

1 – Институт биохимической технологии и нанотехнологии РУДН, Россия, 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, 10/2

1 – Institute of Biochemical technology and nanotechnology PFUR, 10/2, Miklukho-Maklaya str., Moscow, 117198, Russia

* адресат для переписки:
E-mail: Lilya03s@mail.ru
Тел.: 8 (499) 936 86 85

ХАРАКТЕРИСТИКА ВИТАМИНА В₁₂ И ОСНОВНЫЕ ПРОДУЦЕНТЫ ПРИ ЕГО ПОЛУЧЕНИИ

Л.Ф. Сахибгараева^{1*}, А.И. Марахова¹, Д.К. Смагулова¹, И.Е. Станишевская¹

Резюме. Исследованы литературные данные в области применения и дефицита витамина В₁₂ в организме человека. Приведена характеристика штаммов микроорганизмов, которые являются продуцентами данного витамина при микробиологическом синтезе.

Ключевые слова: витамин В₁₂, цианокобаламин, дефицит, род *Pseudomonas* spp., род *Propionibacterium* spp., микробиологический синтез.

CHARACTERISTICS OF VITAMIN В₁₂ AND ITS MAIN PRODUCERS

L.F. Sahibgaraeva^{1*}, A.I. Marahova¹, D.K. Smagulova¹, I.E. Stanishevskaya¹

Abstract. We investigated the published data for the application and vitamin В₁₂ deficiency in humans. The characteristic of strains of microorganisms which are producers of the vitamin in the microbiological synthesis.

Keywords: vitamin В₁₂, cyanocobalamin, *Pseudomonas* spp., *Propionibacterium* spp., microbiological synthesis.

ВВЕДЕНИЕ

Витамины играют в жизни человека огромную роль, являясь незаменимыми факторами питания. Они необходимы для всех систем нашего организма. Витамины группы В активируют белковый, жировой и углеводный обмен, тем самым участвуя в кроветворении и нормальном функционировании нервной ткани [1].

Витамин В₁₂ – сложное неполимерное соединение, содержащее микроэлемент кобальт, который важен для жизнедеятельности организма человека. Витамин В₁₂ имеет огромное значение в медицине и представлен несколькими родственными соединениями, однако, как правило, под витамином В₁₂ подразумевают цианокобаламин. В настоящее время широко изучены свойства и функции витамина В₁₂, но цианокобаламин, его метаболиты и их аналоги продолжают привлекать внимание химиков, биохимиков и медиков. Также исследованы этиология и патогенез витамин-В₁₂-дефицитной анемии (пернициозной анемии) и разработана терапия этого заболевания [2–11].

В работе приведены основные свойства, функции витамина В₁₂ и характеристика различных штаммов микроорганизмов, которые являются продуцентами при его биосинтезе.

ХАРАКТЕРИСТИКА ВИТАМИНА В₁₂

Витамин В₁₂ (цианокобаламин) имеет большое значение в жизнедеятельности человека. Витамин В₁₂ возобновляет запасы железа в организме человека, регулирует основные обменные процессы, в организме, способствует повышению иммунного статуса организма, участвует в делении клеток, синтезе дезоксирибонуклеиновой и рибонуклеиновой кислот, регулировании жирового и аминокислотного обмена, улучшает качество крови. При взаимодействии витамина В₁₂ с молекулами фолиевой кислоты вырабатывается достаточное количество холина для обеспечения устойчивости организма к повседневным стрессам. Витамин В₁₂ совместно с витамином А участвует в синтезе тканей тела, обеспечивая вступление каротиноидов (провитамины А) в обмен веществ и превращение их в активный витамин А. Суточная норма витамина В₁₂ для взрослых – от 2 до 7 мкг, для детей – от 0,3 до 1 мкг, общее содержание в организме человека – 2–5 мкг, большая часть аккумулируется в печени. Витамин В₁₂ участвует в важнейших биохимических процессах миелинизации нервных волокон, установлена достоверная

связь наличия депрессивного состояния у человека с содержанием витамина В₁₂ [1–11].

