

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ АВІАЦІЙНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ФАКУЛЬТЕТ ЕКОЛОГІЧНОЇ БЕЗПЕКИ, ІНЖЕНЕРІЇ ТА ТЕХНОЛОГІЙ
КАФЕДРА БІОТЕХНОЛОГІЇ

ДОПУСТИТИ ДО ЗАХИСТУ
Завідувач випускової кафедри
_____ М.М. Барановський
«__» __-_____ 2021 р.

ДИПЛОМНА РОБОТА

(ПОЯСНЮВАЛЬНА ЗАПИСКА)

ЗДОБУВАЧА ВИЩОЇ ОСВІТИ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ «БАКАЛАВР»
СПЕЦІАЛЬНІСТЬ 162 «БІОТЕХНОЛОГІЇ ТА БІОІНЖЕНЕРІЯ»
ОСВІТНЬО-ПРОФЕСІЙНА ПРОГРАМА «ФАРМАЦЕВТИЧНА БІОТЕХНОЛОГІЯ»

**Тема: «Удосконалення технології отримання біологічно активних форм
аскорбінової кислоти»**

Виконавець: студентки групи ФЕБІТ-402

Гринюк А.В.

Керівник: к.т.н., доцент кафедри біотехнології

Петюх Г.П.

Нормоконтролер:

Дражнікова А.В.

КИЇВ 2021

НАЦІОНАЛЬНИЙ АВІАЦІЙНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Факультет екологічної безпеки, інженерії та технологій

Кафедра біотехнології

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

Освітньо-професійна програма «Фармацевтична біотехнологія»

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач випускової кафедри

_____ М.М. Барановський

«__» ____ 2021 р.

ЗАВДАННЯ

на виконання дипломної роботи

Гринюк Алла Віталіївна

1. Тема дипломної роботи: «Удосконалення технології отримання біологічно активних форм аскорбінової кислоти» затверджена наказом ректора від «11» травня 2021 р. № 715/ст.

2. Термін виконання роботи: з 10 травня по 20 червня 2021 р.

3. Вихідні дані роботи: Об'єктом дослідження є розроблення технології отримання біологічно активних форм аскорбінової кислоти.

4. Зміст пояснювальної записки: Вступ. Літературний огляд. Технологічна схема отримання аскорбінової кислоти. Результати роботи. Висновки. Список використаних джерел.

5. Перелік обов'язкового графічного (ілюстративного) матеріалу: таблиця 1, рисунків 8.

6. Календарний план-графік

№	Завдання	Термін виконання	Підпис керівника
1	Узгодження змісту дипломної роботи з дипломним керівником.	10-11 травня 2021 р.	
2	Підбір літератури за темою: «Характеристика аскорбінової кислоти».	11-13 травня 2021 р.	
3	Підбір літератури за темою: «Технологія отримання аскорбінової кислоти».	14-16 травня 2021 р.	
4	Написання першого та другого розділів дипломної роботи.	17-21 травня 2021 р.	
5	Підбір літератури за темою: «Удосконалення технології отримання аскорбінової кислоти».	22-23 травня 2021 р.	
6	Систематизація отриманого матеріалу та написання третього розділу дипломної роботи.	24-26 травня 2021 р.	
7	Оформлення результатів дослідження.	27 травня 2021 р.	
8	Написання висновків	28 травня 2021 р.	
9	Оформлення дипломної роботи.	29 травня 2021 р.	
10	Перевірка дипломної роботи керівником.	30 травня 2021 р.	
11	Попередній захист дипломної роботи.	1 червня 2021 р.	

12	Захист дипломної роботи.	15 червня 2021 р.	
----	--------------------------	----------------------	--

7. Дата видачі завдання: «10» травня 2021 р.

Керівник дипломної роботи _____ Петюх Г.В.

Завдання прийняла до виконання _____ Гринюк А.В.

