

РИБОФЛАВІН – ВИРОБНИЦТВО І ЗАСТОСУВАННЯ

В.Ю. ПОЛІЩУК, асистент
О.М. ДУГАН, доктор біологічних наук

*Національний технічний університет України,
«Київський політехнічний інститут»*

Наведено основні властивості вітаміну B₂, показано причини його нестачі, проаналізовано інформацію щодо основних продуцентів рибофлавіну, які використовуються в промисловості, розглянуто основні технології отримання рибофлавіну.

Вітамін B₂, рибофлавін, флавоноїди, технологія, *Ermothecium ashbyii*

Історична довідка. Офіційно визнана назва вітаміну B₂ – рибофлавін. Назви, що використовувались раніше: вітамін G, лактофлавін, овофлавін, гепатофлавін, вердофлавін та урофлавін. Більшість з них вказують на джерело, з якого даний вітамін був виділений – молоко, яйця, печінка, рослини та сеча. У 1879 році Бліт виділив з сироватки лактохром – жовту, водорозчинну флуоресцюючу речовину. Через півстоліття – у 1932 році – Варбург та Крістіан виділяють жовтий фермент з пивних дріжджів та припускають, що він відіграє важливу роль у клітинному диханні. Через рік Кун, Георгі та Вагнер-Йорег виділяють з яєчного білка та сироватки жовтий кристалічний пігмент, який стимулює ріст клітин, та ідентифікують його як вітамін B₂. У 1934 р. група Куна в Хейдельберзі та група Каррера в Цюріху синтезують чистий рибофлавін. 1935 р. – відкриття Гільєрмоном явища понадсинтезу вітаміну B₂ міцеліальними дріжджеподібними грибами. 1937 р. – фармацевтична рада Американської медичної асоціації присвоює вітаміну назву «рибофлавін». 1941 р. – група Себреля демонструє клінічні прояви нестачі рибофлавіну в експериментах на волонтерах. 1968 р. – Глатцель та його група пропонують використовувати тест вимірювання активності глутатіон-редуктази еритроцитів для визначення статусу рибофлавіну.

Властивості рибофлавіну. Жоден вітамін не функціонує в обміні речовин в тому вигляді, в якому він потрапляє з їжею. Перш ніж реалізувати свої функції, він має пройти ряд певних етапів за допомогою спеціальних транспортних, ферментних та рецепторних білків (рис.1) [1].

Флавіни, що потрапляють з їжею, звільняються у шлунку під дією кислот і потім всмоктуються у верхній частині тонкого кишечника за допомогою транспортного механізму з участю жовчних солей. В клітинах слизистої оболонки кишечника рибофлавін перетворюється в коферментну форму флавінового мононуклеотиду (ФМН) з подальшим зв'язуванням в системі транспорту з плазматичним альбуміном та переноситься у печінку, де перетворюється в другу коферментну форму флавінового аденін

динуклеотиду (ФАД) і зв'язується з спеціальними білками, які називаються флавіновими протеїнами.

У тканини рибофлавін потрапляє головним чином у формі ФАД, але концентрація його не висока і він не запасується там у великій кількості. Печінка – головний орган зберігання – містить близько третини загальної кількості рибофлавіну в організмі. Рівень вмісту рибофлавіну в плазмі крові відображає кількість рибофлавіну, що потрапляє з їжею і в нормі становить 30-40 мкг/л. Значна концентрація рибофлавіну спостерігається в тканинах сітчатки, але його функція там невідома. Виділення рибофлавіну здійснюється головним чином з сечею, якій він надає жовтий колір. Невелика кількість рибофлавіну також виділяється разом з потом і жовчю. Рибофлавін, що знаходиться в калі, є головним чином результатом діяльності кишкових бактерій. У жінок в період годування груддю близько 10% отриманого рибофлавіну виділяється в молоко.

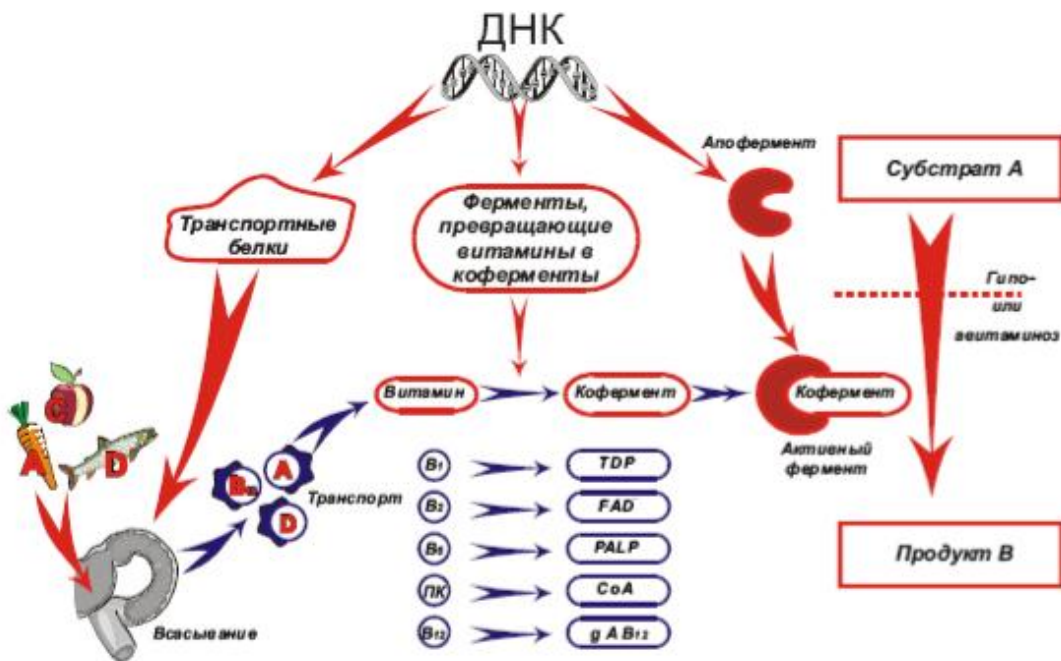


Рис. 1. Обмін та функціональна роль вітамінів

Рибофлавін належить до флавінів, в основі будови яких лежить гетероциклічна ізоаллоксазинова система (рис. 2), що має три конденсованих цикли: ароматичний, піразиновий та піримідиновий. До азоту піримідинового кільця приєднаний спирт рибіт.