Витамин В₁₂ был выделен из печени в 1948 г., а в 1973 г. синтезирован в лабораторных условиях. Витамин В₁₂ представляет собой сложную молекулу, состоящую из тетрапирролового кольца с атомом кобальта в центре. Различают формы витамина В₁₂: цианокобаламин (рисунок 1), гидроксикобаламин, метилкобаламин и 5-дезоксаденозилкобаламин, содержащие разные заместители у атома кобальта – циано-, гидроксильную, метильную группу или дезоксиаденозильный радикал.

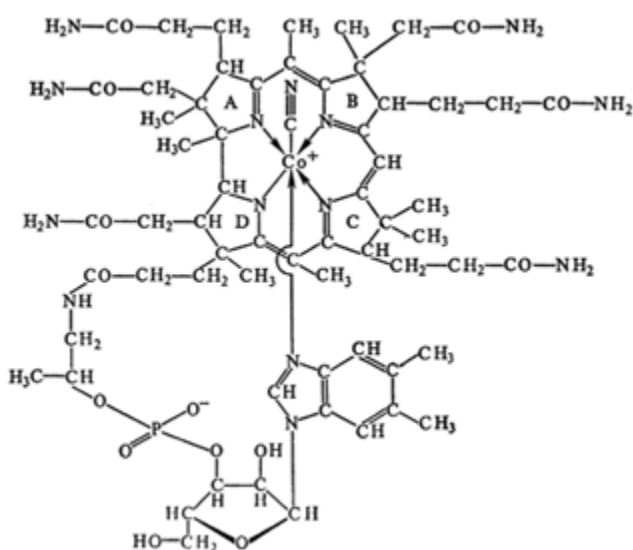


Рисунок 1. Структурная формула цианокобаламина [2]

Цианокобаламин (α-(5,6-диметилбензимидазол)-кобамидцианид) наиболее широко используется в медицинской практике в качестве лекарственного препарата, так как наряду с гидроксикобаламином (оксикобаламин) характеризуется стабильностью при хранении и высокой биологической активностью в отличие от метилкобаламина и 5-дезоксаденозилкобаламина, которые нестабильны и являются коферментами в двух жизненно важных биохимических реакциях. Цианокобаламин биологически неактивен и используется тканями только после превращения его в коферментные формы. Другие представители группы витамина В₁₂ отличаются от цианокобаламина тем, что вместо группы CN- содержат молекулу воды или молекулу аммиака [2, 3, 6, 12].

Дефицит витамина В₁₂ приводит к тяжелейшим нарушениям процесса кроветворения: пернициозной анемии, иммунодефициту, разнообразным симптомам со стороны желудочно-кишечного тракта, поражению нервной системы – подострой дегенерации спинного мозга с поражением задних канатиков, психическим расстройствам, у больных витамин-В₁₂-дефицитной анемией имеются нарушения печеноч-

ного кровотока [1, 7, 9, 10]. В статье [6] авторы приходят к выводу, что дефицит витамина В₁₂ не всегда приводит к развитию анемии, степень дефицита витамина далеко не всегда соответствует степени тяжести анемии. Поскольку ежедневная потеря витамина В₁₂ очень невелика (2–5 мкг), то истинный алиментарный его дефицит встречается крайне редко. Дефицит витамина В₁₂ характерен для вегетарианцев и вскормленных их молоком грудных детей, встречается у 30% пожилых людей.

В настоящее время дефицит витамина В₁₂ обусловлен возрастанием потребления продуктов, подвергнутых технологической обработке, употреблением фастфуда; дефицит витаминов группы В может возникнуть при развитии паразитарного заболевания, на фоне проблем с пережевыванием и расстройствами пищеварения, гипоацидного и атрофического гастритов. Витамин В₁₂ синтезируется исключительно микроорганизмами: бактериями, актиномицетами и сине-зелеными водорослями. Этот витамин вырабатывается микроорганизмами в пищеварительном тракте животного и человека как продукт деятельности микрофлоры. Учитывая, что синтез витамина В₁₂ кишечной флорой незначителен, витамин должен поступать в организм с пищей. Наиболее богаты витамином В₁₂ печень, почки, моллюски, раки, крабы, молочные продукты. Препараты витамина В₁₂ применяют, как правило, в виде инъекций. При пероральном приеме витамина В₁₂ исследователи отмечают слабую всасываемость витамина, так всасываемость цианокобаламина и метилкобаламина составляет всего 1–3% [1, 6, 9, 10, 13].

