Э.В. Сынгеева

Г.П. Ламажапова

БИОТЕХНОЛОГИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

Водорастворимые витамины

Учебное пособие

Москва

2026

УДК 60:661.7
ББК 24.239:28.087
С 95

Рецензенты:

Баженова Б.А. – доктор технических наук, профессор, ФГБОУ ВО «Восточно-Сибирский государственный университет технологий и управления», г. Улан-Удэ, заведующий кафедрой «Технология продуктов животного происхождения. Товароведение»;

Тыхеева Н.А. – кандидат медицинских наук, доцент, ФГБОУ ВО «Бурятский государственный университет им. Д. Банзарова», г. Улан-Удэ, заведующий кафедрой фармакологии, клинической фармакологии с курсом биохимии.

Сынгеева, Эржэна Владимировна
Ламажапова, Галина Петровна
С 95 **Биотехнология биологически активных веществ. Водорастворимые витамины**. Учебное пособие – М.: Мир науки, 2026 г. – Сетевое издание. Режим доступа: https://izd-mn.com/PDF/31MNNPU26.pdf – Загл. с экрана.

ISBN 978-5-908127-30-1
DOI: 10.15862/31MNNPU26

В учебном пособии рассматриваются фундаментальные принципы и современные технологии получения биологически активных веществ (БАВ), в частности, подробно исследуется группа таких незаменимых микрокомпонентов питания, как **водорастворимых витаминов**. Предлагаются контрольные вопросы, которые могут быть использованы в качестве заданий к самостоятельной работе обучающихся, и список рекомендуемой литературы.

Пособие предназначено для обучающихся вузов направлений, связанных с изучением биотехнологий продуктов питания и биологически активных веществ, а также аспирантов и преподавателей.

Издание распространяется под лицензией Creative Commons CC BY 4.0

ISBN 978-5-908127-30-1

© Сынгеева Эржэна Владимировна
© Ламажапова Галина Петровна
© ООО Издательство «Мир науки», 2026 г.

Оглавление

Введение 6
Глава 1. Витамины: от эмпирических наблюдений к современной нутрициологии 7
1.1. Исторические предпосылки и эмпирические открытия 7
1.2. Эволюция понятия «витамин». «Золотой век» витаминологии: открытия, выделения и синтез 7
1.3. Современная классификация витаминов, их значение для организма 8
1.4. Антивитамины и их роль в метаболизме 10
1.5. Современные подходы к витаминотерапии 11
Глава 2. Тиамин (витамин B_1): исторические аспекты, метаболизм, физиологическая роль и биотехнологическое значение 15
2.1. Историческая справка: от «бери-бери» к открытию витамина 15
2.2. Химическая структура и физико-химические свойства 15
2.3. Физиологическая роль и коферментная функция 16
2.4. Метаболизм тиамина в организме человека 17
2.5. Пищевые источники и факторы, влияющие на сохранность 19
2.6. Методы оценки статуса тиамина в организме и проблемы восполнения его дефицита 20
2.7. Биотехнологическое производство и промышленное применение 20
Глава 3. Рибофлавин (Витамин B_2): биологическая роль, пищевые источники и биотехнологическое значение 23
3.1. История открытия. Химическая структура и коферментные формы 23
3.2. Биологическая роль и физиологические функции 24
3.3. Пищевые источники и факторы, влияющие на стабильность 25
3.4. Метаболизм и транспорт в организме 26
3.5. Микробиологический синтез и промышленное производство 28
3.6. Дефицит, метод оценки статуса и безопасность 29
Глава 4. Ниацин (витамин B_3, витамин PP): история открытия, биохимические функции и биотехнологическое значение 32
4.1. История открытия и этиология пеллагры 32
4.2. Химическое строение, формы и свойства 32
4.3. Биологическая роль 34
4.4. Пищевые источники, биодоступность и физиологическая потребность 34
4.5. Нарушения обмена: гипо- и гипервитаминоз 34
4.6. Биотехнологическое производство: от химического синтеза к биокатализу 35
4.7. Промышленное и медицинское применение 36
4.8. Методы анализа и оценка статуса 36

Глава 5. Пантотеновая кислота (витаминB_5): от фактора роста до кофермента А 38
5.1. История открытия 38
5.2. Химическое строение и формы 38
5.3. Биологическая роль витамина B_5 39
5.4. Пищевые источники и факторы стабильности 40
5.5. Всасывание, транспорт и тканевое распределение 40
5.6. Химический синтез и биотехнологическое производство 41
Глава 6. Витамин B_6: от истории открытия до биологической роли и применения 46
6.1. История открытия витамина B_6 46
6.2. Химическая структура и формы витамина B_6 46
6.3. Биологическая роль и метаболизм в организме 47
6.4. Источники витамина B_6 49
6.5. Всасывание, дефицит и избыток витамина B_6 49
6.6. Микробиота и продукция витамина B_6 51
6.7. Биотехнологические способы производства витамина B_6 51
6.8. Методы оценки уровня витамина в организме 52
Глава 7. Витамин B_7 (биотин): от фактора роста до кофермента карбоксилирования 54
7.1. История открытия 54
7.2. Химическая структура, коферментные формы и стабильность витамина B_7 54
7.3. Всасывание, транспорт, дефицит и безопасность 57
7.4. Пищевые источники биотина и его биодоступность 58
7.5. Методы оценки уровня биотина в организме 59
7.6. Микробиота: продукция и потребление витамина B_7 60
7.7. Биотехнологические методы получения и промышленное применение 60
Глава 8. Витамин B_9 (фолиевая кислота): от фактора роста до регулятора одноуглеродного метаболизма 63
8.1. История открытия 63
8.2. Химическая структура и формы витамина B_9 63
8.3. Биологическая роль витамина B_9 64
8.4. Пищевые источники, причины дефицита и его последствия 65
8.5. Микробиота и продукция витамина B_9 66
8.6. Биотехнологические методы получения витамина B_9 и пути обогащения продуктов питания 66
Глава 9. Витамин B_{12} (кобаламин): от сложной структуры до кофактора метаболизма 69
9.1. История открытия 69
9.2. Химическая структура и формы витамина B_{12} 69
9.3. Биологическая роль витамина B_{12} 70

9.4. Пищевые источники витамина B_{12} 71
9.5. Всасывание, транспорт, гипо- и гипервитаминоз 72
9.6. Микробиота и продукция витамина B_{12} 74
9.7. Биотехнологические методы получения 76
9.8. Перспективные направления биотехнологии B_{12} 80
Глава 10. Общая характеристика витамина С и его биологическая роль в организме человека 83
10.1. Исторические аспекты изучения витамина С 83
10.2. Химическая природа и биохимические функции 84
10.3. Пищевые источники и патология обмена витамина С 85
10.4. От химического синтеза к биотехнологии 86
10.5. Промышленное применение аскорбиновой кислоты 89
Заключение 92
Список сокращений 93
Рекомендуемая литература 95
Приложение 96

Введение

Современная биотехнология представляет собой одну из наиболее динамично развивающихся и стратегически важных областей человеческого знания. Ее достижения кардинально меняют подходы к решению фундаментальных проблем медицины, фармакологии, сельского хозяйства, пищевой промышленности и экологии. В центре этого прогресса находятся **биологически активные вещества (БАВ)**.

Биологически активные вещества – химические вещества, необходимые для поддержания жизнедеятельности живых организмов, обладающие высокой физиологической активностью при небольших концентрациях по отношению к определенным группам живых организмов или их клеткам, злокачественным опухолям, избирательно задерживая (или ускоряя) их рост или полностью подавляя их развитие. БАВ являются важнейшими компонентами живой материи, биополимерами и низкомолекулярными биорегуляторами, обладающими специфическими свойствами, которые позволяют им осуществлять и направлять сложные метаболические процессы живого организма.

Объектами изучения биотехнологии БАВ являются как макромолекулы, такие как белки, высокомолекулярные пептиды, углеводы, липиды, нуклеиновые кислоты и нуклеотиды, биополимеры смешанного типа (гликозиды, нуклеопротеины, гликопротеины, липопротеины), так и низкомолекулярные биоорганические соединения (аминокислоты, пептиды, витамины, алкалоиды, терпеноиды, гормоны, антибиотики, стимуляторы роста и ростовые вещества, феромоны, токсины, микотоксины, пестициды, синтетические лекарственные препараты и т.д.). Большое разнообразие БАВ увеличивает и способы их исследования, извлечения и идентификации, поэтому для изучения БАВ используются не только методы органической химии и химического анализа, но и разнообразные современные физические, физико-химические, математические и биотехнологические методы.

В настоящее время известен широкий спектр БАВ различного назначения, которые могут быть либо получены из природных живых организмов, либо синтезированы с помощью различных химических превращений. Применение биотехнологий позволяет оптимизировать получение БАВ, максимизируя выход целевого продукта с сохранением его биологической активности.

В рамках данного учебного пособия рассматриваются водорастворимые витамины - как один из ключевых классов БАВ, имеющих фундаментальное значение для метаболизма и являющихся важным объектом биотехнологического производства. Дается определение водорастворимых витаминов как низкомолекулярных органических соединений, не синтезируемых в достаточном количестве в организме человека и животных, выполняющих функцию коферментов или их предшественников. Подробно разбирается химическое строение, физико-химические свойства и биохимическая роль каждого витамина группы В (тиамин (B_1), рибофлавин (B_2), никотиновая кислота (PP, B_3), пантотеновая кислота (B_5), пиридоксин (B_6), биотин (B_7, H), фолиевая кислота (B_9), кобаламин (B_{12})), а также аскорбиновой кислоты (витамин С).

Основная цель данного учебного пособия – сформировать у обучающихся целостное представление о мире биоорганических соединений, обладающих биологической активностью. В данном издании рассмотрены не только их классификация, строение и свойства, но и фундаментальное значение для протекания жизненных процессов. Однако ключевой фокус смещен от простого изучения к целенаправленному получению, модификации и применению этих соединений. Именно биотехнологические подходы позволяют перейти от наблюдения за метаболизмом к его направленной регуляции, открывая возможности для создания новых лекарственных средств, диагностических систем, биологически активных добавок и других высокотехнологичных продуктов. Предлагаемый материал призван не только дать систематизированные знания, но и продемонстрировать неразрывную связь между структурой вещества, его функцией в живой системе и технологическими путями его создания.

Глава 1. Витамины: от эмпирических наблюдений к современной нутрициологии

1.1. Исторические предпосылки и эмпирические открытия

До XIX века науке не было известно о существовании витаминов. Симптомы авитаминозов, с которыми люди периодически сталкивались, обычно объяснялись инфекциями или другими причинами. Тем не менее, эмпирическая связь между определёнными продуктами питания и здоровьем наблюдалась ещё в глубокой древности. Ярким примером является древнеегипетский медицинский метод лечения куриной слепоты (расстройства сумеречного зрения), который заключался в употреблении большого количества печени. Современная наука подтвердила действенность этого способа: в печени, особенно куриной, содержится высокое количество витамина А, дефицит которого как раз и приводит к нарушению сумеречного зрения.

В середине XVIII века шотландский врач Джеймс Линд, проведя исследование во время плавания, установил связь между употреблением кислых продуктов и профилактикой цинги у матросов. Его выводы впоследствии подтвердил капитан Джеймс Кук, который ввел в корабельный рацион кислую капусту, солодовое сусло и цитрусовый сироп. Благодаря этим мерам во время его плаваний не было зафиксировано ни одного случая смерти от цинги. Окончательно эффективность метода была признана в 1795 году, когда цитрусовые стали обязательной частью питания британских моряков.

В 1880 г. русский учёный Н.И. Лунин, изучавший роль минеральных веществ в питании, заметил, что мыши, которых кормили искусственным молоком, в состав которого входили казеин, жир, сахар и соли, все равно погибали, в то время как животные, получавшие натуральное молоко, были здоровы и чувствовали себя нормально. Николай Иванович Лунин экспериментально доказал, что «… в молоке, помимо казеина, жира, молочного сахара и солей, содержатся еще другие вещества, незаменимые для питания. Представляет большой интерес исследовать эти вещества и изучить их значение для питания».

1.2. Эволюция понятия «витамин». «Золотой век» витаминологии: открытия, выделения и синтез

В 1889 году голландский врач Христиан Эйкман, проводя опыты на заключенных, предположил, что в рисовой шелухе содержится вещество, предотвращающее полиневриты (болезнь бери-бери). Это наблюдение стало ключевым для дальнейших исследований. В 1912 году японский химик Уметаро Судзуки первым выделил активное соединение из рисовых отрубей, которое предотвращало полиневрит, но его открытие не получило широкой известности. Позже в том же году польский биохимик Казимир Функ, независимо выделив то же кристаллическое вещество (тиамин) и обнаружив в его составе аминогруппу, дал всей группе подобных веществ название «витамины» - от латинских слов «vita» (жизнь) и «amine» (амины). Он выдвинул теорию, что такие заболевания, как бери-бери, цинга, пеллагра и рахит, вызваны отсутствием в пище этих жизненно важных компонентов. Хотя позже выяснилось, что не все витамины являются аминами, предложенный Функом термин прочно вошел в науку, а его теория заложила основу учения о витаминах. Несмотря на это, заслуги как Функа, так и первооткрывателя витаминов - российского ученого Николая Лунина, долгое время не получали должного признания в мировом научном сообществе.

В 1915 году Мак-Коллум и Дэвис, сотрудники Висконсинского университета, установили, что рост крыс зависит от двух факторов, которые они назвали фактор А и фактор В. Фактор В излечивал цыплят от бери-бери. В последующем оказалось, что фактор А не является амином.

В 1916 году было открыто вещество, стимулирующее рост, - витамин А. Это стало ключевым открытием в нутрициологии, так как витамин А стал первым из обнаруженных

витаминов, что положило начало их систематическому изучению и дало название всей группе этих жизненно важных соединений.

В 1920 году Джек Сесиль Драммонд предложил убрать «е» из слова «vitamine», потому что недавно открытый витамин С не содержал аминного компонента. В результате витамайны стали витаминами. Затем было установлено, что фактор В неоднороден и состоит из термолабильного, быстро разрушающегося при нагревании вещества, которое было названо B_1 и идентифицировано в последующем как тиамин, и термостабильного – B_2. Термостабильный фактор в свою очередь также оказался смесью аминов. Путаница была прекращена, когда название B_2 закрепилось за рибофлавином, B_3 за пантотеновой кислотой и B_6 за пиридоксином. Тем не менее, до настоящего времени в литературе можно встретить утверждения, что витамин B_2 это комплекс витаминов, включающий рибофлавин, фолиевую, никотиновую и пантотеновую кислоты.

В 1929 году ученые Фредерик Хопкинс (доказал существование незаменимых пищевых факторов, названных позднее витаминами) и Христиан Эйкман (установил, что бери-бери вызывается недостатком вещества в полированном рисе) получили Нобелевскую премию по физиологии и медицине за открытие витаминов. Их работы заложили фундамент витаминологии. Американский биохимик Чарльз Глен Кинг в 1932 году и, независимо, Альберт Сент-Дьёрдьи в Венгрии выделили витамин С, что позволило окончательно победить цингу. Датский химик Хенрик Дам в 1935 году обнаружил вещество, отвечающее за свертываемость крови, которое он назвал витамином К. За это открытие он был удостоен Нобелевской премии в 1943 году. В 1936 году была окончательно установлена химическая структура тиамина**,** что вскоре позволило наладить его промышленный синтез, положив конец массовым случаям бери-бери. Были получены первые препараты витамина Е путём экстракции из масел ростков зерна. Американские исследователи Герберт Эванс и Кэтрин Бишоп ещё в 1922 году доказали его необходимость для размножения, назвав «витамином фертильности». В 1937 году было доказано, что никотиновая кислота излечивает пеллагру («болезнь трёх Д»: дерматит, диарея, деменция). Это стало одним из величайших триумфов биохимии питания. В 1938 году немецкий химик Рихард Кун определил формулу и синтезировал флавин (витамина), вещество, «необходимое для питания» (цитирование Лунина), содержащееся в молоке. В 1948 году было совершено открытие витамина B_{12} и определение его роли в лечении пернициозной (злокачественной) анемии и стало последним из великих открытий в эпоху «охоты за витаминами».

Таким образом, период с 1910-х по 1940-е годы стал «золотым веком» витаминологии, когда были открыты, выделены и синтезированы почти все основные известные нам витамины, что совершило революцию в медицине и диетологии.

К настоящему времени термин «витамин» с химической точки зрения потерял свой смысл, под ***витаминами*** *предложено понимать необходимые для нормальной жизнедеятельности органические низкомолекулярные соединения, синтез которых у организмов данного вида отсутствует или ограничен.* Отдельные витамины могут быть представлены группой близких по химической структуре веществ, способных в организме превращаться друг в друга - такие вещества называют ***витамерами***.

1.3. Современная классификация витаминов, их значение для организма

Витамины делятся на два класса в зависимости от их растворимости: водорастворимые и жирорастворимые витамины. Всего существует 13 признанных витаминов - витамин В-комплекс (B_1, B_2, B_3, B_5, B_6, B_7, B_9, B_{12}) и С обладает способностью растворяться в воде, в то время как A, D, E и K являются жирорастворимыми витаминами. Жирорастворимые витамины растворяются и хранятся в жировых тканях организма. Водорастворимые витамины не накапливаются в жировой ткани, и на их усвоение не влияет изменение абсорбции жиров. Однако при тепловой обработке пищевого сырья водорастворимые витамины могут

разрушаться, тогда как жирорастворимые витамины, как правило, более стабильны к нагреванию.

Жирорастворимые витамины важны для роста, развития и регуляции обмена веществ. Витамин А необходим для зрения, здоровья кожи и иммунитета; витамин D, являющийся производным стероидов, способствует усвоению кальция, развитию костей и участвует в клеточной дифференцировке; витамин Е — классический антиоксидант, защищающий клетки от повреждений свободными радикалами; витамин К необходим для синтеза факторов свертывания крови. Водорастворимые витамины включают витамины группы В и витамин С, которые в основном выступают в роли клеточных кофакторов или их ключевых предшественников, участвуя в различных биохимических реакциях в организме (Рис. 1).

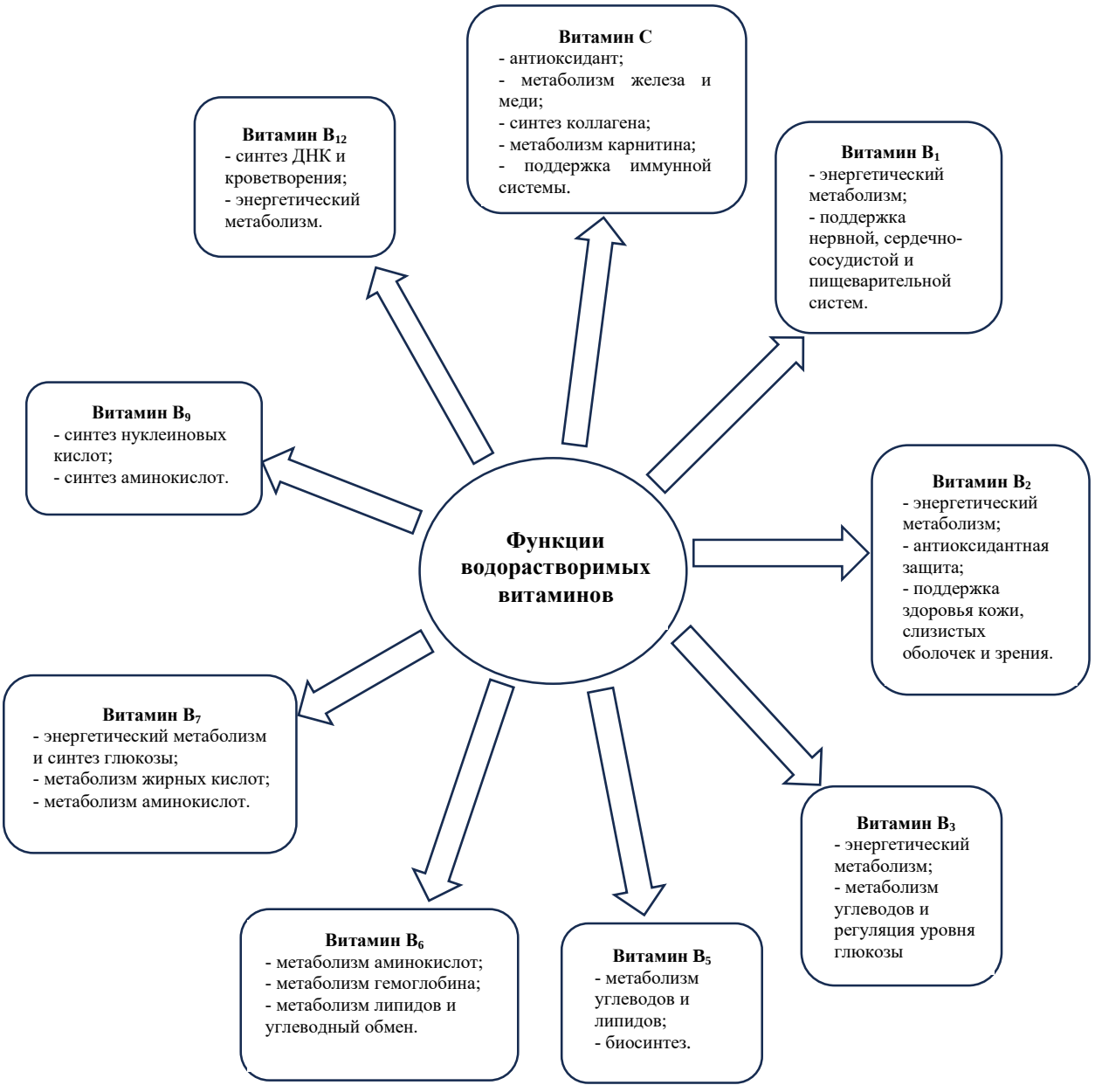


Рисунок 1. Различные функции водорастворимых витаминов

Водорастворимые витамины — это группа необходимых диетических компонентов, необходимых в небольших количествах, которые определяются их полярной природой, следовательно, легко усваиваются и доступны тканям для немедленного использования. Будучи водорастворимыми, их выведение с мочой также эффективно, что затрудняет хранение и сохранение их излишков для последующего использования. Большинство водорастворимых

витаминов относятся к группе В и обладают коферментными функциями (входят в состав коферментов и простетических групп). Также к водорастворимым относится широко всем известный витамин С, противоцинговый или аскорбиновая кислота. Некоферментные свойства витаминов характеризуются способностью участвовать в регуляции метаболизма, проявлять антимутагенное действие, усиливать защитные свойства организма, повышать свертываемость крови и др. Наш организм не накапливает витамины В и С, и поэтому их необходимо регулярно пополнять, они играют решающую роль в нескольких метаболических функциях организма.

1.4. Антивитамины и их роль в метаболизме

Вслед за витаминами были обнаружены вещества различной химической природы, либо вызывающие разрушение витаминов, либо вытесняющие их из метаболических путей. Этот класс веществ получил название *антивитамины*. Антивитамины - вещества, подавляющие активность или конкурирующие с витаминами, что приводит к нарушению биосинтеза ферментов и коферментов и другим нарушениям метаболизма.

Антивитамины принято делить на две группы:

1) **изостерические**, или конкурентные антивитамины, - имеющие структуру, сходную со структурой нативного витамина, и оказывающие действие, основанное на конкурентных взаимоотношениях с ним;

2) **аллостерические**, или не конкурентные антивитамины, вызывают модификацию химической структуры витаминов (чаще разрушение), либо затрудняют их всасывание, либо транспорт, либо связывают витамины, что сопровождается снижением или потерей биологического эффекта витаминов.

Конкурентные антивитамины являются антиметаболитами и при взаимодействии с апоферментом образуют неактивный ферментный комплекс, что блокирует энзиматическую реакцию.

Неконкурентными антивитаминами могут быть ферменты и белки, вызывающие расщепление или связывание молекул витаминов, лишая их физиологического действия. К ним относятся, например, тиаминазы I (фермент рыб) и II (фермент растений), вызывающие распад молекулы витамина B_1, аскорбатоксидаза, катализирующая разрушение витамина С, белок авидин, связывающий биотин в биологически неактивный комплекс. Большинство этих антивитаминов применяют как лечебные средства со строго направленным действием на некоторые биохимические и физиологические процессы. Например, антагонисты витамина К: дикумарол, варфарин и тромексан используются в качестве противосвертывающих препаратов.

Хорошо изученными антивитаминами тиамина являются окситиамин, пири- и неопиритиамин, рибофлавина - атербин, акрихин, галактофлавин, изорибофлавин (все они конкурируют с витамином B_2 при биосинтезе коферментов ФАД и ФМН), пиридоксина - дезоксипиридоксин, циклосерин, изоникотиноилгидразид (изониазид), оказывающий антибактериальное действие на микобактерии туберкулеза. Антивитаминами фолиевой кислоты являются амино- и аметоптерины, витамина B_{12} - производные 2-аминометилпропанол-B_{12}, никотиновой кислоты - изониазид и 3-ацетилпиридин, парааминобензойной кислоты - сульфаниламидные препараты; все они нашли широкое применение в качестве противоопухолевых или антибактериальных средств, тормозя синтез белка и нуклеиновых кислот в клетках.

Может сложиться впечатление, что антивитамины — это вещества искусственного происхождения. Однако это не так. Кроме тиаминаз, например, встречается такой фермент, как аскорбиназа, разрушающий аскорбиновую кислоту. Поэтому, если в среднем яблоке содержится до 70 мг аскорбиновой кислоты, то при употреблении его в пищу в результате взаимодействия аскорбиновой кислоты с аскорбиназой в организм поступает только 10 мг. За

счет увеличения активности аскорбиназ количество этого витамина в картофеле при хранении резко снижается уже через два месяца.

1.5. Современные подходы к витаминотерапии

Наш организм не может накапливать витамины; поэтому для их восстановления требуется частое потребление пищи. Большинство витаминов можно получить в достаточном количестве с помощью диеты, состоящей из цельного зерна, овощей, фруктов и постных продуктов, богатых белком. Людям с определенными заболеваниями, диетическими ограничениями или плохой абсорбцией, возможно, необходимо принимать добавки. Кроме того, некоторые микроорганизмы могут препятствовать усвоению витаминов, вырабатываемых микрофлорой кишечника.

Широкое использование искусственных органических и неорганических удобрений, считавшееся благом и фактором высокой урожайности сельскохозяйственных культур, привело к изменению микробного состава почв, что вызвало уменьшение поступления в растения и их плоды витаминов, синтезируемых почвенными микробами. Выведение пород растений с укороченным вегетационным периодом и ускоренным вызреванием плодов, сопровождалось побочным эффектом: уменьшением накопления витаминов и микроэлементов в плодах за период развития. В результате, в используемой в настоящее время медицинской и кулинарной справочной литературе, созданной в 60-х гг., указано содержание витаминов, иногда в несколько раз превышающее содержание в выращиваемых плодах. Например, если 50 лет назад для пополнения суточного количества витамина С достаточно было съесть половину апельсина, то на сегодня для этого потребуется несколько плодов.

Из результатов исследования, проведенного Калифорнийским университетом в Беркли, было установлено, что из 6000 обследованных американцев 70% мужчин и 80% женщин ели пищу, включающую меньше двух третей рекомендуемой дневной нормы одного или более из 15 витаминов и минералов, считающихся незаменимыми для здоровья. То есть, пониженное содержание витаминов и микроэлементов в продуктах питания привело к формированию такого явления, как скрытый голод. При этом человек съедает достаточное по объему, содержанию белков, жиров, углеводов и суточному калоражу количество пищи, но остается голодным, и вынужден съедать еще для пополнения дефицита микронутриентов. Это явление приводит к заметному перееданию и развитию ожирения.

Даже при достаточном суточном калораже, несбалансированное питание, и, в частности, витаминодефицитные состояния, рассматривается сегодня ВОЗ как проблема голодания; это оказывает прямое влияние на уровень заболеваемости и смертности всего населения. Согласно данным, представленным Институтом питания РАМН, даже сбалансированный рацион является дефицитным по основным витаминам на 20–30%.

Под витаминной недостаточностью понимают патологическое состояние, обусловленное сниженной обеспеченностью организма тем или иным витамином или нарушением его функционирования в организме. Отсутствие какого–либо из витаминов в пище ведет к недостаточному образованию в организме определенных жизненно важных ферментов и, как следствие, к специфическому нарушению обмена веществ.

В зависимости от глубины и тяжести витаминной недостаточности выделяют три ее формы: авитаминоз, гиповитаминоз и субнормальную обеспеченность витаминами (обозначаемую также как маргинальная или биохимическая форма витаминной недостаточности):

- ***авитаминоз*** - состояние практически полного истощения витаминных ресурсов организма, сопровождающееся возникновением симптомокомплекса, характерного и специфичного для дефицита того или иного витамина (например, цинга, пеллагра и др.);

- ***гиповитаминоз*** - состояние резкого, но не полного, снижения запасов витамина в организме, вызывающее появление ряда, в основном, мало специфических и не резко выраженных клинических симптомов (например, снижение аппетита и работоспособности, быстрая утомляемость и т.п.), а также некоторых более специфических микросимптомов;

- ***субнормальная обеспеченность витаминами*** - доклиническая стадия дефицита витаминов, проявляющаяся, как правило, нарушениями метаболических и физиологических реакций, в которых участвует данный витамин, а также отдельными клиническими микросимптомами.

Имеет смысл в самостоятельную форму выделять ***дисвитаминоз***, под которым следует понимать нарушение количественного соотношения нескольких витаминов, что также может сопровождаться нарушением самочувствия в условиях повышенных психофизиологических нагрузок. О дисвитаминозе можно говорить, когда количество каждого из витаминов находится в физиологических пределах, но один или несколько из них обнаруживается в области нижней границы физиологической нормы, а другие - в области верхней. Это приводит к тому, что более активная вследствие большого количества кофактора ферментативная система получает субстрат от своих метаболических предшественников в недостаточном количестве. Это приводит к недостаточно адекватному физиологическому ответу. Проблема дисвитаминозов практически не исследована.

При несбалансированном питании потребность в витаминах также может меняться. Кроме того, менталитет наших сограждан в отношении собственного здоровья характеризуется фактическим отсутствием стереотипа самосохранительного поведения. Популяционные исследования, проведенные Институтом питания РАМН, выявили, что в России наблюдается крайне недостаточное потребление и все более нарастающий дефицит витаминов (А, группы В, С, Е) и ряда микроэлементов (железо, цинк, йод) у значительной части населения. Так, дефицит витаминов группы В выявляется у 30–40%, β-каротина - более чем у 40%, витамина С - у 70–90% обследуемых. При этом витаминный дефицит носит сочетанный характер и обнаруживается не только зимой и весной, но и в летне-осенний период. Общую ситуацию можно рассматривать как массовый круглогодичный полигиповитаминоз. Недостаточная обеспеченность и/или несбалансированное потребление жизненно важных микронутриентов является национальным бедствием России и всего пространства бывшего СССР, фактором постоянного отрицательного воздействия на здоровье, рост, развитие и формирование органо- и системогенеза во все возрастные периоды.

В то же время, назначение профилактических доз витаминов (дозы, обеспечивающие суточную потребность) с лечебными целями бессмысленно, поскольку это профилактические, а не лечебные дозы. При назначении лечебных доз, как правило, эффект реализуется не через коферментные, а какие-то другие, часто совсем не изученные механизмы, если только речь не идет о лечении глубокого витаминного дефицита. Поэтому необходимо более широкое изучение так называемых некоферментных функций витаминов, о которых упоминалось в ранних публикациях о витаминах, но внимание врачей и специалистов на некоферментных функциях витаминов не акцентировалось.

Назначение витаминов пациентам без диагностированного гиповитаминоза является спорным с точки зрения доказательной медицины. Фармакологический эффект витаминов в условиях их нормальной обеспеченности не был продемонстрирован в прямых клинических испытаниях, а показания для такого применения носят преимущественно теоретический характер и основаны на экстраполяции данных, полученных при лечении дефицитных состояний. То есть, поскольку дефицит витамина сопровождается поражением какого-либо органа или функции, то при похожем поражении этого органа или функции необходим соответствующий витамин. Но в клинике эффективность витаминотерапии при заболеваниях, не обусловленных дефицитом витамина, никто не исследовал. Кроме того, в настоящее время злоупотребления витаминными препаратами настолько часты, что в литературе перестали упоминать симптоматику дефицита и подробно описывают симптоматику отравлений.

Несмотря ни на что, актуальным остается вопрос применения современных знаний и инновационных технологий разработки способов производства витаминов в форме лекарственных препаратов или биологически активных добавок, их содержащих, а также фортификации витаминами продуктов питания на основе современных. Они устраняют

проблему дефицита микроэлементов и улучшают общее состояние здоровья и благополучие путем производства целевых добавок и обогащенных продуктов питания.

На современном этапе крупномасштабное производство витаминов достигается путем генетической модификации микробов. В дополнение обычным методам химического синтеза, микробное производство витаминов показало большие перспективы, особенно для тех витаминов, которые являются дорогостоящими или трудными для химического производства. Пищевая и фармацевтическая промышленность значительно выигрывают от способности синтезировать витамины экономичным, устойчивым и узкоспециализированным образом.

Вопросы для самоконтроля

1. Почему ранние симптомы авитаминозов (цинга, куриная слепота) лечились эмпирически задолго до открытия витаминов? Приведите исторические примеры таких методов.
2. Какие ключевые эксперименты Н.И. Лунина и Х. Эйкмана доказали существование незаменимых пищевых факторов? В чём была принципиальная новизна их выводов?
3. Кто и почему ввёл термин «витамины»? Почему это название, с химической точки зрения, оказалось неточным, но всё же прижилось в науке?
4. Объясните, почему работы Н.И. Лунина и К. Функа долгое время не получали широкого признания, в то время как Ф. Хопкинс и Х. Эйкман получили Нобелевскую премию за «открытие витаминов».
5. Почему период с 1910-х по 1940-е годы называют «золотым веком» витаминологии? Перечислите не менее трёх ключевых открытий этого периода.
6. Дайте современное биохимическое определение витамина. Чем это определение отличается от первоначального, предложенного К. Функом?
7. Что такое витамеры? Приведите примеры.
8. Назовите основной принцип классификации витаминов. Каковы ключевые физиологические и биохимические различия между жирорастворимыми и водорастворимыми витаминами (хранение, устойчивость, выведение)?
9. Перечислите 4 общих свойства, характерных для всех витаминов.
10. Почему большинство водорастворимых витаминов относятся к группе В? Какова их основная биохимическая функция?
11. Дайте определения следующим формам витаминной недостаточности: авитаминоз, гиповитаминоз, субнормальная обеспеченность (маргинальная недостаточность).
12. Что такое дисвитаминоз и почему эта форма недостаточности представляет особую проблему и плохо изучена? Приведите гипотетический пример метаболического нарушения при дисвитаминозе.
13. Назовите основные социально-экономические и агротехнические причины распространения полигиповитаминоза и «скрытого голода» в современном мире (в т.ч. в России).
14. Как связано снижение плодородия почв и выведение скороспелых сортов растений с уменьшением витаминной ценности продуктов?
15. Что такое гипервитаминоз? Для каких классов витаминов он наиболее характерен и почему?
16. Дайте определение антивитаминам. На какие две основные группы их разделяют по механизму действия? Приведите по одному примеру для каждой группы.
17. Какой механизм лежит в основе действия конкурентных (изостерических) антивитаминов? Приведите пример такого вещества и его практического применения в медицине.
18. Почему водорастворимые витамины требуют регулярного поступления с пищей, даже если они синтезируются кишечной микробиотой?

19. Каковы перспективы и преимущества микробного (биотехнологического) производства витаминов по сравнению с химическим синтезом?

20. Объясните, почему назначение лечебных доз витаминов при заболеваниях, не связанных с их дефицитом, является спорной практикой с точки зрения доказательной медицины.

Глава 2. Тиамин (витамин B_1): исторические аспекты, метаболизм, физиологическая роль и биотехнологическое значение

2.1. Историческая справка: от «бери-бери» к открытию витамина

Тиамин или витамин B_1 ранее называли антиберибери веществом, антиневритическим витамином. Недостаточность тиамина когда-то была известна на английском языке как «beri beri», а в Японии и Китае как «kakké» (слабые ноги). Самым ранним зарегистрированным доказательством болезни является письмо, написанное португальским священником в 1580 году в Ост-Индии (Цейлон), описывающее состояние, при котором основным симптомом была неспособность выполнять какую-либо работу, давая ему название «bere bere», что означает «Я не могу, я не могу» на сингальском языке.

В конце 1880-х годов в Голландской Ост-Индии начались систематические исследования берибери. Корнелис Пекельхаринг и Корнелис Винклер исследовали берибери и думали, что нашли микрококк, который вызвал болезнь. Впоследствии, в 1897 году, голландский ученый Кристиан Эйкман заметил, что цыплята, которых кормили белым рисом, страдали от паралича конечностей или «полиневрита», в то время как цыплята, которых кормили коричневым (неполированный) рисом, такой патологией не страдали. После этого Геррит Гринс в начале 1900 года определил, что в еде были неоткрытые химические вещества, необходимые для периферической нервной системы. В 1926 году Баренд Янсен и Виллем Донат открыли и кристаллизовали химическое вещество, которое вылечило голубиный полиневрит. Кристиан Эйкман был удостоен Нобелевской премии по физиологии и медицине в 1929 году за открытие антиневритного витамина. В 1936 году Роберт Уильямс раскрыл его молекулярную структуру и разработал процедуру синтеза этого антиневритного витамина.

2.2. Химическая структура и физико-химические свойства

Тиамин (витамин B_1) - водорастворимый витамин, относящийся к гетероциклическим соединениям. Химическая формула тиамина - $C_{12}H_{17}N_4OS$. Тиамин представляет собой бициклическую молекулу, состоящую из колец тиазола и аминопиримидина, соединенных метиленовым мостом (рисунок 2).

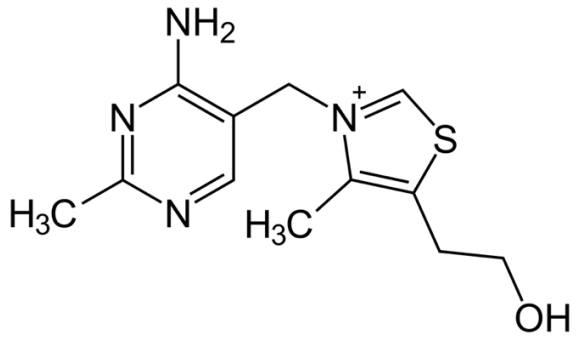


Рисунок 2. Структурная формула тиамина

Тиамин стабилен при комнатной температуре, в замороженном виде и в слегка кислых средах, но нестабилен в щелочных растворах. Он подвергается реакции Майяра при высоких температурах из-за наличия аминогруппы. Тиамин очень восприимчив к сульфитам, которые расщепляют его две кольцевые системы, что приводит к потере тиамина из продуктов, обработанных сульфитами. Тиамин также подвержен окислению реактивными формами кислорода, образующимися под ультрафиолетовым и ионизирующим излучением. Некоторые ткани растений и животных содержат тиамин, состоящий в комплексе с тиамин-связывающим

белком, который, в свою очередь, образует димер с рибофлавин-связывающим белком, который повышает стабильность тиамина.

2.3. Физиологическая роль и коферментная функция

Тиамин играет роль кофермента в нескольких метаболических реакциях, в основном в тех, которые связаны с синтезом энергии из углеводов. Как известно, основной источник энергии получается путем преобразования глюкозы в аденозинтрифосфат (АТФ). Этот и другие механизмы, с помощью которых производится энергия, нарушаются при отсутствии достаточного количества витамина B_1, что может привести к проблемам со здоровьем.

