**Лекція 5. Біотехнологія отримання вітамінів**

Вітаміни (лат. vitae – життяі амін – речовина, що містить аміногрупу(-NH2)) – низькомолекулярні органічні сполуки різної хімічної природи, що необхідні для життєдіяльності живого організму в малих дозах, і не утворюються в самому цьому організмі в достатній кількості, через що повинні надходити із їжею. Організму людини необхідні 13 різних вітамінів, добові потреби яких коливаються від 0,01 до 100 мг. Вони не виконують в організмі ані енергетичної, ані структурної функції, але є входять до складу ферментних систем, відіграють важливу роль у засвоєнні білків, жирів і вуглеводів, а також у захисних функціях організму людини. Більшість з вітамінів є попередниками коферментів, що беруть участь у багатьох ферментативних реакціях

Нестача вітамінів в раціоні визнається важливою причиною зростання захворюваності і смертності людей (авітаміноз, гіповітаміноз). В зв'язку з цим у всіх країнах світу створюються програми вітамінізації масових продуктів харчування, раніше всього хліба і інших борошняних виробів,

Забезпечення потреб людини і сільськогосподарських тварин достатньою кількістю вітамінів є важливою проблемою, яку в сучасних умовах неможливо вирішити лише за рахунок використання традиційних природних вітамінних ресурсів.

*Використання вітамінів:*

1. це лікувальні препарати

2. це компоненти збалансованого харчування

3. це компоненти парфумерної продукції

4. це біологічно активні добавки

5. це компоненти для інтенсифікації біотехнологічних процесів виробництва.

***Класифікація вітамінів***

***По походженню вітаміни класифікують на:***

- натуральні (природні) рослинного або тварини походження;

- напівсинтетичні й синтетичні, які одержують на основі біотехнології.

***По розчинності у воді і ліпідах (жирах):***

- водорозчинні (гідрофільні) В1, В2, В3, Вс, В6, Н, С, Р, РР

1. Мають слабку здатність до кумуляції, що обмежує резистентність організму в умовах гіповітамінозу

2. У споживанні їх клітиною діє принцип quantum satis, інше екскретується у

незмінному вигляді нирками, частково метаболізується в печінці і виводиться з жовчю

*- жиророзчинні (ліпофільні) А, D, E, K і вітаміноїд F*

*1.* Обов’язково всмоктуються в кишечнику в комплексі з ліпідами.

2. Транспортуються, як правило, хіломікронами і альбумінами плазми.

3. Можуть депонуватися ліпоцитами печінки (клітини Іто).

4. Кумулюються в жировій тканині (при гіпервітамінозі).

**За особливостями хімічного складу:**

* вітаміни аліфатичного ряду С, В15 та інші.
* вітаміни аліциклічного ряду А, D та інші.
* вітаміни ароматичного ряду К, Р та інші.
* вітаміни гетероциклічного ряду В1, В2, РР та інші.

**За фармакодинамічними характеристиками** (переважному молекулярному механізму дії):

* коферментні вітаміни – водорозчинні вітаміни, що використовуються для синтезу коферментів, які входять у склад ключових ензимів основних метаболічних шляхів
* редокс-вітаміни – природні антиоксиданти, що захищають біомембрани і клітинні структури від токсичних продуктів перекисного окислення (при оксидативному стресі)
* гормоновітаміни – вітаміни, які після певних структурних модифікацій проникають в каріоплазму з впливом на експресію генів

За прийнятою літерною класифікацією: в групу В (В1 – тіамін, В2 – рибофлавін, В3 – пантотенова к-та, В5 – нікотинова к-та, В6 – піридоксин, Вс чи В9 –фолієва к-та, В12 – ціанкобаламін, Н – біотин). Вітаміни групи В ще називають кофакторними вітамінами, тому що вони входять у структуру коферментів. Ці вітаміни беруть участь в метаболізмі як вищих організмів, так і мікробних клітин.

вітамін С (аскорбінова кислота);

групи А – ретиноли і провітамін А – β-каротин;

D (кальцифероли і провітаміни – ергостерин, холестерин);

Вітаміни А, D, не функціонують в мікробних клітинах, хоча провітаміни останніх двох – β-каротин і ергостерин – беруть участь у життєдіяльності певних типів мікроорганізмів і ними синтезуються.

Е (токофероли);

 К (нафтохінони).

Світовий ринок вітамінів складає близько 3 млрд $.

Розглянемо способи отримання на прикладі аскорбінової кислоти.

*Аскорбінова кислота(гамма-лактон 2,3-дегідро-L-гулонової кислоти, вітамін C) C6H8O6.*

Вітамін С не синтезується в організмі людини і надходить лише з продуктами харчування. Розчиняється у воді й руйнується при тривалому кип'ятінні, тому вимочування або переробка овочів знижує вміст у них вітаміну С.

