**Содержание**

Витамины

Каротаноиды

Витамин D

Рибофлавин, или витамин В2

Аскорбиновая кислота, или витамин С

**Витамины**

Витамины поставляются в организм с пищей или их назначают в форме лекарственных препаратов при определенных патологических процессах. Из жиро-и водорастворимых витаминов известны биотехнологические процессы производства витаминов а и D, рибофлавина, аскорбиновой кислоты, цианкобаламина (В12).

**Каротаноиды** - 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.

Из одной молекулы -каротина при гидролизе образуются две молекулы витамина A. Это имеет место, например, в кишечнике человека.

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

Питательные среды для производства витаминов сложные и включают источники углерода, азота, витаминов, микроэлементов, специальных стимуляторов (гидрол, кукурузно-соевая мука, растительные масла, керосин, -ионон или изопреновые димеры).

Вначале штаммы выращивают раздельно, а затем - совместно при 26?С 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 случаях извлечения белково-каротиноидных комплексов, применяют поверхностно-активные вещества в концентрации 1-2%. В целях очистки и более тонкого разделения можно прибегать к методам хроматографии или к смене растворителей. Витамин A из (3-каротина сравнительно легко можно получить при гидролизе.

В случае изготовления каротинсодержащей биомассы для скармливания животным и птицам возможно ее сочетанное применение с витамином А или без него. В медицинских целях витамин А изготавливают в капсулах для приема через рот.

**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 зргостерина, как провитамина, обладающего антирахитическим действием. Содержание эргостерина в дрожжевых клетках колеблется в пределах 0,2-11%.

При недостатке в организме гормона 1,25-дигидроксихолекальциферола, предшественником которого является витамин D2 у детей развивается рахит (аналог рахита у взрослых - остеомаляция).

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.

Кроме дрожжей продуцентами эрогостерина могут быть мицелиальные грибы - аспергиллы и пенициллы, в которых содержится 1,2-2,2% эргостерина. Замечено, что полиеновые антибиотики, действующие на клеточную мембрану дрожжей, заметно стимулируют их содержание в биомассе.

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

Так, применительно к дрожжам, инокулюм получают на средах, обеспечивающих полноценное развитие клеток, после чего основную среду с ацетатом (активатором биосинтеза стеринов), обогащенную источником углерода и содержащую пониженное количество азота (высокое значение C/N), засевают сравнительно большим объемом инокулята. Культивирование дрожжей (ферментацию) проводят при температуре, близкой к максимальной для конкретного штамма, и выраженной аэрации (2% О2 в газовой фазе). Спустя 3-4 суток, в зависимости от ростовых характеристик и биосинтетической активности культуры, клетки сепарируют и подвергают вакуум-высушиванию. Затем сухие дрожжи облучают ультрафиолетовыми лучами - УФЛ (длина волны 280-300 нм) в течение оптимального по продолжительности времени, при требуемой температуре и с учетом примесных веществ. Эти контролируемые показатели, установленные опытным путем, указываются в регламентной документации. Облучение дрожжей можно проводить до сепарирования клеток в тонком слое 5% суспензии, учитывая малую проникающую способность УФЛ.

Облученные сухие дрожжи применяют в животноводстве; в промышленности их выпускают под названием "кормовые гидролизные дрожжи, обогащенные витамином D2". В таком препарате содержится не менее 46% сырого белка, незаменимые аминокислоты (лизин, метионин, триптофан) и 5000 ME витамина D2 /г.

В случае получения 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 неомыленнной 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. Производят также масляный концентрат витамина D2.

**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. Учитывая изменчивость активных продуцентов названных видов по способности синтезировать витамин В2, необходим систематический отбор культур в процессе их эксплуатации на производстве. Обычно активные продуценты первых двух видов формируют яркооранжевые колонии на агаризованных средах. 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.

Высокий выход рибофлавина у Е.ashbyii коррелирует с азотом пуринов и другими азотистыми источниками, содержание которых должно быть достаточным. В качестве источников углерода применяют глюкозу или сахарозу, практикуют использование дрожжевого и кукурузного экстрактов, соевой муки, масла (жира). Жидкие питательные среды для получения инокулюма 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.

В случае высоких выходных показателей по рибофлавину, витамин можно выделять в индивидуальном состоянии и, наряду с синтетическим рибофлавином, использовать в медицине.

Для Candida guillierniondii важно регулировать содержание железа в питательной среде; оптимальные концентрации колеблются, в среднем, от 0,005 до 0,05 мкг/мл. При этом определенные штаммы дрожжей могут образовывать за 5-7 дней до 0,5 г/л и более витамина. Однако для целей промышленного производства рибофлавина предпочитают использовать более продуктивные виды и штаммы грибов - E.ashbyii и Ashbyii gossypii.