Тиамин нужен для нормального функционирования нервной системы - он играет роль в создании миелина, необходимого для здоровой работы нейронов и нейротрансмиттеров. Он также обладает антиоксидантными свойствами, которые помогают защитить клетки от окислительного стресса, вызванного свободными радикалами. Синдром Вернике-Корсакова, Берибери и Полиневрит - это заболевания, вызванные низким уровнем витамина B_1.

Тело человека может содержать до 30 мг тиамина в тканях - в основном сосредоточенный в скелетных мышцах, он также был обнаружен в мозге, сердце, печени и почках. B_1 необходим для нормального роста и развития, помогает поддерживать надлежащую работу сердца и пищеварительной систем. Тиамин, являясь водорастворимым соединением, не запасается в организме и не обладает отравляющими свойствами. Недостаток данного витамина, возникающий при плохом питании и чрезмерном употреблении алкоголя, приводит к синдрому Вернике-Корсакова. Эти расстройства характеризуются изменениями в нервной системе, которые могут быть восстановлены при высоком уровне потребления тиамина и соответствующей диете.

В природе тиамин синтезируется растениями и многими микроорганизмами. Большинство животных и человек не могут синтезировать тиамин и получают его вместе с пищей. В тиамине нуждаются все животные за исключением жвачных, так как бактерии в их кишечнике синтезируют достаточное количество этого витамина.

Всасываясь из кишечника, тиамин фосфорилируется и превращается в тиаминпирофосфат (ТПФ, рис. 3).

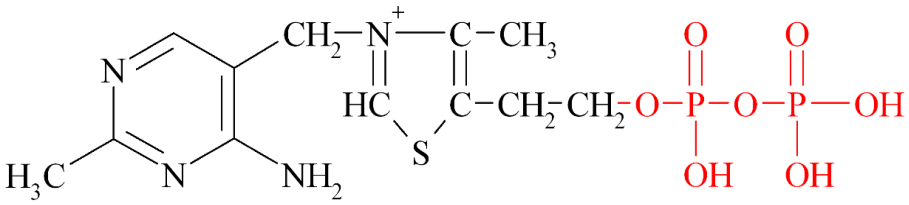


Рисунок 3. Структурная формула тиаминпирофосфата

ТПФ - это активная форма тиамина, является коферментом пируватдекарбоксилазного и α-кетоглутаратдегидрогеназного комплексов, а также транскетолазы. Первые два фермента участвуют в метаболизме углеводов, транскетолаза функционирует в пентозофосфатном пути, участвуя в переносе гликоальдегидного радикала между кето- и альдосахарами. ТПФ синтезируется ферментом тиаминпирофосфокиназой, главным образом в печени и в ткани мозга. Реакция требует присутствия свободного тиамина, ионов Mg^{2+} и АТФ. Также ТПФ выступает коферментом дегидрогеназы γ-оксиглутаровой кислоты и пируватдекарбоксилазы клеток дрожжей.

Другими производными тиамина являются:

- тиаминтрифосфат, обнаружен у бактерий, грибов, растений и животных, у *E. coli* играет роль сигнальной молекулы при ответе на аминокислотное голодание.
- аденозинтиаминдифосфат - накапливается у *E. coli* в результате углеродного голодания.

- аденозинтиаминтрифосфат - присутствует в небольших количествах в печени позвоночных, функция его неизвестна.

2.4. Метаболизм тиамина в организме человека

Тощая кишка и подвздошная кишка являются основными местами абсорбции алиментарного тиамина. Алиментарный ТПФ гидролизуется до свободного тиамина в просвете кишечника фосфатазами и пирофосфатазами. Свободный тиамин затем абсорбируется через апикальную мембрану энтероцитов двумя специализированными переносчиками: **переносчиком тиамина человека 1 (hTHTR-1)** и **переносчиком тиамина человека 2 (hTHTR-2)**. Оба транспортера осуществляют симпорт тиамина с ионами водорода (H^+). При высоких люминальных концентрациях тиамина возможна также пассивная трансцеллюлярная диффузия. Кроме того, небольшое количество тиамина также синтезируется кишечной микробиотой. Этот микробный ТПФ абсорбируется в толстой кишке с помощью **человеческого транспортера ТПФ (hTПФТ)**, присутствующего в апикальной мембране колоноцитов.

Основная роль в выведении свободного тиамина через базальную мембрану энтероцита в кровоток принадлежит **hTHTR-1**, который локализован на базолатеральной поверхности клетки. Внутри энтероцита часть свободного тиамина может повторно фосфорилироваться в ТПФ или тиаминмонофосфат (ТМФ). Эти фосфорилированные формы затем способны экспортироваться в кровь с участием **переносчика восстановленных фолатов 1 (RFC1)**. Таким образом, в процессе движения к базолатеральной мембране тиамин внутри клетки подвергается циклам фосфорилирования и дефосфорилирования (рис. 4).

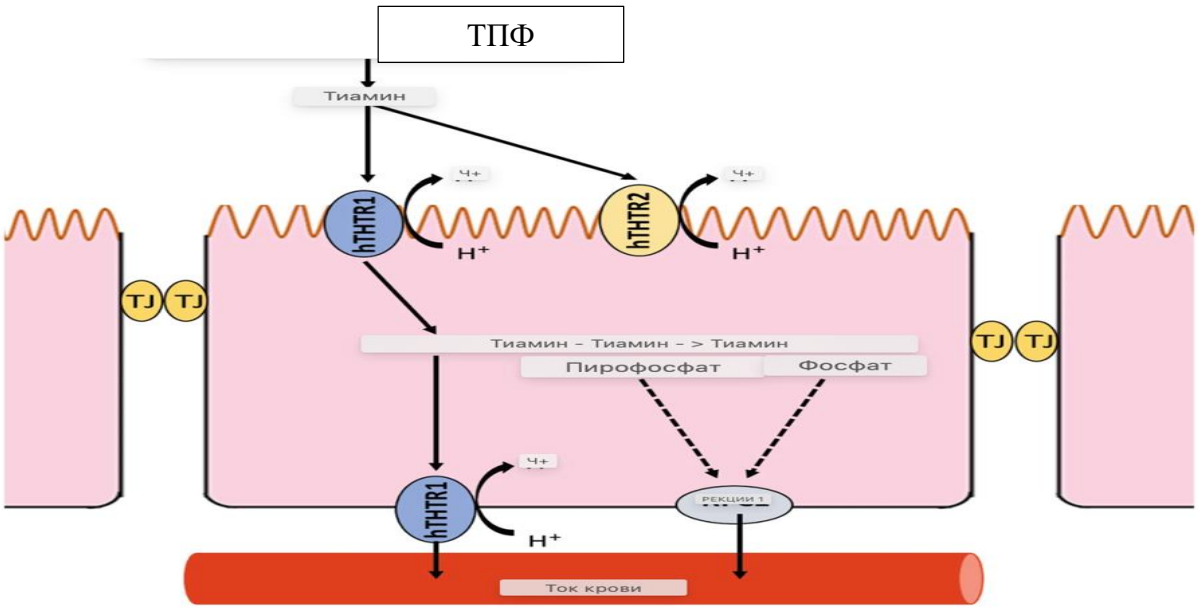


Рисунок 4. Схема всасывания и транспорта тиамина

Уровень экспрессии hTHTR-1 наиболее высок в печени, а в желудочно-кишечном тракте его распределение убывает в следующем порядке: желудок > двенадцатиперстная кишка > тощая кишка > подвздошная кишка > толстая кишка. Количество тиамина в просвете кишечника через активность hTHTR-2 и hTHTR-1 регулирует скорость его всасывания.

Внутри клетки он попадает в митохондрии с помощью **митохондриального транспортера ТПФ (МТПФТ-1)**, где используется в качестве кофермента для ферментов, участвующих в генерации АТФ.

Основная часть тиамина в сыворотке крови находится в состоянии неспецифической связи с белками, преимущественно с альбумином. При этом около 90% от общего содержания тиамина в цельной крови локализовано в эритроцитах, где его концентрация в норме

составляет 50-120 нг/мл (или 5-12 мкг/дл). Большая часть диетического тиамина депонируется в скелетных мышцах и печени; его запасы также формируются в миокарде, лёгких и тканях нервной системы.

В периферических тканях тиамин подвергается фосфорилированию с образованием трёх основных производных: ТМФ, ТПФ, и ТТФ. ТПФ служит активной коферментной формой тиамина в клетках животных и синтезируется из свободного тиамина под действием тиаминпирофосфокиназы (ThPK), Mg^{2+}-зависимого цитозольного фермента. ТТФ образуется преимущественно в скелетных мышцах под действием цитозольного фермента аденилаткиназы. Помимо этого, с участием Mg^{2+}- или Mn^{2+}- зависимой аденилтрансферазы и нуклеотидов (АТФ и АДФ) могут синтезироваться аденозильные аналоги: аденозилтиаминпирофосфат (AdTPP) и аденозилтиаминтрифосфат (AdTTP).

Исследования показывают, что ТМФ может образовываться из ТПФ под действием фермента тиаминпирофосфатазы. В дальнейшем ТМФ может быть гидролизован до свободного тиамина ферментом тиаминмонофосфатазой (рис. 5).

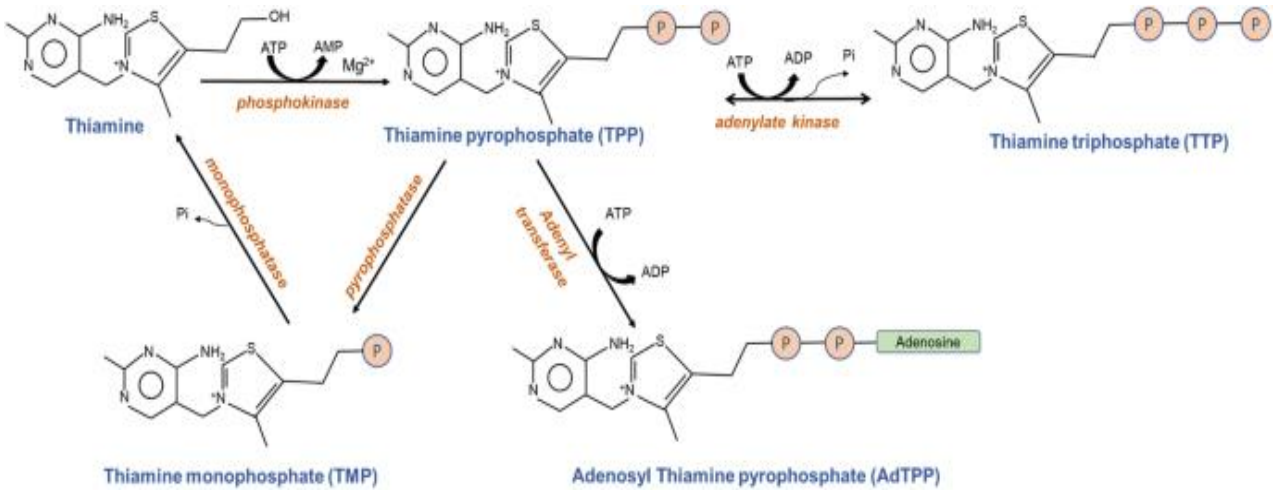


Рисунок 5. Фосфорилирование/дефосфорилирование тиамина

Фосфатные эфиры тиамина могут гидролизоваться как неспецифическими фосфатазами (например, щелочной и кислой фосфатазами), так и специфическими ферментами, такими как ТТФ-трифосфатаза и ТПФ-фосфатаза. Повсеместно присутствующая в тканях неспецифическая фосфогидролаза катализирует гидролиз ТМФ с образованием свободного тиамина. В результате динамического баланса процессов фосфорилирования и дефосфорилирования в клетках формируется значительный физиологический пул ТПФ, который составляет до 80% от общего содержания тиамина.

ТПФ содержит высокоэнергетическую фосфоангидридную связь, что определяет его высокий потенциал переноса фосфатной группы и способность выступать в роли ключевого кофермента. Синтезированный в цитозоле ТПФ используется цитозольной транскетолазой, а часть его транспортируется в митохондрии через митохондриальный транспортер тиаминпирофосфата (МТПФТ-1).

Внутри митохондрий ТПФ выполняет роль кофактора для пируватдегидрогеназного и α-кетоглутаратдегидрогеназного комплексов. Митохондриальный транспортер тиаминпирофосфата (МТПФТ-1) не только обеспечивает импорт ТПФ в митохондрии для участия в метаболических реакциях, но и защищает его от гидролиза цитозольными фосфатазами. В клетке ТПФ и ТТФ также присутствуют в аденозилированных формах (AdTPP и AdTTP), однако их концентрации на порядки ниже, чем у других нуклеотидов, таких как АМФ, АТФ и $НАД^+$.

Структурные аналоги тиамина, содержащие модифицированное тиазоловое кольцо (например, окситиамин и пиритиамин), способны конкурентно ингибировать все ТПФ-зависимые ферменты, выступая в роли антагонистов витамина B_1.

Свободный тиамин не способен накапливаться в организме человека, а запасы его фосфорилированных форм в клетках крайне невелики.

Два наиболее распространённых типа бактерий из микробиома человека, способных синтезировать ТПФ - это *Bacteroidetes* (например, *Bacteroides fragilis*) и *Fusobacteria* (*Fusobacterium varium*). К продуцентам витамина B_1 также относятся и другие представители кишечной микробиоты (*Prevotella, Actinobacteria* и *Clostridium*). В то же время существуют бактерии, например, представители семейства *Ruminococcaceae*, которые лишены механизмов синтеза витамина B_1 и являются его потребителями.

Исследования показывают, что добавление тиамина в рацион жвачных животных может стимулировать синтез уксусной кислоты в рубце и увеличивать численность бактерий, таких как *Succinivibrio, Ruminococcus 1, Pyramidobacter* и *Ruminobacter*. Молочнокислые бактерии, включая *Enterococcus, Lactobacillus, Streptococcus* и *Bifidobacterium*, продуцируя кислоты в желудочно-кишечном тракте, могут косвенно усиливать всасывание тиамина за счёт модуляции pH кишечной среды.

2.5. Пищевые источники и факторы, влияющие на сохранность

Растительные продукты содержат витамин B_1 преимущественно в виде свободного тиамина или ТМФ, в то время как ТПФ является основной формой, присутствующей в продуктах животного происхождения. Хотя его концентрация встречается во многих продуктах питания, она часто низкая, потому что он разрушается во время приготовления пищи.

Зерновые и бобовые являются основными источниками тиамина в рационе, помимо мяса, свинины, бобовых и орехов (таблица 1). Самый внешний алейроновый слой эндосперма цельного зерна (шелуха и зародыш) содержит более 90% тиамина. Белый рис и другие полированные зерна содержат очень мало тиамина из-за удаления слоя алейрона во время обработки.

Мытье риса несколько раз, длительное замачивание бобов в воде и использование пищевой соды для ускорения приготовления бобовых увеличивают потерю тиамина из рациона. Тиаминазы - это термолабильные экзоферменты, которые разрушают тиамин, могут выделяться определенными бактериями и содержаться в продуктах питания, включая чай и кофе. Некоторые виды неприготовленной рыбы также содержат тиаминазу, что приводит к дефициту тиамина при потреблении некоторых блюд, таких как суши, сашими и т.п., в больших количествах в течение длительного периода времени.

Таблица 1 – Содержание тиамина в некоторых продуктах

№	Продукты	Содержание (мг/100 г)
1	Рисовые отруби	2,26
2	Зародыши пшеницы	2,02
3	Семена подсолнечника (жареные)	1,82
4	Пивные дрожжи сухие	1,80
5	Свинина свежая	1,13
6	Семена кунжута	0,98
7	Фасоль сушеная	0,68
8	Цельнозерновая мука	0,55
9	Чечевица	0,43
10	Говяжья печень	0,25

2.6. Методы оценки статуса тиамина в организме и проблемы восполнения его дефицита

Для анализа содержания тиамина в биологических образцах и продуктах питания используют химические, микробиологические и ферментативные методы.

1) Микробиологические методы (биоанализ): исторически первые методы, основанные на оценке роста тест-микроорганизмов (*Lactobacillus fermentum*, дрожжи), зависимых от тиамина.

2) Хроматографические методы: определение ТПФ в гемолизате эритроцитов с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Анализ цельной крови или эритроцитов предпочтительнее сыворотки, где содержание ТПФ ничтожно мало.

3) Ферментативный функциональный тест: оценка активности эритроцитарной транскетолазы с определением её коэффициента активации добавлением ТПФ. Снижение активности свидетельствует о дефиците.

4) Оценка метаболитов: при дефиците тиамина в крови накапливаются лактат, пируват и α-кетоглутарат. В моче может повышаться уровень токсичного метилглиоксаля, образующегося из триозофосфатов из-за блокирования тиамин-зависимых ферментов.

5) Флуориметрические методы: высокочувствительные методы, основанные на окислении тиамина до флуоресцирующего тиохрома.

Дефицит витамина B_1 может привести к развитию болезни бери-бери, которая характеризуется нарушениями в работе нервной системы и сердца. Симптомы гиповитаминоза могут включать в себя: усталость и слабость; раздражительность и бессонницу; потерю аппетита и снижение веса; онемение конечностей и покалывание в них; нарушения сердечного ритма. Гипервитаминоз тиамином встречается редко, так как он водорастворимый и его избыток выводится из организма с мочой. Однако при приёме больших доз витаминных препаратов без назначения врача возможны побочные эффекты, такие как аллергические реакции или раздражение кожи.

Тиамин характеризуется низкой токсичностью и хорошей переносимостью даже в высоких дозах (например, до 300 мг/сутки при лечении синдрома Вернике-Корсакова). Побочные эффекты (головная боль, аллергические реакции, аритмия) возможны лишь при чрезвычайно высоких дозах, вводимых парентерально. Верхний допустимый уровень потребления официально не установлен.

Важно помнить, что перед началом приёма любых витаминных препаратов необходимо проконсультироваться с врачом, который проведёт диагностику и назначит оптимальную дозировку витаминов, учитывая индивидуальные особенности организма и потребности в питательных веществах.

2.7. Биотехнологическое производство и промышленное применение

Для удовлетворения пищевых потребностей витамин B_1 производится методами химического, генетического и метаболического инжиниринга. Химический синтез осуществляется путём конденсации тиазолового и пиримидинового гетероциклов. Помимо химического синтеза, активно развиваются биотехнологические подходы к производству тиамина и его активной формы, ТПФ, с использованием микробных продуцентов и методов метаболической инженерии. Биотехнологические методы позволяют получать тиамин в более экологичных условиях (при мягких температуре и давлении) по сравнению с химическим синтезом и создавать устойчивые источники витамина для фармацевтики и обогащённого питания. Можно выделить два основных подхода в биотехнологиях витамина B_1:

Первый - использование природных и селекционных штаммов:

- молочнокислые бактерии (*Lactobacillus*, *Enterococcus*), участвующие в ферментации, способны синтезировать и высвобождать тиамин;

- для обогащения кормов и пищевых продуктов применяют дрожжевые культуры или бактериальные закваски, продуцирующие витамин B_1.

Второй - метаболическая инженерия микроорганизмов (основными продуцентами витамина B_1 являются генетически модифицированные штаммы *Escherichia coli, Salmonella typhimurium, Bacillus subtilis* и *Corynebacterium glutamicum*):

- усиление биосинтетического пути: гиперэкспрессия генов кластера *thi* (например, *thiCEFGH*), отвечающих за синтез тиазолового и пиримидинового колец и их конденсацию в тиамин.

Escherichia coli считается перспективным микроорганизмом для производства ТПФ**.** Гиперэкспрессия генов кластера *thiFSGHCE* и гена *thiD*, связанных с метаболизмом железо-серных кластеров, значительно повышает его выход.

У *Bacillus subtilis* создаются мутации в генах транспортных белков, связанных с тиамином (*Yua J* и *Yko D*), и в гене ТПФ-киназы (*thiN*). Эти гены являются компонентами рибопереключателей, регулирующих бактериальный путь биосинтеза тиамина.

В исследованиях на грибе *Aspergillus oryzae* сверхэкспрессия генов *nmtA, thiP* и *thiA* позволила увеличить выход тиамина в четыре раза по сравнению с диким штаммом;

- блокирование катаболизма: инактивация генов ферментов, расщепляющих тиамин или его предшественники. У *Salmonella typhimurium* пиримидиновая часть тиамина может синтезироваться как *de novo* через биосинтез пуринов, так и по альтернативному пути биосинтеза пиримидинов, который не зависит от гена *pur F*;

- снятие репрессии: модификация рибопереключателей и промоторных регионов, которые у диких штаммов жёстко подавляют синтез тиамина по принципу отрицательной обратной связи;

- повышение толерантности к продукту: селекция штаммов, способных накапливать высокие внутриклеточные концентрации тиамина без ингибирования роста;

- секреция в среду: конструирование транспортных систем для активного выведения витамина из клетки, что упрощает его выделение и очистку;

- применение в биокатализе: ферменты биосинтеза тиамина используются для *in vitro* синтеза его химически сложных фрагментов или аналогов с высокой стереоселективностью.

В современных патентах также описывается использование *B. Subtilis* в метаболической инженерии для накопления высоких уровней витамина B_1 в средах. В них детально охарактеризованы микроорганизмы с мутациями, вызывающими дерегуляцию синтеза тиамина, включая представителей семейств *Brevibacteriaceae, Lactobacillaceae, Streptococcaceae* и *Corynebacteriaceae*.

Витамин B_1 (тиамин) имеет широкое промышленное применение, главным образом в пищевой, фармацевтической и кормовой отраслях.

Пищевая промышленность (обогащение продуктов): для профилактики дефицита тиамин добавляют в продукты массового потребления, особенно в регионах с риском авитаминоза. Чаще всего обогащают муку, рис, хлеб и готовые завтраки. Традиционные ферментированные продукты (например, индийские идли) также служат источником тиамина, содержание которого увеличивается в процессе микробной ферментации.

Пивоваренная и винодельческая промышленность: тиамин является важным фактором роста дрожжей и их метаболической активности в процессах брожения при производстве пива и вина.

Фармацевтическая промышленность: тиамин играет ключевую роль в энергетическом обмене. Его дефицит связан с сердечной недостаточностью, неврологическими расстройствами (синдром Вернике-Корсакова, бери-бери) и метаболическими нарушениями (лактатацидоз). Рандомизированные контролируемые исследования показывают, что добавки тиамина могут снижать частоту делирия у пациентов в отделениях интенсивной терапии. Препараты, содержащие тиамин (например, в составе комплексных аминокислотных средств), также применяются в онкологии для коррекции нутритивного статуса.

Производство кормов для животных: тиамин - обязательная добавка к кормам для птицы, свиней и жвачных животных, необходимая для поддержания их роста, здоровья и продуктивности.

Вопросы для самоконтроля

1. Почему витамин B_1 исторически называли «антиневритическим витамином»? Какое заболевание, вызванное его дефицитом, известно под названиями «бери-бери» и «каккэ»?
2. Опишите структуру молекулы тиамина. Из каких двух гетероциклических колец она состоит и как они соединены?
3. Объясните, почему тиамин является водорастворимым витамином и каковы следствия этого свойства (накопление, токсичность, потери при приготовлении пищи)?
4. Перечислите основные пищевые источники тиамина. Почему цельные зерна содержат его больше, чем очищенные (например, бурый рис)?
5. Опишите путь всасывания диетического ТПФ в кишечнике. Какие ферменты и транспортеры на апикальной мембране энтероцитов в этом участвуют?
6. В чём состоит разница в функции транспортеров hTHTR-1 и hTHTR-2 на апикальной мембране и базолатеральной мембране энтероцита?
7. Каковы основные места хранения тиамина в организме человека? В какой форме он преимущественно там находится?
8. Назовите три основных фосфорилированных производных тиамина в тканях. Какое из них является главной активной коферментной формой и почему (укажите на энергетическую связь)?
9. Опишите роль митохондриального транспортера ТПФ (МТПФТ-1). В чём заключается его «защитная» функция помимо транспорта?
10. Назовите три ключевых ферментативных комплекса, для которых ТПФ служит коферментом. Укажите метаболические пути, в которых они работают.
11. Как нарушение функций ТПФ-зависимых ферментов объясняет накопление лактата и пирувата в крови при дефиците тиамина?
12. В чём сходство и различие патогенеза и симптомов болезни «бери-бери» и синдрома Вернике-Корсакова (WKS)?
13. Как можно объяснить, что дефицит одного витамина (B_1) приводит к таким разнообразным клиническим проявлениям (неврологическим, сердечным, метаболическим)?
14. Какова роль кишечной микробиоты в обеспечении организма тиамином? В каком отделе кишечника происходит всасывание микробного ТПФ и с помощью какого транспортера?
15. Приведите примеры бактериальных филумов и родов, которые являются продуцентами и потребителями витамина B_1 в кишечнике.
16. Каковы основные стратегии метаболической инженерии для создания микробных штаммов-продуцентов тиамина (на примере *E. coli* или *B. subtilis*)?
17. Сравните преимущества и недостатки химического и биотехнологического способов промышленного производства витамина B_1.
18. Почему для оценки статуса тиамина в организме предпочтительнее анализировать ТПФ в гемолизате эритроцитов, а не его уровень в сыворотке крови?
19. В чём заключается принцип функционального ферментативного теста с транскетолазой эритроцитов для диагностики дефицита B_1?
20. Перечислите основные сферы промышленного применения тиамина (не менее 4-х) и обоснуйте его необходимость в каждой из них.

Глава 3. Рибофлавин (Витамин B_2): биологическая роль, пищевые источники и биотехнологическое значение

3.1. История открытия. Химическая структура и коферментные формы

Рибофлавин**,** также известный как витамин B_2, получил своё название от сочетания «рибоза» (пятиуглеродный сахар, входящий в его структуру) и латинского *«flavus»* — «жёлтый», что отражает его характерный цвет.

Рибофлавин — это водорастворимый витамин, который впервые был замечен в коровьем молоке английским химиком Александром Уинтером Блайтом в 1872 году как пигмент с желто-зеленой флуоресценцией. Тем не менее, он был признан только в 1927 году при изучении комплекса витамина В, который содержал два различных компонента: термолабильный антиневритный фактор, витамин B_1 (тиамин) и более термостабильный фактор витамин B_2 (рибофлавин) (этот фактор был необходим для поддержания роста и профилактики поражений кожи). Пол Дьёрдь, Ричард Кун и Теодор Вагнер-Яурегг в 1933 году впервые добились успеха в изоляции и очистке витамина B_2. Кун предположил, что ярко-желтое флуоресцентное соединение, которое стимулировало рост активности, может быть названо флавином.

Биохимически и физиологически он играет решающую роль в качестве редукционного эквивалента FMN (флавинмононуклеотида) и FAD (флавинадениндинуклеотида) - он является строительным блоком для создания обоих коэнзимов (протеазных групп флавопротеинов). Его биосинтез происходит в бактериях, грибах и растениях и начинается со связи гуанозинтрифосфата и рибулозы-5-фосфата.

Рибофлавин состоит из трициклического диметил-изоаллоксазинового кольца, которое конъюгировано с сахарным спиртом рибитолом и ранее было известно, как витамин G, лактофлавин или рибофлавин (рис. 6).

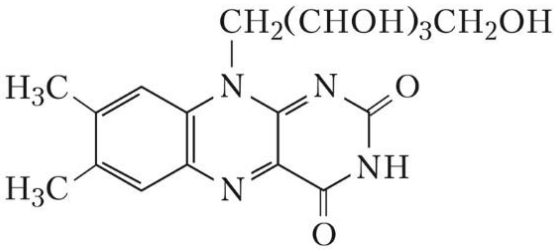


Рисунок 6. Структурная формула рибофлавина

Рибофлавин и флавин - коэнзимы желтого цвета, с полосой поглощения в 450 нм. Он широко распространен в продуктах питания, где он почти исключительно связан с белками через 8α-гистидил-азот или 8α-цистеинилсеру, в основном в формах FMN и FAD (рис. 7).

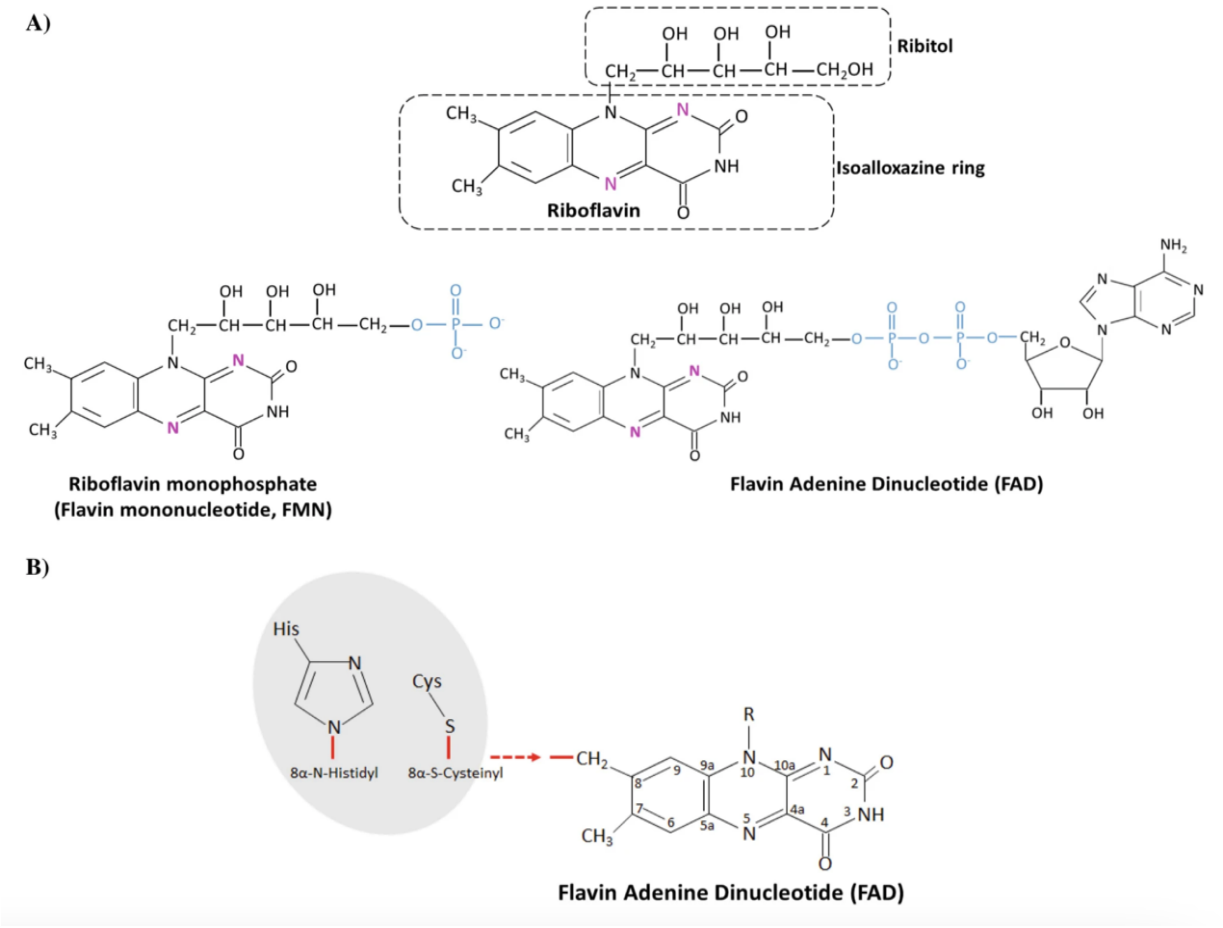


Рисунок 7. (**A**) Структура рибофлавина, флавин монофосфата (FMN) и динуклеотида флавин-аденина (FAD). (**B**) Рибофлавин связан с 8α-гистидил-азотом или 8α-цистеинил-серой с белками, в основном в формах FMN и FAD

3.2. Биологическая роль и физиологические функции

Рибофлавин - один из важнейших водорастворимых витаминов, является основным компонентом кофакторов FAD (динуклеотид флавина-аденина) и FMN (мононуклеотид флавина), поэтому он необходим для правильной работы всех флавопротеинов. Рибофлавин, как один из витаминов группы В, необходим для поддержания общего здоровья и благополучия. Так, от рибофлавина зависят белковый, жировой и углеводный метаболизмы. Рибофлавин необходим как для заживления тканей, так и для пролиферации клеток. Это помогает организму поддерживать неврологическую систему, кожу и глаза здоровыми. Рибофлавин функционирует как антиоксидант, помогая нейтрализовать свободные радикалы, являющиеся опасными химическими веществами, которые могут повредить клетки.

Рибофлавин служит основой комплекса витаминов группы В. Он помогает организму перерабатывать другие витамины группы В, способствует расщеплению железа. Другими пунктами, для чего необходим витамин B_2, являются здоровье глаз, неврологическое благополучие и здоровая беременность, а также предотвращение головных болей и участие в переработке железа. Являясь частью комплекса витаминов группы В, рибофлавин помогает организму перерабатывать глюкозу, которая распределяет энергию по всем тканям, дает возможность легким, печени, коже, сердцу и мозгу эффективно развиваться.

Витамин B_2 предотвращает развитие сердечно-сосудистых заболеваний, контролируя уровень гомоцистеина - аминокислоты, которая увеличивает риск закупорки артерий и сердечного приступа. B_2 помогает расщеплять жировые клетки в организме и выводить жир

из кровотока, поэтому его можно использовать как часть лечения больных с гиперхолестеринемией.

Витамин B_2 важен для роста и деления клеток. Он участвует в синтезе ДНК, который необходим для размножения клеток, а также в метаболизме жирных кислот. B_2 также помогает расщеплять нуклеотиды, которые являются частью репликации ДНК. Рибофлавин участвует в метаболизме железа, способствуя достаточному насыщению эритроцитов кислородом для нормального распределения по всему телу, что предотвращает или замедляет развитие анемии. Спортсмены тоже могут получить пользу от ежедневного потребления витамина B_2 - этот витамин взаимодействует с кальцием, помогая формировать крепкие кости и мышцы, особенно в тех областях, которые чаще подвергаются ударам или напряжению. Он помогает насыщению клеток кислородом, что повышает выносливость мышц для улучшения спортивных результатов.

Таким образом, рибофлавин абсолютно необходим для:

- энергетического метаболизма: расщепления белков, жиров и углеводов с образованием энергии (АТФ);
- клеточного дыхания: работы дыхательной цепи в митохондриях;
- антиоксидантной защиты: ФАД необходим для работы глутатионредуктазы - ключевого фермента системы антиоксидантной защиты, нейтрализующего свободные радикалы;
- поддержания здоровья тканей: витамин B_2 играет важную роль в клеточном росте, регенерации тканей, поддержании нормального состояния слизистых оболочек, кожи, глаз и нервной системы.

Гипервитаминоз рибофлавином встречается редко, так как он водорастворимый и его избыток выводится из организма с мочой.

3.3. Пищевые источники и факторы, влияющие на стабильность

Рибофлавин содержится в достаточном количестве в молоке, йогурте и сыре. Он содержится в постном мясе, включая баранину, свинину и мяса крупного рогатого скота, в то время как печень является одним из органных источников, которые особенно богаты питательными веществами. Рыба, особенно скумбрия и лосось, являются хорошими источниками рибофлавина. Он также присутствует в яйцах, особенно в желтках. Некоторые виды грибов, такие как грибы шиитаке, содержат рибофлавин. Хотя они не содержат столько рибофлавина, сколько продукты животного происхождения, такие овощи, как зеленый горошек, фасоль, брокколи, грибы, авокадо, соевые бобы, болгарский перец, сладкий картофель и темно-зеленые листовые овощи, такие как спаржа, салат и шпинат, богаты этим витамином. Небольшое количество рибофлавина можно найти в миндале и семенах подсолнечника. Цельное зерно богато витамином B_2, включая коричневый рис, цельнозерновой хлеб и обогащенные злаки (Табл. 2).

Рибофлавин устойчив к нагреву, поэтому большинство методов термической стерилизации и приготовления пищи не влияют на содержание рибофлавина в продуктах питания. Тем не менее, рибофлавин очень чувствителен к разрушению под воздействием света, и воздействие света в виде прямой сушки на солнце, воздействие солнечного света на молоко в стеклянных бутылках или приготовление пищи в открытых сосудах может привести к значительным потерям. Это связано с тем, что рибофлавин фоторазлагается до биологически неактивных соединений, таких как люмифлавин или люмихром, в щелочных или кислых условиях, соответственно. Сообщалось, что концентрация рибофлавина значительно снижается в молоке, обработанном под высоким давлением и низкой температурой, по сравнению с сырым молоком. Кроме того, будучи водорастворимым витамином, рибофлавин вымывается в воду, используемую во время приготовления пищи. В злаковых зернах рибофлавин в основном присутствует в зародышевом слое и отрубях, поэтому такие процессы, как измельчение, которые удаляют эти ткани, приводят к значительным потерям витамина. Например, около половины рибофлавина в цельнозерновом рисе и более трети рибофлавина в

цельной пшенице теряются при измельчении этих зерен. В варенном рисе большая часть рибофлавина зерна сохраняется, так как обработка паром выводит витамины, первоначально присутствующие в зародышевых и алейроновых слоях, в эндосперм.

Таблица 2 – Содержание рибофлавина в продуктах питания

№/№	Наименование	Содержание (мг/100 г)
1	Говяжья печень	3,5
2	Курица	0,19
3	Баранина	0,22
4	Свинина	0,27
5	Яйцо	0,30
6	Молоко	0,17
7	Сыр Чеддер	0,46
8	Спаржа	0,18
9	Брокколи	0,22
10	Пшеница	0,11

Добавление рибофлавина во многие обработанные продукты, такие как энергетические батончики и хлопья на завтрак, помогает потребителям удовлетворить свои ежедневные потребности. Рибофлавин присутствует в обогащенных продуктах, которые включают хлеб, детское питание, макароны и цельнозерновые продукты. Также известно, что процесс прорастания увеличивает содержание рибофлавина и его биодоступность в различных злаках.

3.4. Метаболизм и транспорт в организме

С рационом питания витамин B_2 поступает в организм либо как свободный рибофлавин, преимущественно содержащийся в молоке и яйцах, либо в виде его нековалентно связанных белковых форм, таких как FAD и FMN. Последние две формы должны быть гидролизованы для высвобождения свободного рибофлавина перед поглощением в энтероциты. Это происходит через денатурацию диетического белка в желудке и последующий гидролиз кишечными фосфатазами и пирофосфатазами FMN/FAD, присутствующими в подвздошной границе кисти тонкой кишки.

Нековалентно связанные формы рибофлавина в продуктах, FMN, FAD и свободный рибофлавин, хорошо усваиваются, в то время как ковалентно связанные белковые комплексы флавина, такие как те, которые содержатся в растительных тканях, стабильны для переваривания и, таким образом, недоступны. Около 7% диетического рибофлавина ковалентно связывается с белками (в основном в виде рибофлавина-8-α-гистидина или рибофлавина-8-α-цистеина). Затем свободный рибофлавин поступает в энтероциты путём опосредованного переносчиком рибофлавина 3 (RFVT3) транспорта; данный переносчик кодируется геном SLC52A3 и находится на апикальной мембране (Рис. 8).

Сообщается, что этот насыщенный процесс является линейным примерно до 30 мг рибофлавина за прием пищи, после чего происходит снижение поглощения рибофлавина.