БИОСИНТЕЗ ВИТАМИНА В₁₂ МИКРООРГАНИЗМАМИ. ОСНОВНЫЕ ПРОДУЦЕНТЫ

Химический синтез витамина сложен, состоит из 70 стадий, поэтому экономически целесообразно производить витамин В₁₂ микробиологическим способом. В настоящее время для биосинтеза витамина В₁₂ в промышленности используют в основном штаммы представителей родов бактерий: *Propionibacterium*, *Pseudomonas* и *Methanobacteria* [5, 14–19].

Завод препаратов микробиологического синтеза «Энзим» в качестве продуцентов микробиологического синтеза витамина В₁₂ и его коферментной формы применяет пропионовокислые бактерии. Кормовые концентраты, содержащие витамин В₁₂, получают на отходах бродильной промышленности (послеспиртовые, ацетон-бутиловые барды и др.) с помощью комплекса метанообразующих бактерий [20].

Пропионовокислые бактерии (*Propionibacterium freundenreichii*, *P. acidopropionici*, *P. shermanii*) являются активными продуцентами витамина В₁₂, липиды пропионовокислых бактерий входят не только в

структурные элементы клеток, но и играют роль защитных компонентов от действия некоторых антибиотиков. Синтез витамина зависит от условий культивирования: температура и продолжительность проведения процесса, состав питательной среды, содержание ионов кобальта, используемого в качестве предшественника при синтезе витамина В₁₂. В естественных питательных средах содержание кобальта минимально, поэтому в фоновую питательную среду необходимо добавлять ионы Со²⁺, которые влияют на выход биомассы и синтез витамина В₁₂ [5, 17–19]. В работе [21] авторы предлагают применять ультразвуковую модуляцию метаболизма пропионовокислых бактерий для интенсификации промышленного получения витамина В₁₂: исследования показывают, что подбор определённых условий озвучивания сред позволяет направленно изменять соотношение различных форм витамина в среде при культивировании.

В отечественном производстве витамина В₁₂ в качестве продуцента применяют *Propionibacterium freudenreichii* var. *shermanii*, например в работе [10] предложен способ микробиологического синтеза витамина В₁₂ при помощи штамма бактерий *Propionibacterium shermanii* В-4891, позволяющий достигать концентрации витамина В₁₂ в культуральной жидкости до 40 мкг/мл. В промышленном производстве бактерии выращивают посредством периодического культивирования в анаэробных условиях в среде, содержащей кукурузный экстракт, глюкозу, соли кобальта и аммония, при рН около 7,0. Образующиеся в процессе брожения кислоты нейтрализуют раствором щелочи, который непрерывно поступает в ферментер. Через 72 ч в среду добавляют 5,6-диметилбензимидазол – предшественник витамина В₁₂ – и продолжают ферментацию еще 3 суток. При отсутствии предшественника бактерии синтезируют соединения, не имеющие клинического значения. Витамин В₁₂ накапливается в клетках бактерий, поэтому после окончания брожения биомассу сепарируют и экстрагируют из нее витамин водой, подкисленной до рН 4,5–5,0 при температуре 85–90 °С в течение 60 мин в присутствии стабилизатора (0,25% раствор натрия нитрита), после чего водный раствор витамина В₁₂ охлаждают, доводят рН до 6,8–7,0 50% раствором натрия гидроксида. К раствору добавляют алюминия сульфат и хлорид железа трехвалентного [Al₂(SO₄)₃×18H₂O и безводный FeCl₃] для коагуляции белков и фильтруют через фильтр-пресс. Фильтрат упаривают и дополнительно очищают, используя методы ионного обмена и хроматографии, после чего проводят кристаллизацию витамина при 3–4 °С из водно-ацетонового раствора. Для предотвращения разложения В₁₂ все операции необходимо проводить в сильно затемненных помещениях или при красном свете. Во избежание попадания посторонней микрофлоры культивирование следует проводить в аппа-

ратуре закрытого типа в стерильных условиях. Питательная среда перед подачей в посевные аппараты должна стерилизоваться. Таким образом, можно получить не только смесь цианокобаламинов и оксикобаламинов, но и коферментную (связанную с белком микробной клетки) легкоусвояемую форму, которая обладает высоким терапевтическим эффектом [16, 22, 23].