**Аскорбиновая кислота, или витамин С** - это противоцинготный витамин, имеющийся у всех высших растений и животных; толькг человек и микробы не синтезируют ее, но людям она неотложно необходима, а микробы не нуждаются в ней. И, тем не менее, определенные виды уксуснокислых бактерий причастны к биосинтезу полупродукта этой кислоты - L-сорбозы. Таким образом, весь процесс получения аскорбиновой кислоты является смешанным, то есть химико-ферментативным.

Биологическая стадия процесса катализируется мембраносвязанной полиолдегидрогеназой, а последняя (химическая) включает последовательно следующие этапы: конденсация сорбозы с диаде-тоном и получение диацетон - L-сорбозы, окисление диацетон --L-сорбозы до диацетон-2-кето-Ь-гулоновой кислоты, подвергаемой затем гидролизу с получением 2-кето-1,-гулоновой кислоты; последнюю подвергают энолизации с последующей трас формацией в L-аскорбиновую кислоту.

Ферментацию G.oxydans проводят на средах, содержащих сорбит (20%), кукурузный или дрожжевой экстракт, при интенсивной аэрации (8-10 г О2/л/ч). Выход L-сорбозы может достичь 98% за одни-двое суток. При достижении культурой log-фазы можно дополнительно внести в среду сорбит, доводя его концентрацию до 25%. Также установлено, что G.oxydans может окислять и более высокие концентрации полиспирта (30-50%), создаваемые на последних стадиях процесса. Это происходит благодаря полиолде-гидрогеназы, содержащейся в клеточной биомассе. 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 M-82 и Pseudomonas denitrificans M-2436 продуцируют на жидкой среде до 58-59 мг/л цианкобаламина.

Учитывая важную функцию витамина в организме человека (он является противоанемическим фактором), 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 NH4OH; продолжительность ферментации 6 суток; через 3 суток в среду добавляют 5,6-диметилбензимидазол - предшественник витамина Б12 и продолжают ферментацию еще 3 суток. Цианкобаламин накапливается в клетках бактерий, поэтому операции по выделению витамина заключаются в следующем: сепарирование клеток, экстрагирование водой при рН 4,5-5,0 и температуре 85-90?С, в присутствии стабилизатора (0,25% раствор натрия нитрита), Экстракция протекает в течение часа, после чего водный раствор охлаждают, нейтрализуют раствором едкого натра, добавляют коагулянты белка - хлорид железа трехвалентного и алюминия сульфат с последующим фильтрованием. Фильтрат упаривают и дополнительно очищают, используя методы ионного обмена и хроматографии, после чего проводят кристаллизацию витамина при 3-4?С из в одноацетонового раствора.

Кристаллический цианкобаламин можно получать с помощью резорцина или фенола, образующих с ним аддукты, которые сравнительно легко разлагаются на составляющие компоненты.

При реализации данного биотехнологического процесса не забывать о высокой светочувствительности витамина В12, 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.

Съедобные водоросли

Народы Тихоокеанского побережья с давних пор употребляют в пищу морские и океанские водоросли. Жители Гавайских островов из 115 видов водорослей, обитающих в местных океанских пространствах, используют в питании 60 видов. В Китае также высоко ценят съедобные водоросли. Особенно ценятся сине-зеленые водоросли Nostoc pruniforme, по внешнему виду напоминающие сливу и по вкусовым качествам причисленные к китайским лакомствам. В кулинарных справочниках Японии встречается более 300 рецептур, в состав которых входят водоросли. На Дальнем Востоке весьма интенсивно используют водоросли в пищевых целях и плантации не успевают восстанавливаться естественным путем. В связи с этим все чаще водоросли культивируют искусственно, в подводных садах. Выращивание аквакультур - процветающая отрасль биотехнологии. Водоросли используют также в виде сырья для промышленности.

В последнее время внимание специалистов, занимающихся вопросами питания, привлекает сине-зеленая водоросль спирулина (Spirulina platensis и Spirulina maxima), растущая в Африке (оз. Чад} и в Мексике (оз. Тескоко). Для местных жителей спирулина является одним из основных продуктов питания, так как содержит много белка, витамины А, С, D и особенно много витаминов группы В. Биомасса спирулины приравнивается к лучшим стандартам пищевого белка, установленным ФАО. Спи-рулину можно успешно культивировать в открытых прудах или в замкнутых системах из полиэтиленовых труб и получать высокие урожаи (примерно 20 г биомассы в пересчете на СВ с 1 м3 в сут).

Литература

Данные из интернета (http://zhurnal.lib.ru).