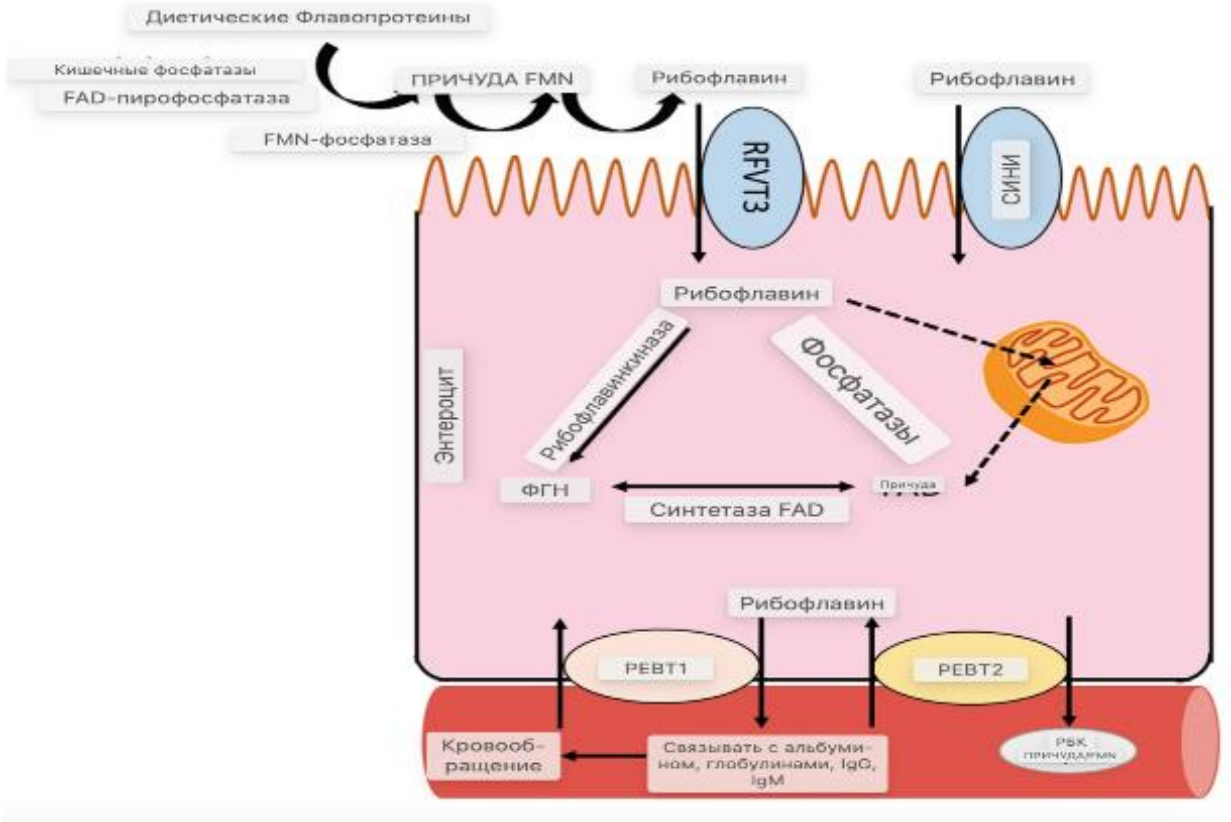


Рисунок 8. Схема метаболизма, всасывания и транспорта рибофлавина

После клеточного поглощения свободный рибофлавин подвергается АТФ-зависимому фосфорилированию рибофлавинкиназой с образованием FMN, который, следовательно, аденилируется до FAD синтетазой *FAD* внутри энтероцита. Рибофлавин высвобождается в портальную кровь и транспортируется в печень в свободной форме или в виде FMN после транспортировки с помощью RFVT1 и RFVT2 (кодируемых *SLC52A1* и *SLC52A2* соответственно), встроенных в базолатеральную мембрану энтероцитов.

Неспецифические фосфатазы в энтероцитах действуют на внутриклеточный FAD, высвобождая свободный рибофлавин, чтобы обеспечить транспорт через базолатеральную мембрану. Рибофлавин транспортируется в плазме как свободный рибофлавин, так и в составе FMN. Около половины свободного рибофлавина и 80% FMN связаны с белками плазмы, такими как альбумин, α- и β-глобулины, иммуноглобулины (IgG и IgM) и фибриноген.

RFVT1 экспрессируется в плаценте, где он транспортирует материнский рибофлавин к плоду. Экспрессия RFVT2 в головном мозге высокая, что опосредует транспорт рибофлавина FMN в ткани. В тканях рибофлавин превращается в форму кофермента, преимущественно в виде FMN (60-95% от общего количества флавинов) или в виде FAD (5-22% от общего количества флавинов), оба из которых почти исключительно связаны со специфическими флавопротеинами. Несвязанные флавины быстро гидролизуются до свободного рибофлавина и выводятся с мочой. Большая часть рибофлавина используется немедленно и не хранится в организме; следовательно, любое потребление, превышающее потребности в тканях, выводится с мочой в виде рибофлавина или его катаболитов - 7-α-гидроксирибофлавина, 10-гидроксиэтилфлавина и люмифлавина. Именно по этой причине рибофлавин имеет относительно низкую токсичность даже при высоких фармакологических дозах.

Было обнаружено, что все геномы *Bacteroidetes, Fusobacteria* и *Proteobacteri* следуют novo пути производства витамина B_2. Тщательное исследование генома производства витаминов группы В показывает, что 256 геномов, или 65% бактериальных геномов, как считается, способны производить витамин B_2. Многочисленные микроорганизмы, включая грибок Ascomycete, такие как *Ashbya gossypii* и *Eremothecium ashbyii*, и дрожжи, включая

Candida famata и *Candida flaeri*, и, в частности, бактерии, *Corynebacterium ammoniagenes* и *Bacillus subtilis* естественным образом производят рибофлавин. Рибофлавин, вырабатываемый микроорганизмами кишечника, в основном поглощается в толстой кишке. В *Lactococcus lactis* гиперэкспрессия генов, ответственных за биосинтез рибофлавина, может привести к тому, что бактерии станут производителями витамина B_2, а не только потребителями. Было изучено, что снижение скорости опорожнения содержимого желудка усиливает абсорбцию рибофлавина. Темпы опорожнения желудочного содержимого были замедлены *Lactobacillus gasseri* и *Lactobacillus reuteri*, что привело к улучшению абсорбции витамина B_2. Кроме того, другое исследование выявило отрицательную корреляцию между потреблением витамина B_2 и относительным обилием *стрептококков*. Считается, что многие виды *Streptococcus*, включая *Streptococcus pyogenes* и *Streptococcus pneumoniae*, связаны с стрептококковыми инфекциями. Поэтому получение достаточного количества витамина B_2 каждый день может помочь защитить организм от стрептококковых инфекций.

3.5. Микробиологический синтез и промышленное производство

Ранее этот витамин выделяли из яичного белка (овофлавин), из печени (гепатофлавин) и в больших количествах из сыворотки (лактофлавин).

Витамин B_2 производится химически из D-глюкозы тремя различными методами. Методами биотехнологии может использоваться генетическая и метаболическая биоинженерия для преобразования химического синтеза в биопроцесс со значительной экономией средств и является промышленным способом производства рибофлавина.

С развитием биотехнологий он был биосинтезирован с использованием различных ферментирующих организмов. Двумя наиболее значимыми промышленными производителями рибофлавина являются бактерия *Bacillus subtilis* и гриб *Ashbya gossypii.*

Для современного биотехнологического производства рибофлавина используются различные микроорганизмы, одним из наиболее часто используемых из них является *Ashbya gossypii*, нитевидные дрожжи. Эти дрожжи культивируются в промышленных процессах ферментации для производства рибофлавина, с последующим использованием его в пищевой, кормовой и фармацевтической промышленности для различных технических применений. Использование *A. gossypii* для производства рибофлавина имеет то преимущество, что этот микроорганизм обладает высокой способностью производить рибофлавин в больших количествах, и, поэтому, хорошо подходит для коммерческих целей.

Гены TheribABCGH могут быть переэкспрессированы для ускорения синтеза рибофлавина. После делеций и нуклеотидных замен в опероне производство рибофлавина значительно увеличилось в *B. Subtilis.* Производство рибофлавина было более 826,52 мг/л после дерегуляции гена *ribA* и гена *purR* у *B. subtilis*. В *Ashbya gossypii* сверхэкспрессия гена малатсинтазы, участвующего в цикле глиоксилата, привела к увеличению выхода на 70%. Сверхэкспрессия *sef1* и *imh3* в *Candida famata* была использована для создания штамма AF-4, который дал около 1026 мг/л витамина B_2.

В пищевой промышленности рибофлавин и его производные (Рибофлавин-5'-фосфат натрия) используются в качестве пищевого красителя жёлтого цвета (код Е101 согласно ТР ТС 029/2012 «Требования безопасности пищевых добавок, ароматизаторов и технологических вспомогательных средств»). Его применение разрешено на территории Российской Федерации и стран Евразийского экономического союза (ЕАЭС) для окрашивания различных продуктов питания.

В фармацевтической промышленности рибофлавин используется в качестве прекурсора в производстве нескольких лекарственных препаратов и диагностических тестов.

Мультивитамины и добавки В-комплекса входят в число пищевых добавок, которые также часто включают рибофлавин. В нутрицевтике для предотвращения дефицита витамина B_2 используют обогащение основных продуктов питания, таких как мука, крупы и молочные продукты, рибофлавином.

В исследованиях было оценено около 10 различных штаммов *Lactobacillus* на предмет особенностей роста и жизнеспособности в соевом молоке, обогащенном витаминами группы В. Результаты исследований, показали, что добавление витаминов группы В в соевое молоко увеличило пролиферацию всех лактобацилл и ускорило выработку рибофлавина и фолиевой кислоты. Штаммы, такие как ATCC314 *L. acidophilus* или FTDC 8833 в качестве заквасочной культуры, повысили концентрацию рибофлавина в соевом молоке (657% и 243%) по сравнению с начальными показателями до 24-часового периода ферментации. Для стабилизации хлеба был использован *L. fermentum* PBCC11.5, лучший штамм для перепроизводства рибофлавина.

Примечательно, что штаммы, продуцирующие витамины, используются в качестве пробиотиков, при этом их способность вырабатывать витамины связана с определенными терапевтическими преимуществами. Исследования свидетельствуют о том, что дефицит фолиевой кислоты может быть связан с IBD (синдром раздраженного кишечника). Витаминопродуцирующие штаммы LAB (рибофлавин и фолат) были протестированы в различных моделях IBD в связи с противовоспалительными свойствами этих витаминов. Так, применение *Lactobacillus plantarum* CRL2130, производящего рибофлавин, способствовало уменьшению воспаления кишечника в мышиной модели колита путем ингибирования неконтролируемого высокого роста провоспалительных цитокинов. Штаммы LAB, которые производят фолат и рибофлавин, могут использоваться в качестве адъювантной терапии для пациентов с воспалительными расстройствами.

В другом исследовании было показано, что витамин B_2 может быть инкапсулирован в наночастицы хитозана. Согласно профилям высвобождения, витамин B_2 может сохраняться в этой системе не менее 5 месяцев с использованием наночастиц альгината/хитозана. Поэтому их можно добавлять в различные продукты питания и напитки для улучшения стабильности витаминов.

3.6. Дефицит, метод оценки статуса и безопасность

Недостаток рибофлавина (арибофлавиноз) проявляется неспецифическими, но серьёзными симптомами: воспалением и трещинами на слизистых (хейлит, глоссит, ангулярный стоматит), себорейным дерматитом, общей слабостью, утомляемостью, замедлением роста у детей и светобоязнью.

Одним из наиболее часто используемых методов оценки статуса рибофлавина является определение активности глутатион-редуктазы (EGR) эритроцитов. Глутатионредуктаза особенно чувствительна к истощению рибофлавина. EGR является ферментативным и, следовательно, функциональным индикатором, который обычно определяется с добавлением флавин-адениндинуклеотида (FAD) - кофермента, необходимого для активности EGR, и без него. Результаты выражаются в виде коэффициента активности (EGRAC), который представляет собой отношение активности при наличии добавленного FAD и без его добавления. Коэффициент EGRAC 1,0 указывает на отсутствие стимуляции FAD и наличие только холофермента, что означает, что в исходных эритроцитах присутствовало больше достаточного количества FAD (а значит, и рибофлавина). Коэффициент активации 1,0-1,3 отражает адекватное состояние питания; >1,7 указывает на дефицит. Коэффициент активации EGR между 1,3 и 1,7 представляет собой промежуточный статус, без клинических признаков дефицита.

Клинические признаки дефицита рибофлавина наблюдаются при приеме менее 1 мг/день. При потреблении менее 1,1 мг/день экскреция рибофлавина с мочой очень незначительна; затем, по мере увеличения потребления, наблюдается резкое увеличение экскреции. В диапазоне примерно до 2,5 мг/день существует линейная зависимость между потреблением и экскрецией. При более высоких уровнях потребления экскреция резко увеличивается, отражая активную почечную секрецию избыточного количества витамина. Следовательно, уровни рибофлавина в моче четко отражают статус рибофлавина человека.

При приёме больших доз витаминных препаратов без назначения врача возможны побочные эффекты, такие как аллергические реакции или раздражение кожи. Важно помнить, что перед началом приёма любых витаминных препаратов необходимо проконсультироваться с врачом. Он проведёт диагностику и назначит оптимальную дозировку витаминов, учитывая индивидуальные особенности организма и потребности в питательных веществах.

Вопросы для самоконтроля

1. Каковы основные биологические функции рибофлавина в организме?
2. Почему витамин B_2 получил название рибофлавин? Каково его происхождение и ключевые физико-химические свойства (растворимость, устойчивость)?
3. Назовите основные пищевые источники рибофлавина. Какие факторы (обработка, хранение, приготовление) приводят к наибольшим потерям этого витамина в продуктах питания и почему?
4. Опишите процесс всасывания, транспорта и усвоения рибофлавина в организме человека. Чем отличается усвояемость рибофлавина из продуктов животного и растительного происхождения?
5. Где и для каких целей используется рибофлавин в пищевой, фармацевтической и других отраслях промышленности? Каков его статус как пищевой добавки?
6. Какие микроорганизмы и биотехнологические методы используются для промышленного производства рибофлавина? Приведите примеры.
7. Каковы основные причины, симптомы и клинические проявления дефицита рибофлавина?
8. Какие существуют лабораторные методы для оценки обеспеченности организма рибофлавином? Опишите принцип метода определения активности глутатионредуктазы (EGRAC) и интерпретацию его результатов.
9. Какова роль пробиотических микроорганизмов (LAB) в контексте синтеза и усвоения рибофлавина? Каковы перспективы их применения?
10. Почему гипервитаминоз рибофлавином встречается крайне редко? Каковы общие рекомендации по его потреблению и применению добавок?
11. Какова химическая структура рибофлавина и как она связана с образованием его активных форм? Какие участки молекулы отвечают за её окислительно-восстановительные свойства и жёлтый цвет?
12. Детально объясните механизм, с помощью которого рибофлавин (через ФАД) участвует в антиоксидантной защите клетки. На примере глутатионредуктазы опишите, почему дефицит B_2 ослабляет эту систему.
13. В каких физиологических состояниях или при каких заболеваниях потребность в рибофлавине может возрастать (например, беременность, интенсивные физические нагрузки, гипертиреоз, алкоголизм)? Обоснуйте, почему.
14. Какие лекарственные препараты или пищевые компоненты могут отрицательно влиять на усвоение, метаболизм или выведение рибофлавина? (Например, оральные контрацептивы, психотропные препараты, борная кислота).
15. Проанализируйте данные таблицы 2. На основании её и текста объясните, какие продукты являются наиболее богатыми и биодоступными источниками витамина B_2, а какие - относительно бедными. С чем связана эта разница?
16. Что такое врождённая мальабсорбция рибофлавина (синдром Броуна-Виалетто-ван Лэра)? Какую роль в этом заболевании играют транспортеры RFVT (SLC52A), описанные в тексте? Каковы основные симптомы этого состояния?
17. Какие конкретные генетические манипуляции (делеции, сверхэкспрессия, ингибирование обратной связи) применяются к микроорганизмам *Bacillus subtilis* или *Ashbya gossypii* для увеличения промышленного выхода рибофлавина? Принцип одной из них.

18. Помимо теста с глутатионредуктазой (EGRAC), какие ещё существуют методы (например, прямые или косвенные) для оценки статуса рибофлавина в организме человека или в пищевых продуктах? Каковы их преимущества и недостатки?

19. Назовите конкретные ключевые ферменты (флавопротеины) в метаболизме белков, жиров и углеводов, для работы которых необходимы ФМН или ФАД. К каким последствиям в энергетическом обмене приведёт их недостаточная активность при дефиците B_2?

20. Какую роль играет кишечная микробиота в обеспечении организма рибофлавином? Если он синтезируется бактериями толстого кишечника, является ли этот источник существенным для человека и может ли быть использован (например, с помощью пробиотиков) для коррекции дефицита?

Глава 4. Ниацин (витамин B_3, витамин PP): история открытия, биохимические функции и биотехнологическое значение

4.1. История открытия и этиология пеллагры

Никотиновая кислота, ниацин, витамин PP - витамин, участвующий во многих окислительно-восстановительных реакциях, образовании ферментов в обмене липидов и углеводов в живых клетках. Одна из форм витамина B_3 является лекарственным средством.

Открытие ниацина стало следствием глобальных изменений в питании и борьбы с тяжелым авитаминозом – пеллагрой. Это заболевание, характеризуемое классической триадой симптомов «дерматит, диарея, деменция» (так называемые «три Д»), получило широкое распространение в Европе и Северной Америке после внедрения кукурузы как основной сельскохозяйственной культуры из Нового Света. В 1735 г. испанский врач Гаспар Касаль впервые описал заболевание как «mal de la rosa», связав его с рационом бедняков. Термин «пеллагра» (от итал. *pelle agra* – «шершавая кожа») был введён Франческо Фраполли в 1771 г.

В начале XX века американский врач Джозеф Голдбергер в ходе эпидемиологических и экспериментальных исследований (включая опыты на собаках с моделью болезни «чёрный язык») доказал, что пеллагра является болезнью недостаточности питания, а не инфекцией. Он ввёл в практику использование дрожжей как эффективного лечебного средства. В 1937 году Конрадом Эльвехьемом было установлено, что антипеллагрическим фактором является никотиновая кислота. Вскоре, для устранения ассоциаций с никотином (особенно при обогащении продуктов), за витамином было закреплено название ниацин.

4.2. Химическое строение, формы и свойства

Ниацин – общее название для двух биологически активных форм: никотиновой кислоты (пиридин-3-карбоновой кислоты, NA) и никотинамида (никотнамида, NAm) (Рис. 9). Обе формы обладают одинаковой витаминной активностью, но различаются по фармакологическим эффектам.

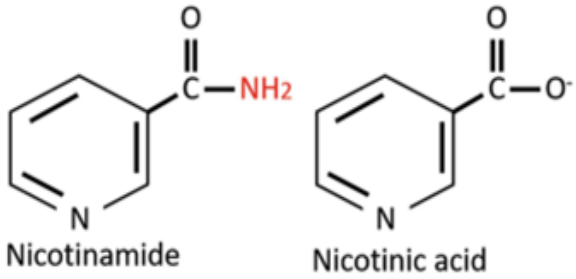


Рисунок 9. Строение никотинамида и никотиновой кислоты

В растениях ниацин часто присутствует в виде прочно связанных комплексов (ниацитина) или метилированной формы (тригонеллина), что снижает его биодоступность.

В организмах животных и человека активные формы существуют в составе жизненно важных коферментов: никотинамидадениндинуклеотида (НАД$^+$/NAD$^+$) и его фосфата НАДФ$^+$/NADP$^+$) (Рис. 10).

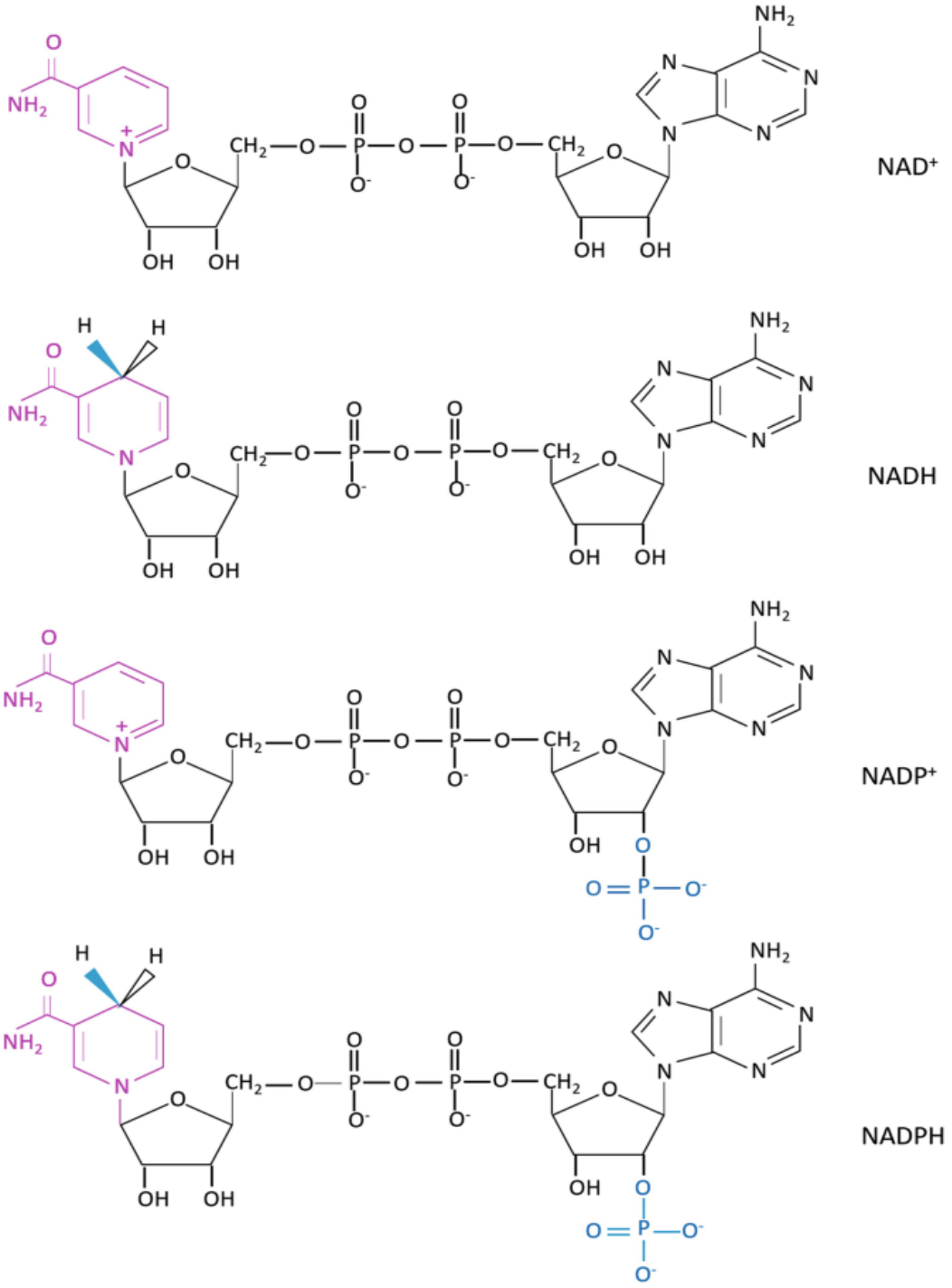


Рисунок 10. Структура никотинамидадениндинуклеотида (НАД$^+$/NAD$^+$) и его фосфата НАДФ$^+$/NADP$^+$)

Коферментные формы способны к обратимому двухэлектронному восстановлению (присоединению гидрид-иона), играя роль универсального переносчика электронов в окислительно-восстановительных реакциях:

$$НАД^+ + 2\bar{e} + H^+ \rightarrow НАДН$$
$$НАДФ^+ + 2\bar{e} + H^+ \rightarrow НАДФН$$

Ключевое аналитическое свойство: восстановленные формы (НАДН, НАДФН) обладают характерным максимумом поглощения при длине волны 340 нм, в то время как окисленные формы (НАД$^+$, НАДФ$^+$) – нет. Это лежит в основе спектрофотометрических методов определения активности дегидрогеназ.

4.3. Биологическая роль

Биологическая значимость ниацина целиком определяется его ролью в составе коферментов НАД и НАДФ, которые участвуют более чем в 400 ферментативных реакциях.

$НАД^+$ – ключевой кофактор катаболических процессов: гликолиза, цикла трикарбоновых кислот, β-окисления жирных кислот. Он акцептирует электроны, которые затем передаются в дыхательную цепь для синтеза АТФ.

НАДФН – основной донор электронов в анаболических (восстановительных) процессах: биосинтезе жирных кислот, холестерина, нуклеотидов, а также в системе антиоксидантной защиты (регенерации глутатиона).

Частично ниацин может синтезироваться в организме из незаменимой аминокислоты триптофана (приблизительно 60 мг триптофана дают 1 мг ниацина). Однако этого синтеза недостаточно для покрытия физиологических потребностей, поэтому ниацин является витамином и должен поступать с пищей.

4.4. Пищевые источники, биодоступность и физиологическая потребность

Основными пищевыми источниками рибофлавина являются печень, мясо (особенно птица), рыба (тунец, лосось) и пивные дрожжи. Хорошими источниками также служат цельные злаки, бобовые, орехи (арахис, семена подсолнечника), грибы и зеленые овощи. Кроме того, рибофлавином часто обогащают такие продукты, как мука, хлеб и сухие завтраки.

В таблице 3 представлены данные о содержании ниацина в некоторых продуктах питания.

Таблица 3 – Содержание витамина B_3 в продуктах

№/№	Наименование	Содержание (мг/100 г)
1	Дрожжи	50
2	Говядина	4,6
3	Курица	4,5-15
4	Баранина	4,5
5	Свинина	0,8-5,6
6	Тунец	13,3
7	Ячмень	3,1
8	Рис (неполированный)	4,7
9	Пшеничные отруби	8,6-33,4
10	Цельная пшеница	3,4-6,5
11	Арахис	17,2

Потребность в витамине B_3 для взрослых составляет 15-20 мг ниацинового эквивалента в сутки, где 1 эквивалент = 1 мг ниацина или 60 мг триптофана.

Степень усвоения ниацина (биодоступность) различается в зависимости от того, из каких продуктов он поступает в организм. В злаках (особенно в кукурузе) он присутствует в форме связанного ниацитина, который не усваивается. Традиционные методы обработки (щелочное замачивание кукурузы в известковой воде при приготовлении тортиль, выпечка с применением щелочных разрыхлителей) высвобождают связанный ниацин, что объясняет низкую распространённость пеллагры в регионах с такими традициями (например, в Мексике).

4.5. Нарушения обмена: гипо- и гипервитаминоз

Гиповитаминоз (А-гиповитаминоз, пеллагра) развивается при длительном дефиците ниацина и триптофана. Проявления включают три основных симптома: дерматит - симметричные фотодерматиты на открытых участках кожи; диарея - поражение слизистых

оболочек желудочно-кишечного тракта, сопровождающееся глосситом («малиновый» язык); деменция - неврологические и психические расстройства, такие как апатия и дезориентация.

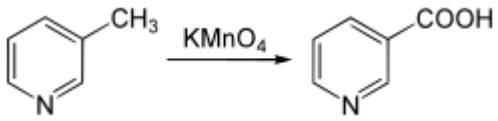
Гипервитаминоз. Для природных форм ниацина в пище гипервитаминоз не характерен. Побочные эффекты (гиперемия кожи, зуд, диспепсия, риск гепатотоксичности) возникают при приёме фармакологических доз (>1 г/сут) никотиновой кислоты в виде лекарственного средства для коррекции липидного профиля (снижение ЛПНП, повышение ЛПВП). Никотинамид такими эффектами не обладает.

4.6. Биотехнологическое производство: от химического синтеза к биокатализу

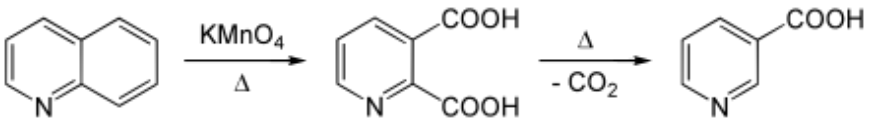
Промышленное получение ниацина является наглядным примером перехода от химического синтеза к биотехнологическому, то есть к применению более экологичных и селективных методов.

Химический синтез (традиционный метод). Основной процесс – это жидкофазный гидролиз 3-цианопиридина в присутствии сильных щелочей или кислот при высокой температуре и давлении. 3-Цианопиридин синтезируют газофазным аммонолизом 3-метилпиридина. Метод высокопроизводителен, но энергозатратен, требует использования коррозионных реагентов и сложной очистки от побочных продуктов.

Как лабораторные, так и промышленные методы синтеза никотиновой кислоты основаны на окислении производных пиридина. Так, никотиновая кислота может быть синтезирована окислением β-пиколина (3-метилпиридина):



либо окислением хинолина до пиридин-2,3-дикарбоновой кислоты с последующим её декарбоксилированием:



Аналогично никотиновая кислота синтезируется декарбоксилированием пиридин-2,5-дикарбоновой кислоты, получаемой окислением 2-метил-5-этилпиридина. Сама никотиновая кислота декарбоксилируется при температурах выше 260^0C.

Никотиновая кислота образует соли с кислотами и основаниями, никотинаты серебра и меди (II) нерастворимы в воде, на осаждении никотината меди из раствора основан гравиметрический метод определения никотиновой кислоты.

Ферментативный биокатализ (современная биотехнология) — это направленная альтернатива, основанная на использовании высокоспецифичных микробных ферментов. Процесс с использованием нитрилазы (EC 3.5.5.1): фермент нитрилаза катализирует прямой гидролиз связи C≡N в 3-цианопиридине до никотиновой кислоты без образования промежуточного амида. Промышленные штаммы-продуценты (например, *Rhodococcus rhodochrous* J1, *Pseudomonas fluorescens*) иммобилизуют на носителях и используют в биореакторах периодического или непрерывного действия. Преимущества данного метода состоят в высокой селективности (>99%), более мягких условиях (30-40^0C, атмосферное давление, pH 7-8), отсутствии токсичных отходов.

Процесс с использованием нитрилгидратазы (EC 4.2.1.84): данный фермент гидратирует нитрил до амида. При его применении 3-цианопиридин сначала превращается в никотинамид, который затем может быть гидролизован до кислоты. Этот двухстадийный процесс менее селективен для целевой кислоты.

Микробиологический синтез de novo: перспективное направление – создание микробных клеточных фабрик для прямого биосинтеза ниацина из дешевых субстратов

(глюкозы, глицерина). Методами метаболического инжиниринга у микроорганизмов (например, у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* или бактерий *Bacillus subtilis*) усиливают поток углерода по пути синтеза хинолиновой кислоты – ключевого предшественника ниацина. Задачи включают: повышение экспрессии генов *nadA, nadB, nadC*; блокирование конкурентных ветвей метаболизма; усиление регенерации кофакторов. Пока эта стратегия уступает по экономической эффективности биокатализу, но активно развивается.

Особая роль в синтезе витамина B_3 принадлежит микробиоте кишечника - симбиотические бактерии (*Bifidobacterium spp., Bacteroides spp., Clostridium spp., Prevotella copri*) обладают полным ферментативным аппаратом для синтеза ниацина из триптофана через кинурениновый путь. Этот микробный пул является дополнительным эндогенным источником витамина для макроорганизма, что открывает перспективы для разработки пробиотиков, направленных на коррекцию витаминного статуса.

4.7. Промышленное и медицинское применение

На сегодняшний день можно выделить следующие основные направления практического применения витамина B_3:

Фармацевтическая промышленность:

- никотинамид может применяться для лечения и профилактики пеллагры, в составе поливитаминных комплексов;
- никотиновая кислота (в высоких дозах) – гиполипидемическое лекарственное средство пролонгированного действия для снижения уровня триглицеридов и холестерина;
- перспективные направления: нейропротекция (роль NAD^+ в репарации ДНК и функции сиртуинов), онкопревенция, терапия кожных заболеваний (акне, буллезный пемфигоид, фотодерматозы).

Пищевая промышленность:

- обязательное обогащение муки и хлебопродуктов ниацином (в форме никотинамида) для профилактики авитаминозов;
- пищевая добавка Е375 (никотиновая кислота) в ряде стран используется как стабилизатор цвета.

Косметическая промышленность: никотинамид – популярный активный ингредиент в средствах для ухода за кожей благодаря своим противовоспалительным, барьероукрепляющим свойствам, способности ингибировать трансфер меланосом и улучшать синтез керамидов.

Агробиотехнология: использование ниацина и его производных в качестве элиситоров для повышения устойчивости растений к abiotic stress.

4.8. Методы анализа и оценка статуса

Для оценки статуса ниацина в организме и контроля качества продукции используют:

1) Микробиологические методы с использованием тест-культур, чувствительных к ниацину (например, *Lactobacillus plantarum*).

2) Химические методы: наиболее распространён метод с использованием цианистого брома и сульфаниловой кислоты (образование окрашенного комплекса).

3) Физико-химические методы: ВЭЖХ с УФ- или масс-спектрометрическим детектированием – «золотой стандарт» для точного определения отдельных форм (никотиновой кислоты, никотинамида, никотинамидных коферментов).

4) Оценка нутритивного статуса: измерение экскреции основных метаболитов ниацина с мочой (N^1-метилникотинамид, 2-пиридон) или определение соотношения НАД/НАДФ в эритроцитах методом ВЭЖХ.

5) Ферментативные сенсоры: использование NAD(P)H-зависимых дегидрогеназ в сочетании с электрохимическими или оптическими датчиками для быстрого анализа в биологических жидкостях и на производстве.

Вопросы для самоконтроля

1. Дайте определение ниацину как биологически активному веществу. Какие две основные формы он принимает?
2. Какое заболевание напрямую связано с дефицитом ниацина в питании? Опишите его ключевые симптомы.
3. Назовите основные коферментные формы, в которые превращается ниацин в организме. В чем заключается их главная биохимическая функция?
4. Объясните, почему восстановленная форма кофермента НАД обозначается как $NADH + H^+$, а не $NADH_2$.
5. Перечислите не менее пяти пищевых источников ниацина, указав, в какой форме (NA или NAm) он преимущественно в них содержится.
6. Какова физическая основа (принцип) количественного определения активности дегидрогеназ, использующих НАД/НАДФ?
7. Почему диета, основанная исключительно на кукурузе, приводит к развитию пеллагры, несмотря на наличие в кукурузе ниацина?
8. Опишите роль триптофана как эндогенного предшественника ниацина. Почему этого синтеза недостаточно для покрытия потребностей организма?
9. В чем заключается ключевое различие в физиологическом действии никотиновой кислоты и никотинамида?
10. Объясните, почему ниацин в больших дозах обладает гиполипидемическим действием, и как это связано с его ролью как витамина.
11. Опишите два основных химико-технологических подхода к промышленному синтезу никотиновой кислоты.
12. Какой микроорганизм и какой фермент используются в биотехнологическом процессе получения никотиновой кислоты из 3-цианопиридина? В чем преимущество этого метода?
13. Какие группы кишечных бактерий способны к синтезу витамина B_3 и как они могут влиять на его доступность для хозяина?
14. Для каких целей ниацин и никотинамид применяются в фармацевтической промышленности (приведите не менее трех направлений)?
15. Каковы перспективы применения никотинамида в косметологии и дерматологии? На чем основан его механизм действия?
16. Проанализируйте историю открытия ниацина: как социально-экономические факторы (распространение кукурузы) повлияли на выявление новой нозологической формы и последующее обнаружение витамина?
17. Сравните биотехнологическое производство ниацина с производством другого водорастворимого витамина (например, рибофлавина или витамина С) по ключевым параметрам: тип продуцента, субстрат, метод выделения.
18. Критически оцените утверждение о том, что «регулярный приём никотиновой кислоты кратно увеличивает риск инсульта и инфаркта». Какие факторы (доза, форма витамина, группа пациентов) необходимо учитывать для корректной интерпретации таких данных?
19. Предложите схему аналитического контроля содержания ниацина в обогащенном пищевом продукте, используя знания о его химических и физических свойствах.
20. Обоснуйте, почему изучение ниацина является ярким примером междисциплинарного подхода, объединяющего историю медицины, биохимию, нутрициологию и промышленную биотехнологию.

Глава 5. Пантотеновая кислота (витаминB_5): от фактора роста до кофермента А

5.1. История открытия

Пантотеновая кислота (витамин B_5) получила своё название от греческого (др.-греч. πάντοθεν) *pántothen* — «повсюду» из-за чрезвычайно широкого её распространения. Витамин B_5, попадая в организм, превращается в пантетеин, который входит в состав кофермента А. Кофермент А (КоА) играет важную роль в процессах окисления и ацетилирования, это одно из немногих веществ в организме, участвующее в метаболизме и белков, и липидов, и углеводов. Пантотеновая кислота требуется для обмена жиров, углеводов, аминокислот, синтеза жизненно важных жирных кислот, холестерина, гистамина, ацетилхолина, гемоглобина. В то же время, название пантотеновой кислоты (слово *pantothen*), можно перевести с греческого языка как «отовсюду», так как некоторое количество пантотеновой кислоты содержится практически в любом пищевом продукте.

Пантотеновая кислота была открыта в 1933 году Роджером Дж. Уильямсом, который показал, что она необходима для роста дрожжей. Позже, в 1936 году, Эльведжем и Джукс определили её как фактор роста и антидерматита у цыплят. Уильямс назвал это соединение «пантотеновой кислотой», так как обнаружил, что оно присутствует почти в каждой пище, которую он изучал. В 1940 году он же определил и химическую структуру этого вещества. Фриц Липманн в 1953 году разделил Нобелевскую премию по физиологии или медицине с Хансом Адольфом Кребсом за открытие коэнзима А (в 1945 г.) и его значение в промежуточном метаболизме, как основного кофактора, участвующего в ряде метаболических реакций. В это же время было выяснено, что пантотеновая кислота является ключевым предшественником биосинтеза коэнзима А (CoA).

5.2. Химическое строение и формы

Естественной формой пантотеновой кислоты является D-изомер, который является пептидом пантоевой кислоты и β-аланина. Витамин играет важную роль в метаболизме, являясь неотъемлемой частью факторов ацилирования коэнзима А (CoA) и белка-носителя ацила (ACP) - именно в этих формах (Рис. 11) пантотеновая кислота необходима для нормального протекания метаболизма углеводов, аминокислот и жирных кислот.