Аскорбінова кислота являє собою білі кристали, розчинні у воді і мають смак лимонного соку. Ця кислота зустрічається в чотирьох різних формах, так званих стереоізомерів. При цьому її атомарний склад завжди однаковий, молекула має іншу просторову побудову. Це дає вітаміну можливість у кожному випадку виконувати різні функції в процесі обміну речовин. Вітамін С – потужний антиоксидант. Він відіграє важливу роль в регуляції окислювально-відновних процесів, бере участь у синтезі колагену і проколагену, обміні фолієвої кислоти та заліза, а також синтезі стероїдних гормонів і катехоламінів. Аскорбінова кислота також регулює згортання крові, нормалізує проникність капілярів, необхідна для кровотворення, надає протизапальну і протиалергічну дію. Вітамін С є чинником захисту організму від наслідків стресу. Посилює репаративні процеси, збільшує стійкість до інфекцій. Зменшує ефекти впливу різних алергенів. Є багато теоретичних і експериментальних передумов для застосування вітаміну С з метою профілактики ракових захворювань. Вітамін С поліпшує здатність організму засвоювати кальцій і залізо, виводити токсичні мідь, свинець і ртуть. Важливо, що в присутності адекватної кількості вітаміну С значно збільшується стійкість вітамінів В1, В2, A, E, пантотенової і фолієвої кислот. Вітамін С захищає холестерин ліпопротеїдів низької щільності від окислення і, відповідно, стінки судин від відкладення окислених форм холестерину. Цей вітамін перетворює амінокислоти в біогенні аміни, тобто в біологічно активні форми білка. Високий вміст вітаміну С і в лейкоцитах, білих кров'яних тільцях, що відіграють важливу роль в імунній системі.

* + антиоксидантна;
	+ синтезує колаген;
	+ синтезує нейромедіатори (норепінефринісеротонін);
	+ модуляція імунітету;
	+ детоксикація і виведення хімічних речовин;
	+ сприяє абсорбції заліза;
	+ розклад і виведення холестерину;
	+ захищає фолати і вітамін Е від окиснення і підтримує ці вітаміни в активній

формі;

* + контролює рівень гістаміну в крові

Більша частина вітамінних препаратів у цей час є синтетичними речовинами, однак серед них є екстракційні препарати, одержувані з рослинної лікарської сировини - препарати плодів шипшини.

Плоди різних видів шипшини (троянди) містять різну кількість аскорбінової кислоти (від 0,1 % до 5,2 % на абсолютно суху масу плодів). З висушених плодів зі вмістом аскорбінової кислоти не нижче 1 % (1000 мг %) - одержують препарати аскорбінової кислоти.

Із плодів з низьким вмістом вітаміну С (до 1 %) одержують: 1) холосас; 2) масло м'якоті; 3) масло насінь шипшини.

Водну витяжку одержують із роздроблених плодів (зі змістом аскорбінової кислоти 0,3 - 0,5 %, але багатих флавоноїдами) у батареї із 12 екстракторів, що працюють за принципом протитоку. Витяжку фільтрують і піддають ферментації. Після бродіння й фільтрації витяжку упарюють до необхідної консистенції. Згущену витяжку фільтрують і подають на варіння холосаса у вакуум-апарат? готовий продукт фільтрують і передають на автоматичну лінію по розфасовці. Застосовують при холециститах і гепатитах.

М'якоть плодів шипшини й насіння після одержання холосаса висушують до залишкової вологості не більше 7 %, відокремлюють м'якоть плодів від насіння за допомогою сепаратора.

Суха м'якоть далі може бути перероблена екстракцією рослинним маслом, органічним розчинником (діхлоретан, хлористий метилен) і зрідженими газами.

Із сухого насіння шипшини, відділених у сепараторі від м'якоті

плодів після сушіння шроту (відходів виробництва холосаса) одержують

масло шипшини екстрагуванням за допомогою органічних розчинників (хлористий

метилен або діхлоретан) або екстрагуванням зрідженими газами.

 Із плодів зі змістом аскорбінової кислоти більше 1 % одержують: 1) препарати аскорбінової кислоти; 2) концентрат вітамінів групи Р; 3) каротиноїдний препарат; 4) концентрат вітаміну Е.

***Хімічний синтез*** проводиться шляхом гідрогенізації D-глюкози до D-сорбітолу з наступним окисненням до L-сорбози та перетворенням останньої шляхом конвертації на L-аскорбінову кислоту.

Багато вітамінів успішно одержують хімічним синтезом. Однак для деяких вітамінів і багатьох коферментів мікробіологічний спосіб їх одержання поки що залишається єдиним або найбільш ефективним, особливо коли немає необхідності виділяти окремі вітаміни, наприклад при використанні їх у тваринництві.

Практичне використання мікроорганізмів до біосинтезу вітамінів розпочалося в 30–40-і роки минулого століттяя. В першу чергу звернули увагу на пивні і пекарські дріжджі як джерело вітамінів — В1, D 2, С. Однак широке використання мікроорганізмів почалось завдяки виявленню у них здатності до так званого надсинтезу, тобто до утворення і накопичення в культурах деяких видів набагато більшої їх кількості, ніж потрібно для виконання каталітичних функцій.