РЕФЕРАТ

Пояснювальна записка до дипломної роботи «Удосконалення технології отримання біологічно активних форм аскорбінової кислоти»: 44 с., 8 рис., 1 табл., 41 літературних джерел.

Об'єктом дослідження є розроблення технології отримання біологічно активних форм аскорбінової кислоти.

Предметом дослідження є аскорбінова кислота, *Gluconobacteroxydans*.

Мета дипломної роботи полягала у вдосконаленні технології отримання біологічно активних форм аскорбінової кислоти.

Методи досліджень – аналітичні, математичні.

Проаналізовано, що аскорбінова кислота (вітамін С) – водорозчинний вітамін, який сприяє оптимальному перебігу тканинного обміну. Бере активну участь в окисно-відновних реакціях. Встановлено, що аскорбінову кислоту отримують з рослинної сировини, хімічним синтезом та за допомогою мікроорганізмів. Зараз чітко простежується тенденція до зменшення кількості хімічних стадій за рахунок залучення біотехнологічних методів. Найбільш досконала стадія в промисловому синтезі аскорбінової кислоти – трансформація D-сорбита в L-сорбозу, здійснювана мікробіологічним окисленням. Удосконалено технологічну схему отримання аскорбінової кислоти за рахунок використання *Gluconobacter oxydans* – уксуснокислих бактерій, які характеризуються неповним окисленням широкого діапазону вуглеводів і спиртів, а також додаванням до поживного середовища біостимулятора.

АСКОРБІНОВА КИСЛОТА, БІОЛОГІЧНО АКТИВНІ РЕЧОВИНИ, ВІТАМІНИ, МІКРООРГАНІЗМИ, *GLUCONOBACTEROXYDANS*.

ЗМІСТ

ВСТУП.....	8
РОЗДІЛ 1. ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД.....	11
1.1. Загальна характеристика антиоксидантів	11
1.2. Загальна характеристика аскорбінової кислоти	12
1.3. Характеристика активної форми аскорбінової кислоти	16
1.4. Висновки дорозділу.....	22
РОЗДІЛ 2. ТЕХНОЛОГІЧНА СХЕМА ОТРИМАННЯ АСКОРБІНОВОЇ КИСЛОТИ.....	24
2.1. Технологія виробництва аскорбінової кислоти.....	24
2.2. Мікробіологічний метод отримання аскорбінової кислоти	25
2.3. Приготування розчинів допоміжних речовин	27
2.4. Обладнання для виробництва аскорбінової кислоти	31
2.5. Висновки до розділу.....	33
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ РОБОТИ	35
3.1. Загальна характеристика <i>Gluconobacter oxydans</i>	35
3.2. Удосконалення технології отримання біологічно активних форм аскорбінової кислоти.....	37
3.3. Висновки дорозділу.....	39
ВИСНОВКИ.....	40
СПИСОК БІБЛІОГРАФІЧНИХ ПОСИЛАНЬ ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	41

ВСТУП

Актуальність теми. Аскорбінова кислота (вітамін С) бере участь в утворенні сполучної тканини, обміні білків, вуглеводів, ліпідів, синтезі гормонів кори надниркових залоз, нуклеїнових кислот, сприятливо впливає на регенеративні процеси, регулює пігментний обмін в шкірі, стимулює антитоксичну функцію печінки, діяльність залоз внутрішньої секреції, сприяє адаптаційним здібностям організму.

Дефіцит вітаміну С призводить до порушення Т-системи імунітету і менш значних відхилень гуморального імунітету. Широко відомий факт меланодермії при С-авітамінозі. Порушення синтезу колагену при авітамінозі виражається в поганому загоєнні ран.

Аскорбінова кислота вперше була виділена в чистому вигляді Сцент-Гіюргі 1928р. під назвою гексууронова кислота. У 1933р. була встановлена її структура.

Синтез її здійснено вперше Рейхштсйном в Швейцарії. Значення вітаміну С для організму людини дуже велике. Аскорбінова кислота бере активну участь у окислювально-відновних процесах в організмі і входить до складу ряду складних ферментів, що обумовлюють процеси клітинного дихання.

