

СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ ВИТАМИНА В₁₂

***Аннотация:** Статья посвящена микробиологическим способу получения витамина В₁₂ с применением различных продуцентов. Направленная ферментация пропионовокислых бактерий является основным методом получения витамина в России. Для производства кормового витамина используют ассоциацию микроорганизмов.*

***Ключевые слова:** витамин В₁₂, цианокобаламин, бактерии, культивирование, синтез.*

***Annotation:** The article is devoted to the microbiological method of obtaining vitamin В₁₂ using different producers. Directed fermentation of propionic acid bacteria is the main method of obtaining vitamin in Russia. For the production of feed vitamin use the association of microorganisms.*

***Key words:** vitamin В₁₂, cyanocobalamin, bacteria, cultivation, synthesis.*

Витамин В₁₂ участвует в осуществлении биокаталитических реакций, которые обеспечивают кроветворную функцию организма, он содействует улучшению работы печени, благотворно воздействует на регенерацию нервных волокон [1].

Недостаток витамина В₁₂ приводит к тяжелейшим нарушениям процесса кроветворения, что чревато такими заболеваниями, как иммунодефицит, пернициозная анемия, разнообразными симптомами со стороны желудочно-кишечного тракта, поражением нервной системы - подострой дегенерацией спинного мозга с поражением задних канатиков,

психическими расстройствами. У больных витамин В₁₂- дефицитной анемией наблюдаются нарушения печеночного кровотока [2].

Выделение витамина В₁₂ (цианкобаламина) вызывает затруднение из-за его малого содержания в природных продуктах. Из 1 тонны свежей говяжьей печени можно получить лишь около 30 мг чистого цианкобаламина (при его содержании 1:1000000) путем освобождения от белков, водно – спиртовой экстракцией, хроматографическим разделением, адсорбцией и посредством других тонких процессов [3].

Химический синтез витамина является нецелесообразным, поскольку включает в себя 70 стадий [4].

Единственными активными продуцентами витамина В₁₂ в природе являются микроорганизмы, населяющие кишечник животных, почву, гнилостный шлам канализационных выбросов и другие природные среды, которые подходят для интенсивной жизнедеятельности микроорганизмов [5].

Для технического получения витамина В₁₂ используют производство антибиотиков. Цианкобаламин наряду со стрептомицином продуцируется актиномицетами и выделяется из мицелия и культуральной жидкости *Streptomyces griseus* или *Streptomyces olivaceus*. После удаления антибиотиков из культуральной жидкости витамин адсорбируют ионообменными смолами (или активированным углем), из которых затем витамин вымывают разбавленной щелочью или водным бутанолом, выделяют и очищают, используя органические растворители и различные адсорбенты. Ферментативный метод совместного получения витамина и антибиотиков с применением актиномицетов имеет небольшое применение [6].

Однако, существенные преимущества имеет направленная ферментация с применением бактерий, которые способны в значительных количествах накапливать цианкобаламин [7].

Активно продуцируют витамин В₁₂ представители рода *Propionibacterium*. Природные штаммы пропионовокислых бактерий

образуют 1,0—8,5 мг/л корриноидов, но получен мутант *P. shermanii* М-82, с помощью которого получают до 58 мг/л цианкобаламина. В семействе *Propionibacteriaceae* есть и другие представители, которые также способны в значительных количествах накапливать цианкобаламин в клетках. Например, *Eubacterium limosum* (*Batyribacterium retteerii*) [7].

Синтез витамина зависит от условий культивирования: продолжительность проведения процесса, температура, содержание ионов кобальта - предшественника при синтезе витамина В₁₂ и состав питательной среды. В природных питательных средах содержание кобальта мало, поэтому в фоновую питательную среду нужно прибавлять ионы Со²⁺, оказывающие влияние на выход биомассы и синтез цианкобаламина. Исследования последних лет показывают, что интенсификации промышленного получения витамина В₁₂ способствует применение ультразвуковой модуляции метаболизма пропионовокислых бактерий [8].

В отечественном производстве цианкобаламина в качестве продуцента применяют *Propionibacterium shermanii* М-82. Промышленное производство витамина заключается в периодическом культивировании пропионовокислых бактерий в анаэробных условиях на среде, состоящей из кукурузного экстракта, глюкозы, солей аммония и кобальта в нейтральной среде. Так, можно получить не только смесь оксикобаламинов и цианкобаламинов, но и коферментную (связанную с белком микробной клетки) легкоусвояемую форму, обладающую значительным терапевтическим эффектом [13].

АКОС «Синтез» предлагает способ микробиологического синтеза витамина В₁₂ с использованием штамма бактерий *Propionibacterium shermanii* В-4891, который обладает повышенной витаминообразующей способностью, недолгим циклом развития и низкой потребностью в кукурузном экстракте. Данный штамм был получен путем ступенчатой селекции из исходного штамма М-82 с использованием химических мутагенов, депонирован в коллекции культур ВНИИГенетика под номером N В-4891. Промышленное

получение витамина В₁₂ с помощью пропионовокислых бактерий полностью удовлетворяет потребности медицины [8].