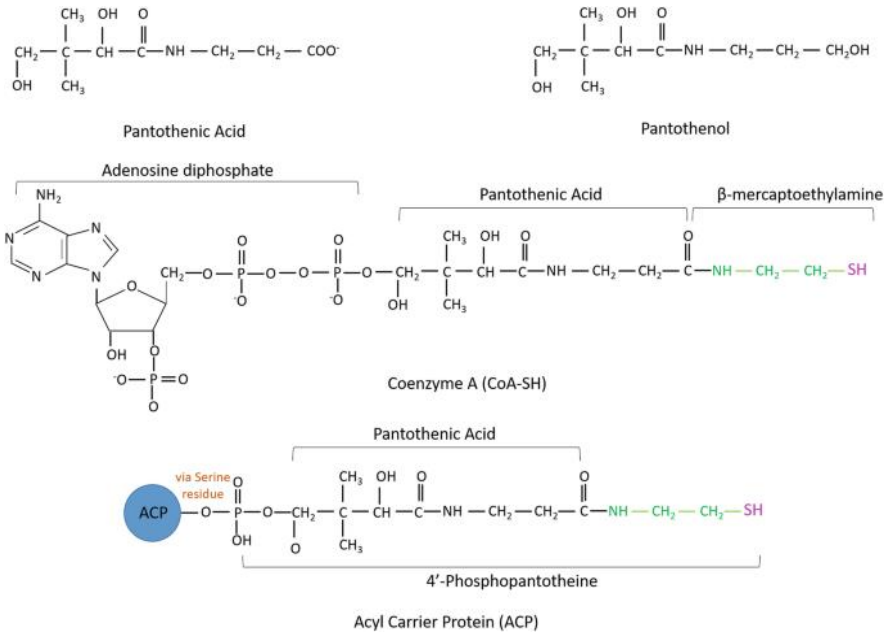


Рисунок 11. Структура пантотеновой кислоты, пантотенола, коэнзима А и белка-носителя ацила (ACP)

Коэнзим А состоит из гидроксильной группы пантотеновой кислоты, соединенной с модифицированной частью ADP с помощью фосфатной эфирной связи и карбоксильной группы, присоединенной к β-меркаптоэтиламину через амидную связь. Гидроксильная группа в положении 3' части ADP имеет фосфориловую группу, отсутствующую в свободном ADP. Реактивная -SH-группа меркаптоэтиламина образует тиоэфир с ацетатом в ацетилкоэнзиме А (ацетил-КоА).

Пантотеновая кислота является важным предшественником биосинтеза коэнзима А - значительного активатора жирных кислот и уксусной кислоты. Бактерии синтезируют пантотеновую кислоту из аминокислоты аспартата и предшественника аминокислоты валина. Аспартат преобразуется в β-аланин. Аминогруппа валина заменяется кето-группой для получения α-кетоизовалерата, который, в свою очередь, образует α-кетопантоат после переноса метиловой группы и D-пантоат (также известный как пантоевая кислота) после восстановления. Затем β-аланин и пантоевая кислота конденсируются с образованием пантотеновой кислоты.

5.3. Биологическая роль витамина B_5

Пантотеновая кислота, или витамин B_5, является водорастворимым веществом, которое необходимо для различных метаболических функций в живых существах. Этот витамин играет решающую роль в энергетическом метаболизме животных и растений как предшественник коэнзима А (КоА), участвующего в синтезе жиров, холестерина и аминокислот (основная функция — перенос остатков карбоновых кислот в биохимических процессах). Преобразование пантотеновой кислоты в пантетеин и ее дальнейшее превращение в ацетил-КоА имеет важное значение для метаболизма жиров и углеводов.

Важнейшим свойством пантотеновой кислоты является её способность стимулировать производство гормонов надпочечников — глюкокортикоидов, что делает его мощным средством для лечения таких заболеваний как артрит, колит, аллергия и болезни сердца. Витамин B_5 играет важную роль в формировании антител, способствует усвоению других витаминов, а также принимает участие в синтезе нейромедиаторов.

Пантотеновая кислота участвует в метаболизме жирных кислот. Она нормализует липидный обмен и активирует окислительно-восстановительные процессы в организме. Витамин B_5 оказывает мощный репаративный эффект на слизистые. Также пантотеновая кислота стимулирует перистальтику кишечника, повышение же её дозы, наоборот, тормозит секреторную функцию желудка.

Пантотеновая кислота оказывает значительное гиполипидемическое действие, обусловленное, по-видимому, ингибированием биосинтеза основных классов липидов, формирующих в печени липопротеины низкой и очень низкой плотности.

Недостаток пантотеновой кислоты в организме животных приводит к нарушениям обмена веществ, на основе которых развиваются дерматиты, депигментация и потеря волос, шерсти или перьев, прекращение роста, истощение, изменения в надпочечниках и нервной системе, а также расстройства координации движений, функций сердца и почек, желудка, кишечника.

При недостатке в организме пантотеновой кислоты в желудке образуется избыток соляной кислоты, что может стать причиной развития язвенно-эрозийных заболеваний желудочно-кишечного тракта.

Причиной дефицита витамина B_5 могут быть малое содержание в пище белков, жиров, витамина С, витаминов всей группы В, заболевания тонкого кишечника с синдромом мальабсорбции, длительное применение многих антибиотиков и сульфаниламидов, а также препаратов на основе гопантеновой кислоты.

Симптомы гиповитаминоза B_5 - усталость, депрессия, расстройство сна, повышенная утомляемость, головные боли, тошнота, мышечные боли, жжение, покалывание, онемение пальцев ног, жгучие, мучительные боли в нижних конечностях, преимущественно по ночам, покраснение кожи стоп, диспепсические расстройства, язвы 12-перстной кишки.

При пантотеновой недостаточности снижается сопротивляемость организма к инфекции, из-за чего часто возникают острые респираторные заболевания.

5.4. Пищевые источники и факторы стабильности

Пантотеновая кислота широко распространена и в некоторой степени содержится почти во всех растительных и животных продуктах питания. Говядина, курица, мясо органов, обогащенные крупы, цельнозерновые, такие как овес, пшеница и коричневый рис, а также молочные продукты, такие как сыр, йогурт и молоко, являются лучшими источниками. Бобовые, такие как горох и чечевица, брокколи, грибы, сладкий картофель, авокадо и некоторые дрожжи, также содержат витамин B_5 (Табл. 4).

Таблица 4 - Содержание пантетоновой кислоты в продуктах питания

№/№	Содержание	мг/100 г
1	Говяжья печень	8,3
2	Куриная грудка	1,3
3	Тунец	1,2
4	Семена подсолнечника	2,4
5	Яйцо куриное	0,7
6	Молоко (2%)	0,9
7	Авокадо	1,0

Пантотеновая кислота в продуктах питания довольно устойчива к обычным методам приготовления и хранения. Однако она может быть неустойчива к экстремальной термической обработке и суровым щелочным или кислотным условиям. Свободная пантотеновая кислота химически нестабильна, поэтому ее аналог в виде спирта (провитамин пантенол) и пантотенат кальция чаще используются в фармакологических препаратах.

5.5. Всасывание, транспорт и тканевое распределение

Абсорбция пантотеновой кислоты в энтероцитах. В большинстве продуктов питания пантотеновая кислота встречается в виде CoA, фосфопантеина и белка-носителя ацила. Использование витамина в продуктах питания зависит от гидролитического переваривания белковых комплексов для высвобождения свободного витамина. И CoA, и ACP гидролизуются в просвете кишечника для высвобождения витамина в виде 4'-фосфопантеина, который дефосфорилируется с пантетеином. Далее он быстро превращается кишечной *пантетеиназой* в пантотеновую кислоту. Пантотеновая кислота поглощается в голодной кишке натрий-зависимым поливитаминным транспортером (SMVT), который является вторичным активным процессом. На высоких уровнях он также всасывается простой диффузией по всей тонкой кишке (Рис. 12).

Пантотеновая кислота транспортируется как в плазме, так и в эритроцитах. Плазма содержит витамин только в свободной кислотной форме, в то время как эритроциты воспринимают его пассивной диффузией. Красные кровяные клетки содержат пантотеновую кислоту, 4-'-фосфо-пантотеновую кислоту и пантотеин, но не содержат CoA, так как в них нет митохондрий. Пантотеновая кислота транспортируется в другие клетки в свободной кислотной форме с помощью котранспортера Na^+, по-видимому, тем же механизмом, который облегчает кишечную абсорбцию.

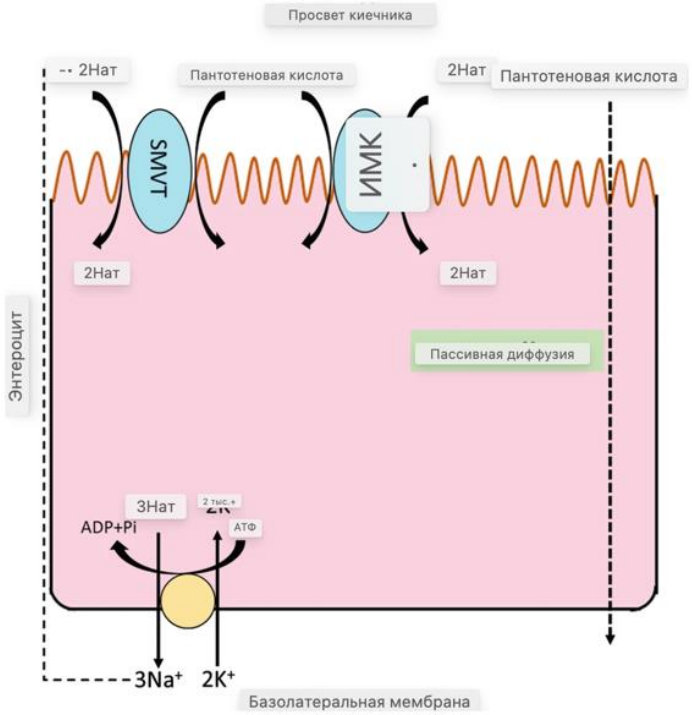


Рисунок 12. Схема всасывания и транспорта пантетоновой кислоты в энтероцитах

После поглощения в клетках большая часть витамина превращается в CoA, преобладающую внутриклеточную форму. Наибольшие концентрации CoA находятся в печени, надпочечниках, почках, мозге, сердце и яичках, большая часть которых находится в митохондриях (70% в печени и 95% в сердце).

5.6. Химический синтез и биотехнологическое производство

Развитие технологий синтеза витаминов можно обобщить в три этапа: химический синтез, химико-ферментативный катализ или ферментативный катализ, а также полностью биологический ферментационный синтез. Этап химического синтеза, при котором витамины синтезируются с помощью химических реакций, позволяет производить их в больших масштабах, но сопряжен с громоздкими стадиями реакций и серьезным загрязнением окружающей среды. Химико-ферментативный катализ использует высокую эффективность и селективность ферментов для катализа синтеза витаминов в мягких условиях, что значительно сокращает количество побочных продуктов и энергопотребление, но сталкивается с такими проблемами, как высокая стоимость ферментов и их низкая стабильность. Этап полностью биологического ферментационного синтеза подразумевает использование генетически и метаболически сконструированных микробных клеточных фабрик для производства витаминов из возобновляемых ресурсов, отличается устойчивостью и экологичностью, но требует дальнейшей оптимизации эффективности производства и контроля ферментационного процесса. В целом, технологии синтеза витаминов развиваются в направлении большей эффективности, экологичности и интеллектуализации.

Химический синтез витамина B_5 обычно проводится с использованием D-пантолактона и β-аланина в качестве непосредственных субстратов. D-пантолактон, один из основных предшественников синтеза витамина, синтезируется четырьмя химическими маршрутами: 1) метод изобутиральдегида с цианидом натрия; 2) метод изобутиральдегида с глиоксиловой кислотой; 3) метод изобутиральдегида с метионином; 4) метод изобутиральдегида с этилацетоацетатом и метилатом натрия. Например, в методе изобутиральдегида с цианидом натрия 1 моль изобутиральдегида и 1 моль формальдегида вступают в реакцию альдольной конденсации в щелочных условиях с образованием 3-гидрокси-2,2-диметилпропаналя, затем

добавляют NaCN или HCN с последующей реакцией гидролиза, подкисления и лактонизации, теоретически получая 1 моль D/L-пантолактона. Этот метод имеет широкую сырьевую базу, чистота и выход могут превышать 98%, но процесс сложен, сопряжен с использованием высокотоксичных реагентов и серьезным загрязнением. β-Аланин — другой предшественник синтеза VB5. Разработано несколько маршрутов химического синтеза β-аланина из различных исходных соединений (акрилонитрил, аминопропионитрил, акриловая кислота, этилен и щавелевая кислота и др.). Основной стадией является прямой синтез β-аланина из акрилонитрила. Эта стадия включает реакцию присоединения акрилонитрила с аммиаком с последующим гидролизом аминогруппы в карбоксильную в щелочных условиях с образованием β-аланината натрия и окончательным вытеснением ионов Na^+ с помощью HCl для получения β-аланина. Технология с использованием акрилонитрила характеризуется низкой стоимостью сырья и простотой процесса, но имеет недостатки: некоторые реагенты токсичны, требуется коррозионная стойкость оборудования из-за изменений кислотно-щелочных условий, много побочных продуктов, низкие выход и чистота.

Химический синтез витамина B_5 заключается в основном в растворении D-пантолактона и β-аланина в молярном соотношении 1:1 в метаноле, добавлении оксида или гидроксида кальция при высокой температуре, перемешивании для получения D-пантотената кальция через реакцию амидирования, после охлаждения до низкой температуры теоретически можно получить 1 моль D-пантотената кальция, но фактический выход составляет около 90%. Таким образом, снабжение предшественниками становится ограничивающим фактором химического синтеза. В целом, процесс химического синтеза пантотеновой кислоты хорошо отработан, но сложен, требует дорогостоящего разделения рацемических продуктов на энантиомеры, а некоторые реагенты серьезно загрязняют окружающую среду.

Ключевой предшественник витамина B_5, получаемый с помощью химического синтеза, — D/L-пантолактон — представляет собой смесь, требующую разделения на энантиомеры для последующего синтеза. При химическом синтезе первого поколения для разделения энантиомеров использовались дорогостоящие реагенты, что было сопряжено с высокими затратами. Использование ферментативного катализа для разделения энантиомеров D/L-пантолактона может усовершенствовать процесс синтеза и повысить конкурентоспособность продукции. В настоящее время производство D-пантолактона с помощью ферментативного катализа включает селективное разделение и асимметричное восстановление. По селективности гидролаз их можно разделить на L-пантолактонгидролазы и D-пантолактонгидролазы. L-Пантолактонгидролаза гидролизует D/L-пантолактон с образованием D-пантолактона и L-пантоевой кислоты, которая затем химически лактонизируется и рацемизуется обратно в D/L-пантолактон. Однако низкая эффективность гидролиза влияет на оптическую чистоту D-пантолактона, что указывает на необходимость поиска гидролаз с высокой каталитической активностью. Позже были идентифицированы D-пантолактонгидролазы, которые используются для получения D-пантолактона с высокой оптической чистотой. D-Пантолактонгидролаза селективно гидролизует D/L-пантолактон, образуя D-пантоевую кислоту, которая затем лактонизируется в D-пантолактон, а оставшийся L-пантолактон химически рацемизуется в D/L-пантолактон для повторного цикла разделения. Этот маршрут не зависит от стереоселективности гидролазы, дает продукт с высокой оптической чистотой, а негидролизованный L-пантолактон после перерацемизации может использоваться многократно, что имеет промышленную ценность. Кроме того, исследовалась возможность биологического асимметричного синтеза D-пантолактона из кетопантолактона с помощью сопряженных поликетонредуктаз. В этом маршруте L-пантолактондегидрогеназа сначала катализирует превращение L-пантолактона в кетопантолактон, который затем восстанавливается сопряженной поликетонредуктазой до D-пантолактона. Сопряженная поликетонредуктаза проявляет высокую каталитическую стереоселективность, эффективно повышая оптическую чистоту D-пантолактона. Несмотря на многочисленные преимущества, ферментативный катализ все еще сталкивается с проблемами с точки зрения экологичности.

Процесс ферментативного синтеза витаминов по-прежнему зависит от использования нефтехимического сырья и промежуточных продуктов, что в определенной степени ограничивает его экологическую устойчивость; кроме того, проблема переработки отходов и побочных продуктов, образующихся в процессе производства, также требует решения и представляет потенциальную угрозу для окружающей среды.

По мере усиления политики в области охраны окружающей среды, энергосбережения и сокращения выбросов, инвестиции витаминной промышленности в области энергосбережения и охраны окружающей среды значительно возросли, что способствовало развитию и широкому применению технологий синтеза витаминов третьего поколения — полностью биологического ферментационного синтеза — на основе ферментации биологического сырья. В основе технологий полностью биологического ферментационного синтеза лежит использование высокопродуктивных микробных штаммов для превращения возобновляемых ресурсов, таких как сахара и растительные масла, в витамины в ферментерах. Технология не только обеспечивает устойчивость производства, но и создает стабильные цепочки поставок сырья, эффективно сокращая выбросы вредных веществ, характерные для химических путей синтеза, и вносит положительный вклад в охрану окружающей среды. На примере витамина B_5: традиционный химический синтез включает трудноперерабатываемые вредные вещества, тогда как технология полностью биологического ферментационного синтеза, благодаря тщательно разработанной модификации путей и сконструированным штаммам *E. coli*, позволила получить высокопродуктивные штаммы для производства данного витамина, постепенно заменяя химический синтез. Производство витамина B_5 с использованием технологии полностью биологического ферментационного синтеза соответствует требованиям экологической безопасности в отношении контроля процессов, расхода сырья и энергии, что делает его привлекательным методом для промышленного применения. В настоящее время стратегии полностью биологического ферментационного синтеза витамина B_5 применяются на модельных штаммах, таких как *E. coli, Corynebacterium glutamicum, Bacillus subtilis, Saccharomyces cerevisiae*, причем *E. coli* стала предпочтительным штаммом для производства данного витамина благодаря ясному генетическому фону, большому арсеналу стратегий модификации и простоте контроля процесса, и производство уже доведено до промышленной стадии. Биосинтез витамина B_5 у *E. coli* вовлекает сложную регуляторную метаболическую сеть, включающую модули системы поглощения сахаров, основного пути синтеза, конкурентных побочных ветвей, транспортной системы и регуляции. В биосинтезе участвуют два основных метаболических модуля: модуль биосинтеза пантоевой кислоты и модуль биосинтеза β-аланина. На основе выделенных модулей было разработано множество стратегий конструирования штаммов для производства. Сначала использовались традиционные стратегии мутагенеза для получения штаммов, продуцирующих витамин B_5, но этот метод страдает из-за неясного генетического фона мутантов и генетической нестабильности. Затем была предложена стратегия перестройки пути биосинтеза и при периодическом культивировании с подкормкой в ферментационную среду добавляли β-аланин для получения более высокого выхода. Однако из-за относительно высокой стоимости сырья (β-аланина), что увеличивало затраты, также предпринимались попытки совместного культивирования двух сконструированных штаммов, продуцирующих D-пантоевую кислоту и β-аланин, для достижения более низкой себестоимости производства. Контролируя количество добавляемого β-аланина, удалось достичь эффективного производства витамина B_5 в ферментере, что указывает на важность балансировки метаболических потоков между модулями пантоевой кислоты и β-аланина. С развитием системной метаболической инженерии балансировка метаболических потоков между путями биосинтеза пантоевой кислоты и β-аланина с помощью новых инструментов редактирования и стратегий модификации будет перспективным методом создания эффективных штаммов для производства.

Благодаря своим увлажняющим свойствам пантотеновая кислота и ее производные, такие как пантенол, часто используются в средствах по уходу за кожей и косметических

средствах - кожа человека получает пользу от пантотеновой кислоты, полученной из пантенола, чтобы оставаться увлажненной.

Витамин B_5 используется в фармацевтическом секторе для целого ряда терапевтических применений. Хотя витамины играют решающую роль в адъювантной терапии инфекций, их полный спектр иммунорегуляторных эффектов не очень хорошо изучен. В ходе обширных исследований B_5 становится пионером не только в области ревматических расстройств и иммунологической модуляции, но и в заживлении ран, что потенциально имеет значительные терапевтические последствия для клинического лечения.

Пантотеновая кислота является жизненно важным компонентом питания животных, так как это компонент корма для животных, который способствует росту, размножению и общему здоровью скота.

Вопросы для самоконтроля

1. Каково происхождение названия «пантотеновая кислота», и кто открыл этот витамин?
2. За какое открытие Фриц Липманн получил Нобелевскую премию в 1953 году, и как это связано с пантотеновой кислотой?
3. Из каких двух основных компонентов состоит молекула пантотеновой кислоты? Какой изомер является естественной формой?
4. Назовите две основные активные формы, в которые превращается пантотеновая кислота в организме, и укажите, какая функциональная группа в коэнзиме А отвечает за перенос ацильных групп.
5. Из каких предшественников (исходных веществ) бактерии синтезируют пантотеновую кислоту? Назовите два ключевых метаболита.
6. В чем заключается основная биологическая роль коэнзима А (КоА) в обмене веществ? Почему КоА называют «универсальным переносчиком ацилов»?
7. Какое влияние оказывает пантотеновая кислота на гормоны надпочечников, и какие заболевания могут лечиться с её помощью?
8. Перечислите не менее четырех биохимических процессов или соединений, в синтезе которых участвует пантотеновая кислота.
9. Какое действие пантотеновая кислота оказывает на липидный обмен (гиполипидемическое действие) и на секреторную функцию желудка (при повышении дозы)?
10. Назовите не менее четырех причин, которые могут привести к дефициту пантотеновой кислоты в организме.
11. Перечислите основные неврологические и дерматологические симптомы гиповитаминоза B_5.
12. Как дефицит пантотеновой кислоты влияет на кислотность желудка и на риск развития заболеваний желудочно-кишечного тракта?
13. Почему при пантотеновой недостаточности снижается сопротивляемость организма к инфекциям?
14. Приведите примеры продуктов питания, являющихся лучшими источниками пантотеновой кислоты (назовите не менее 5 из разных групп).
15. Насколько устойчива пантотеновая кислота к кулинарной обработке? Какие условия (среда, температура) вызывают её разрушение?
16. Какие стабильные формы (аналоги) пантотеновой кислоты используются в фармакологических препаратах вместо свободной кислоты?
17. Опишите последовательность превращений, которые происходят с коэнзимом А и АЦП (белком-носителем ацила) в просвете кишечника для высвобождения свободной пантотеновой кислоты.
18. С помощью какого транспортера происходит всасывание пантотеновой кислоты в тонкой кишке? Какой ион обеспечивает этот транспорт (вторично-активный процесс)?

19. В каких органах наблюдаются наибольшие концентрации коэнзима А? В каких внутриклеточных органеллах он преимущественно локализуется (в печени и сердце)?

20. Назовите примеры микроорганизмов, используемых для биотехнологического производства пантотеновой кислоты, и примерную продуктивность (выход) для *E. Coli* или *B. subtilis*.

Глава 6. Витамин B_6: от истории открытия до биологической роли и применения

6.1. История открытия витамина B_6

Витамин B_6 был обнаружен как важное питательное вещество, ответственное за кожные заболевания. Рудольф Петерс в 1930-х годах продемонстрировал, что у молодых крыс, питающихся полусинтетической диетой без каких-либо других добавок, кроме тиамина и рибофлавина, развилась «крысиная акродиния», дерматологическое расстройство, характеризующееся тяжелыми язвами. Пол Дьёрдь продемонстрировал в 1934 году, что это было связано с дефицитом витамина B_6, и назвал его антидерматитным фактором. Также было показано, что дефицит витамина B_6 является причиной судорог у крыс, свиней и собак, а также микроцитарной анемии у некоторых животных. Позже, в 1938 году, Самуэль Лепковский выделил и кристаллизовал витамин B_6. Лесли Харрис, Карл Фолкерс и Ричард Кун выявили, что витамин B_6 является производным пиридина - 3-гидрокси-4,5-дигидрокси-метил-2-метил-пиридином, который позже Дьёрдьем был назван **пиридоксином**. В 1942 году Эсмонд Снелл провел микробиологический эксперимент, который привел к идентификации аминированного продукта пиридоксамина-пиридоксина и производного альдегида пиридоксала-пиридоксина.

6.2. Химическая структура и формы витамина B_6

Витамин B_6, или адермин - собирательное название производных 3-гидрокси-2-метилпиридинов, обладающих биологической активностью пиридоксина — собственно пиридоксин, пиридоксаль, пиридоксамин, а также их фосфаты, среди которых наиболее важен пиридоксальфосфат. Витамин B_6 - это водорастворимый органический компонент комплекса витамина В, который присутствует в трех естественных, родственных формах: **пиридоксол (Pn),** спирт, **пиридоксаль (Pal),** альдегид и **пиридоксамин (Pm),** амин. Все три витамина превращаются в биологически активный **пиридоксаль 5'-фосфат (PalP)** (Рис. 13), который действует как кофермент в ряде ферментных систем, особенно в тех, которые участвуют в метаболизме и модификации аминокислот. Из-за его структурного сходства с пиридином витамин был назван пиридоксином (3-гидрокси-4,5-бис(гидроксиметил)-2-метилпиридин). Пиридоксин, который содержится в различных продуктах питания, превращается в пиридоксаль in vivo и in vitro в условиях мягкого окисления.

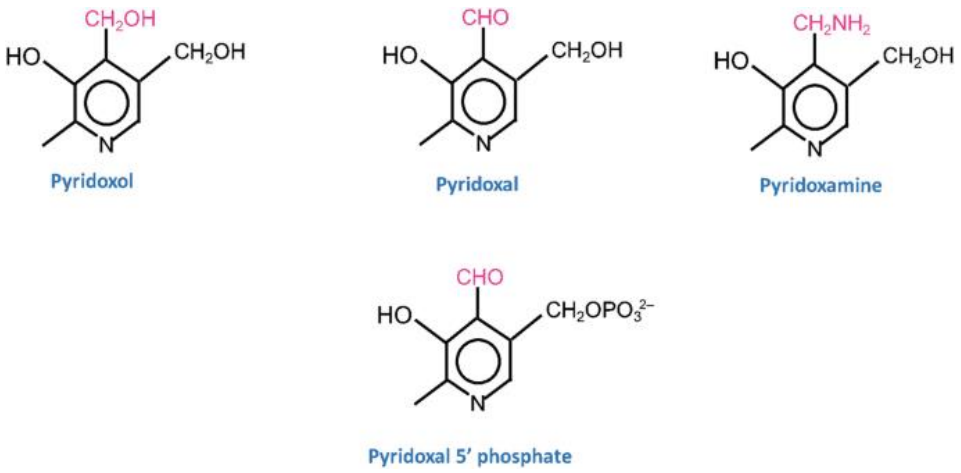


Рисунок 13. Химическая структура витамина B_6 и его форм

Витамин B_6 и его витамеры представляют собой бесцветные кристаллы, устойчивые как в сухом, так и в растворим виде при нормальной температуре. Они легкорастворимы в воде, в этаноле и хлороформе. Однако витамин B_6 является лабильным в нейтральных и

щелочных средах. Пиридоксол значительно более стабилен, чем пиридоксаль или пиридоксамин. Во время приготовления и обработки значительное количество витамина B_6, присутствующих в виде пиридоксаля и пиридоксамина, разрушается в продуктах животного происхождения, в то время как пиридоксол, присутствующий в продуктах растительного происхождения, сохраняется и обладает лучшей биодоступностью. Пиридоксин гидрохлорид обладает высокой стабильностью и используется в пищевых добавках и поливитаминных комплексах.

6.3. Биологическая роль и метаболизм в организме

Отличительной особенностью пиридоксаля и его производных является различие между биологически значимой активной формой витамина и той формой, которая способна проникать внутрь клеток. Фосфорилированные формы витамеров B_6 и пиридоксингликозид не абсорбируются в кишечнике, поэтому они подлежат дефосфорилированию кишечными фосфатазами (PDXP) и дегликозилированию гидролазами (PNGH/LPH). Для витамеров B_6 показана абсорбция в кишечнике посредством пассивной диффузии. Возможно, существует транспорт витамеров B_6 при помощи переносчиков тиамина (THTR), которые относятся к семействам SLC19A2 и SLC19A3 и функционируют в кислой среде тонкого кишечника или других тканях. Абсорбция витамина B_6 повышается при увеличении уровня транскрипции переносчиков (при дефиците пиридоксальфосфата), а также под действием протеинкиназы А. В свою очередь, при повышении внутриклеточного уровня цАМФ наблюдается значительное ингибирование абсорбции витамина B_6, которая также чувствительна к действию диуретика амилорида.

После абсорбции клетками тонкого кишечника витамеры B_6 рефосфорилируются соответствующими киназами (PDXK) и конвертируются в пиридоксальфосфат или с током крови доставляются в печень. В печени также происходит рефосфорилирование и конвертирование пиридоксинфосфата (PNP) и пиридоксаминфосфата (PMP) в пиридоксальфосфат (PLP) пиридоксин(амин)фосфатоксидазой (PNPO). Хотя данный процесс происходит в основном в печени, PNPO экспрессируется и во многих других тканях. Из печени через синусоидные капилляры PLP экспортируется в связанном состоянии с остатком лизина 190 альбумина. Если потребление витамеров B_6 превышает необходимый уровень, PLP дефосфорилируется пиридоксальфосфотазой (PDXP) и окисляется альдегидоксидазой (AOX) до пиридоксиновой кислоты (PA). Также, что за процесс окисления PL может отвечать альдегиддегидрогеназа (ALDH, EC 1.2.1.4) и пиридоксаль оксидаза (PO, EC 1.2.3.8). Пиридоксиновая кислота выводится из организма с мочой, что составляет более 90% всего экскретируемого витамина B_6. Проникновение через клеточную мембрану большинства тканей осуществляется путем пассивной диффузии, исключением является проникновение через мембрану митохондрий и эритроцитов, после дефосфорилирования тканенеспецифичными алкалинфосфатазами (ALP) – эктоферментами, пришитыми к клеточным мембранам гликофосфатидилинозитолом (фосфоглицеридными якорями, GPI Anchors – glycosylphosphatidylinositol anchors). Возможно, PL проходит через гематоэнцефалический барьер посредством облегченной диффузии с использованием переносчика и «депонируется» внутри клеток мозга или сосудистого сплетения (CP) путем фосфорилирования PDXK. Помимо печени, сосудистое сплетение является единственным органом, способным быстро мобилизовать PLP, что объясняет его высокую долю в цереброспинальной жидкости (CSF) относительно общего количества в организме, которая у человека составляет 38%. Возможное участие переносчиков в процессе транспорта PL внутрь митохондрий, эритроцитов или через гематоэнцефалический барьер у человека, хотя соответствующие белки и кодирующие их синтез гены еще не определены. Тем не менее, у дрожжей за транспорт пиридоксина через цитоплазматическую мембрану отвечает белок Tpn1, входящий в семейство пурин-цитозиновых пермеаз, а белок Mtm1p отвечает за транспорт PLP в митохондрии. В некоторых клетках, помимо печени, возможен катаболизм

PLP до пиридоксаминфосфата под действием аминотрансферазы (АТ), и последующий обратный процесс под действием PNPO, так называемый реутилизационный путь.

В клеточном гомеостазе пиридоксальфосфата играет роль связывающий его белок PROSC, нарушение функций которого приводит к накоплению пиридоксинфосфата внутри клеток. Внутри митохондрий PLP тоже присутствует в связанной с белками форме: E-PLP – enzyme bound PLP, E-PMP – enzyme bound PMP, куда он поступает посредством переносчика митохондриальной мембраны (MMT) SLC25A39/40. Следует отметить пространственное распределение процессов превращения и транспорта витамеров в тканях. В большинстве случаев для переноса дефосфорилированной формы витамина B_6 нет особого переносчика. Это безусловно делает весьма перспективным использование данного кофермента в качестве активного компонента лекарственной формы. Основные пути транспорта и метаболических превращений витамеров B_6 показаны на рисунке 14.

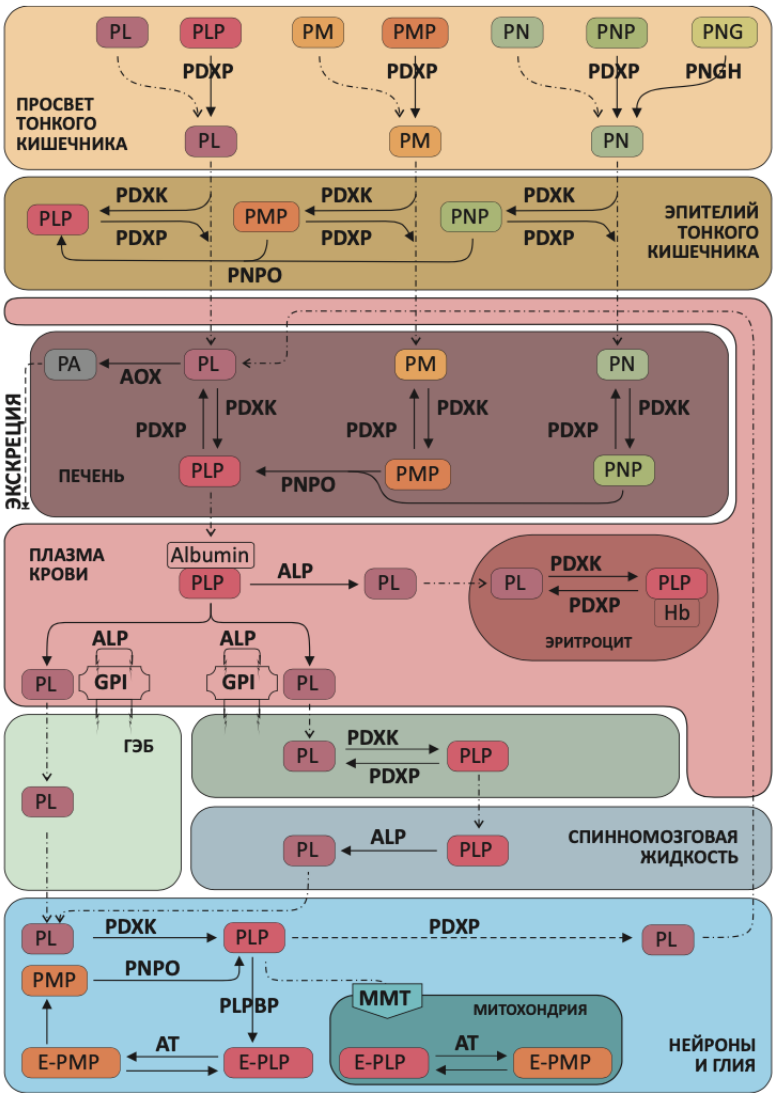


Рисунок 14 – Основные пути транспорта витамеров B_6

При этом альдегидная группа пиридоксальфосфата и ε-аминогруппа остатка лизина в активном сайте фермента формируют основание Шиффа. Такое состояние носит название внутреннего альдимина. Связывание субстрата с ферментом приводит к замещению ε-аминогруппы остатка лизина аминогруппой субстрата, процесс называется трансальдиминацией, а продукт носит название субстракт-PLP. Это состояние называется внешним альдимином. Состояние, формирующееся после разрыва одной из трех связей α-углеродного атома субстрата, является переходным и называется хиноноид. Отрыв протона

H+ от α-углеродного атома субстрата соответствует реакциям трансаминации, β-элиминации или рацемизации, отрыв карбоксильной группы COO^- – декарбоксилированию, а отрыв боковой цепи R – ретроальдольному гидролизу (расщеплению). В ходе реакций PLP выступает в роли акцептора электронов, стабилизируя карбанион. Стабилизация возможна благодаря перераспределению трицательного заряда внутри системы π-связей, образованной основанием Шиффа и пиридиновым кольцом PLP. При этом необходимо, чтобы соответствующая связь была расположена перпендикулярно пиридиновому кольцу PLP, а соответствующие p-орбитали были параллельны. Это дает возможность отрицательному заряду α-углеродного атома субстрата наиболее оптимально стабилизироваться внутри системы π-связей. Наряду с указанными выше свойствами можно отметить участие PLP в системе антиоксидантной защиты. Кроме того, альдегидный витамер B_6 необходим для обеспечения синтеза глутатиона, поскольку PLP-зависимые ферменты синтезируют около 50% цистеина, одного из составных компонентов этого важнейшего антиоксиданта.

6.4. Источники витамина B_6

Витамин B_6 естественным образом содержится в молоке, яйцах, индейке, свинине, тунце, лососе, семенах подсолнечника и льна, коричневом рисе, овсе, чечевице, банане, авокадо, картофеле и шпинате (Табл. 5).

Таблица 5 - Содержание витамина B_6 в продуктах питания

№/№	Содержание	мг/100 г
1	Цельная пшеница	1,3
2	Грецкие орехи	0,58
3	Лосось	0,28-0,83
4	Свинина	0,28-0,74
5	Тунец	0,53
6	Курица	0,25-0,52
7	Картофель	0,3
8	Кукурузная мука	0,3

В зерновых крупах витамин в основном присутствует в алейроновом слое. Кишечная микробиота также синтезирует некоторое количество витамина, но большая его часть используется для собственного метаболизма и недоступна для человека-хозяина. Витамин B_6 в растительных тканях в основном состоит из пиридоксина, в то время как животные ткани в основном имеют пиридоксаль и пиридоксамин. Большая часть витамина B_6 во многих продуктах питания фосфорилируется или связывается с белками через ε-аминогруппы лизиловых остатков или сульфгидриловые группы цистеиниловых остатков. Он также может быть гликозилирован до 5'-*O*-(β-D-глюкопиранозила).

6.5. Всасывание, дефицит и избыток витамина B_6

Потребление витамина B_6 может варьироваться в зависимости от возраста пациентов. Недавнее клиническое исследование количественного содержания витамеров B_6 в крови при приеме внутрь показало, что в старшей возрастной группе (70,1+2,7 лет, 10 мужчин и 10 женщин) наблюдается сниженный уровень пиридоксина и пиридоксальфосфата в плазме крови, но повышенный уровень пиридоксиновой кислоты, по сравнению с данными младшей возрастной группы (24,2+2,8 года, 10 мужчин и 10 женщин). Общее количество принятых витамеров B_6 соответствовало рекомендованной Медицинской школой Гарварда суточной потребности: 1,3 мг для обоих полов в младшей возрастной группе; 1,5 мг и 1,7 мг для женщин и мужчин, соответственно, в старшей возрастной группе. Время максимальной концентрации пиридоксаля в плазме крови после приема витамина B_6 в форме пиридоксина гидрохлорида в фармакокинетических исследованиях составляет 1 ч, в то время как для пиридоксальфосфата

время максимальной концентрации достигает 10 ч, и отражает время, необходимое для метаболизма пиридоксаля клетками печени. От 40% до 60% всего потребляемого витамина B_6 экскретируется с мочой. По данным клинического исследования у младшей возрастной группы наблюдается большая экскреция пиридоксина с мочой по сравнению со старшей, после единичного приема витаминно-минерального комплекса и завтрака. При этом заметной разницы в уровне экскреции с мочой других витамеров B_6 у данных возрастных групп не наблюдается. Что указывает на большую биологическую доступность пиридоксина для людей старшей возрастной группы.

Дефицит только лишь витамина B_6 встречается редко в развивающихся странах, хотя низкий уровень циркулирующего в крови PLP отмечается при применении оральных контрацептивов и некоторых других лекарственных средств, при курении и алкоголизме, целиакии и диабете. Несмотря на пониженную биодоступность растительных витамеров B_6 (преобладание пиридоксингликозида) относительно витамеров из животной пищи, у лиц, придерживающихся вегетарианства, дефицит данного витамина не наблюдается. С биохимической точки зрения, витамины группы В имеют четкую взаимосвязь, играя значительную роль в ключевых метаболических путях человеческого организма. Сочетанный с другими витаминами дефицит B_6 имеет и другие клинические проявления. Например, проявление пеллагры обычно вызвано дефицитом пиридоксина, ниацина и рибофлавина. Клинические и/или биохимические проявления нарушений метаболизма витамина B_6 характеризуются ингибированием функций PLP-зависимых ферментов, и могут быть зафиксированы при измерении уровней концентрации соответствующих метаболитов в плазме крови, моче или спинномозговой жидкости. PLP связан с метаболизмом нейромедиаторов и состоянием ЦНС. Изменение взаимного превращения ГАМК, глицина и глутаминовой кислоты может приводить к дисбалансу процессов возбуждения и торможения в нейронах. При этом процесс синтеза PLP является ATP-зависимым, что, в свою очередь, требует энергетических затрат и активации митохондриального окислительного фосфорилирования в нейронах и астроцитах. Увеличение содержания PLP, активирующее глициндегидрогеназу, которая является частью системы расщепления глицина, что приведет к его снижению в плазме и спинномозговой жидкости и, возможно, повлияет на микроциркуляцию и снабжение нервной ткани ключевыми метаболитами, в частности глюкозой.