Вперше в чистому вигляді вітамін С був виділений в 1928р., а в 1932р. було доведено, що саме відсутність аскорбінової кислоти в їжі людини викликає цингу.

Позитивна дія аскорбінової кислоти відзначено при запальних, дегенеративних та інших патологічних процесах шкіри.

Призначення аскорбінової кислоти доцільно при токсикодермиях, алергічних дерматитах, екземі, нейродерміті, почесухе, хронічної кропивниці, червоному плоскому лишайі, фотодерматозах, васкулітах, пупирчатке, стоматитах, глосситах, хронічному атрофічному акродерматіте, хронічної піодермії, звичайних вуграх, колоподібність облісінні, мікозах стоп, а також при тривалому застосуванні кортикостероїдних препаратів і антималярійних засобів.

У терапії захворювань, що виявляються судинною патологією шкіри, ефективність зростає при поєднанні аскорбінової кислоти і рутина [1].

Аскорбінова кислота вводиться при отруєнні чадним газом, метгемоглобінобразователі у великих дозах - до 0,25 мл / кг 5% розчину на добу. Препарат є потужним антиоксидантом, нормалізує окислювально-відновні процеси.

Аскорбінова кислота застосовується при лікуванні цинги, інфекційних захворювань, ревматизму, туберкульозу, виразковій хворобі, при гепатитах, шоківому стані.

При недостатності аскорбінової кислоти розвивається гіповітаміноз, у важких випадках – авітаміноз (цинга, скорбут). У терапевтичних дозах аскорбінова кислота добре переноситься і побічних ефектів не викликає.

При введенні в великих дозах і протягом тривалого часу вона може пошкоджувати острівцевий апарат підшлункової залози і опосередковано нирки.

Під впливом високих температур, кисню, особливо в присутності важких металів, вітамін С легко руйнується. В організмі людини і більшості тварин аскорбінова кислота не синтезується. Орієнтовна добова доза становить 50-100 мг.

У той же час, в деяких випадках (важкі фізичні навантаження, простудні захворювання) показані збільшені (ударні) дози аскорбінової кислоти (до 0,5-1,0г і більше на прийом).

Тому актуальним є удосконалення технології отримання біологічно активних форм аскорбінової кислоти.

Мета дипломної роботи полягала у вдосконаленні технології отримання біологічно активних форм аскорбінової кислоти.

Для досягнення поставленої мети вирішувалися такі **завдання**:

1. Дати характеристику аскорбіновій кислоті та її впливу на організм людини.
2. Дослідити різні методи отримання аскорбінової кислоти.
3. Розробити технологічну схему отримання активних форм аскорбінової кислоти.

Об'єктом дослідження є розроблення технологіїотримання біологічно активних форм аскорбінової кислоти.

Предметом дослідження є аскорбінова кислота, *Gluconobacteroxydans*.

Методи досліджень – аналітичні, математичні.

РОЗДІЛ 1

ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

1.1. Загальна характеристика антиоксидантів

Антиоксиданти – речовини, що уповільнюють або запобігають окислення органічних сполук. Вони захищають організм від негативних впливів вільних радикалів. Антиоксидант з'єднується з вільним радикалом і ставить заслін руйнівній дії зайвого електрона. За допомогою ферментної захисної системи організм перетворює клітинний оксидант у воду і кисень [1].

В результаті окислення ліпідів в організмі людини накопичуються токсичні сполуки (вільні радикали), великі кількості яких несприятливо позначаються на здоров'ї людини. Найбільш актуальним вирішенням цієї проблеми на даний момент є використання антиоксидантів, які дозволяють безпечним способом значно сповільнити процеси окислення ліпідів і утворення вільних радикалів, тим самим підвищуючи рівень антиоксидантного захисту організму. Саме тому зараз ведеться інтенсивний пошук препаратів, що мають високу концентрацію антиоксидантних речовин і володіють вираженими антиокислювальними властивостями.