Для нужд животноводства для синтеза витамина В₁₂ используют смешанную культуру, состоящую из термофильных метанообразующих бактерий [9].

Биосинтез кобаламинов метанообразующими бактериями (изучен у *Methanosarcina barkeri*) аналогичен биосинтезу корриноидов у пропионовокислых бактерий. Для бактерий *Methanobacterium thermoautotrophicum* характерна локализация большей части клеточного кобаламида во фракции мембран и связь с мембранным белком. Полагают, что интегральный мембранный белковый комплекс, содержащий кобаламид, играет важнейшую роль в метаболизме данных бактерий при утилизации водорода и углекислого газа, которая, вероятно, сводится к транспорту электронов. У метанообразующих бактерий корриноиды участвуют также в катаболизме метанола и ацетата [10].

Во Франции удалось выделить из ила сточных вод мезофильные метаногенные бактерии. Выделенные бактерии инкубируют в ассоциации с другими бактериями в полупроточном режиме с использованием среды, состоящей из метанола, кукурузный экстракт, мелассы, солей аммония и кобальта, 5,6-ДМБ и ортоксалидина. Термофильные штаммы метанотрофных бактерий родов *Methanobacterium* и *Methanobacillus* способны образовывать 2 мг/л кобаламина при содержании в питательной среде 8 г/л метанола [10].

Отечественное производство кормового препарата витамина В₁₂ связано с переработкой барды (отход спиртового или ацетоно-бутилового производства) ассоциацией бактерий, реализовывающих термофильное метановое брожение сточных вод. Ассоциация бактерий представляет собой сложный консорциум анаэробных микроорганизмов, состоящий из сульфатвосстанавливающих углеводсбраживающих, аммонифицирующих и метанообразующих бактерий [9].

Украинский научно-исследовательский институт спиртовой и ликеро-водочной промышленности разработал технологию, позволяющую получить кормовой концентрат витамина В₁₂ сбраживанием меласно-спиртовой барды смешанной культурой метанообразующих бактерий [9].

Среди штаммов рода *Pseudomonas*, способных к образованию цианкобаламина в значительных количествах, чаще всего используют мутант *Pseudomonas denitrificans*, у которого с помощью мутагенеза удалось поднять уровень содержания витамина В₁₂ с 0,6 мг/л (дикий штамм) до 60 мг/л [9].

В качестве продуцента витамина В₁₂ также используют культуру *Pseudomonas fluorescens* штамм ВКМ В-2224Д, полученную путем многоступенчатой селекции и отбора активных по биосинтезу витамина В₁₂ вариантов из коллекционного штамма *Pseudomonas fluorescens* В-98. Штамм депонирован в коллекции микроорганизмов Института биохимии и физиологии микроорганизмов РАН под номером ВКМ В-2224Д. [9].

Использованные источники:

1. Николаев А.Я. Биологическая химия: учебник / А.Я. Николаев. – 5-е изд., стереотип. – М.: Высшая школа, 1989. – 495 с.
2. Лестер С. Витамин В₁₂ / С. Лестер // Витамин В₁₂ и его клиническое применение. – 1962 . - №9. – С.53-61.
3. Сазыкин Ю.О. Биотехнология: учеб. пособие/ Ю.О. Сазыкин, С.Н. Орехов, И.И. Чакалева; под ред. А.В. Катлинского. – 3-е изд., стереотип. - М.: Академия, 2008. – 256 с.
4. Хамагаева И.С. Биотехнология заквасок пропионовокислых: учеб. Пособие / И.С. Хамагаева. – М.: ВСГТУ, 2006. 172 с.
5. Воробьева Л.И. Пропионовокислые бактерии и образование витамина В₁₂/ Л.И. Воробьева. – М.: МГУ, 1986. – 232 с.
6. Грачева И. М. Технология ферментных препаратов: учебное пособие/ И.М. Грачева. – М.: Лесная промышленность, 1975. – 390 с.

7. Быховский В.Я. Микробиологический синтез витамина В₁₂: Обзорная информация. Серия 5. Получение и применение ферментов, витаминов, аминокислот, премиксов/ В.Я. Быховский. – М.: МГУ, 1984. - 60 с.
8. Патент SU 1737915. Штамм бактерий *Propionibacterium shermanii* продуцент витамина В₁₂ / М. А. Ирадян, М.А. Калдрикян, Г.А. Дарбинян, Г.М. Пароникян, В.Д. Грузина, Т.В. Ганичева; акционерное курганское общество медицинских препаратов и изделий «Синтез» (АКОС). — Заяв. 27.03.2005; Оpubл. 20.02.2006; БИ: 05/2006.
9. Безбородов А.М. Биосинтез биологически-активных веществ микроорганизмами / А.М. Безбородов. – Ленинградское отделение: Изд-во Медицина, 1969. – 246 с.
10. Патент SU 2180001. Штамм бактерий *Pseudomonas fluorescens* ВКМ В-2224Д продуцент витамина В₁₂ / А. И. Пахтуев, Ф. Н. Чегодаев; Бердский завод биологических препаратов — Заяв 15.02.2000; Оpubл. 27.02.2002; БИ: 05/2006.