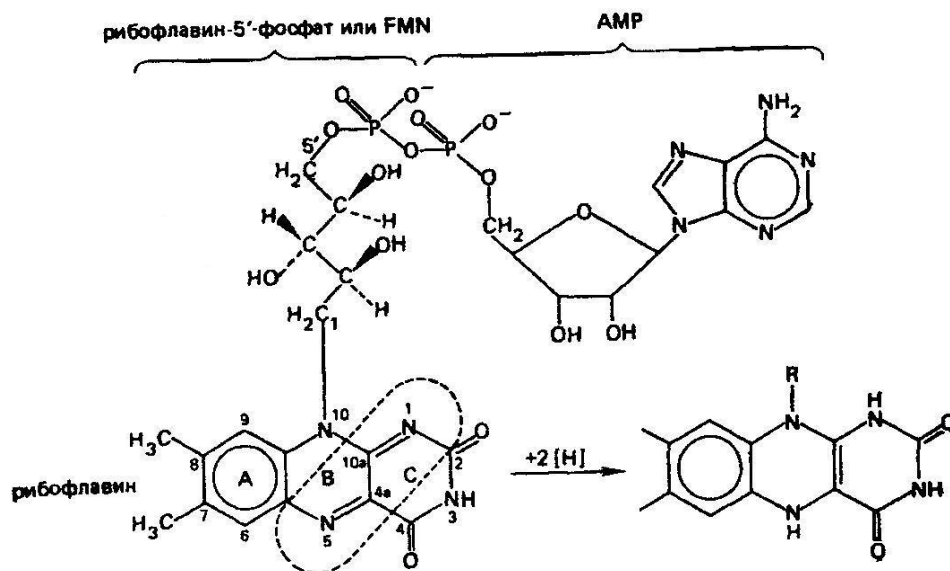


Рис. 2. Структура рибофлавіну, флавінові коферменти ФАД та ФМН.

Пунктиром позначена ділянка, структура якої змінюється при відновленні [2]

Рибофлавін кристалізується у вигляді помаранчево-жовтих голок з температурою плавлення $+282^{\circ}\text{C}$ з розкладанням. Він нерозчинний в жирах та в розчинниках жирів, слабкорозчинний у воді. При температурі $+27,5^{\circ}\text{C}$ насичений водний розчин містить $0,012\%$ рибофлавіну, при $+40^{\circ}\text{C}$ – $0,01944\%$, а при $+100^{\circ}\text{C}$ – $0,23\%$. У лужному середовищі рибофлавін краще розчинний ніж у нейтральному. Слабко розчинний в нормальному бутиловому, аміловому, етиловому ($0,0045\%$ при $27,5^{\circ}\text{C}$) та метиловому спиртах, помірно розчинний у льодяній оцтові та мурашиній кислотах. Добре - у соляній кислоті.

В нейтральних водних розчинах має зеленувато-жовте забарвлення, зумовлене наявністю азометинової групи $>\text{C}=\text{N}-$, з інтенсивною жовто-зеленою флуоресценцією, яка зменшується до зникнення як у кислому, так і в лужному середовищі (максимум при рН 6-7). Рибофлавін у лужному середовищі переходить в люміфлавін, розчинний в хлороформі і не володіє біологічними властивостями вітаміну B_2 .

Рибофлавін – світлочутлива жовта речовина. Світлочутливість зумовлена наявністю в боковому ланцюзі в положенні 2 вільної гідроксильної групи. Під дією світла в нейтральному та кислому середовищі рибофлавін перетворюється на біологічно неактивний люміхром, який володіє сильною голубою флуоресценцією. Пряме сонячне світло швидко руйнує рибофлавін при будь-якому значенні рН. Найбільш пагубну дію на рибофлавін мають промені світла з довжиною хвилі 440 нм . [3]

Спектр поглинання рибофлавіну (у воді) має один максимум у видимій частині спектра при довжині хвилі 445 нм та три максимуми в ультрафіолетовій частині спектра при довжині хвилі $372, 269, 225\text{ нм}$. Спектр флуоресценції знаходиться в жовто-зеленій області (максимум 530 нм). Флуоресценція пов'язана з наявністю вільної аміногрупи у положенні 3 кільця піримідину.

Рибофлавін функціонує в 2 коензимних формах, що являють собою його фосфорні ефіри: рибофлавін-5'-фосфат (ФМН) та

флавінаденіндинуклеотид (ФАД), а також у вигляді моно- та динуклеотидних форм – аналогів рибофлавіну.

Рибофлавін діє як посередник при переносі електронів у різних окислювально-відновних реакціях. Він приймає участь у великій кількості реакцій метаболізму вуглеводів, жирів та білків, а також в реакціях по виробництву енергії в дихальному ланцюгу. Коферменти рибофлавіну грають важливу роль при перетворенні піридоксину (вітаміну В₆) та фолієвої кислоти в їх активні коферментні форми та в перетвореннях триптофану в ніацин.

Три факти пояснюють потребу клітини у флавінових ферментах. Це, по-перше, здатність флавінових коферментів до окислювально-відновних реакцій, що дозволяє флавінам функціонувати в ланцюгу переносу електронів в мітохондріях та різних реакціях дегідрування. По-друге, здатність флавінів приймати участь в окислювальних реакціях з вільними радикалами і в реакціях з іонами металів, та, по-третє, - аутооксидабельність флавінів, яка дозволяє переносити електрони безпосередньо на молекулярний кисень та приймати участь в реакціях гідроксилування [4].

Необхідність у рибофлавіні. Рибофлавін є одним з найбільш широко розповсюджених вітамінів. Він міститься у всіх тваринних та рослинних клітинах, але лише деякі продукти є багатими джерелами даного вітаміну. Найбільша концентрація рибофлавіну спостерігається у дріжджах та печінці, але найбільш розповсюдженими дієтичними джерелами рибофлавіну є молоко та молочні продукти, м'ясо, яйця, овочі та зелень. Рибофлавін з тваринних продуктів засвоюється краще, ніж з рослинних джерел. У коров'ячому, овечому та козиному молоці не менш 90% рибофлавіну знаходиться у вільній формі, в більшості інших джерел він виявляється зв'язаним з білками.