Витамин B_6 может вступать во взаимодействие с рядом лекарственных средств, что необходимо учитывать в клинической практике. Так, длительный прием некоторых лекарственных препаратов, например противотуберкулезных и противосудорожных средств, переводят витамин B_6 в неактивную форму. Изониазид и гидралазин образуют с пиридоксалем гидразоны, что приводит к выведению витамина из организма и может вызвать дефицит, сопровождающийся периферической нейропатией. Поэтому пациентам, получающим изониазид, часто назначают дополнительный прием пиридоксина в дозе 10–50 мг/сут. Фенобарбитал, фенитоин и вальпроевая кислота могут ускорять метаболизм витамина B6 и снижать его уровень в плазме, что потенциально влияет на контроль судорожной активности. Эстрогены, входящие в состав оральных контрацептивов, повышают активность триптофан-2,3-диоксигеназы, что может приводить к относительному дефициту витамина B_6 и изменению метаболизма триптофана. Пиридоксин усиливает периферическое декарбоксилирование леводопы, снижая ее доставку в головной мозг. У пациентов с болезнью Паркинсона, получающих леводопу без ингибитора декарбоксилазы, добавки витамина B_6 противопоказаны. При комбинированной терапии с карбидопой это взаимодействие нивелируется.

Гипервитаминоз (избыток витамина) B_6 может быть вызван врожденным наследственным заболеванием гипофосфатазией. Проявлениями болезни являются аномалии скелета и зубов из-за нарушения минерализации костной ткани, в лабораторных анализах определяются низкие уровни фермента щелочной фосфатазы.

Гипервитаминоз может возникать из-за приема больших доз витаминных препаратов. Признаками избытка витамина могут быть: ощущение слабости и нарушение чувствительности в ногах и руках, неловкость движений (из-за поражения периферических нервов).

6.6. Микробиота и продукция витамина B_6

Витамин B_6 в основном люди получают, сохраняя диету за счет нормальной кишечной микробиоты. Некоторые бактерии, которые могут производить витамин B_6, - это *Bifidobacterium longum* и *Collinsella aerofaciens, H. pylori*, *B. Fragilis* и *P. copri*. Производство PLP кишечной флоры использует путь, зависящий от дезоксиксилулозы-5-фосфата (DXP), а производство PNP использует путь без DXP. Кроме того, pH просвета кишечника напрямую связан с расщеплением пиридоксина, что является важным процессом для его абсорбции. Изменения в количестве определенных бактерий, продуцирующих молочную кислоту, таких как *Enterococcus, Bifidobacterium, Lactobacillus* и *Streptococcus,* могут снизить pH, тем самым влияя на усвоение этого витамина. Некоторые виды микробиоты, включая *Veillonella, Faecalibacterium, Ruminococcus* и *Lactobacillus* spp., неспособны биосинтезировать витамин B_6, и поэтому они получают экзогенный витамин B_6 из желудочно-кишечного тракта.

6.7. Биотехнологические способы производства витамина B_6

Химическая структура молекулы B_6 открывает перспективу многих путей синтеза этого витамина. Наиболее эффективным, казалось, должен быть путь синтеза через производные пиридина (2-метил-5-этилпиридин или β-пиколин). Однако, введение заместителей в пиридиновый цикл (кроме β-положения) является весьма сложным и малодоступным в практическом плане. В промышленности чаще используются два принципиально различающихся метода – метод С. Харриса и оксазоловый метод, разработанные в Институте органической химии им. Зелинского. Другие методы, например из фурановых соединений, имеют меньшее значение. При использовании метода С. Харриса исходят из метоксиацетилацетона и цианацетамида; в оксазоловом – из этилового эфира N-формил-D,L-α-аланина, который подвергают внутримолекулярной циклизации в присутствии P_2O_5 в хлороформе. Полученный 4-метил-5-этоксиоксазол вводят в конденсацию с различными диенофилами. Получающиеся продукты при гидролизе в присутствии концентрированной соляной кислоты дают производные пиридоксина и далее пиридоксин. Однако, исходные оксазолы малодоступны, технология этого метода разработана недостаточно, поэтому метод пока что не нашел широкого промышленного применения. Третий метод синтеза – из фурановых соединений – заслуживает пристального внимания, в последние годы появились работы, направленные на разработку и усовершенствование этого метода. Однако, промышленное производство по этому методу не организовано. Наиболее разработанным и осуществленным в отечественной промышленности является метод синтеза пиридоксина из алифатических фрагментов, предложенный С. Харрисом и Фолькерсом и значительно усовершенствованный в дальнейшем. Основное преимущество метода – доступность исходного сырья и разработанность технологии – сделали его основным промышленным методом производства пиридоксина гидрохлорида. Метод нашел применение во многих странах, в том числе и в отечественной промышленности.

Биотехнологическая промышленность и научные круги предприняли несколько попыток генерировать микроорганизмы для производства витамина B_6 с помощью классического мутагенеза и генной инженерии. До сих пор ни одна из попыток не оказалась достаточно перспективной для создания эффективного процесса ферментации. Тем не менее, с промышленной стороны все еще существует значительный интерес к переходу от процессов химического синтеза к экологически устойчивым технологиям ферментации.

Витамин B_6 является важным питательным веществом, который широко используется в пищевых продуктах, кормовых добавках, фармацевтических препаратах, диагностике

заболеваний и других областях. Пиридоксаль-5-фосфат (PLP), активная форма витамина B_6, является важным коэнзимом, участвующим в различных ферментных реакциях.

6.8. Методы оценки уровня витамина в организме

Токсичность витамина B_6 встречается редко и в основном влияет на периферическую нервную систему. Сообщалось об атаксии и потере контроля над мелкой моторикой, если потребление превышает 2 г/день. В случаях болезни Паркинсона витамин B_6 не следует вводить, так как он увеличивает превращение L-DOPA в дофамин, который не может пересечь гематоэнцефалический барьер, что еще больше усугубляет симптомы. В таких случаях может быть полезным введение ингибитора декарбоксилазы вместе с витамином B_6.

Некоторые из методов, используемых для оценки уровня витамина B_6, перечислены ниже:

- наиболее распространенным методом является проверка уровня витамина в крови. Методом, который регулярно используется, это измерение концентрации PalP в плазме или эритроцитах или общего уровня витамина B_6 в плазме с помощью HPLC. Уровень ≥30 нМ PalP в плазме считается нормальным. Тем не менее, значения зависят от степени физической активности, возраста, пола, беременности, курения и потребления алкоголя субъекта;
- уровень витамина B_6 или 4-пиридоксовой кислоты в моче также может дать оценку общего потребления витаминов. Около 50% поступившего витамина выводится из организма человека с мочой. Дефицит витамина B_6 показан, когда уровень 4-пиридоксовой кислоты составляет менее 128–680 нмоль на нмоль креатинина в моче;
- поскольку витамин B_6 участвует в качестве коэнзима в различных метаболических путях, пероральное потребление избытка более раннего метаболита может активировать этот путь. Концентрация в плазме или моче полученной таким образом молекулы может быть использована для оценки уровня витамина B_6. Например, повышенная ксантуреновая кислота, выделяемая с мочой после нагрузки триптофаном, свидетельствует о дефиците витамина B_6. Однако такие факторы, как беременность, эстрогены, глюкокортикоиды и т.д., могут активировать *триптофан-2,3-диоксигеназу*, что может увеличить выведение ксантуреновой кислоты. Аналогичным образом, потребление метионина может повысить уровень гомоцистеина в плазме.

Вопросы для самоконтроля

1. Какое дерматологическое расстройство, развивавшееся у крыс на полусинтетической диете, послужило отправной точкой для открытия витамина B_6, и кто связал это расстройство с дефицитом нового витамина?
2. Какие три основные природные формы витамина B_6 существуют, и какая из них является биологически активной коферментной формой?
3. Почему пиридоксин (пиридоксол) более стабилен при термической обработке продуктов по сравнению с пиридоксалем и пиридоксамином?
4. В каких органах происходит основное превращение витамина B_6 в его активные коферментные формы?
5. Назовите не менее трех ключевых метаболических процессов (обмен веществ), в которых пиридоксаль-5'-фосфат (PLP) выступает в роли кофактора.
6. Каким образом дефицит витамина B_6 связан с повышенным риском развития сердечно-сосудистых заболеваний (атеросклероза, инфаркта, инсульта)?
7. Каков механизм развития пиридоксин-зависимых судорог у новорожденных с генетическими нарушениями?
8. Перечислите не менее четырех групп риска или состояний, которые могут привести к развитию гиповитаминоза B_6.
9. Назовите основные неврологические и дерматологические симптомы, характерные для дефицита витамина B_6.

10. Объясните механизм взаимодействия изониазида (противотуберкулезный препарат) с витамином B_6. С какой целью пациентам, принимающим изониазид, назначают пиридоксин?

11. Почему при лечении болезни Паркинсона комбинация леводопы с витамином B_6 требует осторожности, а совместное применение с карбидопой нивелирует это взаимодействие?

12. Какие клинические проявления характерны для гипервитаминоза B_6 (избытка витамина) и какое наследственное заболевание может имитировать его симптомы?

13. Приведите примеры продуктов как растительного, так и животного происхождения, являющихся богатыми источниками витамина B_6.

14. Опишите, как происходит всасывание витамина B_6 в кишечнике. Какая роль в этом процессе принадлежит лактаза-флоризин гидролазе?

15. Как кишечная микробиота влияет на обеспеченность организма витамином B_6, и какие факторы могут нарушать этот процесс?

16. Назовите промышленные способы получения витамина B_6 (химический и биологический) и примеры микроорганизмов, используемых для биосинтеза.

17. В каких трех отраслях промышленности, помимо производства пищевых добавок, находит применение витамин B_6? Приведите конкретные примеры использования.

18. Какой лабораторный метод (с указанием биологической жидкости) является наиболее распространенным для оценки уровня витамина B_6 в организме, и какая концентрация пиридоксальфосфата в плазме считается нормальной?

19. В чем суть функционального теста с нагрузкой триптофаном для диагностики дефицита витамина B_6?

20. Как использование ингибиторов декарбоксилазы (например, карбидопы) влияет на взаимодействие между леводопой и витамином B_6?

Глава 7. Витамин B_7 (биотин): от фактора роста до кофермента карбоксилирования

7.1. История открытия

В 1901 году Юджин Вилдьес предположил, что для нормального роста дрожжей недостаточно только солей, сахара и источника азота. Он открыл органическое вспомогательное вещество, которое назвал «Bios» (от греч. *Bios* - «жизнь»). Позднее выяснилось, что «Bios» представляет собой смесь нескольких соединений, одним из которых оказался биотин. В 1927 году Маргарет Аверил Боас обнаружила, что у молодых крыс, получавших сушеный яичный белок в качестве единственного источника белка, развивались тяжелый дерматит, алопеция (облысение) и характерная «кенгурообразная» поза, обусловленная спастической походкой. Животные погибали в течение 4-6 недель. Это состояние было названо «травмой яичного белка». Она также установила, что добавление дрожжей или сырой печени (содержащих некий «защитный фактор X») предотвращает это расстройство. В 1933 году Франклин Эллисон**,** Сэм Гувер и Дин Берк выделили из яичных желтков вещество, необходимое для роста бактерий рода *Rhizobium*, и назвали его коэнзимом R. В 1936 году Фриц Кёгл и Бенно Тённис выделили кристаллическое вещество из вареных утиных яичных желтков и назвали его «биотином» (от греч. *bios*), полагая, что это один из компонентов фактора «Bios», открытого Вилдьесом.

В 1937 году американский диетолог и врач Пол Дьёрдь обнаружил, что вещество, предотвращающее патологические изменения у крыс и цыплят, получавших сырой яичный белок, отлично от ранее известных витаминов B_1 и B_2. Он назвал это соединение витамином H (от нем. *Haut* — «кожа») из-за его выраженного дерматопротекторного действия. Позже, при хронологической нумерации витаминов группы B, витамин H был переименован в витамин B_7.

К 1940 году Винсент дю Виньо доказал, что биотин и витамин H являются одним и тем же соединением, и выделил его из экстрактов печени и молока. Дю Виньо и его коллеги показали, что причиной «травмы яичного белка» является белок авидин**,** присутствующий в сыром яичном белке. Авидин обладает чрезвычайно высоким сродством к биотину, образуя с ним прочный комплекс, который не расщепляется пищеварительными ферментами. Это приводит к нарушению всасывания биотина в кишечнике и развитию дефицита B_7. Авидин был открыт Эсмондом Снеллом, который также разработал микробиологический метод количественного определения биотина. В 1942 году дю Виньо и соавторы опубликовали точную структурную формулу биотина. И уже в 1943 году Стэнтон Харрис и его коллеги из компании *Merck and Company* наладили промышленный синтез биотина.

Окончательное подтверждение пространственной структуры кристаллического биотина было достигнуто В. Траубом в 1956 году с помощью метода рентгеновской дифракции.

7.2. Химическая структура, коферментные формы и стабильность витамина B_7

Водорастворимый витамин B_7 или биотин является коэнзимом с кольцами уреидо и тетрагидротиофена и химически называется цис-гексагидро-2-оксо-1H-тиено[3,4-димидазол-4-пентановая] кислота. Карбоксильная группа биотина связывается с ε-аминогруппами пептидиллизиловых остатков с формиоцитином (ε-*N*-биотиниллизин) и функционирует как кофермент в реакциях карбоксилирования в различных метаболических процессах в организме (Рис. 15).

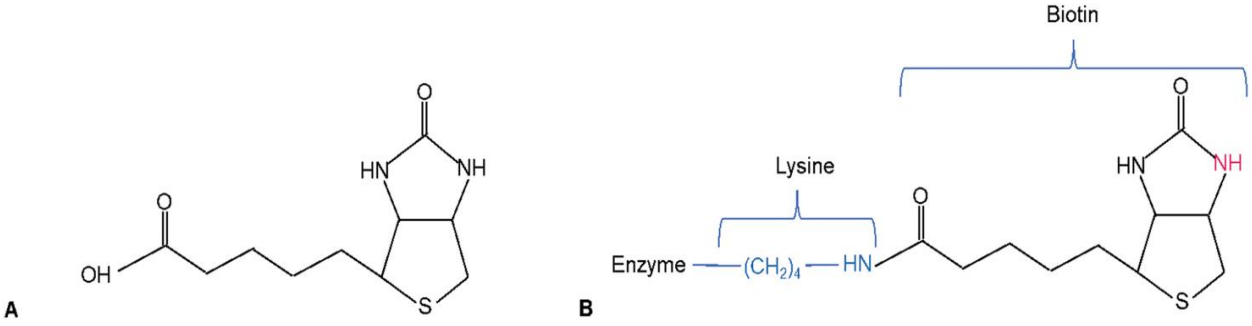


Рисунок 15. Структура витамина B_7 (биотина) (**A**). Структура биотина, связанного с ферментами, т.е. биоцитина (**B**).

Реактивным центром молекулы выступает атом N_1 уреидо-кольца. Именно этот атом азота участвует в обратимом переносе углекислого газа (CO_2) в реакциях карбоксилирования, катализируемых биотинзависимыми ферментами. Карбоксильная группа боковой цепи валериановой кислоты выполняет структурную функцию: она служит для ковалентного связывания биотина с ε-аминогруппой остатка лизина в активном центре фермента. Образующаяся амидная связь (биоцитинильная связь) прочно удерживает кофермент на ферменте, но непосредственно в переносе CO_2 эта карбоксильная группа не участвует.

Механизм переноса CO_2 включает три основных этапа. При активации биотина атом N_1 уреидо-кольца биотина выступает в роли нуклеофила и атакует молекулу углекислого газа. Реакция требует затраты энергии АТФ и катализируется ферментами семейства биотиновых карбоксилаз (например, ацетил-КоА-карбоксилазой, пропионил-КоА-карбоксилазой, пируваткарбоксилазой). Затем происходит образование карбоксибиотина. В результате присоединения CO_2 к атому N_1 образуется нестабильное высокоэнергетическое промежуточное соединение - N_1-карбоксибиотин (карбоксипроизводное биотина). В этом соединении углекислый газ активирован и готов к переносу на субстрат. При переносе карбоксильной группы на субстрат активированная карбоксильная группа с атома N_1 биотина переносится на молекулу субстрата (Рис. 15).

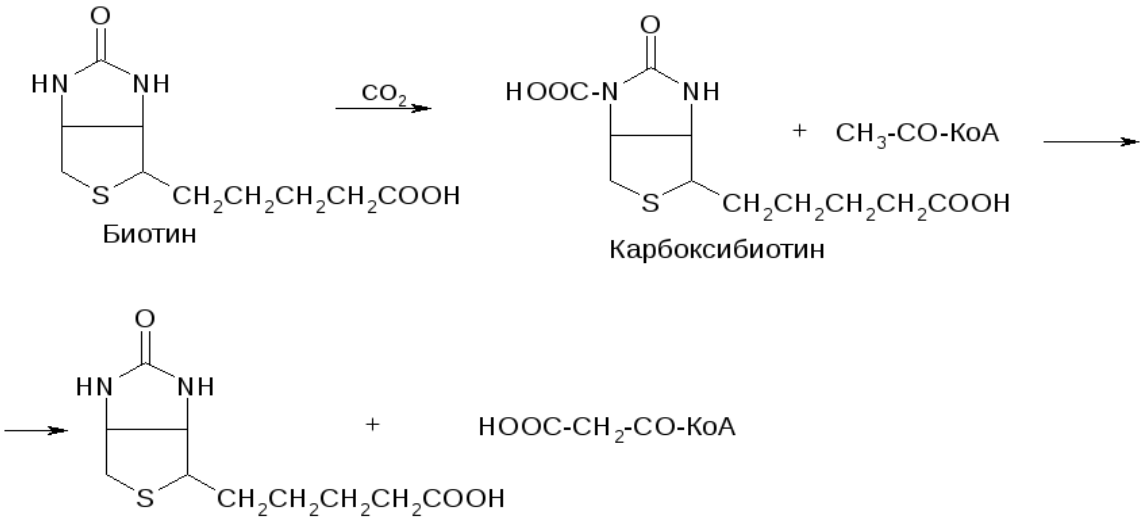


Рисунок 15. Механизм карбоксилирования биотина и переноса активированной карбоксильной группы на ацетил-КоА

Биотин является коферментом для четырех карбоксилаз у людей: пируваткарбоксилаза, которая преобразует пируват в оксалоацетат, начальный шаг глюконеогенеза; пропионил-КоА-карбоксилаза, которая катаболизирует несколько аминокислот с ветвью цепи и нечетные цепные жирные кислоты; β-метилкротонил-КоА карбоксилаза, которая участвует в катаболизме лейцина; и ацетил-КоА карбоксилаза, которая преобразует малонил-КоА в

ацетил-КоА, первый шаг в биосинтезе жирных кислот. Все четыре фермента находятся в митохондриях, хотя ацетил-КоА карбоксилаза в основном находится в цитозоле (Рис. 16).

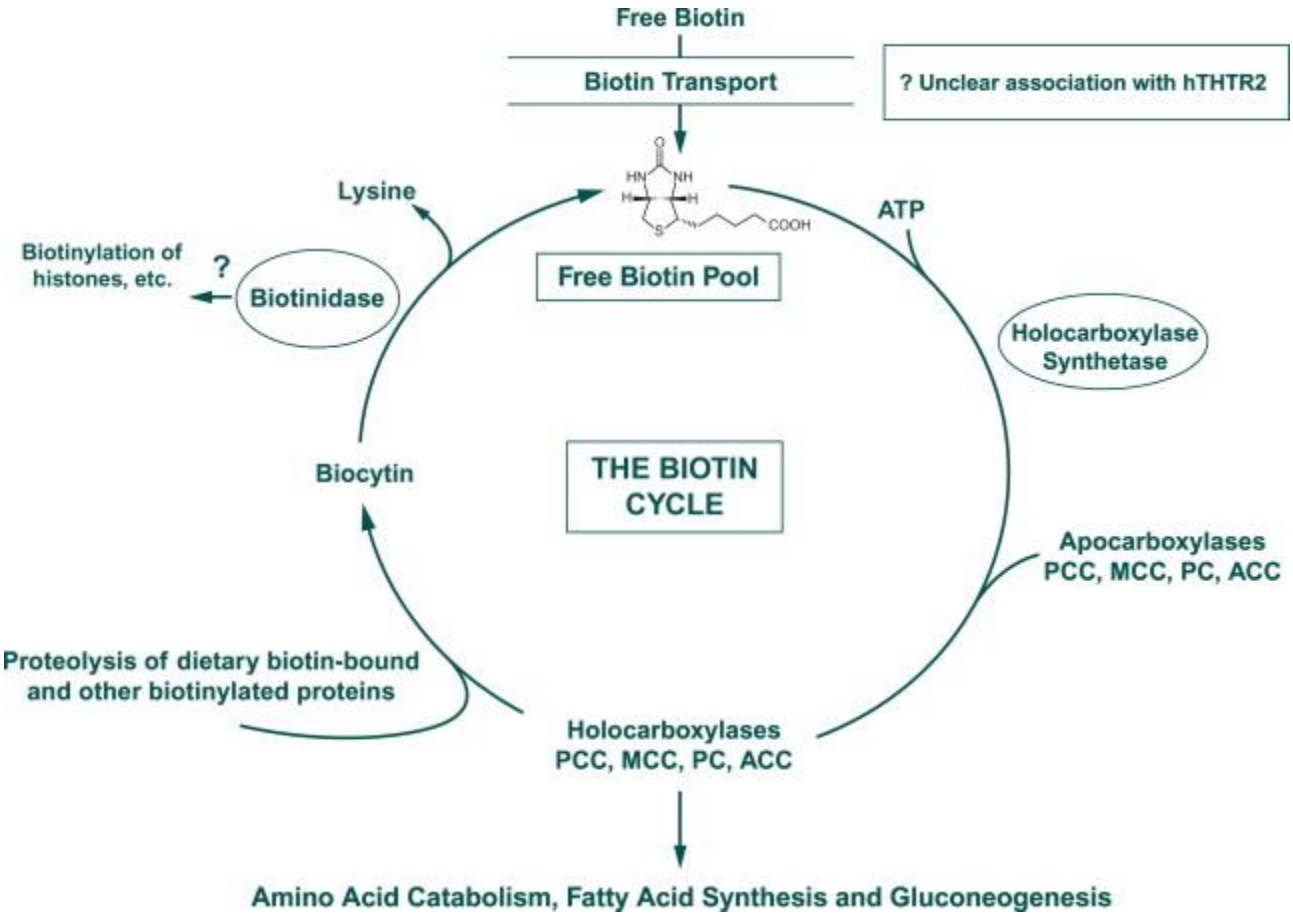


Рисунок 16 - Биотиновый цикл

Карбоксильная группа биотина ковалентно присоединяется через амидную связь к эпсилон-аминогруппе различных апокарбоксилаз, которые используют его в качестве кофермента HCS. Эта реакция происходит через две частичные реакции. Первый - это фосфорилирование биотина, требующее АТФ, в результате чего биотинил 5'-АМФ. Во второй частичной реакции этот промежуточный продукт АМФ реагирует с апокарбоксилазами, в результате чего образуются биотинилированные голоферменты. Один из азотов уреидо-части гетероциклического кольца (N-1) биотина участвует в переносе углекислого газа из различных субстратов в соответствующие карбоксилированные продукты. После протеолитической деградации голокарбоксилазы биоцитин (биотинил-ε-лизин) или биотинил-пептиды расщепляются в амидной связи ферментом, биотинидазой, высвобождая лизин или лизил-пептиды и свободный биотин; затем биотин может быть переработан.

Биотин в сухом состоянии стабилен при комнатной температуре и не разрушается при нагревании, но может разрушаться при длительном нагревании в кислой или щелочной средах. Методы пищевой промышленности, такие как экстракция растворителем, термоотверждение, консервирование и другие, могут способствовать перекисному окислению липидов и окислению биотина, делая его нестабильным. Использование антиоксидантов, таких как витамин С или Е, защищают биотин от окислительной деградации. Ультрафиолетовое облучение вызывает медленное разрушение.

7.3. Всасывание, транспорт, дефицит и безопасность

Всасывание биотина в тонкой кишке осуществляется двумя основными механизмами в зависимости от концентрации витамина. При низких физиологических концентрациях свободный биотин поглощается Na^+-зависимым поливитаминным транспортером (SMVT), который расположен на апикальной мембране щёточной каймы энтероцитов. Этот процесс является вторично-активным. При высоких фармакологических концентрациях биотин, а также биоцитин поглощаются в тощей кишке путём пассивной диффузии, которая не требует затрат энергии.

SMVT обладает широкой субстратной специфичностью. Помимо биотина, этот транспортер также опосредует всасывание других витаминов, в частности витамина B_5 (пантотеновой кислоты) и липоевой кислоты. Активность SMVT может подавляться некоторыми веществами. Ингибирующее действие оказывают алкоголь (этанол) и его метаболит ацетальдегид, что объясняет низкое всасывание биотина у лиц, злоупотребляющих алкоголем. Кроме того, противосудорожные препараты (например, вальпроевая кислота, фенитоин, карбамазепин) также ингибируют этот транспортер, что создаёт риск дефицита биотина у пациентов с эпилепсией, проходящих длительную противосудорожную терапию. После всасывания в энтероциты биотин транспортируется через базолатеральную мембрану в портальное кровообращение с участием другого Na^+-зависимого транспортера (вероятно, SMVT или его изоформы). В плазме крови биотин циркулирует преимущественно в свободной форме.

Дефицит биотина встречается редко, что обусловлено двумя основными факторами: широким распространением биотина в различных продуктах питания, а также способностью кишечной микробиоты синтезировать этот витамин, хотя точный вклад микробного синтеза в общую обеспеченность организма окончательно не установлен.

Среди причин дефицита биотина важнейшее место занимает потребление сырого яичного белка. Белок авидин, содержащийся в яичном белке, является антагонистом биотина: он связывает биотин в просвете кишечника, образуя прочный комплекс, устойчивый к действию пищеварительных протеаз, что делает витамин недоступным для всасывания. В результате у животных развиваются характерные симптомы: дерматит, тяжёлая потеря волос (алопеция), паралич задних конечностей, стеатоз печени (жировая дистрофия) и нарушение роста.

У людей дефицит биотина наблюдается в крайне редких случаях. Описаны случаи у младенцев, находящихся на полном парентеральном питании, когда витамин не поступает энтерально. Также дефицит может возникать у младенцев, если грудное молоко матери содержит недостаточное количество биотина. Клинические проявления у младенцев включают дерматит, гипотонию (снижение мышечного тонуса), конъюнктивит, судороги и частые кожные инфекции. Большинство из этих симптомов можно объяснить нарушением синтеза жирных кислот, поскольку ацетил-КоА-карбоксилаза - ключевой фермент липогенеза, который является биотинзависимым ферментом.

Пожилые люди, перенёсшие частичную гастрэктомию, находятся в группе риска по развитию маргинального (пограничного) дефицита биотина вследствие нарушения всасывания. У женщин во время беременности наблюдается повышенная экскреция биотиновых метаболитов с мочой, что также может приводить к маргинальному статусу биотина, при этом клинические симптомы часто отсутствуют. В таких случаях показано назначение биотиновых добавок.

Люди, страдающие алкоголизмом, также подвержены риску дефицита биотина. Это связано с двумя механизмами: во-первых, этанол ингибирует SMVT, снижая всасывание витамина; во-вторых, у лиц с алкогольной зависимостью часто наблюдается неполноценное питание. Длительная противосудорожная терапия, как уже упоминалось, также создаёт риск дефицита биотина из-за ингибирования SMVT противосудорожными препаратами.

Важно отметить, что в последнее время широкое распространение получила практика приёма биотиновых добавок с целью прекращения выпадения волос и укрепления ногтей. Однако для этих эффектов не установлено никаких научных оснований, и такая практика не имеет доказательной базы.

Что касается безопасности биотина, то не было зарегистрировано никаких случаев токсичности у людей даже при приёме высоких доз: до 200 мг при пероральном введении или до 20 мг при внутривенном введении. В связи с этим, до сих пор не установлен верхний допустимый уровень потребления для биотина. Витамин характеризуется исключительно низкой токсичностью даже при дозах, значительно превышающих физиологическую потребность, которая составляет около 30 мкг в сутки.

7.4. Пищевые источники биотина и его биодоступность

Одним из лучших природных источников биотина являются яичные желтки (только в сочетании с вареным яичным белком!). При варке яиц авидин из яичного белка денатурирует и теряет свою антивитаминную активность, поэтому термически обработанные яйца являются полноценным источником биотина (Табл. 6).

Печень, особенно говяжья, представляет собой органный мясной продукт с очень высоким содержанием биотина. Другие субпродукты (почки, сердце) также содержат значительные количества этого витамина. Рыба (лосось, тунец, сардины) и мясо (курица, свинина) являются умеренными источниками.

Среди орехов и семян хорошими поставщиками биотина являются семена подсолнечника, миндаль, арахис и грецкие орехи. Бобовые культуры, включая горох, бобы, соевые бобы, чечевицу и нут, содержат биотин в умеренных количествах. Из овощей источниками биотина служат помидоры, шпинат, брокколи, цветная капуста, сладкий картофель и грибы. Цельнозерновые продукты (овёс, пшеница, коричневый рис) и мука из масличных культур также вносят вклад в обеспечение организма биотином.

Сушёные дрожжи, мука из люцерны, а также некоторые виды ферментированных продуктов содержат биотин.

Таблица 6 – Содержание биотина в продуктах питания

№/№	Продукты	Содержание (мг/100 г)
1	Печень говяжья (варёная)	8,6
2	Яичный желток (вареный)	4,2
3	Яйцо куриное целое (вареное)	2,8
4	Дрожжи сушёные	2,2
5	Семена подсолнечника	1,1
6	Грецкие орехи	5,9
7	Соевые бобы (варёные)	5,6

Одно варёное яйцо (особенно желток) обеспечивает около 10 мкг биотина, а порция варёной говяжьей печени (100 г) может полностью покрыть суточную потребность. Вегетарианцам рекомендуется включать в рацион орехи, семена, бобовые и цельнозерновые продукты. Кроме того, до 5% от общей потребности в биотине может синтезироваться кишечной микробиотой, однако точный вклад этого источника в обеспечение организма окончательно не установлен.

Биодоступность биотина варьируется в зависимости от источника. Биотин из яичного желтка и печени усваивается хорошо. В растительных продуктах часть биотина может быть связана с белками или находиться в форме, менее доступной для всасывания. Ферментация (например, приготовление кисломолочных продуктов или хлеба на закваске) может повышать биодоступность биотина.

7.5. Методы оценки уровня биотина в организме

Оценка обеспеченности организма биотином может проводиться с использованием прямых и косвенных методов. Наиболее информативными являются определение специфических метаболитов в моче и оценка насыщения биотин-зависимых ферментов.

При умеренном дефиците биотина в моче повышаются уровни следующих метаболитов: 3-гидроксиизовалериновая кислота, 3-гидроксиизовалерилкарнитин и 3-метилкротонилглициновая кислота. Механизм повышения этих метаболитов связан со снижением активности биотин-зависимой β-метилкротонил-КоА-карбоксилазы. Этот фермент катализирует карбоксилирование β-метилкротонил-КоА, который является метаболитом аминокислоты лейцина, с образованием β-метилглутаконил-КоА. При дефиците биотина активность фермента падает, что приводит к накоплению β-метилкротонил-КоА. Избыток этого соединения затем метаболизируется в альтернативные продукты - 3-гидроксиизовалериновую кислоту, 3-гидроксиизовалерилкарнитин и 3-метилкротонилглициновую кислоту, которые выводятся с мочой. Таким образом, повышение концентрации этих метаболитов в моче служит чувствительным и специфичным маркёром умеренного дефицита биотина, причём это изменение может предшествовать появлению клинических симптомов.

Альтернативным методом оценки уровня биотина является определение степени насыщения биотин-зависимых ферментов коферментом. Для этого измеряют активность фермента до и после добавления биотина in vitro. Разница между этими показателями отражает степень дефицита витамина: если апофермент не полностью насыщен коферментом, добавление биотина приведёт к повышению ферментативной активности. Наиболее часто для этой цели используется пропионил-КоА-карбоксилаза (PCC), выделяемая из лимфоцитов периферической крови. Методика включает следующие этапы: сначала измеряют базальную активность фермента в лизате лимфоцитов, затем добавляют избыток биотина (в форме биоцитина или свободного биотина), после чего повторно измеряют активность фермента и рассчитывают коэффициент активации. Низкая базальная активность в сочетании с высокой активацией после добавления биотина указывает на недостаточную насыщенность апофермента коферментом, то есть на дефицит биотина в организме.

Каждый из описанных методов имеет свои преимущества и недостатки. Определение метаболитов в моче является неинвазивным, достаточно чувствительным и специфичным, однако требует сбора суточной мочи или нормализации показателей по концентрации креатинина. Оценка насыщения ферментов в лимфоцитах является функциональным тестом, который отражает реальную обеспеченность организма биотином на уровне коферментного статуса, но этот метод более сложен в выполнении и требует забора крови, что делает его инвазивным.

Помимо описанных двух основных подходов, для оценки статуса биотина могут использоваться и другие методы. К ним относятся прямое определение биотина в плазме крови с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) или конкурентных связывающих анализов, определение активности других биотин-зависимых карбоксилаз (таких как ацетил-КоА-карбоксилаза или пируваткарбоксилаза), а также оценка экскреции биотина и его метаболитов (биснорбиотина, биотина сульфоксида) с мочой. Однако эти методы используются реже, чем определение метаболитов лейцина и оценка насыщения пропионил-КоА-карбоксилазы в лимфоцитах.

Своевременная диагностика умеренного дефицита биотина важна для предотвращения развития клинически выраженных симптомов, таких как дерматит, алопеция, неврологические расстройства. Особое значение мониторинг статуса биотина имеет у групп риска: беременных женщин (у которых наблюдается повышенная экскреция биотиновых метаболитов), пациентов на длительной противосудорожной терапии, лиц с алкогольной зависимостью, а также у младенцев на парентеральном питании. У этих категорий пациентов регулярное

определение уровня метаболитов биотина в моче или оценка насыщения лимфоцитарной пропионил-КоА-карбоксилазы позволяет своевременно выявить дефицит и провести коррекцию.

7.6. Микробиота: продукция и потребление витамина B_7

Витамин B_7 может синтезироваться только бактериями, дрожжами и растениями. Животные и человек утратили способность к биосинтезу биотина, поэтому они зависят от поступления этого витамина с пищей и, частично, от продукции кишечной микробиотой. Микробиота толстой кишки человека вносит важный вклад в ежедневное обеспечение организма биотином в дополнение к диетическим источникам.

К числу бактерий, способных продуцировать витамин B_7, относятся *Prevotella copri*, *Bacteroides fragilis*, *Campylobacter coli* и *Fusobacterium varium*. Эти микроорганизмы содержат полный набор ферментов для биосинтеза биотина из предшественников.

Некоторые бактерии не имеют генов, необходимых для биосинтеза витамина B_7, и поэтому должны получать его из окружающей среды для поддержания своего метаболизма. К таким бактериям относятся, например, представители рода *Lactobacillus*, у которых выявлены гены, участвующие в приобретении биотина из внешней среды. Эти бактерии имеют специфические транспортеры свободного биотина.

Среди других бактерий, которым требуется экзогенный биотин, можно назвать *Prevotella, Bifidobacterium, Ruminococcus* и *Lactobacillus*. Низкий уровень витамина B_7 в кишечнике может негативно влиять на численность этих бактерий, поскольку они не способны синтезировать биотин самостоятельно и конкурируют за его поглощение.

Витамин B_7 может оказывать модулирующее влияние на кишечный микробиом хозяина. Изменение концентрации биотина в просвете кишечника способно влиять на соотношение различных бактериальных популяций, отдавая предпочтение тем видам, которые способны синтезировать витамин самостоятельно, или, напротив, подавляя рост ауксотрофных форм, зависящих от экзогенного поступления биотина.

7.7. Биотехнологические методы получения и промышленное применение

Биотин может быть получен химическим синтезом из двух основных предшественников - пимелоил-КоА и аланина с участием трёх ферментов. Однако химический синтез является многостадийным, требует использования дорогостоящих реагентов и приводит к образованию рацемической смеси, тогда как биологической активностью обладает только природный D-изомер. Поэтому всё большее значение приобретают биотехнологические методы получения биотина с использованием микроорганизмов.

Некоторые микроорганизмы обладают естественной способностью к перепродукции биотина. К ним относятся *Mesorhizobium loti, Corynebacterium glutamicum* и *Sinorhizobium meliloti*. У *Bacillus sphaericus* и *Serratia marcescens* выделены мутантные штаммы, устойчивые к аналогам биотина, что приводит к дерепрессии биосинтетических путей и перепродукции витамина. Также сообщалось, что *Bacillus subtilis, Bacillus sphaericus* и *Escherichia coli* способны использовать синтетический биотин или продуцировать его в небольших количествах.

Для повышения продуктивности биотина разработаны различные стратегии метаболической инженерии. Основные подходы включают гиперэкспрессию биотиновых оперонов, использование сильных промоторов, оптимизацию сайтов связывания рибосомы (RBS), а также мультикопийное интегрирование генов.

Повышение продукции биотина может быть достигнуто не только за счёт модификации генов биосинтеза, но и путём увеличения доступности предшественников — пимелоил-КоА и аланина. Для этого используются следующие подходы:

- инженерия пула пимелоил-КоА через усиление синтеза жирных кислот или введение гетерологичных путей биосинтеза пимелиновой кислоты;

- увеличение доступности аланина путём модуляции метаболизма пирувата и глутамата;

- снятие обратного ингибирования биосинтетических ферментов конечным продуктом (биотином).

К современным перспективным направлениям относится рациональный дизайн штаммов на основе системной биологии и моделирования метаболических сетей. К ним относятся:

- применение CRISPR/Cas9 для точечной модификации генов биосинтеза и регуляторных элементов;

- создание синтетических биотиновых оперонов с оптимизированной структурой и регуляцией и использование двухстадийных процессов ферментации с разделением фаз роста и продукции;

- разработка бесклеточных систем для биосинтеза биотина с использованием иммобилизованных ферментов.

Биотин находит широкое применение в различных отраслях промышленности благодаря своей биологической активности и уникальным химическим свойствам. Он используется в *фармацевтической промышленности* для производства лекарственных препаратов и биологически активных добавок. Также часто включается в составы, предназначенные для лечения заболеваний, связанных с дефицитом биотина, а также для поддержки здоровья кожи, волос и ногтей.

Биотин является важным компонентом *кормов для сельскохозяйственных животных* и птицы. Исследования показали, что добавление биотина улучшает эффективность кормления и физиологические показатели цыплят-бройлеров, подвергающихся окислительному стрессу, например вызванному добавлением перекиси водорода в питьевую воду. Биотин также необходим для поддержания здоровья копыт у крупного рогатого скота и репродуктивной функции у свиней.

