

Получение витаминов и коферментов биотехнологическими методами

Байбулатова Нелли
ХТБМП-05

- **Витамины** - 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 количества разнообразных ферментов либо выступая информационными регуляторными посредниками, выполняя сигнальные функции экзогенных прогормонов и гормонов.

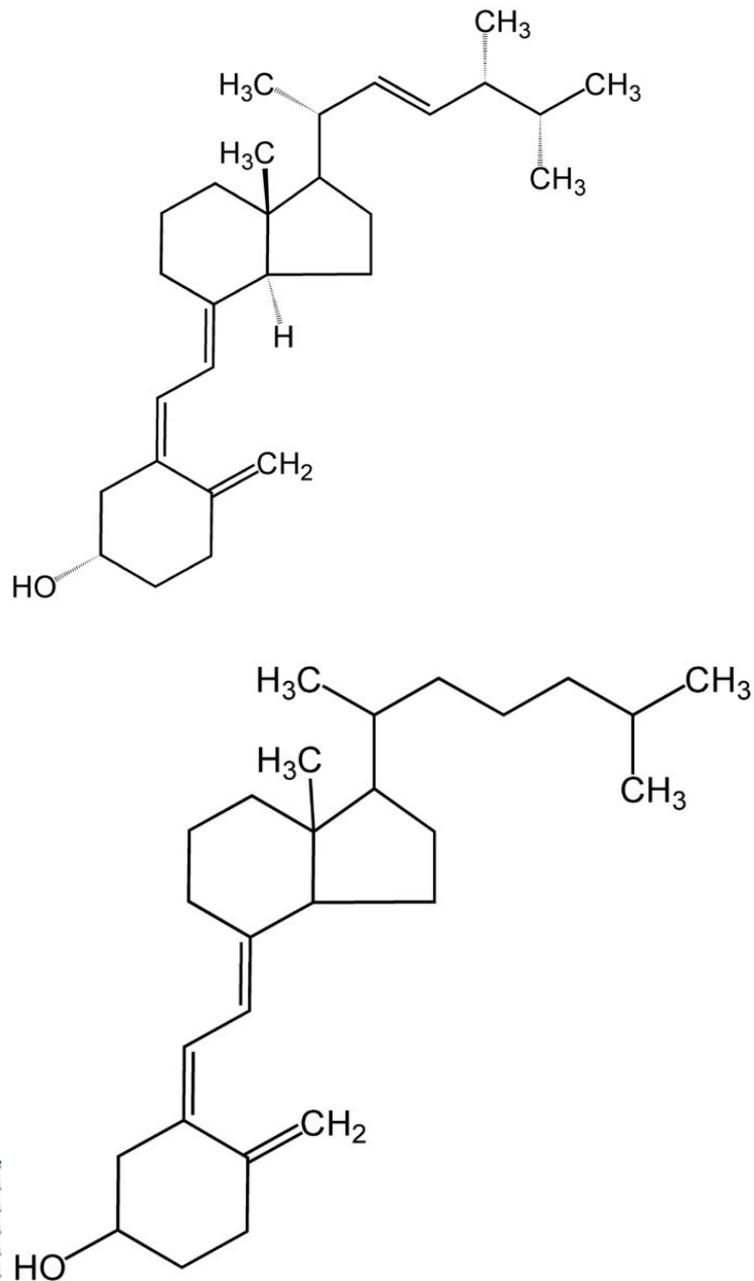
▣ **Каротиноиды** - это изопреноидные соединения, синтезирующиеся многими пигментными микроорганизмами из рода *Aleuria*, *Blakeslea*, *Corynebacterium*, *Flexibacter*, *Fusarium*, *Halobacterium*, *Phycomyces*, *Pseudomonas*, *Rhodotorula*, *Sarcina*, *Sporobolomyces* и др. Всего описано около 500 каротиноидов.

- Каротиноиды локализуются в виде сложных эфиров и гликозидов в клеточной мембране микроорганизмов, либо в свободном состоянии - в липидных гранулах в цитоплазме.
- Каротиноид "ретиаль" у галофильного вида - *Halobacterium halobium* - соединен с белком через остаток лизина(опсиноподобный белок); он участвует в синтезе АТФ благодаря генерации транс мембранного потенциала.

- Основная функция каротиноидов - защитная. Их биосинтезу в клетках способствует свет.
- В качестве продуцентов каротиноидов можно использовать бактерии, дрожжи, мицелиальные грибы. Более часто применяют зигомицеты *Blakeslea trispora* и *Choanephora conjuncta*. Спаривающиеся (+) и (-) штаммы этих видов при совместном культивировании могут образовать 3-4 г каротина на 1 л среды.