Останнім часом зріс інтерес до природних антиоксидантів і їх застосування в харчовій промисловості. Численні дослідження встановили різноплановий вплив антиоксидантів на поліпшення стану здоров'я людей, що є позитивним чинником їх використання при розробці рецептур спеціалізованих функціональних продуктів [2].

До природних антиоксидантів, що містяться в харчових продуктах і рослинних матеріалах, відносяться:

- флавоноїди (флаволи, флавоноли, флаванони, ізофлаволи, флаваноноли, флаванани, флавоноли, халькони, дигідрохалькони, флавонол-3,4-діоли, антоціанідини);
- похідні бензойної кислоти (галова, протокатехінова, ванілінова, бузкова кислоти);
- похідні коричної кислоти (ферулова, кадова, сіанова кислоти);

- похідні кумарину;
- фітоестрогени (лігнано, естрогени, лактони та ін);
- вітаміни: вітамін E (α -, β -, γ -, δ -токофероли та α -, β -, γ -, δ -токотрієноли), вітамін C;
- каротиноїди (лікопен, α -, β -каротини, лютеїн і ін).

Антиоксиданти є речовинами, що допомагають запобігти пошкодження клітин організму, викликане окисленням. Кожен день організм людини споживає кисень, в той же час піддаючись впливу окислювальних процесів. Окислення перетворює хімічні елементи в так звані вільні радикали, що ушкоджують організм. Вплив сонця, сигаретного диму, забруднення і алкоголю посилює деструктивні ефекти вільних радикалів. Надалі деякі клітини здатні до відновлення, проте інші пошкоджуються назавжди. Антиоксиданти не тільки стабілізують пошкодження, викликані вільними радикалами, вони можуть повернути назад нанесений в ході окислення збиток. Вільні радикали можуть впливати на процеси старіння і розвитку таких захворювань, як рак, цукровий діабет і серцево-судинні захворювання [3].

1.2. Загальна характеристика аскорбінової кислоти

Вітаміни – це життєво необхідні органічні сполуки, які постійно потрібні для нормального перебігу біохімічних реакцій в організмі.

Вченими описано понад 50% вітамінів і вітаміноподібних речовин. З цієї кількості 20 вітамінів людина повинна одержувати неодмінно. Серед них як на чільному місці стоїть вітамін C (аскорбінова кислота).

За час еволюціонування людський організм втратив здатність синтезувати вітамін C (аскорбінову кислоту), на відміну від організмів багатьох тварин. Водночас він є життєво необхідним для людини і тому повинен щоденно вживатися разом із різноманітними стравами.

Аскорбінова кислота (див. рис. 1.1) – це органічна сполука, яка є незамінним елементом людського організму. Її можна знайти в живильному складі певних овочів і особливо фруктів. Ще одна назва аскорбінової кислоти - вітамін C.

Аскорбінова кислота приносить незаперечну користь: сприяє зміцненню імунної захисту, повернення втрачених сил, нормалізації метаболічних процесів. З'єднання може перебувати в різних формах. Найчастіше це драже з кислотою серединою жовтого кольору. Але зустрічаються і порошки для приготування розчинів, розчинні таблетки, особливі біологічні добавки, ампули для ін'єкцій. У нашій статті ми розглянемо, яка користь і шкода бувають від аскорбінової кислоти.

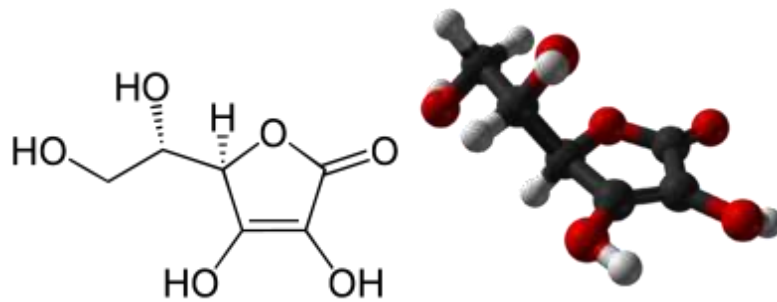


Рис. 1.1. Структурна формула аскорбінової кислоти

У природі аскорбінова кислота міститься у фруктах, ягодах і овочах (особливо в плодах шипшини, чорної смородини, в болгарському перці і яблуках).