Вопросы для самоконтроля

1. Какое состояние, развивавшееся у крыс при кормлении сушеным яичным белком, получило название «травма яичного белка», и кто его впервые описала?
2. Почему Пол Дьёрдь назвал витамин B_7 «витамином Н», и какое вещество, открытое позже, оказалось идентичным этому витамину?
3. Какой белок яичного белка связывает биотин и препятствует его всасыванию? Кто открыл этот белок?
4. Из каких двух колец состоит молекула биотина? Назовите активную форму биотина, ковалентно связанную с ферментами.
5. Какую химическую группу (какой ион) переносит биотин, выступая в роли кофермента? Назовите три класса метаболических процессов, в которых участвуют биотиновые карбоксилазы.
6. Почему варка яиц устраняет антивитаминное действие авидина?
7. Перечислите не менее пяти пищевых продуктов, являющихся богатыми источниками биотина.
8. Какой транспортер обеспечивает всасывание свободного биотина в тонкой кишке? Какие вещества ингибируют этот транспортер?
9. Какой процент от общей потребности в биотине может синтезироваться кишечной микробиотой? Назовите три вида бактерий, способных продуцировать биотин.
10. Почему длительный прием сырых яичных белков может привести к дефициту биотина? Опишите механизм.
11. Назовите основные клинические проявления дефицита биотина у взрослых и у младенцев.
12. Почему алкоголики входят в группу риска по развитию гиповитаминоза B_7?

13. Установлен ли верхний допустимый уровень потребления биотина для человека? Какие дозы считаются безопасными?

14. Какие метаболиты в моче определяют для диагностики умеренного дефицита биотина и почему именно они накапливаются?

15. Назовите микроорганизмы, которые используются для промышленного производства биотина, и укажите достигнутую продуктивность (мг/л) для *Sphingomonas* sp. и *Rhizobium*HK40.

16. Какие генетические стратегии применяются для повышения продуктивности биотина у *E. coli* и *B. subtilis*?

17. В каких двух фармацевтических направлениях (помимо лечения дефицита) применяются добавки биотина согласно тексту?

18. Что такое авидин? Какова константа диссоциации (Kd) комплекса авидин-биотин, и почему это свойство используется в биологических исследованиях?

19. Чем стрептавидин отличается от авидина по происхождению, и для каких целей он применяется?

20. Какие бактерии кишечной микробиоты не способны синтезировать биотин и вынуждены получать его из окружающей среды? Как уровень биотина влияет на их численность?

Глава 8. Витамин B_9 (фолиевая кислота): от фактора роста до регулятора одноуглеродного метаболизма

8.1. История открытия

Название «фолиевая кислота» происходит от латинского слова *folium*, что означает «зелёные листовые овощи», поскольку именно из шпината это соединение было впервые выделено. Ранее фолиевую кислоту часто путали с витамином B_{12} из-за сходства симптомов их дефицита (оба вызывают мегалобластную анемию).

В 1930 году Люси Уиллс продемонстрировала, что определённая форма анемии у беременных женщин вызывается неправильным питанием, а не инфекционными или паразитарными агентами. После успешных исследований на крысах Уиллс предложила использовать специальные добавки из печени и пивных дрожжей для лечения людей с симптомами дефицита, включая анемию. Неопознанное вещество, обладающее антианемическим действием и улучшающее исходы беременности, было первоначально обозначено как «фактор Уиллса».

Со временем, в зависимости от источника происхождения, для этого вещества применялись разные названия:

- витамин М (от англ. *monkey* - обезьяна), поскольку было установлено, что он необходим для нормального кроветворения у обезьян;
- витамин Вс (от англ. *chicken* - курица), так как он оказался необходим для роста цыплят;
- фактор роста *Lactobacillus casei*, поддерживающий пролиферацию этих бактерий;
- витамин B_9 (хронологическое название в группе В).

В 1941 году Митчелл Х.К., Снелл Э.Э. и Уильямс Р.Дж. выделили фолиевую кислоту из шпината. Термин «фолиевая кислота» (*folic acid*), происходящий от латинского *folium*, закрепился как основное название этого витамина. В 1945 году Р.Б. Энджер и его коллеги успешно синтезировали витамин; синтетический материал показал терапевтическую активность, аналогичную природному витамину.

Дефицит фолиевой кислоты долгое время оставался одним из самых распространённых витаминных дефицитов. Установлено, что распространённость дефицита фолата составляет более 20% во многих странах с низким уровнем дохода, тогда как в странах с высоким уровнем дохода она обычно ниже 5%, что связано с обогащением пищевых продуктов синтетической фолиевой кислотой.

8.2. Химическая структура и формы витамина B_9

Фолат — это общее название для природных форм витамина, представляющих собой производные птероилглутаминовой кислоты. Фолиевая кислота - синтетическая форма витамина, которая содержится в обогащённых продуктах питания и пищевых добавках. Фолиевая кислота лучше всасывается в тонком кишечнике, поэтому она считается более биодоступной, чем природные фолаты.

Химическое название N-{4-[(2-амино-4-гидрокси-6-птеридил)-метил]-амино}-бензоил-L(+)-глутаминовая кислота. Молекула фолиевой кислоты состоит из трёх структурных компонентов: птеридиновое ядро (2-амино-4-гидроксиптеридин), пара-аминобензойная кислота (PABA), остаток глутаминовой кислоты (одна или несколько молекул) (Рис. 17).

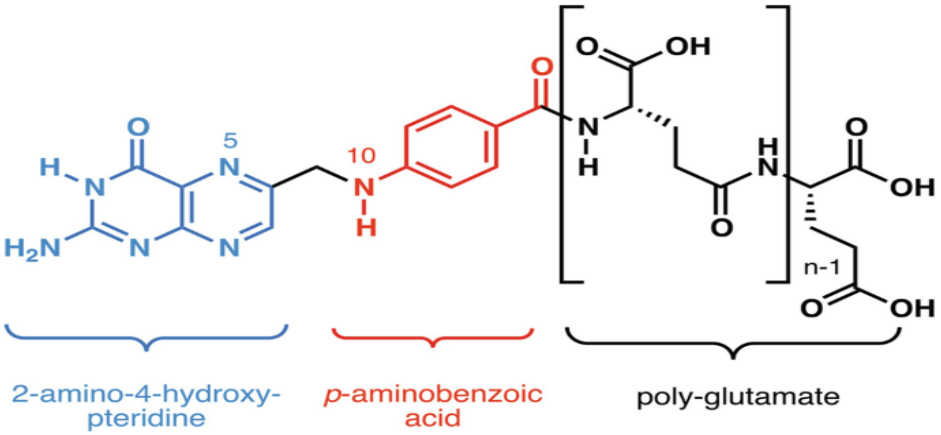


Рисунок 17. Структура и компоненты фолиевой кислоты

Птеридиновое ядро связано с PABA, образуя птероевую кислоту. Птероевая кислота, в свою очередь, присоединена к глутаминовой кислоте, образуя птероилглутаминовую кислоту (птероилмоноглутамат).

В молекуле фолиевой кислоты содержится один остаток глутаминовой кислоты, но в конъюгированных природных формах может быть от 2 до 7 (и даже до 9) остатков глутамата. Такие соединения называются «фолиевые кислоты» или «фолаты» (Рис. 18). Все эти производные в совокупности называются фолацин (устаревшие синонимы: витамин B_9, витамин Bc, витамин M).

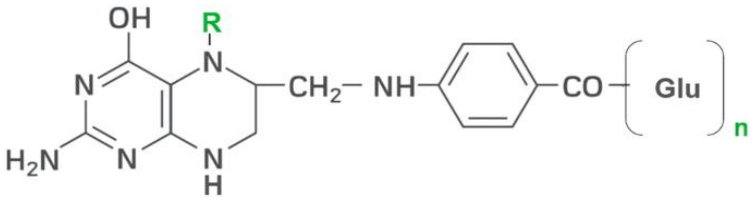


Рисунок 18. Структура фолата

Дигидрофолат (DHF) и тетрагидрофолат (THF) - это восстановленные формы фолата. Реакция восстановления катализируется ферментом дигидрофолатредуктазой (DHFR) и происходит преимущественно в положениях 6, 7 и 8 птеридинового кольца, а также в положении 10 PABA.

Фолиниевая кислота (leucovorin, фактор цитроворума) — это восстановленная форма фолиевой кислоты, которая используется в клинической практике для «спасения» от токсичности метотрексата.

Фолаты могут модифицироваться путём восстановления птеридинового кольца, добавлением полиглутаминовой цепи (хвоста), присоединением одноуглеродных единиц.

Присоединение одноуглеродных единиц происходит преимущественно в положении N5 и/или N10 тетрагидрофолата. THF служит акцептором и переносчиком одноуглеродных фрагментов (метил-, метилен-, метенил-, формил-, формимино-групп) в реакциях метаболизма аминокислот, синтеза пуринов и тимидилата.

8.3. Биологическая роль витамина B_9

Фолат (витамин B_9) необходим для репликации ДНК и участвует в метаболизме аминокислот и витаминов. Тетрагидрофолат является ключевым коферментом в переносе одноуглеродных фрагментов, что критически важно для синтеза пуриновых нуклеотидов, тимидилата (dTMP), метаболизма аминокислот (серина, глицина, метионина, гистидина) и регенерации метионина из гомоцистеина.

Фолиевая кислота необходима для создания и поддержания в здоровом состоянии новых клеток, поэтому её наличие особенно важно в периоды быстрого развития организма - на стадии раннего внутриутробного развития и в раннем детстве. Наибольшую потребность в фолиевой кислоте испытывают ткани с часто делящимися клетками и интенсивным синтезом ДНК: у взрослого человека это кроветворная ткань (костный мозг), слизистые оболочки и гонады. Процесс репликации ДНК требует участия фолиевой кислоты, и нарушение этого процесса увеличивает опасность развития раковых опухолей. В первую очередь от нехватки фолиевой кислоты страдает костный мозг, в котором происходит активное деление клеток.

Фолиевая кислота влияет на метаболизм гомоцистеина, снижая его уровень в крови. Недостаток фолата (например, при нарушениях всасывания при целиакии или болезни Крона) ведёт к гипергомоцистеинемии — фактору риска сердечно-сосудистых заболеваний, инсульта и нейродегенеративных расстройств.

Фолиевая кислота особенно необходима беременным женщинам, особенно на ранних сроках беременности, для профилактики дефектов нервной трубки плода. Приём добавок фолиевой кислоты во время беременности снижает вероятность аномалий нервной трубки. Всемирная организация здравоохранения рекомендует ежедневно принимать пероральные добавки с фолиевой кислотой и железом, чтобы уменьшить вероятность очень низкого веса при рождении, анемии во время беременности и дефицита железа. Для всех беременных взрослых женщин и подростков добавки фолиевой кислоты должны начинаться как можно раньше. Аномалии нервной трубки составляют около 10% из 7,9 миллионов младенцев, рождающихся каждый год с врождённой инвалидностью.

Фолиевая кислота необходима мужчинам для нормальной выработки сперматозоидов. Кроме того, она участвует в поддержании геномной целостности и нормальных функций организма.

8.4. Пищевые источники, причины дефицита и его последствия

Источниками витамина B_9 являются как растительные, так и животные продукты. К богатым источникам относятся:

- фрукты - дыня, грейпфрутовый сок, бананы, малина, клубника, папайя, грейпфрут, медовая дыня;
- овощи - авокадо, горох, шпинат, капуста, цветная капуста, фасоль, зелень горчицы, спаржа, брокколи, салат;
- бобовые и орехи - нут (грамм), семена подсолнечника, арахис, чечевица;
- зерновые - зародыши пшеницы, кукуруза, цельнозерновые продукты;
- продукты животного происхождения - печень (особенно говяжья), рыба, яйца.

В странах с высоким уровнем дохода распространена практика обогащения продуктов питания синтетической фолиевой кислотой. Чаще всего обогащают муку, рис, кукурузную крупу и другие зерновые продукты. Это позволяет снизить распространённость дефицита фолата в популяции.

Человек редко страдает от выраженного B_9-гиповитаминоза, так как фолиевая кислота синтезируется микрофлорой желудочно-кишечного тракта и может поступать в организм в достаточном количестве. Однако дефицит может развиваться при недостаточном потреблении с пищей, нарушении всасывания (целиакия, болезнь Крона), повышенной потребности (беременность, лактация, период быстрого роста), приёме некоторых лекарственных препаратов (метотрексат, противосудорожные средства), а также при алкоголизме и генетических дефектах. При дефекте гена *PCFT*, кодирующего протон-сопряжённый транспортер фолатов, развивается врождённая мальабсорбция фолатов.

У пациентов с редким синдромом церебральной фолатной недостаточностью уровень фолата снижен в центральной нервной системе, при этом уровень фолата в сыворотке может оставаться в норме. Синдром характеризуется неврологическими и психическими нарушениями.

Клетки-предшественницы эритроцитов, образующиеся в костном мозге, при недостатке фолиевой кислоты увеличиваются в размере, образуя так называемые мегалобласты. Это приводит к мегалобластной анемии, которая проявляется слабостью, бледностью, одышкой, головокружением.

Дефицит фолата поражает слизистые оболочки желудочно-кишечного тракта, что приводит к нарушению всасывания и диспептическим расстройствам. Недостаток фолиевой кислоты у беременных женщин значительно повышает риск рождения детей с дефектами нервной трубки (spina bifida, анэнцефалия). Дефицит фолата ведёт к накоплению гомоцистеина в крови, что является фактором риска сердечно-сосудистых заболеваний, инсульта, болезни Альцгеймера. Также дефицит связывают с повышенным риском некоторых злокачественных опухолей (колоректальный рак, рак молочной железы), периферической невропатией и психическими расстройствами (депрессия).

В норме в сыворотке крови человека содержится 6-20 нг/мл фолатов. При недостатке фолацина в организме увеличивается выведение с мочой формиминоглутаминовой кислоты (с 35 до 450 мг/сутки) и урокининовой кислоты.

Избыток фолиевой кислоты (высокое потребление в качестве витаминной добавки) может снижать активность естественных киллеров (NK-клеток), которые участвуют в противовирусном и противоопухолевом иммунитете. В 2005 году было обнаружено, что у 78% здоровых женщин в постменопаузе в плазме крови содержится неразрушенная фолиевая кислота, что указывает на её избыточное потребление. У них также отмечалась более низкая активность NK-клеток.

8.5. Микробиота и продукция витамина B_9

Микробы кишечника человека, включая представителей типов *Actinobacteria* (26% штаммов способны к синтезу), *Proteobacteria* (71%), *Fusobacteria* (79%) и *Firmicutes* (15%), обладают способностью синтезировать витамин B_9 *de novo*. К числу бактерий, продуцирующих фолат в кишечнике, относятся: *Bacteroides fragilis, Prevotella copri, Clostridium difficile, Lactobacillus plantarum, L. reuteri, L. helveticus, L. delbrueckii subsp. bulgaricus, L. sakei, Streptococcus thermophilus, Bifidobacterium* spp. (из них *B. bifidum* и *B. infantis* - высокопродуцирующие; *B. breve, B. adolescentis* и *B. longum* - низкопродуцирующие); *Salmonella enterica*; *Fusobacterium varium*.

Lactobacillus sakei LZ217, выделенный из сырого молока, является отличным генератором витамина B_9. *Propionibacterium* sp., широко известный своей способностью генерировать витамин B_{12}, также может производить довольно большое количество фолата.

Синтез фолата кишечной микробиотой может вносить существенный вклад в обеспечение организма хозяина этим витамином, особенно при достаточном потреблении пребиотиков, стимулирующих рост фолат-продуцирующих бактерий.

8.6. Биотехнологические методы получения витамина B_9 и пути обогащения продуктов питания

Фолиевая кислота химически производится с помощью нескольких методологий, включая синтез из птеридиновых предшественников, PABA и глутаминовой кислоты. Однако химический синтез является многостадийным и требует использования дорогостоящих реагентов.

Некоторые витамины, включая витамин B_9, могут быть получены в процессе ферментации с участием бактерий, грибов и других микроорганизмов. Микроорганизмы могут быть генетически модифицированы для перепроизводства фолатов.

Для увеличения выхода витамина B_9 при микробиологическом синтезе используется несколько подходов, которые можно применять как по отдельности, так и в комбинации. Эти стратегии направлены на то, чтобы «заставить» микроорганизм производить больше фолата, чем ему требуется для собственных нужд.

Молочнокислые бактерии широко используются для создания биообогащённых ферментированных продуктов с повышенным содержанием фолата. Комбинация нестандартной заквасочной культуры *Lactobacillus amylovorus* CRL887 с выбранными штаммами *L. bulgaricus* CRL871 и *Streptococcus thermophilus* была признана эффективной для создания йогурта, продуцирующего высокие концентрации фолата (260 мкг/л). Такой биообогащённый продукт является интересной альтернативой обогащению химической фолиевой кислотой.

Добавление *Lactococcus lactis* в сок огурца и арбуза оказалось эффективным способом повысить уровень фолата в этих напитках.

Различные штаммы *Bifidobacterium* и *Lactobacillus* используются для обогащения ферментированных молочных продуктов фолатом.

Добавки фолиевой кислоты рекомендуются для удовлетворения повышенных потребностей организма, а также для профилактики неблагоприятных исходов беременности, таких как дефекты нервной трубки (NTD). Хотя обогащение пищи фолиевой кислотой увеличило потребление фолата, оно всё ещё не всегда достигает рекомендуемого уровня для снижения риска NTD.

Некоторые люди применяют фолиевую кислоту непосредственно в составе жевательной резинки для лечения инфекций дёсен. Фолиевая кислота часто используется в сочетании с другими витаминами.

Добавление фолата в муку и другие ингредиенты для выпечки является обычной практикой во многих странах. Обогащение риса витаминами и минералами улучшает качество питания людей в странах-потребителях риса, которые страдают от дефицита микроэлементов. Для восполнения дефицита B_9 в рационе населения производители прибегают к созданию йогуртов, кефиров и других ферментированных продуктов с повышенным содержанием фолата с использованием специально подобранных заквасочных культур.

Лекарственные препараты, которые являются гидрофильными или гидрофобными, могут быть инкапсулированы с помощью гидрогеля фолиевой кислоты для targeted drug delivery (направленной доставки лекарств). Фолиевая кислота служит лигандом для рецепторов фолата, которые часто переэкспрессированы на поверхности раковых клеток, что позволяет использовать фолат-конъюгированные препараты для адресной терапии опухолей.

Вопросы для самоконтроля

1. От какого латинского слова происходит название «фолиевая кислота» и что оно означает? С чем связано такое название?
2. Какие исторические названия (не менее четырёх) носил витамин B_9 до того, как получил современное наименование, и с чем было связано каждое из них?
3. Кто из учёных в 1930 году продемонстрировал связь между неправильным питанием и анемией у беременных, и какие вещества были предложены для лечения этого состояния?
4. В каком году и из какого растительного источника была впервые выделена фолиевая кислота, и кто осуществил это выделение?
5. Из каких трёх структурных компонентов состоит молекула фолиевой кислоты? Назовите химическое название фолиевой кислоты по номенклатуре IUPAC.
6. Чем отличается природный фолат от синтетической фолиевой кислоты? Какая из этих форм лучше всасывается в кишечнике и почему?
7. Что такое дигидрофолат и тетрагидрофолат? Какой фермент катализирует их образование, и в каких положениях птеридинового кольца происходит восстановление?
8. Что представляет собой фолиниевая кислота (фактор цитроворума), и в каких клинических ситуациях она применяется?
9. Какую ключевую функцию выполняет тетрагидрофолат в метаболизме? Какие одноуглеродные фрагменты он переносит и в каких биохимических процессах они используются?

10. Почему ткани с активно делящимися клетками (костный мозг, слизистые оболочки, гонады) наиболее чувствительны к дефициту фолиевой кислоты?

11. Каков механизм влияния фолиевой кислоты на уровень гомоцистеина в крови? К каким заболеваниям приводит гипергомоцистеинемия?

12. Почему фолиевая кислота особенно важна для беременных женщин? Какие врождённые пороки развития предотвращает адекватное потребление фолата во время беременности?

13. Назовите не менее пяти пищевых продуктов, являющихся богатыми источниками фолата (природной формы витамина B_9).

14. Какие причины могут привести к дефициту фолиевой кислоты у человека? Что такое церебральная фолатная недостаточность и чем она характеризуется?

15. Какие клинические проявления характерны для мегалобластной анемии, вызванной дефицитом фолата? Почему при дефиците фолата образуются мегалобласты?

16. Какие лабораторные показатели (в сыворотке крови и в моче) используются для диагностики дефицита фолата? Каковы нормальные значения фолатов в сыворотке?

17. Каковы возможные негативные последствия избыточного потребления фолиевой кислоты? Какое влияние на активность NK-клеток оказывает высокий уровень фолиевой кислоты?

18. Какие виды кишечных бактерий (назовите не менее пяти) способны синтезировать фолат? Какие из них являются высокопродуктивными, а какие — низкопродуктивными?

19. Опишите четыре основные стратегии метаболической инженерии для повышения продукции фолата микроорганизмами. Какую продуктивность (в мг/л) удалось достичь у *Ashbya gossypii* и *Scheffersomyces stipitis*?

20. Как молочнокислые бактерии используются для биообогащения пищевых продуктов фолатом? Приведите примеры конкретных продуктов и штаммов, а также достигнутых концентраций фолата.

Глава 9. Витамин B_{12} (кобаламин): от сложной структуры до кофактора метаболизма

9.1. История открытия

Витамин B_{12} также известен как внешний фактор Касла**.** Его открытие связано с исследованиями пернициозной (злокачественной) анемии, которая долгое время оставалась смертельным заболеванием. В 1920-х годах американские врачи Джордж Ричардс Майнот и Уильям Парри Мёрфи обнаружили, что включение в рацион больших количеств сырой печени приводит к выздоровлению пациентов с пернициозной анемией. Позже Уильям Боуэн Касл показал, что для всасывания «внешнего фактора» (содержащегося в пище) необходим «внутренний фактор» (белок, вырабатываемый желудком). В 1948 году витамин B_{12} был впервые выделен в кристаллическом виде из печени, а его структура была расшифрована Дороти Кроуфут Ходжкин с помощью рентгеновской кристаллографии, за что она получила Нобелевскую премию в 1964 году.

9.2. Химическая структура и формы витамина B_{12}

Витамины группы B_{12} называют кобаламинами — это группа биологически активных веществ, относящихся к корриноидам, содержащим в своей структуре атом кобальта (III) и являющихся хелатными соединениями. Витамин B_{12} — единственный витамин, в состав которого входит металл (кобальт), что отражено в его названии («кобаламин»).

Структура витамина B_{12} является одной из самых сложных среди всех витаминов (Рис. 19). Её можно упрощённо представить в виде основных компонентов, корриновое кольцо - это порфириноподобная структура, состоящая из четырёх пиррольных колец, которая хелатирует (удерживает) ион кобальта в качестве центрального атома. В отличие от порфиринов (как в геме), корриновое кольцо имеет менее насыщенную структуру. Аденозильная группа (или другой лиганд в верхней β-позиции) связывается с атомом кобальта с верхней стороны.

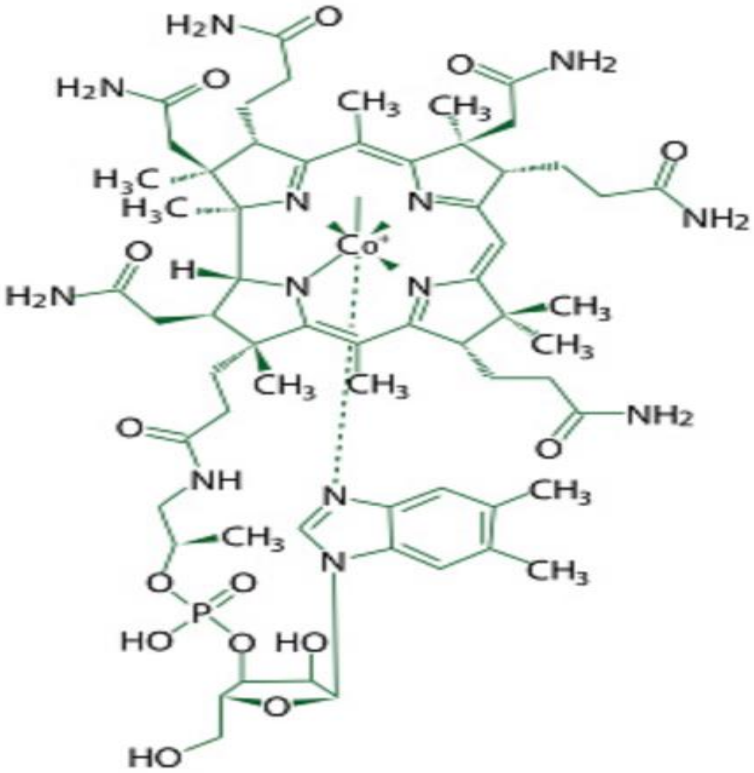


Рисунок 19. Структурная формула витамина B_{12}

5,6-диметилбензимидазол (DMBI) — нуклеотидоподобное основание, которое образует лиганд с центральным атомом кобальта с нижней стороны (α-позиция), стабилизируя структуру. DMBI связан с корриновым кольцом через фосфатную группу и аминоспирт (аминопропанол).

В зависимости от того, какой лиганд присоединён к кобальту, различают несколько форм витамина B_{12}. Аденозилкобаламин — основная коферментная форма, участвующая в реакциях перегруппировки. Метилкобаламин — коферментная форма, участвующая в метилировании гомоцистеина. Цианокобаламин — синтетическая форма, наиболее стабильная и широко используемая в пищевых добавках и для обогащения продуктов. Гидроксокобаламин — природная форма, образующаяся под действием света.

В научной литературе под витамином B_{12} обычно подразумевают цианокобаламин, который свободно преобразуется в одну из коферментных форм (аденозилкобаламин или метилкобаламин) в организме человека. Однако цианокобаламин не является единственным соединением с B_{12}-витаминной активностью: несколько других кобаламинов также обладают биологической активностью.

Витамин B_{12} представляет собой тёмно-красные кристаллы, хорошо растворимые в воде. Красный цвет обусловлен наличием атома кобальта в структуре. Витамин относительно устойчив к нагреванию, но разрушается под действием света, особенно в присутствии восстанавливающих веществ.

9.3. Биологическая роль витамина B_{12}

Аденозилкобаламин и метилкобаламин являются важными кофакторами в ключевых метаболических реакциях. Аденозилкобаламин необходим для работы фермента метилмалонил-КоА-мутазы, которая катализирует превращение метилмалонил-КоА в сукцинил-КоА. Эта реакция имеет критическое значение для метаболизма некоторых аминокислот (валина, изолейцина, треонина, метионина) и нечётных жирных кислот. Нарушение этой реакции приводит к накоплению метилмалоновой кислоты, что вызывает метилмалоновую ацидемию.

Метилкобаламин является кофактором метионинсинтазы — фермента, который катализирует реметилирование гомоцистеина в метионин. Метионин, в свою очередь, служит предшественником S-аденозилметионина (SAM) — универсального донора метильных групп для многочисленных реакций метилирования (включая метилирование ДНК, РНК, белков, фосфолипидов и нейротрансмиттеров). Таким образом, витамин B_{12} играет центральную роль в метаболизме одноуглеродных групп (C_1-метаболизме).

Витамин B_{12} необходим для нормального образования эритроцитов. Он участвует в синтезе ДНК в клетках-предшественницах эритроцитов в костном мозге. При дефиците витамина B_{12} нарушается синтез ДНК, клетки не могут нормально делиться, но продолжают расти, превращаясь в крупные незрелые клетки мегалобласты. Это приводит к развитию мегалобластной анемии, при которой эритроциты становятся аномально большими (макроцитоз) и неспособными нормально функционировать.

Витамин B_{12} необходим для поддержания целостности миелиновой оболочки нервных волокон. Миелин — это изолирующая оболочка, обеспечивающая быструю передачу нервных импульсов. Дефицит витамина B_{12} приводит к демиелинизации и развитию неврологических нарушений, включая периферическую нейропатию, нарушение координации движений, снижение вибрационной и тактильной чувствительности, когнитивные расстройства и даже психические нарушения (депрессия, психозы). Кроме того, витамин B_{12} участвует в синтезе ацетилхолина — нейротрансмиттера, играющего ключевую роль в передаче нервных импульсов.

В процессе клеточного метаболизма витамин B_{12} участвует в различных биохимических реакциях в качестве коэнзима, особенно в реакциях переноса метила и молекулярной перестановки. Мало того, витамин B_{12} также является важным кофактором различных ферментов, таких как метионинсинтаза и фермента

трансформации метилпропилкоэнзима А, и участвует в важных физиологических процессах, таких как реметилирование гомоцистеина, нечетноцепочечных жирных кислот и метаболизм аминокислот с разветвленной цепью. В биохимической системе витамин B_{12} тесно взаимодействует с другими витаминами группы В, особенно с фолиевой кислотой. Оба витамина сотрудничают, чтобы участвовать в реакции метилирования, в которой витамин B_{12} обеспечивает метил, а фолиевая кислота действует как метиловый носитель, который совместно преобразует гомоцистеин в метионин. Этот процесс имеет решающее значение для синтеза белка, синтеза нуклеиновых кислот. Однако, поскольку люди не могут синтезировать витамин B_{12} эндогенно, они должны полагаться на экзогенное потребление, чтобы поддерживать уровень в организме для выполнения ряда физиологических действий, таких как производство эритроцитов, функция нервной системы, а также синтез нуклеиновых кислот и белков.

Дефицит витамина B_{12} (как и дефицит фолата) приводит к накоплению гомоцистеина в крови — гипергомоцистеинемии**.** Высокий уровень гомоцистеина является независимым фактором риска сердечно-сосудистых заболеваний, включая атеросклероз, инфаркт миокарда и инсульт. Таким образом, поддержание нормального уровня витамина B_{12} важно для профилактики сердечно-сосудистых заболеваний.

9.4. Пищевые источники витамина B_{12}

В природе продуцентами витамина B_{12} являются исключительно бактерии и археи. Растения и животные не способны синтезировать этот витамин. Животные получают витамин B_{12} за счёт потребления продуктов животного происхождения (где он накапливается из бактерий) или за счёт симбиотических бактерий, обитающих в их желудочно-кишечном тракте.

Витамин B_{12} в основном содержится в продуктах животного происхождения. К богатым источникам относятся мясные продукты, такие как свинина, баранина, говядина. Также содержится и в субпродуктах: печень (особенно говяжья и свиная), почки, сердце. Мясо курицы и индейки, а также рыба и морепродукты (лосось, тунец, сардины, скумбрия, моллюски и устрицы (одни из самых богатых источников) содержат достаточное количество этого витамина (Табл. 6).

Таблица 6 – Содержание витамина B_{12} в продуктах питания

№/№	Продукты	Содержание (мг/100 г)
1	Печень говяжья (варёная)	70–83
2	Сердце говяжье	~10
3	Сардины	8–11
4	Лосось/Форель (варёные)	2,5–7,7
5	Говядина (варёная)	2,6
6	Баранина	3,3
7	Кролик	4,3
8	Свинина (мясо)	2,7
9	Курица (мясо)	0,9
10	Яйцо куриное (целое)	1,1
11	Сыр (твёрдый)	1,4

Растения практически не содержат витамина B_{12}. Некоторые водоросли (например, спирулина, хлорелла) содержат соединения, которые при анализах определяются как B_{12}, но эти соединения являются псевдовитамином B_{12} - аналогами, не обладающими биологической активностью у человека и даже способными ухудшать статус B_{12}, конкурируя с истинным витамином. Интересно, что самые высокие концентрации истинного витамина B_{12} среди

водорослей обнаружены в других видах морских водорослей (например, в нори, используемой в приготовлении суши), но их содержание вариабельно.

Поскольку витамин B_{12} в основном добывается из продуктов животного происхождения, люди, придерживающиеся строгой вегетарианской или веганской диеты, находятся в группе высокого риска по развитию дефицита этого витамина. Им рекомендуется принимать добавки витамина B_{12} или потреблять обогащённые продукты (например, растительное молоко, соевые продукты, завтраки с добавлением B_{12}).

9.5. Всасывание, транспорт, гипо- и гипервитаминоз

Всасывание витамина B_{12} - сложный многостадийный процесс, требующий участия нескольких белков. В желудке под действием пепсина и соляной кислоты витамин B_{12} высвобождается из белков-носителей пищи. Освобождённый B_{12} связывается с белком гаптокоррином (также известным как R-белок или транскобаламин I), который секретируется слюнными железами и слизистой желудка. В двенадцатиперстной кишке протеазы поджелудочной железы расщепляют гаптокоррин, высвобождая B_{12}. Высвобожденный B_{12} связывается с внутренним фактором Касла (IF) — гликопротеином, секретируемым париетальными клетками желудка. Этот комплекс устойчив к действию протеаз. Комплекс B_{12}-IF связывается со специфическими рецепторами (кубилиновыми рецепторами) на поверхности энтероцитов в подвздошной кишке и всасывается путём рецептор-опосредованного эндоцитоза. Внутри энтероцита B_{12} высвобождается из комплекса с IF и связывается с транскобаламином II (TCII) для транспорта в кровоток.

В крови витамин B_{12} транспортируется двумя основными белками: транскобаламином I (связывает большую часть B_{12}, но эта форма не доступна для большинства тканей) и транскобаламином II (связывает меньшую часть, но именно этот комплекс отвечает за доставку B_{12} к клеткам-мишеням). Комплекс B_{12}-TCII связывается со специфическими рецепторами на поверхности клеток и всасывается путём рецептор-опосредованного эндоцитоза.

Основным местом хранения витамина B_{12} в организме является печень, которая может депонировать значительные количества витамина (до нескольких миллиграммов), что обеспечивает защиту от дефицита в течение нескольких лет даже при полном отсутствии поступления.

Дефицит витамина B_{12} может развиваться по нескольким причинам, которые можно разделить на четыре основные группы.

1) *Недостаточное диетическое потребление* наиболее актуально для веганов и строгих вегетарианцев, поскольку витамин B_{12} в природе содержится исключительно в продуктах животного происхождения. Также в группу риска входят люди с несбалансированным питанием, например, при длительном употреблении рационов с низким содержанием мяса, рыбы, яиц и молочных продуктов. Кроме того, недостаточное потребление может наблюдаться у пожилых людей с плохим аппетитом и у лиц с алкогольной зависимостью, чей рацион часто обеднён.

2) *Нарушение всасывания (мальабсорбция)* является наиболее частой причиной дефицита B_{12} даже при адекватном поступлении витамина с пищей. Это нарушение может быть связано с атрофическим гастритом, при котором снижается секреция внутреннего фактора Касла — белка, необходимого для всасывания B_{12} в подвздошной кишке. Тяжёлой формой такого нарушения является пернициозная анемия — аутоиммунное заболевание, при котором происходит разрушение париетальных клеток желудка, вырабатывающих внутренний фактор. Также нарушение всасывания может быть следствием хирургических вмешательств на желудке (гастрэктомия, шунтирование) или резекции подвздошной кишки. Заболевания поджелудочной железы с нарушением её экзокринной функции приводят к недостаточному расщеплению гаптокоррина, что также препятствует образованию комплекса B_{12} с внутренним фактором. Хронические воспалительные заболевания кишечника, такие как целиакия и болезнь Крона, повреждают слизистую оболочку тонкой кишки, где происходит

всасывание витамина. Наконец, длительный приём некоторых лекарственных препаратов, включая ингибиторы протонной помпы (омепразол, пантопразол), снижающие кислотность желудка, и метформин (противодиабетическое средство), может приводить к нарушению всасывания B_{12}.

3) *Повышенная потребность* в витамине B_{12} возникает в определённые периоды жизни и при некоторых состояниях. К ним относятся беременность и лактация, когда витамин активно используется для развития плода и образования грудного молока, а также период быстрого роста у детей и подростков. Гемолиз (разрушение эритроцитов) и некоторые эндокринные заболевания, такие как тиреотоксикоз, также увеличивают потребность организма в B_{12}.

4) *Генетические дефекты* встречаются редко, но являются серьёзной причиной дефицита B_{12}. К ним относятся нарушения синтеза или функции белков, участвующих в транспорте и метаболизме B_{12}, такие как дефекты внутреннего фактора, транскобаламина II, или ферментов внутриклеточного метаболизма кобаламинов. Эти состояния проявляются в раннем детстве и требуют пожизненной заместительной терапии.

Симптомы дефицита витамина B_{12} могут развиваться постепенно, иногда в течение нескольких лет, так как печень содержит значительные запасы этого витамина. Клинические проявления делятся на гематологические, неврологические и желудочно-кишечные.

Гематологические проявления связаны с нарушением синтеза ДНК в клетках костного мозга. Основным проявлением является мегалобластная анемия, при которой эритроциты становятся аномально крупными (макроцитоз) и функционально неполноценными. Симптомы анемии включают общую слабость, повышенную утомляемость, бледность кожных покровов и слизистых оболочек, одышку при физической нагрузке и головокружение. Кроме того, может развиваться лейкопения — снижение количества лейкоцитов, что ведёт к повышению восприимчивости к бактериальным и вирусным инфекциям. Также наблюдается тромбоцитопения — снижение количества тромбоцитов, которое проявляется склонностью к кровотечениям, лёгкому образованию синяков и длительному кровотечению при мелких порезах.

Неврологические проявления обусловлены повреждением миелиновой оболочки нервных волокон и могут возникать даже при отсутствии выраженной анемии, что часто затрудняет диагностику. К ним относятся периферическая нейропатия, которая проявляется парестезиями — ощущениями онемения, покалывания, «ползания мурашек», а также снижением вибрационной и тактильной чувствительности, особенно в нижних конечностях. Нарушение координации движений (атаксия) проявляется неустойчивостью походки, частыми падениями и затруднениями при выполнении точных движений. Снижение когнитивных функций включает проблемы с памятью, концентрацией внимания и замедление мышления, что может напоминать деменцию у пожилых людей. Психические нарушения включают депрессию, тревожность, раздражительность, а в тяжёлых случаях — психозы с галлюцинациями и бредом. В наиболее тяжёлых и длительно существующих случаях дефицита развивается фуникулярный миелоз — дегенерация задних и боковых канатиков спинного мозга, которая проявляется грубым нарушением вибрационной чувствительности, спастическим параличом и тяжёлой атаксией.

Желудочно-кишечные проявления включают глоссит — воспаление языка, при котором язык становится гладким, блестящим, малиново-красным («лакированный язык»), что часто сопровождается болезненностью и жжением. Также наблюдаются снижение аппетита, потеря массы тела, а также запоры или диарея.

Гипервитаминоз витамина B_{12} встречается редко, так как это водорастворимый витамин, и его избыток обычно выводится из организма с мочой. Однако в некоторых случаях может наблюдаться повышенный уровень B_{12} в крови, что сопровождается определёнными клиническими проявлениями.

Основные проявления включают дерматологические изменения, такие как покраснение кожи лица и угревые высыпания. В редких случаях могут возникать аллергические реакции

различной степени тяжести. Также могут появляться симптомы, характерные для фуникулярного миелоза — парестезии и снижение вибрационной чувствительности. Парадоксально, но эти симптомы могут возникать на фоне высокого уровня B_{12} при некоторых заболеваниях, когда развивается функциональный дефицит витамина, то есть витамин присутствует в крови, но не может использоваться клетками.

Повышенный уровень витамина B_{12} в крови может наблюдаться при злокачественных новообразованиях, особенно при раке печени, лёгких и поджелудочной железы, а также при гемобластозах (лейкозы, лимфомы). К другим причинам относятся заболевания печени, такие как гепатит и цирроз, а также почечная недостаточность. Важно отметить, что гипервитаминоз B_{12} часто сопровождается функциональным дефицитом витамина, то есть, несмотря на высокие показатели в крови, клетки не могут усваивать и использовать витамин, что приводит к парадоксальной картине: лабораторно определяется высокий уровень B_{12}, но клинически присутствуют симптомы дефицита. Это значительно усложняет диагностику и лечение.