Вітамін В₂ термостабільний, тому він практично не руйнується в процесі звичайного приготування їжі, якщо тільки не піддавати продукти тривалій дії світла, що може призвести до втрати до 50% вітаміну. Деяка частина рибофлавіну може також втрачатись разом з водою, що використовується для приготування. Внаслідок високої чутливості рибофлавіну до дії світла, він швидко руйнується в молоці, що зберігається в скляних пляшках при яскравому сонячному світлі (85% протягом 2 год.). Стерилізація продуктів опроміненням або обробка оксидом етилену може також призвести до руйнування рибофлавіну.

Нестача рибофлавіну. Явні клінічні симптоми рибофлавінової нестачі не часто зустрічаються у розвинутих країнах. Проте доклінічні стадії рибофлавінової нестачі, що характеризуються змінами біохімічних параметрів, достатньо широко розповсюджені. У дітей це може призвести до затримки росту. Нестача рибофлавіну не часто спостерігається сама по собі, та зазвичай проявляється у комбінації з нестачею інших водорозчинних вітамінів.

Штучно викликана рибофлавінова нестача в експериментах на волонтерах призводила до глоситу (запалення язика), стоматиту (запалення слизової оболонки порожнини рота з утворенням тріщинок у кутках губ), зуду, шелушіння шкіри та себорейного дерматиту (висипу на шкірі). У осіб,

які страждають рибофлавіновою нестачею, може спостерігатися васкуляризація рогиовиці у поєднанні з фотофобією, погіршенням зору, зудом та враженням, наче в око потрапила порошок.

Дослідження з використанням антагоніста галоктофлавіна виявили ряд змін, що зазвичай не зустрічаються при звичайній дієтологічній нестачі рибофлавіну. Зокрема, спостерігалась нормохронічна анемія та периферична невротія кінцівок (відчуття поколювання, відчуття холоду та болю). Нестача рибофлавіну також розглядається як тератогена, оскільки вагітні криси, які отримували недостатню кількість рибофлавіну народжували дітей з багатьма аномаліями.

Нестача рибофлавіну може виникнути внаслідок травматичного пошкодження, операції або хірургічної операції, а також спостерігалась у пацієнтів, з хронічним хворобливим станом (ревматоїдна лихорадка, туберкульоз, повільнопротікаючий бактеріальний ендокардит), діабет, запалення щитовидної залози та цироз печінки. Другу групу ризику складають жінки похилого віку, що приймають пероральні контрацептиви, діти та підлітки з малозабезпечених сімей, діти, що страждають хронічними хворобами серця, люди, що не включають у свій раціон молочні продукти, та малі діти з підвищеним вмістом білірубину в сироватці крові та які проходять тривалий курс фототерапії.

Синдром нестачі всмоктування може розвинути в результаті шлунково-кишкових розладів, таких як спру, целиакальна хвороба, запір, резекція тонкої кишки, діарея, запалення тонкої кишки, атрезія жовчних протоків та синдром подразнення кишечника. Наслідки недостатнього надходження рибофлавіну в організм можуть ускладнюватися хронічним алкоголізмом та хронічним стресом.

Більше 20-ти років в Україні вирішують проблеми, пов'язані з наслідками Чорнобильської катастрофи. Було проведено обстеження людей, які брали участь у ліквідації аварії, а також тих, хто проживає на території, прилеглий до Прип'яті (Київська область, м. Славутич), і працюють на об'єкті «Укриття» та ЧАЕС. Вибіркове обстеження вітамінного статусу персоналу ЧАЕС і об'єкта «Укриття» показало, що забезпеченість організму більшості цих людей (67–91%) вітамінами С, В₁, В₂, В₆ значно нижче норми. Дефіцит цих вітамінів і мікроелемента селену виявлено також в організмі 50–90% обстежених жінок і дітей, що мешкають у м. Славутич. Дефіцит вітамінів в організмі більшості обстежених має характер полігіповітамінозу, тобто поєднання нестачі кількох вітамінів групи В за одночасно низької забезпеченості селеном, а у частини обстежених жінок і дітей – також і залізом. Результати багаторічних комплексних досліджень авторських колективів свідчать про необхідність та актуальність формування та здійснення Міждержавної програми з оптимізації харчування, мікронутрієнтного статусу та здоров'я населення потерпілих регіонів України, Білорусі та Росії [5].

Застосування рибофлавіну. Рибофлавін застосовують при гіпо- та арибофлавінозі екзо- та ендogenous походження, гемералопії, кон'юнктивіті, іриті, кератиті, помутнінні рогиовиці, катаракті, ранах та язвах, що довго не загоюються, променевої хворобі, астенії, хейліті, кутовому стоматиті (заїди), глоситі, зудячому дерматозі, екземі, нейродерміті, фотодерматозі, себореї,

червоних вуграх, кандидозі, вірусному гепатиті А, хронічному гепатиті, цирозі печінки, порушеннях функції ШКТ, спру, гіпотрофії, анемії, лейкозі. З профілактичною метою – при зниженні всмоктування з ШКТ, інтенсивній елімінації та збільшенні потреби в рибофлавіні (гостра і хронічна гіпоксія, дихальна та серцева недостатність, опікова хвороба, обмороження, нестача білкового та надлишок вуглеводного харчування, гострі інфекційні захворювання, в т.ч. при лікуванні протимікробними засобами, що пригнічують грамнегативну флору кишечника, фототерапія).

Рибофлавін незамінний при виробництві звичних бульйонних кубиків, супів швидкого приготування та інших подібних продуктів. Саме рибофлавін (Е 101) надає цим продуктам характерний «бульйонний» відтінок. Рибофлавін вдало використовується для того, щоб надати привабливого забарвлення таким продуктам, як морозиво, пудинги, молочні напої, цукрова глазур, сухі швидкорозчинні напої. Безсумнівною перевагою рибофлавіну в якості барвника в порівнянні з багатьма штучними барвниками є його безпечність та органічність для людини. Для забарвлення продуктів використовується як сам рибофлавін, так і натрієва сіль рибофлавін-5'-фосфату, оскільки вона краще розчинна у воді.