По фізичних властивостях аскорбінова кислота являє собою білий кристалічний порошок кислого смаку. Легко розчинний у воді і у спирті [4].

Аскорбінова кислота є похідним моносахарида L-ряду. Ця будова підтверджено сполуками, в яких вихідними речовинами є L-сорбоза (найбільш доступна) або L-гулоза, що перетворюються в 2-кето-гулонову кислоту – ключовий напівпродукт в синтезі аскорбінової кислоти (див. рис. 1.2).

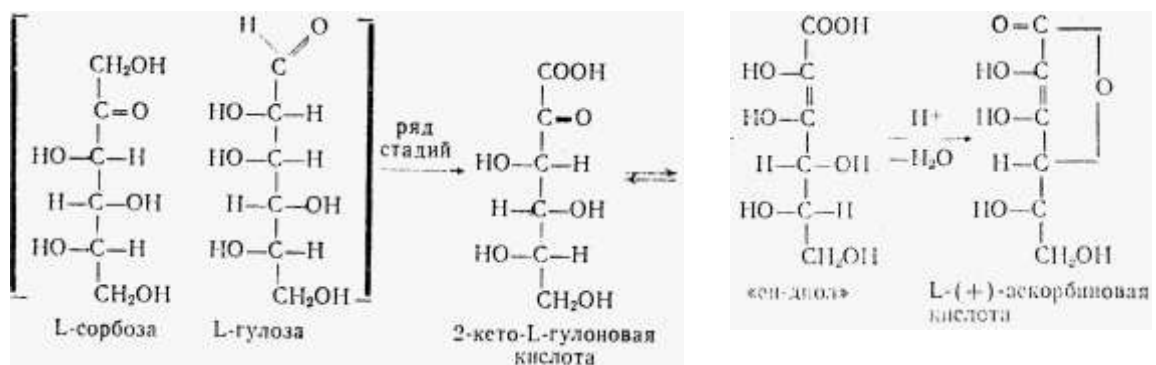


Рис. 1.2. Перетворення L-сорбози в аскорбінову кислоту

Аскорбінова кислота має два асиметричні атоми вуглецю в положеннях 4 і 5 і утворює чотири оптичних ізомери і два рацемату (див. рис. 1.3).