Лечение гипервитаминоза B_{12} включает ограничение поступления витамина с пищей и добавками, а также, что самое главное, коррекцию основного заболевания, вызвавшего повышение уровня B_{12}. При функциональном дефиците, несмотря на высокий уровень витамина, может потребоваться специфическая терапия для коррекции метаболических нарушений.

9.6. Микробиота и продукция витамина B_{12}

Витамин B_{12} является одним из важнейших кофакторов в метаболизме как организма человека, так и его микробиоты. В кишечнике человека сложилась уникальная экосистема, в которой способность к синтезу витамина B_{12} и зависимость от него распределены между бактериями крайне неравномерно. Согласно современным данным, примерно 20% кишечных бактерий способны самостоятельно синтезировать B_{12} *de novo*. При этом более 80% кишечных бактерий являются ауксотрофами по B_{12}, то есть полностью зависят от внешних источников этого витамина для своих метаболических процессов. Такое соотношение создаёт сложные сети метаболической взаимозависимости, где продуценты B_{12} обеспечивают жизнедеятельность большинства членов микробного сообщества.

Существует два способа синтеза витамина B_{12} с самого начала: аэробный и анаэробный. Некоторые бактерии, такие как кишечная палочка, содержат восстановительные пути, которые могут преобразовывать предшественники кобальта в витамин B_{12}. В настоящее время промышленное производство витамина B_{12} может быть достигнуто только путем микробной ферментации. *Pseudomonas denitrificans, Sinorhizobium meliloti 320, Ensifer adhaere ns, Propionibacterium freudenreichii* являются основными производственными штаммами, а *E. coli*, как модельная бактерия, привлекла внимание в последние годы, а также была преобразована для синтеза витамина B_{12} с самого начала, став потенциальным производственным штаммом. В настоящее время уровень производства витамина B_{12}, очевидно, ниже, чем у других витаминов. Из-за сложного пути синтеза витамина B_{12} и сложной генетической трансформации природных промышленных штаммов, его исследования в прошлом фокусировались на мутации штаммов и оптимизации процесса ферментации. С момента появления редактирования генов CRISPR/Cas в последнее десятилетие другие инструменты редактирования генов для промышленных штаммов витамина B_{12} появились один за другим, как и появились исследования по генетической трансформации природных штаммов.

Биосинтез витамина B_{12} - это сложный процесс, который проводится только в определенных прокариотах, включающий около 30 этапов ферментативной реакции, как показано на рисунке 19. Ядром этого пути является структура тетрапиррола, а исходным веществом для синтеза является 5-аминоацетилпропионовая кислота (ALA). ALA широко используется для синтеза витамина B_{12}, гема и цирогема и других веществ (Рис. 20).

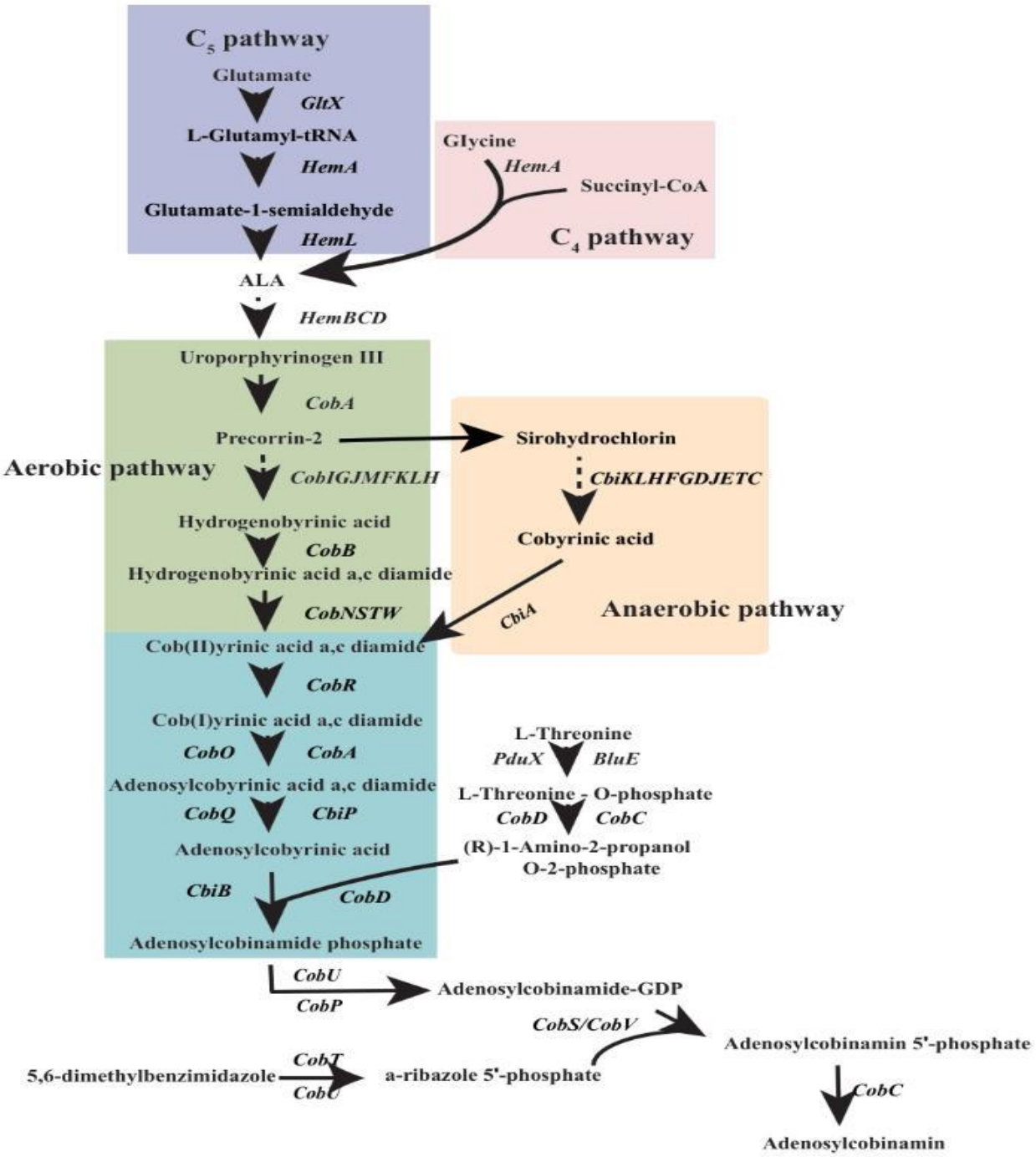


Рисунок 20. Биосинтез витамина B_{12}

Анаэробный путь характеризуется тем, что кобальт встраивается на ранних этапах биосинтеза, ещё до завершения формирования корринового кольца. Этот путь не требует молекулярного кислорода и характерен для анаэробных и факультативно-анаэробных бактерий, обитающих в кишечнике, почве и других бескислородных средах. Типичными представителями, использующими анаэробный путь, являются *Salmonella typhimurium*, *Bacillus megaterium*, *Propionibacterium freudenreichii* и *Propionibacterium shermanii*.

Аэробный путь, напротив, предполагает позднюю вставку кобальта — после полного завершения сборки корринового кольца. Этот путь требует присутствия молекулярного кислорода для работы некоторых ферментов (например, кобаламинсинтазы). Он характерен для строгих аэробов и микроаэрофилов. Классическими примерами являются *Pseudomonas denitrificans*, *Sinorhizobium meliloti*, *Ensifer casida* и *Rhodobacter capsulatus*.

Общая схема биосинтеза B_{12} начинается с двух ключевых метаболитов. Первым из них является сукцинил-КоА — метаболит цикла лимонной кислоты. Вторым служит глицин (или глутамат в зависимости от конкретного организма). Через несколько ферментативных стадий образуется уропорфириноген III. Это соединение представляет собой общий предшественник для биосинтеза трёх важнейших классов макроциклических кофакторов: кобаламина (витамин B_{12}), гема и хлорофилла. Далее уропорфириноген III подвергается специфическим модификациям, включая метилирование, перестройку колец и восстановление, в результате чего формируется корриновое кольцо. После вставки иона кобальта (на раннем или позднем этапе в зависимости от пути) присоединяется DMBI-лиганд, а затем и верхний лиганд — аденозил-, метил- или гидроксигруппа. В зависимости от присоединённого верхнего лиганда образуются различные биологически активные формы B_{12}: аденозилкобаламин, метилкобаламин или гидроксокобаламин.

Высокий процент B_{12}-ауксотрофов среди кишечных бактерий (более 80%) объясняется тем, что витамин необходим в качестве кофактора для нескольких ключевых ферментов. К их числу относятся метионинсинтаза, участвующая в синтезе метионина из гомоцистеина; метилмалонил-КоА мутаза, важная для катаболизма жирных кислот и пропионата; а также рибонуклеотидредуктаза у некоторых микроорганизмов, осуществляющая восстановление рибонуклеотидов до дезоксирибонуклеотидов.

Дефицит витамина B_{12} в кишечной среде может ограничивать рост ауксотрофных бактерий, что приводит к снижению разнообразия микробиоценоза и нарушению его функциональной стабильности. В свою очередь, бактерии-продуценты (например, *Propionibacterium* и *Bifidobacterium*) могут обеспечивать витамином не только соседние микроорганизмы, но и в определённой степени организм человека. Однако усвоение микробного B_{12} в толстой кишке ограничено, поскольку основное всасывание кобаламина происходит в подвздошной кишке через рецептор кубилин в комплексе с амнионлессом (белок, связывающий внутренний фактор). Тем не менее, у некоторых групп людей (например, при длительном вегетарианстве, после резекции кишечника или при синдроме избыточного бактериального роста) микробный синтез B_{12} может вносить существенный вклад в витаминный статус организма.

Таким образом, сложный, генетически затратный биосинтез витамина B_{12}, его чёткое разделение на аэробный и анаэробный пути, а также неравномерное распределение способности к синтезу между продуцентами и ауксотрофами отражают глубокую эволюционную адаптацию микробиоты к условиям кишечника. Изучение этих механизмов важно не только для фундаментальной микробиологии, но и для разработки подходов к коррекции дисбиозов и оптимизации витаминного статуса человека.

9.7. Биотехнологические методы получения

В последние годы в связи с быстрым развитием биотехнологии, исследователи добились значительного прогресса в биосинтезе витамина B_{12}. Промышленное производство витамина B_{12} в основном зависит от микробной ферментации, особенно производственной системы с аэробными микроорганизмами в качестве ядра. В настоящее время широко используемые производственные штаммы для синтеза витамина B_{12} включают *P. denitrificans, S. melilot и E. adhaerens*. Исследования показывают, что производительность витамина B_{12} можно значительно увеличивать, оптимизируя культуральную среду, применяя методы генной инженерии и других средств. После долгосрочной оптимизации процесс отбора и ферментации выход витамина B_{12} был значительно улучшен, но есть очевидные различия в метаболических характеристиках, сложности генетической работы и условиях культивирования каждого штамма.

P. denitrificans (также известный как *S. meliloti* 320 и *E. adhaerens*), грамотрицательные бактерии, является одним из наиболее широко используемых штаммов при производстве витамина B_{12} в промышленности из-за его четких

биосинтетических путей и высокой производительности. Он использует путь аэробного синтеза, цикл ферментации длится около 7-8 дней. Его ген синтеза витамина B_{12} расположен в двух больших генных кластерах и регулируется внутриклеточным рибозным коммутатором. В высоковыводимых мутантных штаммах могут быть деингибирующие мутации ключевых ферментов в синтетическом пути. Например, метилтрансфераза уропорфириногена III (также известная как SUMT) в пути синтеза бактерий восприимчива к витамину B_{12} и ингибированию промежуточной обратной связи. В последние годы, с развитием геномного секвенирования и генетических инструментов, исследователи начали пытаться нацелиться на *P. denitrificans*. С одной стороны, анализ его синтетического генного кластера витамина B_{12} показывает, что выход может быть увеличен за счет увеличения экспрессии ключевых ферментов. С другой стороны, в геноме *P. denitrificans* есть несколько витамина B_{12}-зависимых рибозных переключателей, которые могут реагировать на внутриклеточные уровни B_{12} и регулировать транскрипцию связанных генов. Отказ от регуляции витамином B_{12} рибозы является эффективной стратегией для усиления экспрессии генов синтетического пути.

Инженерия промотора является ключевой технологией для трансформации синтетического пути. Ван Линлин и др. оценили сильный промоутор Pdnak в *Pseudomonas*, который может улучшить уровень экспрессии ключевых генов, участвующих в синтезе витамина B_{12}. Отчет GFP подтвердил генетическое тестирование, что Pdnak очень эффективен в качестве промотора, тем самым переэкспрессируя ген cobA в рекомбинантном штамме. Результаты ферментации показали, что выход витамина B_{12} у рекомбинантного штамма достиг 75,5 мг/л, что было на 21,5 мг/л больше по сравнению с дикими штаммами. Лю и др. обнаружили два новых типа стимуляторов, вызванных лилозой (PA и PB) в ризоматоме *S. meliloti* 320, которые характеризуются высокой индуцированной экспрессией и низкой экспрессией утечки. После чрезмерной экспрессии гена hemA с использованием промотора PA выход витамина B_{12} увеличился на 11% (массовая доля), а после добавления 0,1% (объемная фракция) сукцината натрия выход витамина B_{12} также увеличился на 11%. С развитием мультиомной технологии исследователи могут получить глубокое понимание процесса бактериального метаболизма, что облегчит получение эффективных целей трансформации. Сюй и его коллеги определили гены, связанные с биосинтезом кобаламина, с помощью секвенирования генома и анализа транскриптома. В *E. adhaerens* HY-1 экспрессия ключевых генов cobSV, cobQ и cobW регулировалась с помощью градиентных промоторов, тем самым успешно усиливая биосинтез кобалламина. Кроме того, Лю и исследователи внесли целенаправленные улучшения в новый высокоэффективный штамм витамина B_{12} *E. adhaerens* S305 посредством анализа генома и транскриптома. Исследование показало, что ген биосинтетического пути витамина B_{12} в штамме S305 очень похож на ген в штамме Casida A. При сверхэкспрессии ключевых генов cobA и cobT выход витамина B_{12} штаммами S305 значительно улучшился. Ван и другие повысили экспрессию ключевого гена cysG, который отвечает за превращение уропорприногена III в прекаротен-2 в качестве фермента, ограничивающего скорость. В то же время гиперэкспрессия генов cobS и cobN (компонента комплекса кобальт-хелазы) увеличилась в 6,2 раза и в 2,9 раза соответственно.

В последние годы исследователи постепенно внедрили методы метаболической инженерии для преобразования бактерий с целью дальнейшего увеличения продуктивности и снижения себестоимости производства. Ослабляя или выбивая эти коммутационные элементы с помощью генной инженерии, ожидается, что это высвободит ингибирование экспрессии последующих генов, тем самым улучшая синтез продукта. Например, сообщалось, что производство витамина B_{12} значительно увеличилось за счет мутаций с переключением рибозы в грамположительных

пропионовокислых бактериях. Были использованы технология генной инженерии для выполнения трансформации экспрессии гена регулятора кислорода b12fla в бактериях адгезивного ряда и успешно культивировали штамм мутантной экспрессии. В эксперименте по ферментации выход витамина B_{12} мутантного штамма был на 8,9% выше, чем у дикого штамма. Аналогичным образом, Лю и другие успешно усилили биосинтез витамина B_{12}, выбив ген синтазы Сирохаема cysG в штамме *E. Adhaerens* Casida A и ослабив ключевой ген hemE в пути синтеза гема, в то время как это не оказывало существенного влияния на рост штамма.

В последние годы, с развитием синтетической биологии, исследователи разработали генетические инструменты для *S. meliloti*, что в определенной степени улучшило производственные показатели его витамина B_{12} и заложило основу для дальнейшей метаболической инженерии. Исследователи разработали набор инструментов для генной инженерии C12KGET на основе Cas12k, который является инструментом редактирования генов, сочетающим в себе характеристики системы CRISPR и транскапазы, которые могут реализовать направленную интеграцию больших фрагментов ДНК без создания двухцепочечного разрушения ДНК, особенно он подходит для бактерий с низкой эффективностью корекомбинации. С помощью этого инструмента можно достичь интеграции генома фрагментов до 10 кб с эффективностью до 100%. В *S. meliloti* C12KGET был успешно использован для переэкспрессии генов синтетических путей витамина B_{12} и блокирования конкурирующих путей, что в конечном итоге увеличило производство витамина B_{12} (массовая фракция) на 25%. Тем не менее, C12KGET имеет ограничение в том, что он не может точно редактировать. По этой причине Лю и ученые способствовали редактированию генов штамма с высоким содержанием витамина B_{12} *S. meliloti* 320 через CRISPR/Cas12eGET, а также путем оптимизации промотора и использования плазмид с низким содержанием копий. Режущий эффект Cas12e был улучшен, тем самым повышая эффективность преобразования и точного редактирования. В то же время они выбили ген ku, снизив конкуренцию за исправление неоднородного терминального соединения (NHEJ) и еще больше повысив эффективность точного редактирования. Эти результаты представляют новую платформу для метаболической инженерии штаммов с низкой способностью к гомогенной рекомбинации. Хотя эффективность интеграции транслоказы, связанной с CRISPR, высока, она также имеет недостатки целевого иммунитета и коинтеграции плазмид. Считается, что с развитием этой технологии или появлением новых альтернативных технологий более эффективные инструменты редактирования генов будут применены для генетической модификации штамма *S. meliloti* в будущем.

Из-за сложности генетической модификации *S. meliloti* раннее улучшение его продуктивности в основном зависит от мутагенного отбора. В отличие от традиционного скрининга с плоским экраном, недавнее исследование создало инновационную систему скрининга с помощью рибозных переключателей, которая значительно повышает эффективность скрининга высокопродуктивных мутантов. Саи и его коллеги использовали витамин B_{12}-зависимый элемент btuB рибозы (полученный из *Salmonella*), чтобы соединить его с отчетным геном для создания флуоресцентной библиотеки штаммов, которая может реагировать на концентрацию витамина B_{12} в клетках. Когда мутагенный штамм производит более высокий уровень B_{12}, рибозный переключатель связывается с B_{12} и прекращает передачу гена отчета, а флуоресцентный сигнал ослабевает. Используя эту отрицательную корреляцию, исследователи использовали проточные цитометры для быстрого отбора особей с низкой флуоресценцией (т.е. высоким выходом B_{12}) в огромной мутагенной флоре. В сочетании с методом атмосферной мутации плазмы комнатной температуры (ARTP) для улучшения плотности случайных мутаций команда эффективно отсеивала несколько мутантных штаммов с лучшим выходом, чем исходные бактерии, примерно в 6×10^7 мутагенных бактерий. Значение титрования витамина B_{12} у одного из мутантов *S.*

meliloti MC5-2 достигло (156±4,2) мг/л, что на 21,9% выше, чем у родительского SM320. Кроме того, в исследовании также были проанализированы генетические мутации высокопродуктивных штаммов с помощью тестирования всего генома, что дает новые идеи для повышения продуктивности витамина B_{12} с помощью метаболической инженерии. Китайские исследователи разработали высокопропускную платформу скрининга на основе гибридных биосенсоров РНК-белка, которая направлена на скрининг высокопроизводящего штамма витамина B_{12} *S. meliloti* 320. Путем оптимизации динамического диапазона и рабочей концентрации датчика был успешно реализован быстрый скрининг биосинтеза витамина B_{12}. В последние годы появилось множество технологий непрерывной эволюции in vivo. По сравнению с традиционной индукцией физических и химических мутаций, время и частота мутации можно лучше контролировать. Сочетание технологии непрерывной эволюции in vivo с высокопроизводительным скринингом является перспективным направлением в будущем.

Как один из традиционных методов разведения микробов, мутагенная технология демонстрирует важный потенциал для улучшения выхода микробных метаболитов. Сяо Чжицян с коллегами использовали технологию мутации плазмой комнатной температуры (ARTP) нормального давления у *E. adhaerens* и успешно выделили высокопродуктивный мутантный штамм 46H-1, увеличивший выход витамина B_{12} на 24,8% (массовая фракция). Wang с учеными использовали технологию мутации ARTP для установки радиочастотной мощности 120 Вт, скорости потока гелия 10 л/мин, расстояние обработки составляло 2 мм, а время - от 0 до 110 с. После обработки ячеек *E. adhaerens* производство витамина B_{12} в варианте BCA-24 значительно увеличилось с 65,64 мг/л до 104,54 мг/л.

Согласно исследованиям, концентрация витамина B_{12} в ферментационной жидкости высокопродуктивных мутантов *Pseudomonas* может достигать 250-280 мг/л, что значительно выше, чем у других бактерий. Однако инструменты генетической работы природных штаммов *P. denitrificans* не имеют инструментов генетической манипуляции, процесс ферментации сложный, а требования к культуральной среде высоки. После генетической трансформации множественные стратегии ферментации в системе *Pseudomonas* значительно влияют на выработку витамина B_{12}, который также является важной частью инженерного совершенствования. Исследования 2015 года показали, что использование солодового сиропа и кукурузного сиропа в качестве основного субстрата, а также сочетание анализа поверхности отклика для оптимизации ферментационной среды значительно увеличили выход витамина B_{12} *P. denitrifican* в ферментационном резервуаре 12 $м^3$. Оптимизированный выход витамина B_{12} составлял (198,27±4,60) мг/л, что сопоставимо с продуктивностью рафинированной сахарозы и значительно выше, чем у свеклы, что доказывает потенциал бактерий *P. denitrificans* в промышленном производстве витамина B_{12}. Ся и другие исследовали влияние бетаина на метаболизм витамина B_{12} *P. denitrificans*. Результаты исследований показывают, что бетаин является незаменимым донором метила в биосинтезе витамина B_{12}, однако глицин, вырабатываемый в то же время, значительно подавляет рост клеток. В исследовании использовалась сравнительная метаболомика, чтобы обнаружить, что бетаин может активно регулировать выработку прекурсоров и промежуточных продуктов витамина B_{12}, тем самым способствуя биосинтезу витамина B_{12}. Кстати, Ли и другие использовали технологию iTRAQ для проведения протеомного анализа и обнаружили, что бетаин может усилить путь биосинтеза витамина B_{12} в *P. denitrificans*. Результаты их исследований показывают, что бетаин может значительно увеличить экспрессию ферментов, связанных с биосинтезом витамина B_{12}.

Китайские ученые изучили эффект ферментации различных источников углерода (мальтозы, сахарозы, глюкозы, фруктозы) на ферментацию бактерий, продуцирующих витамин B_{12}, *E. adhaerens*. Используя анализ динамической модели, было показано, что

сахароза является лучшим источником углерода, который может значительно увеличить выход витамина B_{12} до 115 мг/л, что является полезным для промышленного производства.

Контроль растворенного кислорода чрезвычайно важен для аэробных синтетических бактерий. Синтез витамина B_{12} является высоко потребляющим АТФ процессом. Увеличение концентрации кислорода в клетке может активировать цикл трикарбоновых кислот, чтобы обеспечить больше АТФ для клетки.

Для механизма накопления витамина B_{12} Ли и другие ученые прояснили физиологический и метаболический механизм накопления витамина B_{12} в *E. adhaerens Casida* A в условиях с ограниченным содержанием кислорода с помощью транскриптомики и метаболомического анализа. Исследование показало, что ограничение кислорода усиливает транспорт и емкость хранения кислорода *E. adhaerens*, повышая экспрессию белка, связывающего гем (Hmp), тем самым способствуя биосинтезу и накоплению витамина B_{12}.

Таким образом, внедрение результатов различных исследований, от улучшения метаболического пути, трансформации конкурентного пути, разработки генетических инструментов до высокопроизводительного скрининга и оптимизации ферментации, может способствовать улучшению выхода микробного витамина B_{12}. В то же время, благодаря передовой технологии ферментации, эти достижения ускорят развитие промышленного биопроизводства витамина B_{12}. В будущем, с внедрением методов синтетической биологии и систематической биологии, станет возможной направленная оптимизация и динамическое регулирование общего синтетического пути витамина B_{12}, открыв новую главу для достижения более высокого уровня выхода ферментации витамина B_{12}.

9.8. Перспективные направления биотехнологии B_{12}

Одним из важнейших направлений является создание функциональных пищевых продуктов с естественно повышенным содержанием витамина B_{12} с помощью молочнокислых бактерий.

Современные биотехнологические подходы включают:

- **синтетическую биологию** — создание синтетических оперонов для биосинтеза B_{12}, оптимизацию регуляторных элементов, использование системы CRISPR/Cas9 для точечной модификации генов;
- **метаболическую инженерию** — увеличение пула предшественников (сукцинил-КоА, глицин, 5-аминолевулиновая кислота), снятие обратной регуляции, оптимизацию условий ферментации.

Витамин B_{12} широко используется для производства лекарственных препаратов и пищевых добавок. Он выпускается в форме таблеток (для перорального приёма) и растворов для инъекций (внутримышечно или внутривенно).

Благодаря высокой растворимости и эффективному механизму абсорбции B_{12} рассматривается как перспективная система для пероральной доставки лекарств. Ведутся исследования по использованию B_{12} в качестве транспортной молекулы для направленной доставки других терапевтических веществ.

В настоящее время проводится клиническое исследование (проект OB_{12}) в первичной медико-санитарной помощи с целью сравнения эффектов перорального и внутримышечного введения B_{12} у пациентов с дефицитом витамина. Ожидаемые результаты должны определить, является ли пероральный приём B_{12} жизнеспособной альтернативой инъекциям с учётом качества жизни пациента.

В рандомизированных клинических исследованиях, квазиэкспериментальных и наблюдательных исследованиях витамин B_9 (фолат) вводился дополнительно к витамину B_{12} и химиотерапевтическому препарату пеметрекседу. Такое сочетание позволяет снизить токсичность химиотерапии.

Витамин B_{12} добавляют в готовые завтраки, растительное молоко, соевые продукты и другие продукты для профилактики дефицита, особенно у веганов и вегетарианцев. Перспективной альтернативой является создание функциональных продуктов питания (например, на основе сои), биообогащённых витаминами с использованием штаммов лактобацилл, которые могут производить соединения с B_{12}-активностью. Таким образом становится возможным естественное (без добавок) обогащение ферментированных молочных продуктов витаминами группы В.

Согласно исследованию, проведённому в Западной Индии, потребление воды, очищенной системой обратного осмоса, положительно коррелировало с дефицитом витамина B_{12}. Исследование случай-контроль показало, что вегетарианская диета, тёмный цвет лица, происхождение из низкого социально-экономического слоя, а также употребление воды, обработанной обратным осмосом, были независимо связаны с дефицитом B_{12} у взрослых.

Витамин B_{12} добавляется в корма для сельскохозяйственных животных, особенно для жвачных (крупный рогатый скот, овцы, козы), а также для свиней и птицы, с целью профилактики дефицита, улучшения роста и продуктивности.

Вопросы для самоконтроля

1. Кто и с помощью какого метода впервые расшифровал структуру витамина B_{12}, и за что была присуждена Нобелевская премия?
2. Опишите общую структуру кобаламина. Какой металл входит в его состав и почему витамин имеет красный цвет?
3. Перечислите основные формы витамина B_{12}. Какая из них является синтетической и наиболее стабильной, а какие выполняют роль коферментов в организме человека?
4. В каких двух ключевых метаболических реакциях участвуют аденозилкобаламин и метилкобаламин? Какие ферменты они активируют?
5. Каковы последствия дефицита витамина B_{12} для кроветворной и нервной систем? Что такое мегалобластная анемия и фуникулярный миелоз?
6. Почему растения и водоросли (например, спирулина) не могут служить надёжным источником активного витамина B_{12} для человека?
7. Опишите путь всасывания витамина B_{12} от поступления с пищей до попадания в кровь. Какую роль играет «внутренний фактор Касла»?
8. Почему дефицит B_{12} может развиться даже при его достаточном поступлении с пищей? Назовите основные причины мальабсорбции.
9. Какие группы населения находятся в зоне наибольшего риска развития дефицита кобаламина?
10. Объясните парадокс: почему при некоторых заболеваниях (например, раке печени) высокий уровень B_{12} в крови может сопровождаться симптомами его дефицита?
11. Какое соотношение бактерий в кишечнике является продуцентами, а какое — ауксотрофами по витамину B_{12}? Что означает термин «ауксотроф»?
12. Назовите не менее трёх видов бактерий-продуцентов B_{12}, обитающих в кишечнике человека.
13. В чём принципиальное отличие аэробного пути биосинтеза B_{12} от анаэробного? Приведите примеры микроорганизмов для каждого пути.
14. Какие два ключевых предшественника (метаболита) лежат в основе биосинтеза корринового кольца витамина B_{12}?
15. Какие микроорганизмы считаются предпочтительными для пищевых применений благодаря статусам GRAS и QPS, и почему *Pseudomonas denitrificans* не рекомендуется использовать для обогащения продуктов питания?
16. Что такое ко-культивирование в биотехнологии B_{12} и какое преимущество оно даёт (приведите пример с фолатом)?

17. Как молочнокислые бактерии и пропионовокислые бактерии могут использоваться для создания функциональных продуктов питания с B_{12}?

18. Какие современные инструменты синтетической биологии и метаболической инженерии применяются для повышения выхода витамина B_{12}?

19. Для чего витамин B_{12} используется в комбинированной терапии с препаратом пеметрексед при лечении рака?

20. Согласно исследованиям в Западной Индии, как использование воды обратного осмоса (RO) связано с уровнем витамина B_{12}?

Глава 10. Общая характеристика витамина С и его биологическая роль в организме человека

10.1. Исторические аспекты изучения витамина С

Задолго до открытия витамина С человечество столкнулось с тяжелейшим заболеванием — цингой (скорбутом). Особенно широкое распространение цинга получила в эпоху Великих географических открытий (XV–XVIII века). Во время длительных морских путешествий, когда рацион моряков состоял преимущественно из сухарей, солонины и вяленой рыбы (и практически не содержал свежих фруктов и овощей), цинга косила экипажи не менее жестоко, чем штормы и кораблекрушения. В XVI–XVIII веках от цинги погибло больше моряков, чем от всех морских сражений вместе взятых. Например, в экспедиции Васко да Гамы (1497–1499) из 160 человек экипажа 100 умерли от цинги.

Симптомы**,** как теперь известно, результат дефицита аскорбиновой кислоты: разрушение коллагена (кровоточивость дёсен, выпадение зубов), ломкость сосудов (гематомы, тёмно-красные пятна на коже), нарушение заживления ран, вялость, отёки суставов.

Древние египтяне, финикийцы, викинги, русские полярные мореходы (поморы) использовали хвою, клюкву, морошку и квашеную капусту как средство от «скорбута». Однако эти знания носили разрозненный и несистематический характер.

Не зная химической структуры, шотландский военно-морской врач Джеймс Линд в 1747 году поставил один из первых в истории контролируемых клинических испытаний. На борту корабля «Солсбери» он отобрал 12 моряков с цингой, разделил их на 6 пар и давал каждой паре разные добавки к стандартному рациону:

- Сидр
- Эликсир витриола (серная кислота)
- Уксус
- Морскую воду
- Смесь пряностей и ячменной воды
- Два апельсина и один лимон в день

Результат: через 6 дней моряки, получавшие цитрусовые, практически полностью выздоровели, в то время как остальные продолжали болеть. Линд опубликовал свой труд «Трактат о цинге» в 1753 году, однако Королевский флот внедрил регулярную выдачу лимонного сока матросам только спустя 42 года, в 1795 году, после дополнительных подтверждений.

Норвежские врачи Аксель Холст и Теодор Фрёлих в 1907 году впервые вызвали цингу у морских свинок, доказав, что заболевание вызвано отсутствием определённого фактора питания, а не инфекцией (как тогда предполагали некоторые учёные). Морские свинки, как и люди, не синтезируют витамин С — это стало идеальной моделью. В 1928 году венгерский биохимик Альберт Сент-Дьёрдьи (Нобелевская премия 1937 года) выделил из надпочечников быка, из апельсинов и капусты кристаллическое вещество с формулой $C_6H_8O_6$. Сначала он назвал его «игно́з» (от греч. *Ignos* — неизвестный), а затем «гексуроновая кислота». Он заметил его сильные восстанавливающие свойства, но ещё не знал, что это и есть антискорбутный витамин. Английский химик Норман Хеуорс (Нобелевская премия 1937 года по химии) и его группа в Бирмингемском университете определили точную структуру витамина С: это лактон глюконовой кислоты с эндиольной группой (–C(OH)=C(OH)–), обеспечивающей сильные восстановительные свойства. Одновременно и независимо швейцарский химик Тадеус Рейхштейн (также удостоенный Нобелевской премии позже за другие работы) синтезировал витамин С химическим путём. Хеуорс и Рейхштейн показали, что активной является L-аскорбиновая кислота**,** в то время как D-изомер практически неактивен (около 5% активности). L-конфигурация объясняет, почему большинство животных

(которые синтезируют L-аскорбинат из D-глюкозы) и человек (получающий её с пищей) используют именно этот энантиомер.

10.2. Химическая природа и биохимические функции

Аскорбиновая кислота (от др.-греч. ἀ «не-» + лат. scorbutus «цинга») - органическое соединение с формулой $C_6H_8O_6$ (Рис. 21), является одним из основных веществ в человеческом рационе, которое необходимо для нормального функционирования соединительной и костной ткани. Выполняет биологические функции восстановителя и кофермента некоторых метаболических процессов, является антиоксидантом. Аскорбиновая кислота представляет собой кристаллический порошок белого или бледно-желтого цвета, не имеет запаха и имеет приятный резкий кислый вкус.

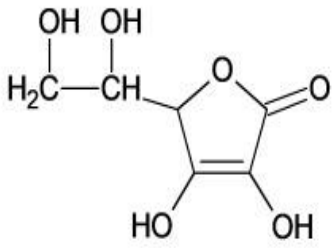


Рисунок 21. Структурная формула витамина С

Аскорбиновая кислота (витамин С) - это виниловая кислота, которая важна не только в медицине, но и в фармацевтической и пищевой промышленности в качестве антиоксиданта (Е300). Естественным и эффективным витамином С является L-(+)-аскорбиновая кислота, которая обладает самой высокой эффективностью из четырех изомеров. Для пищевой промышленности D-изоаскорбиновая кислота также важна как антиоксидант, но она обладает только 5% эффекта витамина С.

Аскорбиновая кислота участвует в образовании коллагена, серотонина из триптофана, образовании катехоламинов, синтезе кортикостероидов. Аскорбиновая кислота также участвует в превращении холестерина в желчные кислоты. Витамин С необходим для детоксикации в гепатоцитах при участии цитохрома Р450. Витамин С сам нейтрализует супероксидный радикал до перекиси водорода. Восстанавливает убихинон и витамин Е. Стимулирует синтез интерферона, следовательно, участвует в иммуномодулировании. Аскорбиновая кислота улучшает всасывание железа из пищи путём преобразования иона Fe^{3+} в Fe^{2+} с образованием комплексного соединения. Тормозит гликозилирование гемоглобина, тормозит превращение глюкозы в сорбит. Существуют данные о нейропротекторном действии аскорбиновой кислоты, в частности, о её положительном действии при преждевременном старении, профилактике возрастного снижения когнитивных способностей и болезни Альцгеймера. При этом, по всей видимости, избегание дефицита витамина в пище оказывает более положительное влияние, чем употребление больших доз в качестве добавок к здоровому рациону. Аскорбиновая кислота биохимически образуется через пентозофосфатный путь. В окислительной фазе глюкоза окисляется до глюкуроновой кислоты, которая восстанавливается до L-гулоновой кислоты с NADPH. Это соединение лактонизируется путем удаления воды (L-гулофуранолактон) и восстанавливается до аскорбиновой кислоты ферментом L-гулофуранолактоноксидазой путем включения двойной связи.

У людей L-гулофуранолактоноксидаза отсутствует из-за генетического дефекта. Поэтому люди нуждаются в витамине С или аскорбиновой кислоте в качестве микроэлемента из-за его плейотропных свойств, которые связаны с его способностью к переносу электронов. Он функционирует как кофактор для ряда генно-регулирующих и биосинтетических ферментов и является сильным антиоксидантом. Витамин С может обеспечить защиту от

окислительного стресса, повышая способность кожи выводить окислители, сохраняя при этом ее способность отражаться от инфекций.

10.3. Пищевые источники и патология обмена витамина С

Большие количества витамина С были обнаружены в вишне Ацерола, шиповнике и облепихе. Отличными источниками аскорбиновой кислоты являются цитрусовые и фрукты, такие как апельсины, клубника, лимоны, киви и дыни, но и овощи, включая брокколи, цветную капусту, капусту, вареную капусту и брюссельскую капусту, также содержат достаточные ее количества (Табл. 7).

Таблица 7 - Содержание витамина С в продуктах питания

№/№	Содержание	мг/100 г
1	Вишня Ацерола	1650
2	Шиповник (свежие плоды)	1250
3	Облепиха	280
4	Смородина черная	181
5	Болгарский перец(красный)	153
6	Зеленый перец	139
7	Брокколи	95
8	Брюссельская капуста	85
9	Цветная капуста	82
10	Капуста белокочанная(свежая)	60
11	Киви	75
12	Апельсины	55
13	Лимоны	53

Синтетический витамин С входит в форму добавок, которые имеют те же функции и биодоступность, что и органический витамин С, полученный из пищи. Кроме того, добавки витамина С обычно содержатся в структуре аскорбиновой кислоты, но есть и другие структуры, такие как аскорбат кальция, аскорбат натрия, аскорбиновая кислота с биофлаваноидами и другие минеральные аскорбаты, изготовленные для различных групп потребителей. Кроме того, добавки с витамином С также производятся в различных формах, включая порошок, твердые и жевательные таблетки, жидкости и жевательные резинки, чтобы удовлетворить предпочтения различных потребителей.

Дефицит витамина С может привести к цинге — состоянию, характеризующемуся пятнами на коже, отеком в суставах и кровоточащими деснами. К общим симптомам недостатка в организме витамина С относятся: слабость иммунной системы, бледность и сухость кожи, замедленное восстановление тканей после физических повреждений (раны, синяки), потускнение и выпадение волос, ломкость ногтей, вялость, быстрая утомляемость, ослабление мышечного тонуса, ревматоидные боли в крестце и конечностях (особенно нижних, боли в ступнях), расшатывание и выпадение зубов. К кровоточивости дёсен и кровоизлияниям в виде тёмно-красных пятен на коже приводит хрупкость кровеносных сосудов.

С другой стороны, длительный прием высоких доз витамина С приводит к нарушению всасывания витамина B_{12}, повышает концентрацию мочевой кислоты в моче, способствует образованию оксалатных камней в почках и увеличивает концентрацию эстрогенов в крови женщин, получающих эстрогенные препараты. Кроме того, на фоне высоких доз витамина С активируются метаболизирующие его ферменты. Если это происходит во время беременности, то у новорожденного может развиться рикошетная цинга.

10.4. От химического синтеза к биотехнологии

Варианты получения витамина С включают несколько процессов, реализуемых для получения различных ключевых промежуточных продуктов в виде:

- диацетон-2-кето-L-гулоновой кислоты из обычного процесса Рейхштейна;
- 2-кГА из текущих процессов, которые реализуются в промышленных или лабораторных условиях.

Схемы различных процессов, включающих процесс Рейхштейна, обычный двухэтапный процесс ферментации, новый двухэтапный процесс ферментации и одноступенчатый процесс ферментации, представлен на рисунке 22.