На сьогодні існують такі напрями вирішення проблеми одержання вітамінів мікробіологічним синтезом:

1. Одержання вітамінів і коферментів з використанням мікроорганізмів-продуцентів, в основному надсинтетиків, і спеціальних режимів їх культивування. До цієї категорії належать уже існуючі біотехнології одержання вітамінів В2, В12, каротиноїдів.

2. Одержання індивідуальних вітамінів і коферментів з біомаси мікроорганізмів, яку вирощують у промислових масштабах на різних вуглецевих субстратах, або використання її як комплексних вітамінних препаратів. Сьогодні, коли в усьому світі існує крупнотоннажне виробництво білка одноклітинних, цей напрям набуває великого значення, тому що мікробна білкова біомаса може слугувати комплексним джерелом вітамінів у тваринництві, а також використовуватися для виділення деяких синтезованих продуцентами білка сполук вітамінної природи.

3. Використання мікроорганізмів для здійснення окремих стадій процесу синтезу вітамінів. Можливості використання для вирощування таких мікроорганізмів нових видів нехарчової сировини розширюють межіі цього напряму. Встановлено, що карбон належить до факторів, задіяних у регуляції процесів вітаміногенезу, і використання відповідних субстратів забезпечує підвищення рівня синтезу (рибофлавіну, ергостерину, пантотенової кислоти, ФАД, НАД, вітаміну В6, коензиму Q, вітаміну В12).

Сировиною для синтезу аскорбінової кислоти є глюкоза.

Промислове виробництво основане на двох хіміко-ферментативних методах та їх модифікаціях :

 - ***методом Райхштайна-Грюсснера (ферментація за допомогою бактерій Acetobacter***

*Suboxydans, або* *+ хімічні перетворення)*

***- за методом Соноями***

 *(ферментація клітинами бактерій Erwinia sp. +*

*ферментація бактеріями Corynebacterrium sp. + хімічні перетворення).*

Останнім етапом синтезу вітаміну С у будь-якому процесі є те, що гулонова кислота в кислих умовах легко перетворюється на аскорбінову кислоту.

*Ферментативна стадія* синтезу аскорбінової кислоти за методом Райхштайна-Грюсснера каталізується мембранозв’язаною поліолдегідрогеназою, Ферментацію проводять на середовищах, які містять сорбіт (20 %), кукурудзяний або дріжджовий екстракт, при інтенсивній аерації. Вихід L-сорбози може сягнути 98 % за одну–дві доби. При досягненні культурою log-фази можна додатково вводити в середовище сорбіт, доводячи його концентрацію до 25 %. Доведена можливість одержання L-сорбози із сорбіту за допомогою іммобілізованих у поліакриламідному геліі бактеріальних клітин.

*Хімічна частина* процесу включає послідовно такі етапи: конденсація сорбози з діацетоном і одержання діацетон-L-сорбози; окислення останньої до діацетон-2-кето-L-гулонової кислоти, яку в подальшому піддають гідролізу з одержанням 2-кето-L-гулонової кислоти; останню піддають енолізації з наступною трансформацією в L-аскорбінову кислоту.

Ферментативний (мікробіологічний) синтез аскорбінової кислоти за методом Соноями:

- Етап І – перетворення D-сорбіту у глюконову кислоту (α-сорбоза) за допомогою Erwinia sp.

- Етап ІІ - за допомогою Corynebacterrium sp. Утворюється гулонова кислота.

Останній етап виробництва – хімічна реакція.

*Ідентифікація кислоти аскорбінової:*

1) за фізико-хімічними константами: УФ- та ІЧ-спектроскопія. Спектр поглинання в УФ у кислому водному середовищі має максимум при 245 нм, в лужному середовищі максимум зсувається до 265 нм. Це свідчить про наявність спряженої системи подвійних зв'язків. ІЧ спектр аскорбінової кислоти (v см-1 ): 780, 1378, 1462 (фуранове кільце), 3214, 3310, 3406, 3528 (OH).

2) Визначення рН та питомого оптичного обертання.

3) Якісні реакції.

Фармакопейні реакції : До розчину кислоти аскорбінової додають кислоту нітратну розведену та розчин арґентуму нітрату - випадає сірий осад металічного арґентуму.

Нефармакопейні реакції:

 а) при додаванні до розчину кислоти аскорбінової по краплях розчину 2,6-дихлорфеноліндофенолу його синє забарвлення зникає.

б) Кислота аскорбінова з феруму (ІІ) сульфатом у присутності натрію гідрокарбонату утворює феруму аскорбінат, забарвлений у фіолетовий колір.

4) Кількісне визначення:

- Йодометрія в присутності кислоти сульфатної розведеної, пряме титрування, індикатор – крохмаль, s = 1:

- Йодатометрія, пряме титрування в кислому середовищі в присутності калію йодиду, індикатор – крохмаль, s = 3. У момент еквівалентності надлишок розчину калію йодату викликає синє забарвлення розчину:

- Алкаліметрія, пряме титрування, індикатор – фенолфталеїн,

- Титрування розчином натрію 2,6-дихлорфеноліндофеноляту, s = 1. Метод використовують для визначення вмісту кислоти аскорбінової в рослинній сировині.

- Інші редокс-методи (йодохлорометрія, цериметрія).