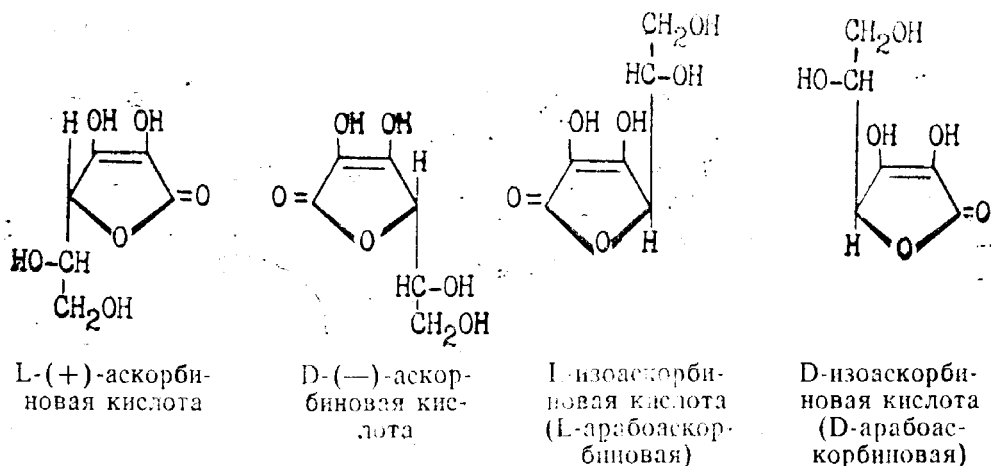


Рис. 1.3. Ізомери аскорбінової кислоти

Біологічно активною є L - (+) - форма. Д - (-) - форма є антивітаміном і не існує в природі. Прийнята будова аскорбінової кислоти підтверджується рентгеноструктурним аналізом. Молекулярна модель, встановлена цим методом, показує, що всі атоми вуглецю і кисню циклу лежать в одній площині, крім C4, що лежить поза її.

Аскорбінова кислота являє собою біла кристалічна речовина з $T_{пл} 192^\circ$, дуже чутлива до нагрівання, добре розчинна у воді, погано в спиртах (за винятком метанолу), практично нерозчинні в неполярних розчинниках. Вона дуже чутлива до важких металів, мідь і залізо руйнівні, діють на аскорбінову кислоту. Аскорбінова кислота легко відщеплює протон гідроксилу в положенні C3 кільця і по силі не поступається карбоновим кислотам.

Аскорбінова кислота є двоосновною, однак, її вважають практично одноосновною, оскільки $pK_I = 4,12$ а $pK_{II} = 11,57$.

Кислотність обумовлена фенольною HO-групою. Аскорбінова кислота легко утворює солі - найбільш відома її натрієва сіль (аскорбинат натрію). Аскорбінова кислота дуже легко окислюється і має сильну відновлювальну здатність. Процес окислення аскорбінової кислоти протікає складно, початковою стадією його є

утворення дегідроаскорбіновою кислотою під впливом кисню повітря або інших окислювачів. Цей процес є оборотним.

При $\text{pH} < 7$ в процесі окисного і гідролітичного розщеплення дегідроаскорбінової кислоти, наприклад, перетворюється в 2,3-дікето-L-гулоновою кислотою. Остання під впливом підвищеної температури декарбоксилюється і перетворюється в L-ксілозон-2. Ксілозон відновлюється аскорбіновою кислотою в L-ксілозу, яка циклізується в фурфурол шляхом дегідратації:

Відомо, що фурфурол легко вступає в реакції приєднання, утворюючи полімери, а також легко окислюється з розкриттям циклу і утворенням бурштинової та інших органічних кислот і смолистих речовин.

Зазначені процеси протікають навіть у присутності кисню повітря, утворюючи цикл каталітичного розкладання аскорбінової кислоти. Тому бажано виключити вплив кисню на розчини аскорбінової кислоти і її препарати у виробництві і при зберіганні.

Природно, що в присутності більш сильних окислювачів і, особливо, іонів важких металів (мідь, магній, залізо) аскорбіновою кислотою окислюється з деструкцією циклу і утворенням в результаті різних органічних кислот (L-треонова, гліцерінова, щавлева і ін.). Всі процеси окислення йдуть легше в лужному середовищі.

При нагріванні з лугами аскорбіновою кислотою легко гідролізується, перетворюючись на сіль 2-кето-L-гулоновою кислоти.

З інших властивостей аскорбінової кислоти слід зазначити її здатність до утворення простих і складних ефірів. Найбільш відомий пальмітат аскорбінової кислоти, який використовують для вітамінізації харчових продуктів.

1.3. Характеристика активної форми аскорбінової кислоти

Аскорбінова кислота (вітамін С) бере участь в утворенні сполучної тканини, обміні білків, вуглеводів, ліпідів, синтезі гормонів кори надниркових залоз, нуклеїнових кислот, сприятливо впливає на регенеративні процеси, регулює пігментний обмін в шкірі, стимулює антитоксичну функцію печінки, діяльність залоз внутрішньої секреції, сприяє адаптаційним здібностям організму. Дефіцит вітаміну С призводить до порушення Т-системи імунітету і менш значних відхилень гуморального імунітету. Широко відомий факт меланодермії при С-авітамінозі. Порушення синтезу колагену при авітамінозі виражається в поганому загоєнні ран.