Інша сфера застосування рибофлавіну – збагачення продуктів харчування. Він широко використовується для вітамінізації молока, круп, дієтичних продуктів, дитячого харчування. Найчастіше він входить у склад сухих гомогенних вітамінних сумішей (преміксів), які застосовують для збагачення.

Рибофлавін застосовується у сільському господарстві. Використання препарату у тваринництві збільшує приріст тварин та птахів до 15%, на 30% знижує смертність, на 3% збільшує яйценосність у курей та на 6% – виводимість курчат.

Лікарські препарати, що містять рибофлавін. Лікарські препарати, що містять рибофлавін, вміст у них рибофлавіну та назви фірм-виробників наведено у таблиці 1.

Виробництво рибофлавіну.

Продуценти. Рибофлавін синтезує більша частина вищих рослин та багато мікроорганізмів, включаючи бактерії, дріжджі та гриби. Тварини не здатні до самостійного синтезу рибофлавіну, і їх потреба в ньому задовольняється мікрофлорою ШКТ та їжею.

Мікроорганізми-продуценти рибофлавіну поділяють на 3 групи:

- слабкі (*Clostridium acetobutylicum*);
- помірні (дріжджі *Pichia guilliermondii*, *Candida flareri*);
- сильні суперпродуценти (*Eremotecium ashbyii*, *Ashbya gossipii*).

1. Лікарські препарати, що містять рибофлавін.

Назва препарату	Вміст у препараті рибофлавіну, мг	Фірми-виробники даного препарату
Ревіт	1,0	Одеське виробниче хіміко-фармацевтичне підприємство ТОВ «Біостимулятор», Укр. фарм. компанія «Технолог», Київський вітамінний завод «Кутновський ФЗ. Польща»
Вітамін В ₂ Рибофлавін моноклеотид	3,0 1% розчин для ін'єкцій	Біостимулятор (Україна), Московська фармацевтична фабрика (Росія) Новосібіхфарм (Росія), Уфавіта (Росія), Фармстандарт-Уфімський вітамінний завод (Росія)
Вітабекс	3,0	СТС Кемікал Індастріз
Герімакс	1,7	Данск Дроге А/С (Данія), Нікомед Австрія ГмбХ (Австрія)
Комплевіт	15,0	Уфавіта (Росія), Фармстандарт-Уфімський вітамінний завод (Росія), київський вітамінний завод
Комплевіт-Актив	1,0	Уфавіта (Росія)
Декамевіт	10,0	АЙ СІ ЕН Октябрь (Росія), Уфавіта (Росія), Київський вітамінний завод
Вітаспектрум	1,0	Верофарм/ Белгородський філіал (Росія)
Віташарм	5,0	Верофарм/ Белгородський філіал (Росія)
Мульти-табс Юніор	1,6	Ферросан АС (Данія)
Мульти-табс Перинатал Гексавіт	2,4 2,0	Ферросан АС (Данія)
Гендевіт	1,5	АЙ СІ ЕН Марбіофарм (Росія), Алтайвітаміни (Росія), Верофарм/ Белгородський філіал (Росія), Дальхімфарм (Росія), Уралбіофарм (Росія), Уфавіта (Росія), Щелковський вітамінний завод (Росія), Українська фармацевтична компанія «Технолог» АЙ СІ ЕН Марбіофарм (Росія), Верофарм, Белгородський філіал (Росія), Уфавіта (Росія), Фармстандарт-Уфімський вітамінний завод (Росія), Щелковський вітамінний завод (Росія)
Дуовіт	1,2	KRKA
Піковіт	0,3	KRKA
Гексавіт-УВІ	2,0	Фармстандарт-Уфімський вітамінний завод (Росія)
Гепасол А	12,0	Хемофарм Д.Д. (Югославія)
1	2	3
Біо-Макс	1,27	Щелковський вітамінний завод (Росія)
Біовіталь гель для дітей	0,33	Хоффманн-Ля Рош Лтд вироблено А. Наттерман унд Сі ГмбХ (Германія)

(Кіндер Біовіталь) Матерна	3,4	Ваєт-Ледерле (США), Вайєт-Айєрст (Канада)
Пексвітал	1,8, складається з вітамінного концентрату "Премікс" фірми "Хоффман-Ля Рош"	Хімімпекс (Україна)
Вітрум Кідс	1,2	Юніфарм Інк(США)
Вітонк	1,0	ГНЦ ПМ Фарма на замовлення ЕлітМед (Росія)
Вітатресс	2,0	Верофарм/ Белгородський філіал (Росія)
Флавінат для ін'єкцій	порошок ліофілізований для приготування ін'єкційного розчину 2мг	Уфавіта (Росія)
Рибофлавін (Вітамін В2)	субстанція-порошок, субстанція 20г, субстанція 50г, субстанція 100г	Басфхелфф (Данія), Рош вітаміни Лтд(Германія)
Ліволін Форте	6,0	Медікап Лтд (Таїланд)
Гептавіт	10,0	АЙ СІ ЕН Октябрь (Росія)
Рибовітал	2,0	АЙ СІ ЕН Октябрь (Росія)
Аміносол	2,0	Хемофарм концерн А.Д. (Югославія)
Церневіт	4,14	Бакстер АГ (Франція)
Джерітон	2,0	Медікап Лтд (Таїланд)
Рибофлавін	таблетки 2мг, таблетки 5мг, таблетки 10мг	АЙ СІ ЕН Октябрь (Росія), Белмедпрепарати (Беларусь), Борисовський завод медичних препаратів (Беларусь)
Вітрум Циркус	1,2	Юніфарм Інк (США)
Ледис формула "Для беременних и кормящих жінчин"	1,7	Фарма-Мед (США)
Ундевіт	2,0	Українська фармацевтична компанія «Технолог»
Юнівiт	0,3	Київський вітамінний завод
Супєрвіт	1,6	Київський вітамінний завод
Ундетаб	2,0	Київський вітамінний завод
Вітам	2,5	Київський вітамінний завод
Квадевіт	2,5	Київський вітамінний завод

На середовищі з глюкозою *E. ashbyii* здатен синтезувати до 3,8 г/л, *A. gossipii* – до 6,4 г/л рибофлавіну. Саме ці гриби використовують зазвичай при отриманні рибофлавіну мікробіологічним способом, проте описані способи отримання його за допомогою *Pichia guilliermondii* [6]. Недоліком використання дріжджів *P.guilliermondii* в промисловості є їх дуже велика

чутливість до іонів заліза, середовища культивування потребують ретельної чистки від іонів Fe. На біосинтез рибофлавіну *E. ashbyii* та *A. gossipii* іони заліза не впливають, що є важливою перевагою для використання цих продуцентів в промисловості [7]. Недоліком *E. ashbyii* є нестабільність мікроорганізму при зберіганні. Недоліком *A. gossipii* є дуже тривалий процес культивування та складні та дорогі середовища.