- Вначале штаммы выращивают отдельно, а затем - совместно при 26°C и усиленной аэрации с последующим переносом в основной ферментатор. Длительность ферментации - 6-7 дней. Каротиноиды извлекают ацетоном (или другим полярным растворителем), переводят в неполярный растворитель.
- В целях очистки и более тонкого разделения можно прибегать к методам хроматографии или к смене растворителей.

- ▣ **Витамин D** - это группа родственных соединений, в основе которых находится эргостерин, который обнаружен в клеточных мембранах эукариот. Поэтому, например, пекарские или пивные дрожжи применяют для получения эргостерина, как провитамина, обладающего антирахитическим действием.
- ▣ Содержание эргостерина в дрожжевых клетках колеблется в пределах 0,2-11%.



Трансформация эргостерина в витамин D2 (**кальциферол**) происходит под влиянием ультрафиолетового облучения. При этом разрывается связь в кольце (позиции 9,10) и образуется двойная связь в боковой цепочке (позиции 22, 23).

Эта последняя гидрирована в витамине D3 (**холекальциферол**). Физиологическая активность обоих витаминов (D2 и D3) равноценна.

- Получение эргостерина в производственных условиях можно подразделить на следующие этапы: размножения исходной культуры и накопление инокулята (инокулюма), ферментация, сепарирование клеток, облучение клеток ультрафиолетовыми лучами, высушивание и упаковка целевого продукта.

Получение облученных сухих дрожжей

- Культивирование дрожжей (ферментацию) проводят при температуре, близкой к максимальной для конкретного штамма, и выраженной аэрации (2% O₂ в газовой фазе).
- Спустя 3-4 суток клетки сепарируют и подвергают вакуум-высушиванию.
- Затем сухие дрожжи облучают ультрафиолетовыми лучами - УФЛ в течение оптимального по продолжительности времени, при требуемой температуре и с учетом примесных веществ.

Готовый препарат - "кормовые гидролизные дрожжи, обогащенные витамином D2".

В таком препарате содержится не менее 46% сырого белка, незаменимые аминокислоты (лизин, метионин, триптофан) и 5000 МЕ витамина D2 /г.

Получение кристаллического витамина D2

- Клетки продуцента гидролизуют соляной кислотой при 110*С, затем температуру снижают до 75-78*С и добавляют этанол.
- Смесь фильтруют при 10-15*С, оставшуюся после фильтрации массу промывают водой, высушивают, измельчают, нагревают до 78*С и дважды обрабатывают тройным объемом этанола.
- Спиртовые экстракты объединяют и упаривают до 70%-го содержания сухих веществ.
- Полученный "липидный концентрат" обрабатывают раствором едкого натра. Эргостерин кристаллизуется из неомыленной фракции концентрата при 0*С. Его очищают повторной перекристаллизацией.
- Кристаллы высушивают, растворяют в серном эфире, облучают УФЛ, эфир отгоняют, раствор витамина D2 концентрируют и кристаллизуют.
- "Кислотный фильтрат" обычно упаривают до 50%-го содержания сухих веществ и применяют как концентрат витаминов.

- ▣ **Рибофлавин, или витамин В2** - содержится в клетках различных микроорганизмов, будучи коферментом в составе флавопро-теинов (прежде всего - соответствующих ферментов из класса оксидоредуктаз - ФМН, ФАД). Поэтому в качестве продуцентов рибофлавина (флавопротеинов) могут быть бактерии, дрожжи и нитчатые грибы. Однако наиболее заманчивыми являются те штаммы, которые образуют на жидких средах 0,5 г и более рибофлавина в 1 л среды. К подобным организмам относятся *Ashbyii gossypii*, *Eremothecium ashbyii* и *Candida guilliermondii*.
- ▣ Методами генной инженерии удалось получить штамм сенной палочки, образующий около 6 г рибофлавина в 1 л среды, включающей мелассу, белково-витаминный концентрат и его гидролизат.

- В качестве источников углерода применяют глюкозу или сахарозу, практикуют использование дрожжевого и кукурузного экстрактов, соевой муки, масла (жира).
- Жидкие питательные среды для получения инокулята и для основной ферментации могут несколько различаться между собой.

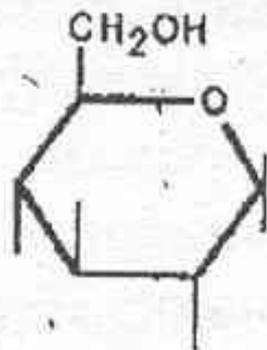
Например, для получения *посевного материала* известна среда, содержащая сахарозу, пептон, кукурузный экстракт, калия дигидрофосфат, магния сульфат, подсолнечное масло, время выращивания продуцента на этой среде - 2 суток при 27-30*С (в зависимости от штамма).

Ферментационная среда обычно включает кукурузную и соевую муку, сахарозу, кукурузный экстракт, калия дигидрофосфат, кальция карбонат, натрия хлорид и ненасыщенный жир.

