $15 \pm 5$  °С.

Кристаллический  $\beta$ -каротин представляет собой крупные оранжево-красные с фиолетовым отливом кристаллы, температура плавления которых составляет 181–182 °С.

Готовый продукт фасуют в плотно закрытые банки оранжевого стекла, обернутые черной бумагой для защиты светочувствительного  $\beta$ -каротина.

Потребителями кристаллического  $\beta$ -каротина является пищевое производство, в которой он применяется в тех же целях, что и каротин в масле. Кроме того, данный продукт находит применение в медицине и ветеринарии для производства некоторых лечебно-профилактических и витаминных препаратов.

Данные продукты микробиологической промышленности для сельскохозяйственных производств играют важную роль в интенсификации животноводства и птицеводства, увеличения объемов производства и улучшения технико-экономических показателей продукции сельского хозяйства.

### **13.2. Перспективы получения каротиноидов на основе культуры растительных клеток и тканей**

Основой использования культур растительных тканей является способность их клеток в условиях *in vitro* синтезировать разнообразные группы БАВ (фенольные соединения, гликозиды, эфирные масла, каротиноиды, смолы, алкалоиды и др.), участвующие в обмене веществ растений и выполняющие определенные, часто весьма существенные функции.

В последние годы количество сообщений о биосинтезе вторичных метаболитов в культурах растительных тканей значительно возросло. В настоящее время получены данные, свидетельствующие об образовании каротиноидов в культуре растительных тканей. Так, в культуре ткани *Solanum laciniatum* обнаружены каротиноиды ( $\beta$ -каротин, криптоксантин, зеаксантин, лютеин). Однако их количество в 1000 раз меньше, чем в органах целого растения. Такое низкое содержание каротиноидов характерно и для других растительных культур.

В результате изучения влияния различных факторов на выход каротиноидов, получаемых на основе культуры растительных тканей, установлено стимулирующее влияние света на увеличение содержания данных соединений в культуре растительной ткани.

### **14. Получение убихинонов**

Кофермент Q (кофермент Q<sub>10</sub>, убихинон) – группа коферментов – бензохинонов, содержащих хиноидную группу и несколько изопрениловых групп (10 в случае кофермента Q<sub>10</sub>).



Убихиноны – жирорастворимые коферменты, представленные преимущественно в митохондриях эукариотических клеток.

Наиболее высокое содержание убихинона обнаружено в органах с наибольшими энергетическими потребностями (в сердце и печени).

Кофермент Q по химической природе имеет сходство в строении молекулы с витаминами E и K, и представляет собой 2,3-диметокси-5-метил-1,4-бензохинон с изопреновой цепью в 6-м положении. Число остатков изопрена в боковой цепи убихинона в разных организмах варьируется от 6 до 10 – в клетках *Saccharomyces cerevisiae* содержится CoQ<sub>6</sub>, *Escherichia coli* – CoQ<sub>8</sub>, грызунов – CoQ<sub>9</sub>. В митохондриях клеток большинства млекопитающих, включая человека, встречается убихинон только с 10 изопреновыми звеньями.

Кофермент Q представляет собой желто-оранжевые кристаллы без вкуса и запаха с температурой плавления 49–51 °С; растворим в диэтиловом эфире, очень слабо растворим в этаноле и практически нерастворим в воде. На свету он постепенно разлагается и окрашивается. Кофермент Q образует с водой эмульсию с концентрацией 10%, 20% и 40%.

В организме человека кофермент Q синтезируется из мевалоновой кислоты, производных тирозина и фенилаланина

Кофермент Q принимает участие в реакциях окислительного фосфорилирования, является компонентом цепи переноса электронов в митохондриях, принимает участие в переносе электронов с NADH-дегидрогеназного комплекса (комплекс I) и сукцинатдегидрогеназного комплекса (II) на комплекс III, и таким путем, участвует в биосинтезе АТФ. Ингибиторы действия убихинона останавливают реакции окислительного фосфорилирования.