Перший етап перетворення рибофлавіну у коферментні форми каталізує рибофлавінкіназа (РФ-кіназа) – АТФ-залежний фермент, який фосфорилує рибофлавін з утворенням РФ-5'-фосфату (ФМН).

Серед грибів високу питому активність РФ-кінази мають *A.gossipii* й *E.ashbyii* – відомі промислові продуценти рибофлавіну і ФАД [8, 9].

У Львівському інституті біології клітини НАН України та Львівському національному університету імені Івана Франка проведені дослідження генетичних механізмів регуляції біосинтезу рибофлавіну у еукаріотичних мікроорганізмів. Зручною моделлю для досліджень обрані дріжджі *Pichia guilliermondii* [10].

У дріжджів *Pichia guilliermondii* виявлено регуляцію біосинтезу рибофлавіну за позитивним і негативним типом дії. Показано, що дефіцит заліза в середовищі або пошкодження регуляторних генів негативного типу дії RIB80, RIB81, HIT1 і RED1 спричиняють дерепресію майже всіх ферментів флавіногенезу та як наслідок – надсинтез РФ у вищезгаданих дріжджів. Ці ж гени контролюють також асиміляцію заліза у *P.guilliermondii*, запобігаючи його надмірному нагромадженню у клітинах. Очевидно, у *P.guilliermondii* функціонує механізм, який координує як постачання дихального ланцюга обома кофакторами – флавінами та залізом, так й інші потреби клітини в іонах заліза [11, 12, 13].

У львівському інституті біології клітини НАН України сконструйований генно-інженерний штам флавіногенних дріжджів *Candida famata* з високою активністю рибофлавінкінази [14].

Bacillus subtilis – продуцент рибофлавіну. Природні штами *B. subtilis* синтезують рибофлавін тільки в кількості, необхідній для підтримки власної життєдіяльності і зовсім не виділяють його в середовище. У ВНДІ генетики та селекції промислових мікроорганізмів під керівництвом Степанова А.І. створено промисловий продуцент рибофлавіну на основі *B. subtilis*. Спочатку були отримані мутанти, стійкі до розеофлавіну – структурного аналогу рибофлавіну. Дані мутанти мали здатність виділяти в культуральне середовище до 10 мг/л вітаміну. На другому етапі були отримані мутації в гені-регуляторі, що кодує регуляторний білок, здатний впливати на експресію рибофлавінового оперону. Це дозволило отримати штам, що продукував до 100 мг/л вітаміну. На наступному етапі отримані мутації стійкості до аналогу пурину, що також призвело до росту продукції рибофлавіну.

Наступним етапом було створення рекомбінантного штаму *B. subtilis*. Генно-інженерними методами була сконструйована рекомбінантна плазміда рМХ45, яка несла в собі розрегульований рибофлавіновий оперон *B. subtilis* та ген стійкості до еритроміцину. Ця плазміда була внесена в штам *B. subtilis*, що за рахунок збільшення кількості копій рибофлавінового оперона дало можливість отримувати до 3-4 г/л вітаміну на комплексних поживних

середовищах. В результаті подальших селекційних робіт були отримані мутанти, ауксотрофні по аденіну, та мутанти з порушеною транскетолазою та глутаматсинтетазою.

Все це, а також підібраний склад середовища та умов культивування, дозволило отримувати до 8-12 г/л рибофлавіну [4, 15].

Проведені дослідження показали, що плазмід рМХ45 є стійкою протягом 50 генерацій на твердих поживних середовищах. Єдиною умовою елімінації плазміди є збільшення температури вище 45°C. Технологічну схему виробництва кормового препарату рибофлавіну наведено на рис. 2.

Параметри ферментаційного процесу: температура – 37-40°C, аерація, перемішування, рН підтримується 6,8-7,5, піногасник подають за необхідністю, тривалість 50-72 години.

За необхідності отримання кристалічного рибофлавіну кристали рибофлавіну у культуральній рідині переводять у повністю розчинний стан за рахунок нагрівання та додавання концентрованої соляної кислоти. Гарячий розчин фільтрують. Фільтрат охолоджують та додають відновник. Отримують технічні кристали рибофлавіну.

Ermothecium ashbyi – продуцент рибофлавіну. *Ermothecium ashbyi* Guillierm., C.R. hebdom. Séanc Acad. Sci., Paris, Paris 200(19): 1556 (1935)

Класифікація: *Ermotheciaceae*, *Saccharomycetales*, *Saccharomycetidae*, *Saccharomycetes*, *Ascomycota*, *Fungi*.

За іншою класифікацією: Царство *Fungi*

Клас *Ascomycota*

Підклас *Hemiascomycetales*

Порядок *Saccharomycetales*

Сімейство *Ermotheciaceae*

Рід *Ermothecium* [16].