В качестве продуцента витамина В₁₂ также используют культуру *Pseudomonas fluorescens* штамм ВКМ В-2224Д. Достоинствами этого штамма являются высокий выход витамина по сравнению с другими продуцентами, например *Propionibacterium shermanii*, относительная устойчивость к заражению посторонней микрофлорой, непатогенность. Штамм бактерий *Pseudomonas fluorescens* ВКМ В-2224Д растет при 28–32 °С и рН 7–7,2 и постоянном перемешивании. Рост культуры происходит параллельно с биосинтезом витамина В₁₂ в аэробных условиях. Продуктивность культуры за 150 ч роста ферментации составляет 130–150 мкг/мл [14].

В Японии производство витамина осуществляют при помощи бактерий *Acentobacterium*, *Rhizobium Colalaminogenum FERMBP-4429*, *Propionibacterium shermanii* или *freundenreichii*, устойчивых к пропионовой кислоте. При данных способах получения витамина В₁₂ концентрация витамина В₁₂ в культуральной жидкости составляет 60–70 мкг/мл [22]. В ряде стран (Франция, Китай, Корея и др.) для промышленного получения кобаламинов в аэробных условиях используются штаммы бактерий *Pseudomonas denitrificans*, трансформированные плазмидой. Применение рекомбинантных штаммов *Pseudomonas denitrificans* позволяет повысить продуктивность биосинтеза витамина В₁₂ [14, 24–26].

Промышленное получение витамина В₁₂ с бактериями данных штаммов позволяет полностью удовлетворить потребности медицины как в настоящее время, так и в будущем.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данная статья была посвящена характеристике продуцентов витамина В₁₂. Наиболее часто в качестве продуцентов витамина В₁₂ используют культуры представителей родов *Pseudomonas*, *Propionibacterium* и метаногенных бактерии, позволяющие совмещать высокий выход конечного продукта с относительной устойчивостью к заражению посторонней микрофлорой.

Также были рассмотрены основные свойства витамина В₁₂. Его применяют в медицине при лечении пернициозной анемии, нарушениях в нервной системе и головном мозге. Дефицит витамина в организме человека может привести к серьезным нарушениям обмена веществ, нервной системы и функций мышц.