Кроме того, кофермент Q является антиоксидантом и, в отличие от других антиоксидантов, регенерируется организмом. Кроме того, кофермент Q восстанавливает антиоксидантную активность витамина E ( $\alpha$ -токоферола). Антиоксидантное действие кофермента Q обусловлено, главным образом, его восстановленной формой (CoQH<sub>2</sub>). Активность восстановленной формы кофермента Q на три порядка выше невосстановленной. Реакцию нейтрализации свободных радикалов восстановленным коферментом Q можно описать следующим уравнением:  $2\text{LOO}\cdot + \text{CoQH}_2 \rightarrow 2\text{LOOH} + \text{CoQ}$ .

Убихинон представляет собой производное бензохинона, широко распространенное в живых организмах. Он локализуется в митохондриях, лизосомах, тельцах Гольджи, микросомах, пероксисомах, клеточных мембранах и т.д., является веществом, необходимым для поддержания биологических функций в качестве компонента электронной транспортной системы, а также участвует в активации биосинтеза АТФ, антиоксидантной активности в организме и стабилизации мембран.

Поскольку источником убихинона является не только пища, но и его биосинтез в организме, то можно считать, что в нормальном состоянии организму он доступен в необходимом количестве. Однако известно, что содержание убихинона в организме заметно снижается в результате старения и стрессов разной этиологии, которым подвергается живой организм. Сниже-

ние содержания убихинона в организме, как правило, приводит к угнетению производства АТФ и сердечной функции, пониженной резистентности к окислительному стрессу и нестабильности биологических мембран. Восполнение недостаточности убихинона является инструментом для усиления продукции энергии в митохондриях, повышения антиоксидантной функции организма и поддержания гомеостаза. Кроме того, убихинон используют в клинической практике в качестве лекарственного препарата при сердечбиении, одышке и отеке, возникающих в результате сердечной недостаточности или заболеваниях сердца средней тяжести.

На практике убихинон используют в качестве лекарственного препарата или пищевой биологической добавки в виде таблеток или капсул. Хотя его удобнее принимать как обычный пищевой продукт, чем в виде таблеток или капсул. При этом можно создавать пищевые продукты, имеющие различные вкусовые свойства и формы, что предоставляет большое преимущество в том, что потребителю не надоеет потреблять такие продукты.

Установлено, что убихинон широко содержится во многих продуктах животного и растительного происхождения (мясо, рыба, злаки, овощи, фрукты, молочные продукты, яйца и т.п.). Однако его содержание в таких продуктах, как правило, невысокое, за исключением говядины, в которой его количество составляет около 30 мкг/г. В этой связи, общее суточное потребление убихинона с обычным рационом питания составляет примерно 3–5 мг. Кроме того, скорость усвоения убихинона после перорального потребления является низкой, так что затруднительно в полной мере восполнить его запасы в организме (при их снижении за счет различных стрессов). В таких случаях, если использовать пищевой продукт, обогащенный убихиноном, то можно ожидать улучшение его усвоения в результате взаимодействия с компонентом пищевого продукта и, следовательно, можно предположить, что в данном случае легче восполнить его запасы при возникновении недостаточности. Однако частично вследствие того, что убихинон является лекарственным препаратом и его пищевое применение ограничено, имеется только несколько обогащенных убихиноном пищевых продуктов.

До настоящего времени окончательно не установлены пути биосинтеза убихинонов и витаминов группы E и K. Вероятно, в тканях растений и животных, а также микроорганизмов данные БАВ и представители других классов, имеющие сходную структуру (сквален и каротиноиды), синтезируются из уксусной кислоты. В некоторых случаях (при биосинтезе токоферолов в растениях) предшественником ароматических колец является шикимовая кислота и родственные соединения.