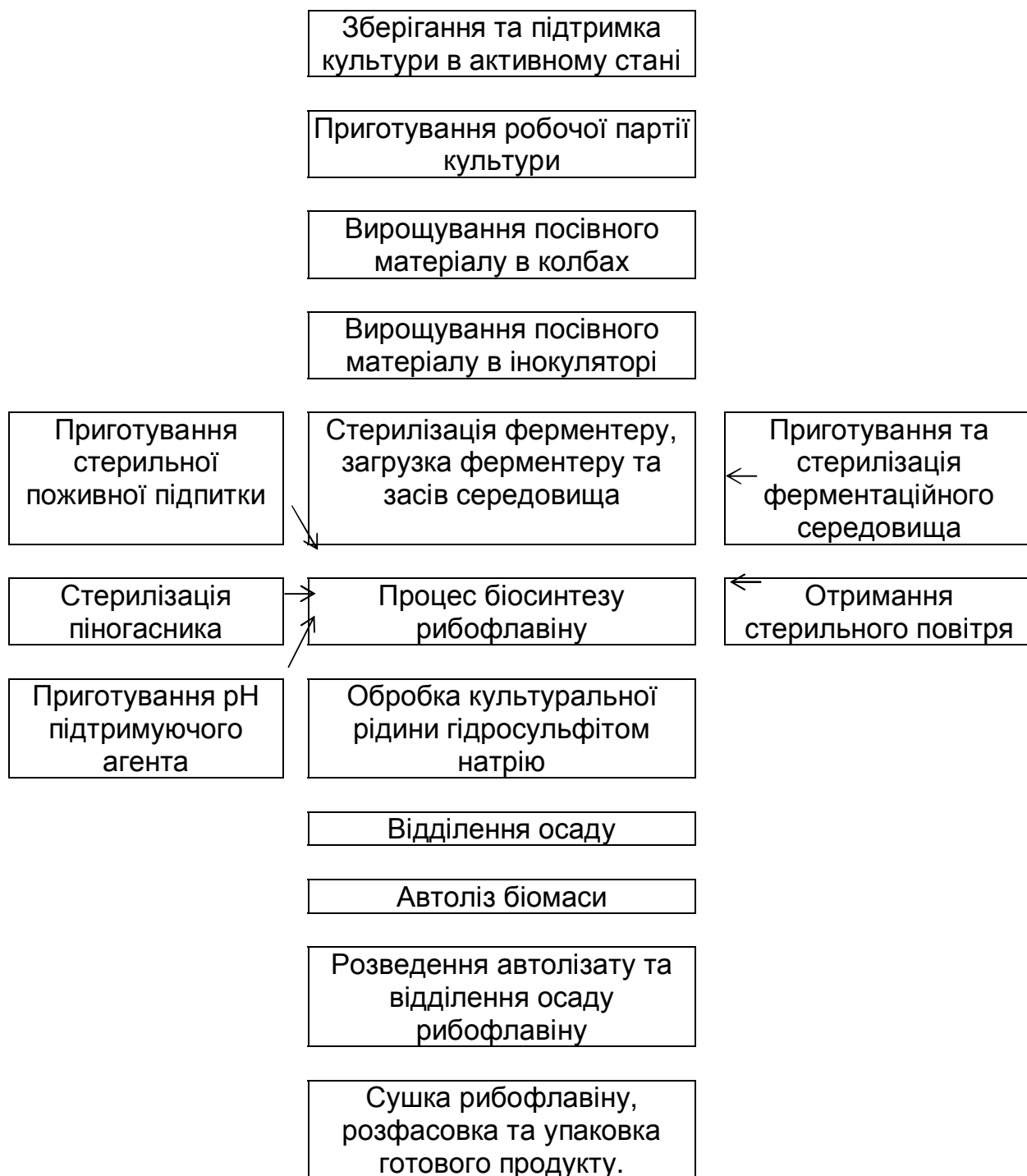


Рис. 2 Технологічна схема виробництва кормового препарату рибофлавіну

E. ashbyii належить до класу сумчастих грибів, або аскоміцетів. Він паразитує на коробочках хлопчатнику, утворює справжній розгалужений багатоядерний міцелій, що зрідка септований, плодових тіл не утворює. Міцелій має яскраво-жовтий колір, що зумовлено присутністю рибофлавіну, який накопичується в такій кількості, що випадає у вигляді кристалів у вакуолях. Аски утворюються з продовгуватих вегетативних клітин або клітин міцелію без попередньої кон'югації та незабаром після дозрівання

руйнуються з визволенням спор. Аскоспори по 8-32 в аску, веретеноподібні, голкоподібні.

Відомо, що штами *E. ashbyii* дуже нестабільні, утворення рибофлавіну дуже змінюється навіть при ідентичних умовах культивування. *E. ashbyii* можливо зберегти в активному стані 8-10 місяців шляхом систематичного розсіву на тверді поживні середовища та відбору найбільш інтенсивно забарвлених в жовтогарячий колір колоній [17].

Технологія виробництва рибофлавіну за допомогою *E. ashbyii* коротко наведена у класичних підручниках з біотехнології [2, 18, 19, 20].

В якості поживного середовища можна застосовувати 1-3% меляси, гідрола або глюкози, 3-8% кукурудзяного екстракту або дріжджового автолізату, додаючи N, P₂O₅, K, Mg, Zn [20].

У СРСР для отримання кормового препарату застосовували середовище, яке включало наступні компоненти: масло, соєве борошно, кукурудзяний екстракт, крейду та буряковий або яблучний порошок. В Англії застосовують середовище, яке складається з глюкози (5 г/л), соняшникової олії (15 г/л), рН 6,5-7,0 [2].

Також можна застосовувати середовище, що містить 5% цукру-сирцю, 3% пептону, 1% пшеничних зародків, 0,3% м'ясного екстракту, 0,3% KН₂РO₄ та 0,25% NaCl. рН 6,0 [19].

Також застосовують середовища наступного складу:

– 3% соєвого борошна, 8% меляси, 1% білково-вітамінного концентрату, 0,5% крейди, 0,1% NaCl. В якості стимулятора росту мікроорганізму на четвертій годині культивування у дозі 10⁻⁹-10⁻¹² моль/л у середовище вводять циклічний аденозин-3,5-монофосфат. В результаті введення добавки концентрація вітаміну В₂ в культуральній рідині збільшувалась на 22-25% [21].

– соєве борошно 25г/л; кукурудзяний екстракт (сухий) 15г/л; патока 15г/л; цукор 5г/л; крейда 0,5г/л; хлорид натрію 1,0г/л; сульфат магнію 0,7г/л; вода, рН 6,7-7,0. Якщо замість неорганічної солі магнію застосувати 2,2·10⁻⁶ г/л аквахелату магнію з пантотеновою кислотою та гліцином (1:1:1), то вихід рибофлавіну збільшиться на 33% [22].