ЛИТЕРАТУРА

1. В. Г. Ребров. Витамины, макро- и микроэлементы. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. 128 с.
2. В.Л. Кретович. Биохимия растений. – М.: Высшая школа, 1980. 445 с.
3. В.Б. Спиричев, Ю.И. Барашнев. Врожденные нарушения обмена витаминов. – М.: Медицина, 1977. 216 с.
4. И.В. Данилова, Н.В. Доронина, Ю.А. Троценко, А.И. Нетрусов, И.П. Рыжикова. Участие витамина В₁₂ в биосинтезе ДНК у *Methylobacterium dichloromethanicum*, зависимое от интенсивности аэрации // Микробиология. 2004. № 2. С. 169–174.
5. И.С. Хамагаева. Биотехнология заквасок пропионовоокислых. – М.: ВСГТУ, 2006. 172 с.
6. Т.Н. Перекатова, М.Н. Остроумова. Еще раз о дефиците витамина В₁₂ // Клиническая онкогематология. 2009. Т. 2. № 1. С. 185–195
7. Ю.А. Старчина. Витамины группы В в лечении заболеваний нервной системы // Неврология, нейропсихиатрия, психоматика. 2009. № 2. С. 84–87.
8. И.С. Луцкий, Л.В. Лютикова, Е.И. Луцкий. Витамины группы В в неврологической практике // Международный неврологический журнал. 2008. № 2. С. 89–93.
9. М.Ю. Андрианова, Е.В. Ройтман, А.М. Исаева, И.М. Колесникова, М.В. Нуреев. Патогенетическое и клиническое обоснование комплексной профилактики гипергомоцистеинемии // Архивъ внутренней медицины. 2014. № 4(18). С. 32–36.
10. С.Н. Заика, Н.Н. Жилкова, В.Г. Сейидов. Особенности гемодинамики печени при витамин-В₁₂-дефицитной анемии // Здоровье. Медицинская экология. Наука. 2012. № 1–2. С. 47–48.
11. Я.М. Навменова, Т.В. Мохорт. Содержание витамина В₁₂ и гомоцистеина у пациентов с сахарным диабетом 1-го типа и депрессией // Здоровоохранение. 2012. № 11. С. 18–20.
12. М.Д. Машковский. Лекарственные средства. В 2 ч. – Минск: Беларусь, 1987. 576 с.
13. О.-Я.Л. Бекиш, В.М. Семенов, Л.Э. Бекиш, В.Я. Бекиш. Влияние гельминтов на содержание витаминов у их хозяев // Вестник ВГМУ. 2007. Т. 6. № 3. С. 28–35.
14. Патент 2180001 РФ. Штамм бактерий *Pseudomonas fluorescens* ВКМ В-2224Д – продуцент витамина В₁₂ / А.И. Пахтуев, Ф.Н. Чегодаев; Бердский завод биологических препаратов. – №2000103571; Заяв. 15.02.2000; Опубл. 27.02.2002; Бюл. № 13.
15. Патент 1737915 РФ. Штамм бактерий *Propionibacterium shermanii* – продуцент витамина В₁₂ / Т.В. Ганичева, В.Д. Грузина, Г.М. Пароникян и др.; Курганский комбинат медицинских препаратов и изделий «Синтез». – №4806695; Заяв. 26.03.1990; Опубл. 30.11.1994; Бюл. № 13.
16. В.Н. Соколов. Аппаратура микробиологической промышленности. – Л.: Машиностроение, 1988. 278 с.
17. Э.А. Сейдаметова, М.Р. Шакирзянова, Д.М. Рузиева, Т.Г. Гулямова. Получение кобальтоустойчивых штаммов пропионовоокислых бактерий – активных продуцентов витамина В₁₂ // Прикладная биохимия и микробиология. 2004. № 6. С. 645–648.
18. Л.И. Воробьева. Пропионовоокислые бактерии. – М.: Изд-во МГУ, 1995. 288 с.
19. О.Н. Гора, И.Н. Павлов. Исследование некоторых основных факторов, определяющих получение сухих препаратов пропионовоокислых бактерий // Техника и технология пищевых производств. 2011. № 4. С. 78–81.
20. Официальный сайт завода препаратов микробиологического синтеза «Энзим». URL: <http://enzim.biz/> (дата обращения 20.07.2015).
21. Б.С. Шершенков, Е.П. Сучкова. Ультразвуковая модуляция метаболической активности *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* при получении пищевых продуктов, обогащённых витамином В₁₂ // Научный журнал НИУ ИТМО. Серия «Процессы и аппараты пищевых производств». 2013. № 2. URL: <http://www.processes.ihbt.ifmo.ru> (дата обращения 20.07.2015).
22. Л.В. Тимощенко, М.В. Чубик, А.Н. Пестряков. Основы микробиологии и биотехнологии. – Томск: Томский политехнический университет, 2011. 194.
23. Пробиотики для здоровья. Микробиологический синтез витамина В₁₂. URL: <http://propionix.ru/mikrobiologicheskii-sintez-vitamina-b12> (дата обращения 20.07.2015).
24. S.Zhou, S.Ashok, Y.Ko, D.-M.Kim, S.Park. Development of a deletion mutant of *Pseudomonas denitrificans* that does not degrade 3-hydroxypropionic acid // Applied Microbiology and Biotechnology. 2014. V. 98. Issue 10. P. 4389–4398.
25. X. Cheng, W.Chen, W.-F. Peng, K.-T. Li. Improved vitamin В₁₂ fermentation process by adding rotenone to regulate the metabolism of *Pseudomonas denitrificans* // Applied Biochemistry and Biotechnology. 2014. V. 173. Issue 3. P. 673–681.
26. M.V. Arasu, R. Sarkar et al. Isolation of a novel *Pseudomonas* species SP2 producing vitamin В₁₂ under aerobic condition // Biotechnology and Bioprocess Engineering. 2013. V. 18. Issue 1. P. 43–51.