Обычно ферментацию проводят в течение 5 суток при рН 5,5- 7,7. После использования сахарозы (примерно через 30 часов) начинает заметно накапливаться витамин В2, вначале - в мицелии, а затем - в культуральной жидкости. Всю биомассу можно подвергнуть высушиванию и полученный сухой продукт с остаточной влажностью 8%, содержащий 1,5-2,5% рибофлавина, 20% белка, тиамин, никотиновую кислоту, пиридоксин, цианкобаламин, микроэлементы и другие вещества, рекомендуют для кормления животных.

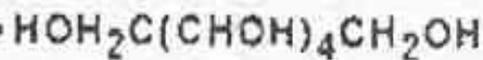
Аскорбиновая кислота, или витамин С - это противощитовый витамин, имеющийся у всех высших растений и животных.

Определенные виды уксуснокислых бактерий причастны к биосинтезу полупродукта этой кислоты - L-сорбозы. Весь процесс получения аскорбиновой кислоты является смешанным, то есть химико-ферментативным.



D-глюкоза

гидрирование

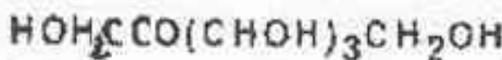


D-сорбит

Gluconobacter oxydans

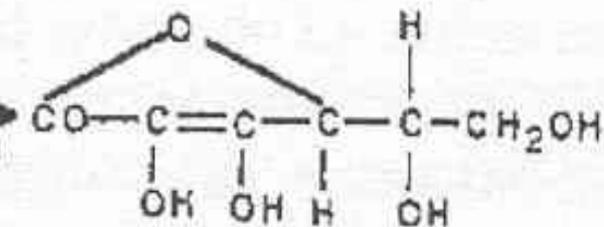


биологическое окисление,
pH=5,0



L-сорбоза

химический процесс
(трансформация)



L-аскорбиновая кислота

Ферментацию *G. oxydans* проводят на средах, содержащих сорбит (20%), кукурузный или дрожжевой экстракт, при интенсивной аэрации (8-10 г O₂ л/ч). Выход L-сорбозы может достигь 98% за 1-2 суток. При достижении культурой log-фазы можно дополнительно внести в среду сорбит, доводя его концентрацию до 25%.

Ферментацию бактерий проводят в периодическом или непрерывном режиме. Принципиально доказана возможность получения L-сорбозы из сорбита с помощью иммобилизованных клеток в ПААГ.

▣ **Цианкобаламин, или витамин В12-** получают только микробиологическим синтезом.

Его продуцентами являются прокариоты и, прежде всего, пропионовые бактерии, которые и в естественных условиях образуют этот витамин.

Мутанты *Propionibacterium shermanii* М-82 и *Pseudomonas denitrificans* М-2436 продуцируют на жидкой среде до 58-59 мг/л цианкобаламина.

Его мировое производство достигло 10 т в год, из которых 6,5 т расходуют на медицинские нужды, а 3,5 т - в животноводстве.

Отечественное производство цианкобаламина базируется на использовании культуры *P.freudenreichii var. shermanii*, культивируемой в периодическом режиме без доступа кислорода.

Ферментационная среда обычно содержит глюкозу, кукурузный экстракт, соли аммония и кобальта, рН около 7,0 поддерживают добавлением NH_4OH ; продолжительность ферментации 6 суток; через 3 суток в среду добавляют 5,6-диметилбензимидазол - предшественник витамина В12 и продолжают ферментацию еще 3 суток.

Цианкобаламин накапливается в клетках бактерий, поэтому операции по выделению витамина заключаются в сепарировании клеток, экстрагировании водой и фильтровании. Фильтрат упаривают и дополнительно очищают, после чего проводят кристаллизацию витамина.

Витамин В12 обладает высокой светочувствительностью, поэтому все операции необходимо проводить в затемненных условиях (или при красном свете).

На ацетонобутиловой и спиртовой бардах с добавлением солей кобальта и метанола в нашей стране получают кормовой препарат КМБ 12 - концентрат, содержащий витамин В12 и другие ростовые вещества.

- Определение каротина. Каротин в растительном сырье контролируют физико-химическим методом по ГОСТ 8756.22—80. Метод основан на фотометрическом определении массовой доли каротина в растворе, полученном в процессе экстрагирования из продуктов органическим растворителем. Предварительно раствор очищают от сопутствующих красящих веществ с помощью колоночной хроматографии. Каротин легко растворяется в органических растворителях (эфир, бензин и др.) и придает им желтую окраску.
- Для количественного определения каротина используют адсорбционную хроматографию на колонках с окисью алюминия и магния. Такое определение пигментов на колонке зависит от активности адсорбента, количества пигментов, а также присутствия других компонентов в разделяемой смеси. Сухая смесь окиси алюминия задерживает каротин, а влажная пропускает в раствор другие красящие вещества.