Біосинтез рибофлавіну стимулюється додаванням ненасичених жирних кислот, насичені, навпаки, гальмують його утворення. Розвиток *E. ashbyii* стимулюється додаванням біотину, тіаміну, інозиту. Піримідинові та пуринові основи є попередниками утворення рибофлавіну і також можуть бути використані для інтенсифікації його біосинтезу. Найкращим стимулятором є ксантин [19].

E. ashbyii поряд із синтезом рибофлавіну здійснює підвищений синтез ФАД. Підвищення накопичення ФАД було отримано за рахунок внесення мальтози після 48 годин культивування *E. ashbyii* на середовищі з глюкозою [6].

E. ashbyii культивують в глибинних умовах у ферментері при температурі 28-30°C, постійному перемішуванні зі швидкістю 750 об./хв. та аерації зі швидкістю 220см³/хв протягом 80-84 годин. Для безперервного контролю кількості рибофлавіну безпосередньо в процесі його накопичення в субстраті розроблено іонселективний електрод [23].

Для отримання кормового препарату рибофлавіну культуральну рідину випарюють в вакуумі до 30-40% сухих речовин та сушать у розпилювальній або валково-вакуумній сушарці. Готовий продукт являє собою порошок жовто-бурого кольору, який містить не менш 10 мг/г рибофлавіну і до 20% протеїну. Кормовий препарат містить також вітаміни В₁, В₃, В₆, В₁₂ та ніотинову кислоту [18,20].

Існує спосіб виділення рибофлавіну, який передбачає нагрівання отриманої після ферментації суспензії рибофлавіну з максимальним вмістом сухих речовин при температурі 35-55°C в квазіанаеробних умовах (помірне розмішування без введення повітря) протягом 6-28 годин та при значеннях рН 4-9. З отриманого після індукованого автолізу розчину, що містить рибофлавін, останній виділяють центрифугуванням, десантуванням та сушать [24].

Для отримання кристалічного препарату рибофлавіну культуральну рідину нагрівають до 95-100°C, оскільки в цих умовах весь рибофлавін виходить з клітин. Потім розчин центрифугують, центрифугат охолоджують до 18-20°C, встановлюють рН 4,5-5,0 та осаджують рибофлавін з розчину за допомогою гідросульфїту. Після декантації розчин промивають, центрифугують, сушать та подрібнюють. Таким чином отримують технічний препарат рибофлавіну. Медичний препарат отримують перекристалізацією рибофлавіну з розчину технічного рибофлавіну в соляній кислоті.

Пропонують спосіб очистки та кристалізації рибофлавіну, при якому рибофлавін в стабільній модифікації розчиняють у водному розчині мінеральної кислоти при температурі не >30°C при інтенсивному перемішуванні, додають до отриманого розчину активоване вугілля, фільтрують через керамічні мембрани з розмірами пор 20-200 нм, отриманий розчин змішують при температурі не вище 30°C з 5-10-кратною кількістю води, кристали рибофлавіну, що випали, відокремлюють центрифугуванням або фільтруванням [25].

Виробники рибофлавіну. Промислове виробництво рибофлавіну здійснюється трьома способами: повним хімічним синтезом, повним мікробіологічним синтезом, змішаним синтезом, який включає мікробний синтез рибози з наступною хімічною трансформацією її в рибофлавін. Більше ніж 70% промислової продукції виробляють шляхом хімічного синтезу з рибози. Оскільки в хімії немає простого та економічного синтезу рибози, цей вуглевод отримують в основному шляхом мікробної ферментації. Так отримують рибофлавін у Японії (фірма "Takeda Yachuni Kogi"), а для отримання рибози використовують високопродуктивні штами-мутанти по транскетолазі бактерій роду *Bacillus* [2, 4].

Китайська компанія «Шанхай Десано Вітамініс Лтд.» має єдину в світі лінію по виробництву синтетичного вітаміну В₂ (всього є 4 виробника вітаміну В₂) і продукт не містить змінених генів, BSE, TSE (губчатої енцефалопатії), лінія оснащена аерозольною сушкою. Справляє враження система контролю якості на цьому підприємстві: GMP, ISO9001:2000, сертифікат KOSHER, HALAL, HACCP.

Державним науково-дослідницьким інститутом генетики і селекції промислових мікроорганізмів («ГосНИИгенетика»), на основі *Bacillus subtilis* створені високопродуктивні штами-продуценти рибофлавіну. Технологія

виробництва рибофлавіну передана для освоєння на Бердський завод ферментних препаратів та впроваджена у виробництво Тяньдзиньською фармацевтичною компанією (КНР).

Ще у середині 1930-х років компанія «Ф.Хоффманн-Ля Рош Лтд.» стала великим виробником та поставщиком вітамінів у світі, цей сегмент діяльності стає одним із пріоритетів компанії. З 1938 по 1947 роки спеціалісти «Рош» розробляють технології промислового синтезу вітамінів А, В₁, В₂, Е та К₁, починають випуск перших в історії мультівітамінних препаратів.

Зараз компанія DSM Nutritional Products («Ф.Хоффманн-Ля Рош Лтд.») випускає вітамін В₂:

- для фармацевтичної промисловості;
- для харчової промисловості;
- для потреб сільського господарства випускають РОВІМІКС В₂ 80 SD, який являє собою добре сипучий порошок, висушений методом розпилення, від помаранчево-коричневого до жовто-коричневого кольору. Він містить 80% рибофлавіну рівномірно розподіленого в матриці декстрину. На відміну від інших форм рибофлавіну РОВІМІКС В₂ 80 SD неелектростатичний та не утворює грудок, що забезпечує точне дозування та змішування. Застосовується для годування тварин в преміксах та комбікормах.

Великим виробником рибофлавіну є корпорація BASF (Германія).

В Україні технологією виробництва рибофлавіну володіє ВАТ «Фермент». Протягом 1997- 2000 років була розроблена та освоєна в промислових масштабах технологія виробництва рибофлавіну. Ця технологія була розроблена у співдружності у вченими РАН. На сьогоднішній день штамп-продуцент має найкращі в світі виробничі показники. За період з 1998 по 2003 роки штамп та технологія були продані підприємствам Республіки Південна Корея, Болгарії, Китаю [www.ferment.com.ua].