Получение убихинонов, как правило, относится к биотехнологиям, основанным на использовании каллусных культур риса или опухолевой ткани.

В качестве продуцентов убихинонов используют бактерии, дрожжи и дрожжеподобные микроорганизмы. Так, сухая биомасса грибов рода *Candida* содержит смесь убихинонов. Данная технология служит одним из примеров, когда биотехнология совмещает в одном процессе получение убихинонов и эргостерина из микробных липидов.

С 50-х гг. XX в. ткани табака *Nicotina tabacum* служат модельным объектом в исследованиях по физиологии и генетике растительной клетки. После детального фотохимического изучения культура ткани *N. tabacum* была предложена в качестве продуцента убихинона. Активное изучение культуры ткани табака принадлежит японской фирме «Tobacco and Salt Public Corp.». Исследования данной фирмы практически реализованы в промышленном получении биомассы табака в качестве продуцента убихинона-10.

Кроме того, предложен микробиологический способ получения убихинона. Известными продуцентами убихинона являются грибы *Aspergillus fumigatus* и *Vadosporium fulvum*, которые культивируют на дорогостоящих питательных средах сложного состава, что, в свою очередь, повышает стоимость конечного продукта. Следует отметить, что среди данных продуцентов убихинонов встречаются патогенные формы.

Кроме того, известен непатогенный штамм *Fusarium sambucinum* синтезирующий убихинон в количестве до 131,0 мкг/г при культивировании на питательной среде Чапека. Сущность разработанной и запатентованной технологии заключается в использовании в качестве продуцента *Fusarium sambucinum* 139 для получения убихинона с использованием дешевого и доступного субстрата – разведенной молочной сыворотки. При этом достигается снижение себестоимости целевого продукта.

Предлагаемый штамм получен в результате адаптации и отбора известного штамма *F. sambucium* к питательной среде, приготовленной на основе молочной сыворотки, и депонируется во ВКПМ института "ВНИИГенетика".

Морфолого-культуральные признаки *F. sambucinum* 139: культура хорошо растет и образует колонии с пушистым войлокообразным мицелием на среде Чапека с сахарозой, сусло-агаре, молочном агаре. На сусло-агаре на 7-е сутки мицелий приобретает светло-кремовый цвет, края колонии равные. Штамм имеет несептированный мицелий. Макроконидии веретенообразные, серповидные, реже конечные. Строма в культуре риса желтая. Оптимальные условия для роста и биосинтеза убихинона – температура 28 °С, значение рН среды 5,0.

Физиолого-биохимические признаки культуры продуцента *F. sambucinum*: в качестве источника углерода штамм использует глюкозу, сахарозу, мальтозу, этиловый и изопентиловый спирты, слабо растет на метаноле; источниками азотного питания служат сульфат аммония, нитрат аммония, хлорид аммония. Кроме того, штамм усваивает кукурузный экстракт, слабее дрожжевой автолизат и пептон. Для биосинтеза убихинона на синтетической питательной среде необходимо наличие этилового и изопентилового спиртов или глюкозы. Штамм активно развивается на вторичном сырье (солодовом отваре, отваре виноградных выжимок, пивном сусле, молочной сыворотке). Обычно часто используемая на практике дорогостоящая синтетическая среда Чапека не содержит органических форм азота, поэтому не обеспечивает биосинтеза убихинона Q-10 в количестве рентабельном для микробиологического производства. Разработанная питательная среда представляет собой разбавленную молочную сыворотку (1:1), содержащую все

необходимые органические соединения (белковые вещества, аминокислоты, углеводы, молочную кислоту, жир, витамины), что позволяет увеличить выход биомассы и убихинона в 1,34 и 3,5 раза, соответственно, а также ускорить и упростить технологический процесс. При этом снижается себестоимость целевого продукта, за счет снижения стоимости питательной среды в 10 раз, обеспечивается безотходная, экологически приемлемая технология переработки молочных продуктов.