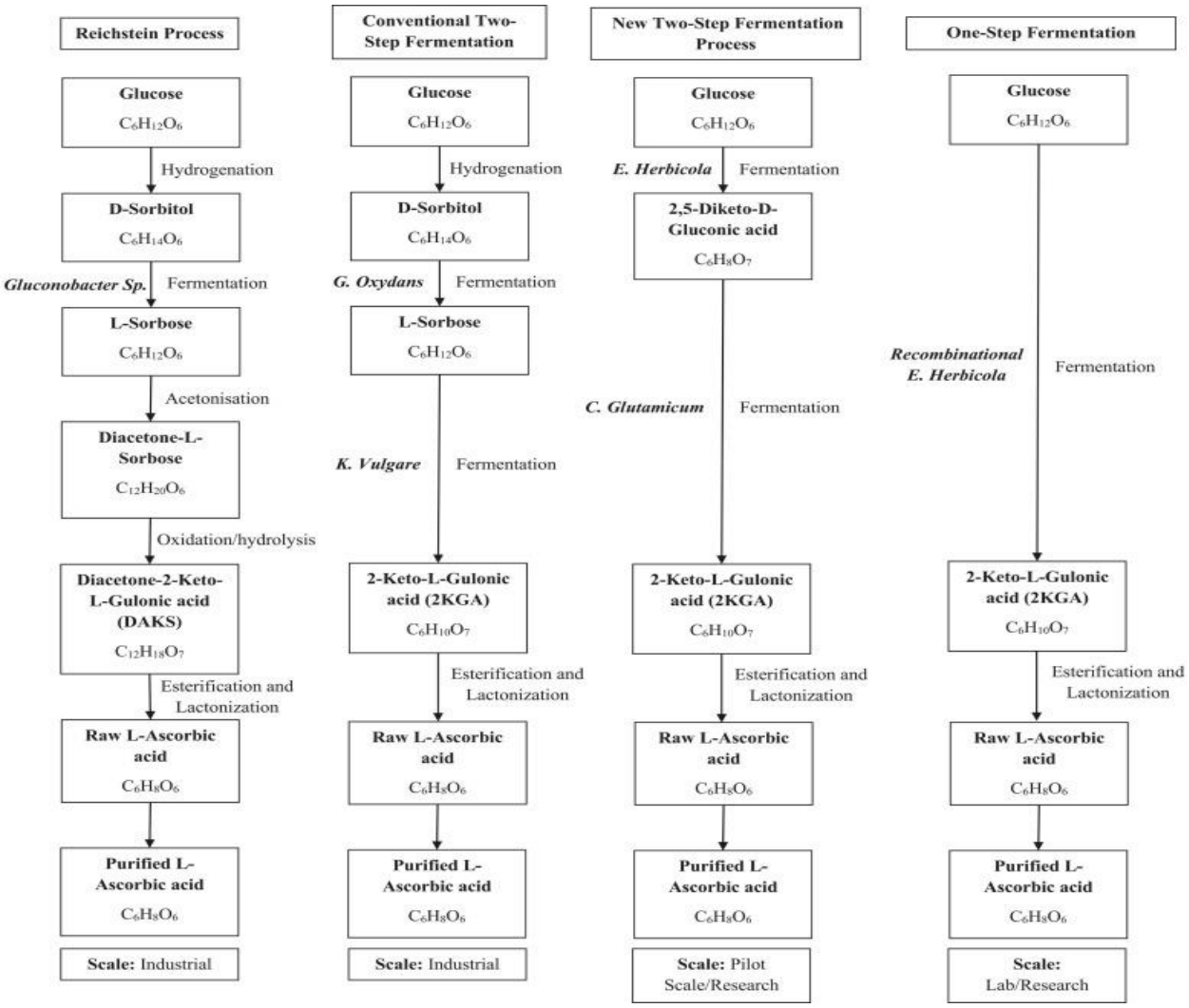


Рисунок 22. Технологии получения витамина С

Процесс Райхштейна был самой ранней технологией в синтезе витамина С, который можно датировать еще 1930-ми годами. Процесс начинается с ферментации D-сорбита ($C_6H_{14}O_6$), который может быть получен путем химического гидрирования глюкозы ($C_6H_{12}O_6$) со штаммом бактерий *Gluconobacter oxydans*, для синтеза L-сорбозы ($C_6H_{12}O_6$) путем удаления 2 атомов водорода. Кроме того, добавление ацетона (C_3H_6O) в смесь для защиты гидроксильных групп в нерелевантных углеродных ветвях приводит к тому, что диацетон-L-сорбоза ($C_{12}H_{20}O_6$) окисляется карбоксильной группой в перманганате калия ($KMnO_4$) с образованием диацетон-2-кето-L-гулоновой кислоты ($C_{12}H_{18}O_7$). Краткое представление об этом процессе представлено на рисунке 23.

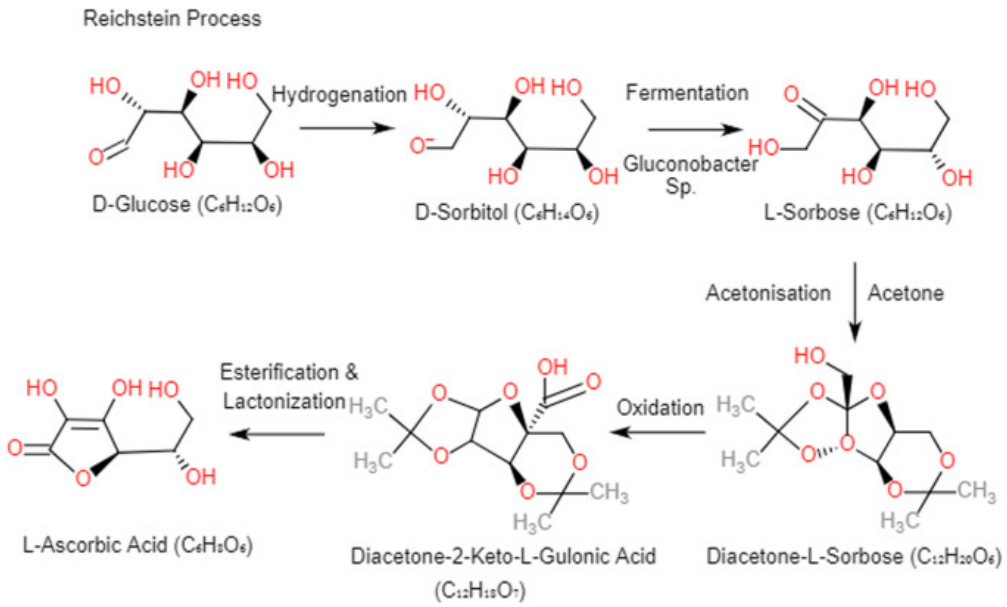


Рисунок 23. Процесс Райхштейна

Процесс Рейхштейна, который был разработан в 1933 году, служил основной технологией производства витамина С в промышленных масштабах в течение примерно 7 десятилетий за счет стабильности процесса до появления двухэтапного процесса ферментации. Переходу к новым технологиям способствовал ряд существенных недостатков этого процесса: высокое потребление энергии из-за требований к высокому давлению и температуре для нескольких этапов; применение высокотоксичных химических веществ (таких как ацетон, гидроксид натрия и серная кислота), вызывающих загрязнение окружающей среды; длительное время производства; высокая стоимость утилизации отходов несмотря на использование дешевого сырья.

Двухэтапный процесс ферментации для синтеза витамина С начинается с преобразования D-сорбита ($C_6H_{14}O_6$) (который может быть получен путем гидрирования глюкозы ($C_6H_{12}O_6$) штаммом *Gluconobacter oxydans H24*, который широко применяется китайскими производителями в паре с ключевым ферментом *PQQ-SLDH* для дегидрогеназы D-сорбита) в L-сорбозу ($C_6H_{12}O_6$). Затем проводится второй этап, который заключается в преобразовании L-сорбозы ($C_6H_{12}O_6$) в 2-кето-L-гулоновую кислоту (2-кГА, $C_6H_{10}O_7$) с помощью штамма *Ketogulonicigenium vulgare*. Краткое описание технологического процесса обычного двухэтапного процесса ферментации показано на рисунке 24.

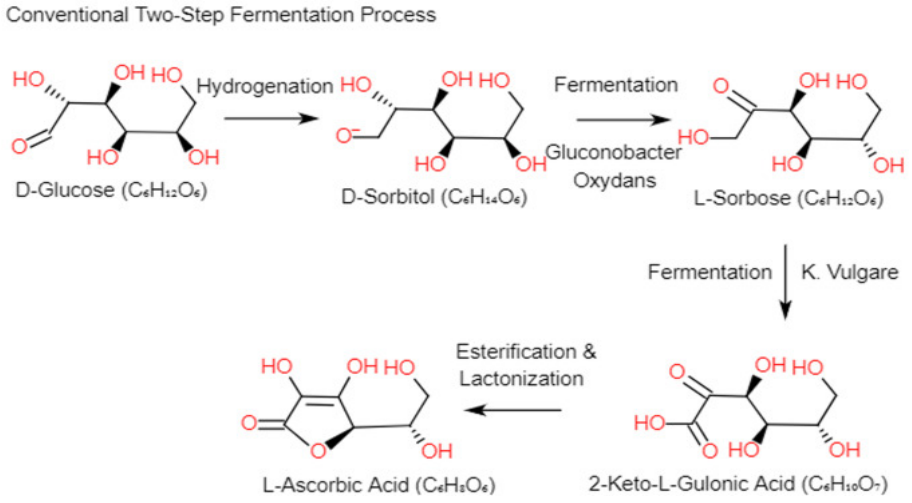


Рисунок 24. Двухэтапный синтез витамина С

Текущее производство витамина С, применяемое в промышленных масштабах, является обычным двухэтапным процессом ферментации. Это в основном связано с тем, что двухступенчатая ферментация является относительно отработанной технологией процесса в мягких условиях, в то время как недостатки этого технологического процесса заключаются в том, что для достижения того же продукта, заменяющего процесс Райхштейна, необходимы дополнительные шаги на более позднем этапе, когда процесс будет завершен. Кроме того, технология этого варианта процесса требует ферментации смешанных культур, что приводит к сложности контроля оптимального баланса между различными видами микроорганизмов, и загрязнение ферментации вряд ли будет обнаружено.

Новая двухэтапная технология процесса ферментации разработана для улучшения обычного двухэтапного процесса ферментации, содержит относительно больше шагов для достижения ключевого промежуточного продукта 2-кГА. Процесс новой двухэтапной ферментации начинается с ферментации глюкозы ($C_6H_{12}O_6$) штаммом *Erwinia herbicola* для получения синтеза 2,5-дикето-D-гулоновой кислоты ($C_6H_8O_7$). Кроме того, второй этап ферментации проводится штаммом *Corynebacterium glutamicum* с образованием 2-кГА ($C_6H_{10}O_7$). В этом процессе меньше шагов по сравнению с обычной двухступенчатой ферментацией. Краткое описание нового двухэтапного процесса ферментации показано на рисунке 25.

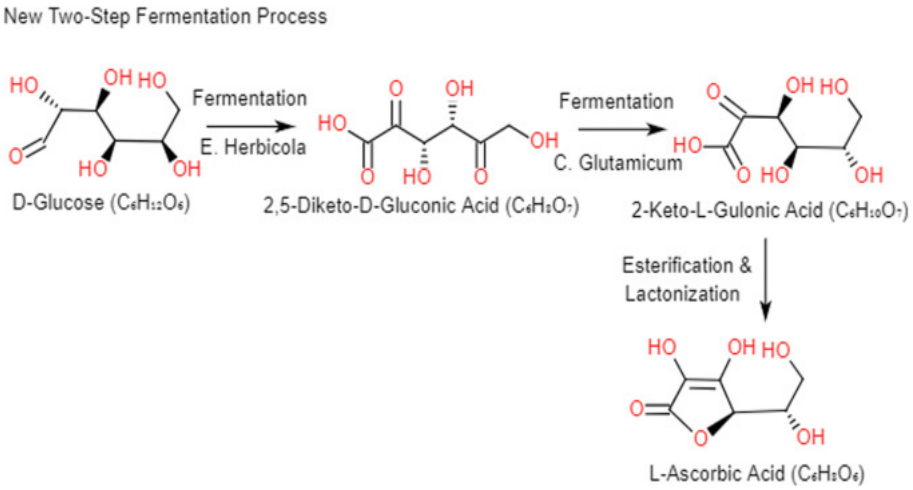


Рисунок 25. Новый двухэтапный ферментивный процесс получения витамина С

Появление недавно разработанной двухэтапной технологии процесса ферментации с D-глюкозой в качестве субстрата характеризуется простыми шагами реакции. Тем не менее, и у него существуют различные недостатки, которые включают в себя наличие промежуточного продукта, который является нестабильным и связан с ферментами низкой активности.

В связи с этим, для уменьшения количества шагов ферментации была разработана одноступенчатая ферментация, в которой процесс начинается с единственной ферментации глюкозы ($C_6H_{12}O_6$) с использованием рекомбинационного штамма *Erwinia herbicola* для прямого получения 2-кГА ($C_6H_{10}O_7$). Краткое описание процесса одноэтапного процесса ферментации показано на рисунке 26.

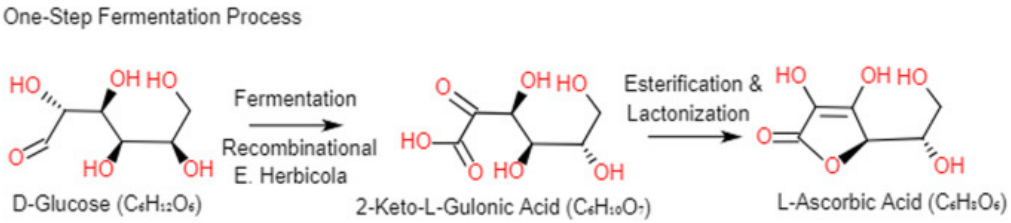


Рисунок 26 – Одноэтапный процесс ферментации витамина С

Учеными также были исследованы и разработаны и другие методики по синтезу 2-кГА из глюкозы или D-сорбита в одноэтапном процессе ферментации в лабораторных масштабах. Несмотря на значительный прогресс в лабораторных исследованиях, промышленное внедрение одностадийных процессов сталкивается с рядом вызовов, таких как устойчивость рекомбинантных штаммов, а также то, что плазмидные системы могут теряться в процессе длительной ферментации без селективного давления. Тем не менее, учитывая уровень мирового производства витамина С в 180–200 тысяч тонн в год с ежегодным ростом 5–6%, даже небольшое снижение затрат при переходе на одностадийную технологию даст многомиллионный экономический эффект.

10.5. Промышленное применение аскорбиновой кислоты

В рыночной экономике витамина С, основанной на цене продажи, можно увидеть, что в течение 2018 года наблюдалось снижение цен в основном из-за того, что ведущие китайские производители продавали его по более низкой цене, основанной на промышленном применении двухэтапного процесса ферментации, который снижает производственные затраты по производству витамина С по сравнению с обычным процессом Рейхштейна, а также из-за уменьшения масштабов производства. Тем временем, в течение 2020-2022 годов наблюдался всплеск производства аскорбиновой кислоты во время пандемии COVID-19 из-за увеличения рыночного спроса, когда витамин С был определен как один из способов лечения пациентов с COVID-19.

Тенденция к росту масштабов производства может быть объяснена и тем, что витамин С широко используется во многих отраслях промышленности, таких как фармацевтическая, животноводческая, косметическая и пищевая. Типичные формы продуктов с витамином С выпускаются в виде порошков, масел, а также имеющие кристаллическое и защитное покрытие.

Индустрия личной гигиены и косметических продуктов использует огромное количество витамина С благодаря его антиоксидантным свойствам и свойствам, способствующим здоровью кожи, таким как снижение старения, улучшение появления морщин, дипегментация и предотвращение повреждений от солнца. Так, сыворотка с витамином С используется в уходе за кожей и имеет функции, включая увлажнение, уменьшение покраснения, осветление кожи, предотвращение провисания, успокоение солнечных ожогов, помощь в заживление ран, уменьшение гиперпигментации, выработку коллагена и уменьшение кругов под глазами.

Типы витамина С, которые применяются в личной гигиене и косметической промышленности, включают различные металлические или минеральные аскорбаты, такие как аскорбаты магния, аскорбат кальция, аскорбат натрия, аскорбилфосфат магния и аскорбилфосфат натрия. Кроме того, различные формы проявления витамина С в косметике также привлекли внимание из-за увеличения биодоступности, которое включает в себя местные препараты, такие как магний аскорбилфосфат (MAP) и аскорбил-6-пальмитат, которые являются этерифицированными формами витамина С, устраняющими нестабильность чистого витамина С.

В пищевой промышленности витамин С широко используется в производстве продуктов питания и напитков, таких как хлопья, фруктовые соки, замороженные фрукты и сухофрукты вследствие его пользы для здоровья и необходимости потреблять с питанием. Кроме того, витамин С также выполняет функцию консерванта (антиоскиданта) для сохранения продуктов питания, включая варенье, вяленое мясо, желе и хлеб, чтобы избежать ухудшения их качества. Известно также, что витамин С, добавленный в пищевые продукты, способен сохранять цвет пищи (например, он поддерживает красный цвет мяса за счет ингибирования окисления липидов).

Как известно, витамин С необходим для синтеза коллагена. Коллаген — это структурный белок, который жизненно важен для соединительных тканей, кожи и

кровеносных сосудов. В связи с чем, фармацевтические препараты и косметические средства, содержащие витамин С, могут использоваться для поддержки образования коллагена во время заживления ран и восстановления тканей. Так, витамин С в высоких дозах используется для лечения и профилактики таких расстройств, как атеросклероз, глаукома, рак, сердечно-сосудистые заболевания, инсульт и диабет.

Кроме того, различные вариации витамина С в качестве активного ингредиента в фармацевтических дозах включаются в мультивитаминные добавки с минералами, эликсиры, сиропы, инъекционные и педиатрические капли. В этих продуктах витамин С используется с целью профилактики и лечения обычной простуды и аутизма.

Всё это способствует созданию огромного рынка, на котором фармацевтические и медицинские фирмы и компании продвигают использование и потребление витамина С в различных формах, которые подходят для различных групп людей.

Кроме того, сырье для животных также требует добавления витамина С, улучшая их состояние. Так, витамин С, способен повысить антистрессовую способность животных, что было показано в экспериментальном исследовании, в котором дополнительный витамин С давался цыплятам-бройлерам в дозе 150 мг/кг рациона. Это важно, так как стресс окружающей среды, испытываемый животными, вызывает окислительный стресс и дисбаланс в антиоксидантах, который негативно влияет на здоровье животных.

Вопросы для самоконтроля

1. Какое заболевание развивается при длительном дефиците витамина С, и почему в эпоху Великих географических открытий оно было особенно распространено среди моряков?
2. В чём заключался ключевой эксперимент Джеймса Линда в 1747 году, и почему его результаты не были сразу внедрены в практику Королевским флотом?
3. Почему морские свинки стали идеальной экспериментальной моделью для изучения цинги, в отличие от большинства других животных?
4. Кто и из каких источников впервые выделил кристаллический витамин С? Какое временное название дали этому веществу?
5. Почему из четырёх возможных изомеров аскорбиновой кислоты биологической активностью обладает только L-форма, а D-изомер практически неактивен?
6. Какая химическая особенность строения аскорбиновой кислоты (какая группа) обеспечивает её сильные восстановительные свойства и роль антиоксиданта?
7. Почему люди (в отличие от большинства животных) нуждаются в постоянном поступлении аскорбиновой кислоты с пищей? Какой фермент отсутствует у человека?
8. Перечислите не менее пяти ключевых биохимических функций витамина С в организме человека (синтез каких веществ, участие в метаболизме).
9. Как витамин С влияет на всасывание железа? Каков молекулярный механизм этого процесса (превращение ионов)?
10. Назовите топ-5 пищевых источников витамина С (в порядке убывания содержания на 100 г продукта). Какое растение содержит рекордное количество — до 1700 мг%?
11. Опишите основные симптомы цинги. Почему при дефиците витамина С возникает кровоточивость дёсен и подкожные гематомы?
12. Каковы последствия длительного приёма сверхвысоких доз витамина С (риски для почек, взаимодействие с B_{12}, эффект «рикошета» у новорождённых)?
13. В чём заключались основные недостатки чисто химического синтеза витамина С по методу Рейхштейна (1934 год)?
14. Опишите классический двухступенчатый ферментационный метод производства витамина С. Какие микроорганизмы используются на первом и втором этапах?
15. В чём суть «процесса Соноямы» (1982 год) и какие бактерии в нём участвуют для превращения глюкозы в 2-кето-L-гулоновую кислоту?

16. Какая главная цель современной биотехнологии витамина С? Что такое «одностадийный процесс» и почему он экономически привлекателен?

17. Какие гены встраивают в *Gluconobacter oxydans*, чтобы наделить его способностью превращать L-сорбозу в 2-KLG, и какую роль играет кофактор PQQ?

18. Какой прорыв был достигнут в 2024 году при конструировании штаммов *G. oxydans* для ко-утилизации глюкозы и сорбита? Какой титр 2-KLG был получен?

19. В чём заключается альтернативный подход к синтезу витамина С с использованием *E. coli* и растительного пути *Arabidopsis thaliana* (путь Смирноффа-Уиллера)?

20. Что такое AA-2G (L-Аскорбиновая кислота 2-O-α-D-глюкозид), и какой фермент из *Bifidobacterium longum* используется для его биокаталитического синтеза?

Заключение

Настоящее пособие посвящено комплексному рассмотрению водорастворимых витаминов – от их фундаментальной биохимической роли до передовых методов промышленного производства. Проведенный анализ позволяет сформулировать системные выводы, отражающие современное состояние и перспективы данного сегмента биотехнологии биологически активных веществ (БАВ).

Неспособность организма человека и животных синтезировать большинство витаминов группы В и витамин С в достаточном количестве создает объективную и постоянную потребность в их экзогенном поступлении. Гипо- и гипервитаминозы, детально описанные в пособии, наглядно демонстрируют высокую «цену» дисбаланса этих коферментов и метаболитов, что подчеркивает социально-экономическую значимость их производства. Биотехнология, в отличие от чистой химии, предлагает стратегию, воспроизводящую естественный путь их создания – биосинтез, но в контролируемых и масштабируемых условиях.

Эволюция взглядов на микробный синтез витаминов прошла путь от признания его ограниченной роли в кишечнике (где синтез бактериями, например, витамина К и некоторых витаминов группы В, важен, но недостаточен для нужд хозяина) до осознания потенциала микроорганизмов как основных промышленных продуцентов. В результате работы многих исследователей на данный момент идентифицированы и внедрены в производство ряд высокоэффективных штаммов. Молочнокислые бактерии представляют особый интерес, выступая в роли естественных биоусилителей питательной ценности пищи и одновременно как перспективные объекты для метаболической инженерии. Так, в «темпе» (традиционном индонезийском ферментированном с помощью молочнокислых бактерий продукте из соевых бобов) содержание рибофлавина удваивается, а ниацина – увеличивается в 7 раз. Это прообраз «in situ» фортификации – обогащения продукта непосредственно в процессе его изготовления без добавления синтетических препаратов. Открытие генов биосинтеза кобаламина у некоторых пробиотических лактобацилл (*L. reuteri*) указывает на возможность создания «витамин-продуцирующих» пробиотиков. Это открывает новые горизонты для персонализированного питания и нутрицевтики. Для ряда витаминов (пантотеновая кислота, пиридоксин) необходима дальнейшая оптимизация штаммов и процессов для достижения конкурентоспособной продуктивности.

Разработка эффективных, малозатратных и масштабируемых методов выделения и очистки витаминов из культуральной жидкости остается критически важной для экономики всего процесса их биотехнологического производства. Эффективными решениями в этом плане могут стать широкое внедрение инструментов синтетической биологии, системной биологии и машинного обучения для точного проектирования метаболических путей и регуляторных сетей у промышленных штаммов.

Рыночная динамика (рост доли ферментированных витаминов с 5% до 75% за 13 лет) и прогнозы значительного роста рынка (до ~94 млрд долларов к 2033 г.) свидетельствуют о высокой инвестиционной привлекательности сектора. Использование возобновляемого сырья (углеводы) снижает зависимость от нефтехимии. Растущий спрос на продукты натурального происхождения в пищевой, косметической и фармацевтической отраслях создает устойчивый рынок сбыта для витаминов микробного происхождения.

Биотехнологическое производство водорастворимых витаминов является эталонным примером успешной конвергенции фундаментальных биологических знаний и инженерных дисциплин. Оно эволюционировало от использования природных продуцентов к созданию сконструированных микробных клеточных фабрик. Этот сектор не только обеспечивает глобальную потребность в жизненно важных нутриентах, но и служит драйвером для развития пищевой, фармацевтической и кормовой промышленности, отвечая на вызовы в области здоровья, питания и экологии. Дальнейший прогресс будет связан с углублением междисциплинарных исследований, внедрением цифровых технологий и созданием новых интегрированных биотехнологических платформ, что укрепит роль биотехнологии как ключевого поставщика широкого спектра высокоценных БАВ для экономики будущего.

Список сокращений

АДФ — аденозиндифосфат
АМФ — аденозинмонофосфат
АТФ — аденозинтрифосфат
БАВ — биологически активные вещества
ВОЗ — Всемирная организация здравоохранения
ВЭЖХ — высокоэффективная жидкостная хроматография
ГАМК — гамма-аминомасляная кислота
ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота
ЕАЭС — Евразийский экономический союз
МТПФТ-1 — митохондриальный транспортер тиаминпирофосфата 1
НАД⁺/NAD⁺ — никотинамидадениндинуклеотид (окисленная форма)
НАДН — никотинамидадениндинуклеотид (восстановленная форма)
НАДФ⁺/NADP⁺ — никотинамидадениндинуклеотидфосфат (окисленная форма)
НАДФН — никотинамидадениндинуклеотидфосфат (восстановленная форма)
РАМН — Российская академия медицинских наук
РНК — рибонуклеиновая кислота
ТМФ — тиаминмонофосфат
ТПФ — тиаминпирофосфат
ТР ТС — Технический регламент Таможенного союза
ТТФ — тиаминтрифосфат
ФАД — флавинадениндинуклеотид
ФМН — флавинмононуклеотид
цАМФ — циклический аденозинмонофосфат
ЦНС — центральная нервная система
ACP — ацил-переносящий белок (белок-носитель ацила)
AdTPP — аденозилтиаминпирофосфат
AdTTP — аденозилтиаминтрифосфат
ARTP — атмосферная мутация плазмой комнатной температуры (Atmospheric Room Temperature Plasma)
B12fla — бактериальный регуляторный ген биосинтеза кобаламина
Cas — CRISPR-ассоциированный белок (CRISPR-associated protein)
cob — бактериальные гены биосинтеза кобаламина
CRISPR — кластеризованные регулярно расположенные короткие палиндромные повторы (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)
CSF — цереброспинальная жидкость (спинномозговая жидкость)
DHFR — дигидрофолатредуктаза
DMBI — 5,6-диметилбензимидазол
DXP — дезоксиксилулозо-5-фосфат
EGR — глутатионредуктаза эритроцитов
EGRAC — коэффициент активации глутатионредуктазы эритроцитов
FAD — флавинадениндинуклеотид (Flavin Adenine Dinucleotide)
FMN — флавинмононуклеотид (Flavin Mononucleotide)
GFP — зеленый флуоресцентный белок (Green Fluorescent Protein)
GRAS — общепризнанный безопасным (Generally Recognized as Safe)
hSTLV — транспортер биотина (также SMVT)
HCS — голокарбоксилазосинтетаза
hTHTR-1, -2 — переносчики тиамина человека 1 и 2 (human Thiamine Transporters)
hТПФТ — человеческий транспортер тиаминпирофосфата
IBD — воспалительное заболевание кишечника (Inflammatory Bowel Disease)

IF — внутренний фактор Касла (Intrinsic Factor)
iTRAQ — изобарная метка для относительного и абсолютного количественного анализа (Isobaric Tag for Relative and Absolute Quantitation)
Kd — константа диссоциации
LAB — молочнокислые бактерии (Lactic Acid Bacteria)
L-DOPA (L-ДОФА) — леводопа (L-3,4-дигидроксифенилаланин)
MAP — магния аскорбилфосфат
NA — никотиновая кислота (Niacin)
NAm — никотинамид (Nicotinamide)
NHEJ — негомологичное соединение концов (Non-Homologous End Joining)
NK-клетки — натуральные киллеры (Natural Killer cells)
NTD — дефекты нервной трубки (Neural Tube Defects)
PABA — пара-аминобензойная кислота
PalP — пиридоксальфосфат (активная форма витамина B6)
PCC — пропионил-КоА-карбоксилаза
PDXP — пиридоксальфосфатаза
PDXK — пиридоксалькиназа
PLP — пиридоксаль-5'-фосфат (Pyridoxal Phosphate)
PNPO — пиридоксин(амин)фосфатоксидаза
PQQ — пирролохинолинхинон (кофактор)
PROSC — белок, связывающий пиридоксальфосфат
QPS — презумпция безопасности (Qualified Presumption of Safety)
RBS — сайт связывания рибосомы (Ribosome Binding Site)
RFC1 — переносчик восстановленных фолатов 1
RFVT3 — переносчик рибофлавина 3
RNA — рибонуклеиновая кислота
SAM — S-аденозилметионин
SLC (семейство) — семейство переносчиков растворенных веществ (Solute Carrier family)
SMVT — натрий-зависимый поливитаминный транспортер (для биотина и пантотеновой кислоты)
TCII — транскобаламин II
THF — тетрагидрофолат
ThPK — тиаминпирофосфокиназа
WKS — синдром Вернике-Корсакова (Wernicke-Korsakoff syndrome)
А-витаминоз — гиповитаминоз А (пеллагра при дефиците ниацина)
2-KGA (2-кГА) — 2-кето-L-гулоновая кислота (ключевой предшественник витамина С)

Рекомендуемая литература

1. Abano E. E., Dadzie R. G. Simultaneous detection of water-soluble vitamins using the high performance liquid chromatography (HPLC) - a review // Croatian Journal of Food Science and Technology. — 2014. — Vol. 6, No. 2. — P. 116-123.

2. Антонова А. А., Яманова Г. А., Сердюков В. Г. Гигиеническое значение водорастворимых витаминов: учебно-методическое пособие. — Астрахань: Изд-во Астраханского ГМУ, 2021. — 115 с.

3. Blake C. J. Analytical procedures for water-soluble vitamins in foods and dietary supplements: a review // Analytical and Bioanalytical Chemistry. — 2007. — Vol. 389, No. 1. — P. 63-76.

4. Chawla J., Kvarnberg D. Hydrosoluble vitamins // Handbook of Clinical Neurology. — 2014. — Vol. 120. — P. 891-914.

5. Винокурова Н. В., Кузьмичева Н. А., Михайлова И. В. Витамины: учебное пособие. — Оренбург: ОрГМУ, 2022. — 138 с.

6. Gonçalves R., Rodrigues A., Machado A., et al. Recent advances in water-soluble vitamins delivery systems prepared by mechanical processes (electrospinning and spray-drying techniques) for food and nutraceuticals applications: a review // *Foods*. — 2022. — Vol. 11, No. 15. — Art. No. 2211.

7. Громова О. А., Торшин И. Ю., Пронин А. В. Особенности фармакологии водорастворимой формы витамина D на основе мицелл // Фарматека. — 2015. — № 1 (294). — С. 28-35.

8. Коханов А. В., Бисалиева Р. А., Гудинская Н. И. Водорастворимые витамины = Vitamines hydrosolubles : учебное пособие. — Астрахань: Астраханский ГМУ, 2023. — 66 с.

9. Селеменев В. Ф., Рудакова Л. В., Рудаков О. Б. Витамины как объекты пищевой химии и фармакологии: монография. — Воронеж: Научная книга, 2022. — 212 с.

10. Shah A. K., Tappia P. S., Dhalla N. S. Hydrophilic Vitamins in Health and Disease. — Cham: Springer, 2024. — 407 p. — (Advances in Biochemistry in Health and Disease, Vol. 29).

11. Shrivas K., Patel C., Sahu B., et al. Advances and challenges in sample preparation and analytical methods for water-soluble vitamins: application in food, clinical, pharmaceutical samples // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. — 2025. — Vol. 257. — Art. No. 116764.

12. Titova A. V., Nesterenko I. S., Kochkin V. S. Water-soluble vitamins: hypo- and hypervitaminosis in pediatric population // *Pharmaceutics*. — 2025. — Vol. 17, No. 1. — Art. No. 20.

13. Яман М., Чатак Дж., Угур Х. [и др.] Биодоступность водорастворимых витаминов: Обзор. The bioaccessibility of water-soluble vitamins: A review // Trends in Food Science & Technology. — 2021. — Т. 109. — С. 552-563.

Приложение

Рекомендуемые суточные нормы потребления витамина B_1 (МР 2.3.1.0253-21)

Категория населения	**Витамин B_1 (мг/сут)**
Младенцы (0-1 год)	
0-3 месяца	0,3
4-6 месяцев	0,4
7-12 месяцев	0,5
Дети (1-14 лет)	
1-2 года	0,8
3-6 лет	0,9
7-10 лет	1,1
11-14 лет (мальчики)	1,3
11-14 лет (девочки)	1,3
Подростки (15-17 лет)	
15-17 лет (юноши)	1,5
15-17 лет (девушки)	1,3
Взрослые (18-65 лет)	
Мужчины	1,5
Женщины	1,5
Пожилые (старше 65 лет)	
Мужчины и женщины	1,5
Беременные (II-III триместры)	1,7
Кормящие (1-6 мес.)	1,8
Кормящие (7-12 мес.)	1,8

Рекомендуемые суточные нормы потребления витамина B_2 (МР 2.3.1.0253-21)

Категория населения	**Витамин B_2 (мг/сут)**
Младенцы (0-1 год)	
0-3 месяца	0,4
4-6 месяцев	0,5
7-12 месяцев	0,6
Дети (1-14 лет)	
1-2 года	0,9
3-6 лет	1,0
7-10 лет	1,2
11-14 лет (мальчики)	1,5
11-14 лет (девочки)	1,5
Подростки (15-17 лет)	
15-17 лет (юноши)	1,8
15-17 лет (девушки)	1,5
Взрослые (18-65 лет)	
Мужчины	1,8
Женщины	1,8
Пожилые (старше 65 лет)	
Мужчины и женщины	1,8
Беременные и кормящие	
Беременные	2,0
Кормящие	2,1

Рекомендуемые суточные нормы потребления витамина B_5 (МР 2.3.1.0253-21)

Категория населения	Норма (мг/сутки)	Примечания
Дети		
0 – 3 мес.	1	
4 – 6 мес.	1	
7 – 12 мес.	2	
1 – 3 года	2	
4 – 6 лет	3	
7 – 11 лет	4	
Подростки (12–17 лет)		
Юноши и девушки	5	Совпадает с нормой для взрослых
Взрослые		
Мужчины (18–59 лет)	5	
Женщины (18–59 лет)	5	
Старше 60 лет		
Мужчины и женщины	5	Потребность не снижается
Особые периоды (женщины)		
Беременные	6	Дополнительно +1 мг к базовой норме
Кормящие грудью	7	Дополнительно +2 мг к базовой норме

Рекомендуемые суточные нормы потребления витамина B_6 (МР 2.3.1.0253-21)

Категория населения	Норма (мг/сутки)
Грудные дети	
0 – 3 мес.	0,4
4 – 6 мес.	0,5
7 – 12 мес.	0,6
Дети	
1 – 2 года	0,9
3 – 4 года	1,3
5 – 6 лет	1,4
7 – 10 лет	1,7
Подростки	
11 – 13 лет (мальчики)	2,0
11 – 13 лет (девочки)	1,6
14 – 17 лет (юноши)	2,2
14 – 17 лет (девушки)	1,9
Взрослые	
Мужчины (18 – 59 лет)	2,0
Женщины (18 – 59 лет)	2,0
Пожилые (старше 60 лет)	2,0
Беременные	2,2 – 2,5
Кормящие	2,5

Рекомендуемые суточные нормы потребления витамина B_7 (МР 2.3.1.0253-21)

Категория населения	**Норма (мкг/сутки)**
Грудные дети	
0 – 3 мес.	5
4 – 6 мес.	5
7 – 12 мес.	7,5
Дети	
1 – 3 года	8,5
4 – 6 лет	10
7 – 10 лет	15
11 – 14 лет	20
Взрослые	
Мужчины и женщины (18 – 59 лет)	**50**
Пожилые	
Мужчины и женщины (60 – 74 года, 75+ лет)	50
Особые периоды (женщины)	
Беременные	50
Кормящие грудью	60

Рекомендуемые суточные нормы потребления витамина B_9 (МР 2.3.1.0253-21)

Категория населения	**Возрастная группа**	**Норма (мкг/сутки)**
Грудные дети	0 – 6 месяцев	50
	7 – 11 месяцев	60
Дети	1 – 2 года	100
	3 – 10 лет	200
	11 – 14 лет	300 – 350
	15 – 17 лет	400
Взрослые	18 лет и старше (мужчины и женщины)	**400**
Беременные	Независимо от возраста	**600**
Кормящие	Независимо от возраста	**500**

Рекомендуемые суточные нормы потребления витамина B_{12} (МР 2.3.1.0253-21)

Категория населения	**Норма (мкг/сутки)**
Грудные дети	
0 – 6 месяцев	0,4
7 – 12 месяцев	0,5
Дети	
1 – 3 года	0,9
4 – 6 лет	1,2
7 – 10 лет	1,5
Подростки	
11 – 14 лет	2,0
15 – 17 лет	2,5
Взрослые	
Мужчины и женщины (18 лет и старше)	**3,0**
Особые периоды	
Беременные	3,5
Кормящие грудью	3,5

Рекомендуемые суточные нормы потребления витамина С

Категория населения	**Витамин С (мг/сут)**
Младенцы (0-1 год)	
0-3 месяца	30
4-6 месяцев	35
7-12 месяцев	40
Дети (1-17 лет)	
1-2 года	45
3-6 лет	50
7-10 лет	60
11-14 лет (мальчики)	70
11-14 лет (девочки)	60
15-17 лет (юноши)	90
15-17 лет (девушки)	70
Взрослые (18+ лет) и пожилые	
Мужчины (18-65 лет)	100
Мужчины (> 65 лет)	100
Женщины (18-65 лет)	100
Женщины (> 65 лет)	100
Беременные (2-я половина)	+10 (к норме) -> 110
Кормящие матери	+30 (к норме) -> 130

Сынгеева Эржэна Владимировна
Ламажапова Галина Петровна

Биотехнология биологически активных веществ. Водорастворимые витамины

Учебное пособие издано в авторской редакции

Сетевое издание

Ответственный за выпуск – Алимова Н.К.

Учебное издание

Системные требования:
операционная система Windows XP или новее, macOS 10.12 или новее, Linux.
Программное обеспечение для чтения файлов PDF.

Объем данных 3,5 Мб

Принято к публикации «30» апреля 2026 года

Режим доступа: https://izd-mn.com/PDF/31MNNPU26.pdf свободный. – Загл. с экрана. – Яз. рус., англ.

ООО «Издательство «Мир науки»

«Publishing company «World of science», LLC

Адрес:

Юридический адрес – 127055, г. Москва, пер. Порядковый, д. 21, офис 401.

Почтовый адрес – 127055, г. Москва, пер. Порядковый, д. 21, офис 401.

https://izd-mn.com/

ДАННОЕ ИЗДАНИЕ ПРЕДНАЗНАЧЕНО ИСКЛЮЧИТЕЛЬНО ДЛЯ ПУБЛИКАЦИИ НА ЭЛЕКТРОННЫХ НОСИТЕЛЯХ