У Білорусі кормовий вітамін В₂ з 1970 року випускав Пінський завод кормових вітамінів (РУП "Ензим"). У теперішній час це виробництво законсервовано через імпортозалежність окремих видів сировини та неконкурентоспроможність за ціною.

Список літератури

1. Спиричев В.Б. Теоретические и практические аспекты современной витаминологии.// Укр. біохім. журнал, 2004, т.76, №4, с. 32-53.
2. Воробьева Л.И. Промышленная микробиология: Учеб. пособие. – М.: Изд-во МГУ, 1989. – 294с.
3. Шнайрман Л.О. Производство витаминов. – М.: Пищевая промышленность, 1973. – 443с.
4. Биотехнология биологически активных веществ. Учебное пособие для студентов высших учебных заведений./ Под ред. д.б.н., проф. МГУ И.М.Грачевой и д.т.н., проф. МГУ Л.А.Ивановой. – М.: Издательство НПО «Элевар», 2006. – 453с.
5. Спірічев В.Б., Донченко Г.В., Блажеєвич Н.В. та ін. До 20-річчя Чорнобильської аварії. Вивчення вітамінного статусу та забезпеченості мікро- та макроелементами окремих груп людей в різні періоди часу після аварії на ЧАЕС.// Укр. біохім. журнал, 2006, т.78, №2, с. 5-26.

6. Поморцева Н.В. Перспективы получения витаминов и коферментов с помощью микроорганизмов (обзор).// Химико-фармацевтический журнал, 1986, №8, с. 965-974.
7. Воробьева Л.И. Промышленная микробиология: Учебное пособие. – М.: Изд-во МГУ, 1989. – 294с.
8. Білінська І., Гавриленко З., Кащенко В. Дослідження активності рибофлавінкінази – першого ферменту біосинтезу флавінових нуклеотидів у мікроорганізмів.// "Вісник Львівського національного університету. Серія біологічна", випуск 25, 2000, с. 81-86.
9. Мочевинський Л., Білінська І., Кащенко В. Електрофоретичне дослідження АТФ:рибофлавін-5'-фосфотрансферази деяких мікроорганізмів.// "Вісник Львівського національного університету. Серія біологічна", випуск 37, 2004, с. 37-44.
10. Шавловский Г.М., Логвиненко Е.М. Сверхсинтез флавинов у дрожжей.// Укр. биохим. журнал. 1985. Т. 57. № 4. С. 98–112.
11. Капустяк К., Стенчук М. Спільний вплив мутацій *red2* і *red3* на біосинтез рибофлавіну та фериредуктазну активність у дріжджів *Pichia guilliermondii*.// "Вісник Львівського національного університету. Серія біологічна", випуск 27, 2001.
12. Романюк Т., Федорович Д., Протченко О., Гудзь С. Вплив суміщення мутацій *RIB80* і *HIT* на біосинтез рибофлавіну та фериредуктазну активність у дріжджів *Pichia guilliermondii*.// "Вісник Львівського національного університету. Серія біологічна", випуск 26, 2001.
13. Фаюра Л.Р., Федорович Д.В., Прокопів Т.М. и др. Плейотропный характер мутаций *rib80*, *hit1* и *red6*, нарушающих регуляцию биосинтеза рибофлавіна у дрожжей *Pichia guilliermondii*.// Микробиология, 2007, т. 76, №1, с. 66-71.
14. Іщук О.П., Яцишин В.Ю., Дмитрук К.В. та ін. Генно-інженерне конструювання штамів флавіногенних дріжджів *Candida famata* з високою активністю рибофлавінкінази.// Укр. біохім. журнал, 2006, т. 78, №5, с. 63-64.
15. Патент России №2081175. Степанов А.И., Куканова А.Я., Галушкина З.М. и др. Штамм *Bacillus subtilis* – продуцент рибофлавіна. – 1994.
16. Бабаева И.П., Чернов И.Ю. Биология дрожжей. Учебное пособие для университетов. Электронная версия. – 2005.
17. Голышева М.Г., Гришакова Е.В., Успенская В.Э. и др. О сохранении *Ermothecium ashbyii* в активном состоянии.// Микробиология, 1965, т. 34, №4, с. 661-665.
18. Мосичев М.С., Складнев А.А., Котов В.Б. Общая технология микробных производств. – М.: Легкая и пищевая промышленность, 1982. – 264с.
19. Никитин Г.А., Биохимические основы микробных производств: Учебное пособие. – К.: Вища школа, 1992. – 319с.
20. Бекер М.Е. Введение в биотехнологию. Пер. с латышского. – Рига, 1978. –
21. Патент России №2098482. Виноходов В.О. Способ культивирования микроорганизмов. – 1997.
22. Патент России №2115657. Шишков Ю.И. Аквахелат, способ получения аквахелата, способ модулирования характеристики культуры клеток, культуры ткани, одноклеточного или многоклеточного организма и транспортная система. – 1998.
23. Карандеев К.Г., Карандеева Н.И., Твердоступ О.В. и др. Использование мембранного ионоселективного электрода при технологическом контроле микробиологического продуцирования рибофлавіна (витамина B_2).// Всероссийская конференция "Актуальные проблемы аналитической химии", Москва, 11-15 марта, 2002: Тезисы докладов. 2002, т.2, с. 155-156.

24. Патент России №2033427. Роланд Курт Способ выделения рибофлавина. – 1995.
25. Способ очистки и кристаллизации рибофлавина Reinigungs- und Kristallisationsverfahren fur Riboflavin. Патент 0995749 ЕПВ, МПК⁷ С 07 D 475/14. Roche F. Hoffmann-la. № 99120364.7; Заявл. 13.10.1999; Оpubл. 26.04.2000

Приведены основные свойства витамина B₂, показаны причины его недостаточности, проанализирована информация об основных продуцентах рибофлавина, которые используются в промышленности, рассмотрены основные технологии получения рибофлавина.

Vitamin B₂, riboflavin, flavonoids, technology, Eremothecium ashbyii.

The main properties of vitamin B₂ are given, show the causes of riboflavin deficiency, analyzed information about the main producer of riboflavin, which are used in industry, the basic technology for production of riboflavin

Vitamin B₂, riboflavin, flavonoids, technology, Eremothecium ashbyii.