Позитивна дія аскорбінової кислоти відзначено при запальних, дегенеративних та інших патологічних процесах шкіри. Призначення аскорбінової кислоти доцільно при токсикодерміях, алергічних дерматитах, екземі, нейродерміті, почесухе, хронічній кропивниці, червоному плоскому лишаї, фотодерматозах, васкулітах, пупирчатке, стоматитах, глосситах, хронічному атрофічному акродерматіте, хронічній піодермії, звичайних вуграх, колоподібність облісінні, мікозах стоп, а також при тривалому застосуванні кортикостероїдних препаратів і антималярійних засобів. У терапії захворювань, що виявляються судинною патологією шкіри, ефективність зростає при поєднанні аскорбінової кислоти і рутина [10].

Аскорбінова кислота вводиться при отруєнні чадним газом, метгемоглобінобразователі у великих дозах - до 0,25 мл / кг 5% розчину на добу. Препарат є потужним антиоксидантом, нормалізує окислювально-відновні процеси.

Також застосовується при геморагічному діатезі, капилляротоксикозе, геморагічному інсульті, кровотечі (в т.ч. носовому, легеневої, маточне), інфекційних захворюваннях, ідіопатичною метгемоглобінемії, інтоксикації, алкогольному і інфекційному делірій, гострої променевої хвороби, посттрансфузійних ускладненнях, захворюваннях печінки (хвороба Боткіна, хронічний гепатит і цироз), захворюваннях шлунково-кишкового тракту (ахілія, виразкова хвороба, особливо після кровотечі, ентерит, коліт), гельмінтозах, холециститі, мляво гояться ранах,

виразках, опіках, фізичних і розумових перевантаженнях, вагітності, а також при нестачі вітаміну С [13].

У Кокрейновском огляді 2012 року повідомлялось про відсутність впливу добавок з вітаміном С на загальну смертність. У Кокрейновском огляді 2013 роки не було виявлено доказів того, що додавання вітаміну С знижує ризик раку легенів у здорових людей або осіб з високим ризиком через куріння або впливу азбесту.

Станом на 2017 рік немає доказів того, що прийом вітаміну С знижує серцево-судинні захворювання, за станом на 2014 рік немає доказів користі вітаміну С при цукровому діабеті. Добавки вітаміну С не запобігають і не уповільнюють прогресування вікової катаракти.

Докази високої якості показують, що аскорбінова кислота не поліпшує перебіг хвороби Шарко - Марі - Тута у дорослих з точки зору використовуваних параметрів результату. Згідно доказам низької якості, аскорбінова кислота не поліпшує перебіг хвороби Шарко - Марі - Тута у дітей. Однак хвороба Шарко - Марі - Тута повільно прогресує, і параметри результату показують лише невеликі зміни з плином часу. Слід враховувати більш тривалі дослідження, а параметри результатів, більш чутливі до зміни в часі, повинні бути розроблені і затверджені для майбутніх досліджень [22].

Вітамін С (аскорбінова кислота) є розчинним у воді вітаміном. Вітамін С важливий для росту і відновлення клітин тканин, ясен, кровоносних судин, кісток і зубів, сприяє засвоєнню організмом заліза, прискорює одужання (калоризатор). Його користь і цінність дуже велика для захисту від інфекцій. Він діє як стимулятор запуску імунних процесів.

В якості харчової добавки позначається як E300.

Фізико-хімічні властивості вітаміну С. Аскорбінова кислота являє собою органічне з'єднання, родинне глюкози, у вигляді білого кристалічного порошку кислого смаку. Виконує біологічні функції відновлення і коферменту деяких метаболічних процесів, є антиоксидантом.

Вітамін С легко руйнується теплової обробки речовин, світлом і смогом.

Втрата вітаміну С може виникнути при неправильній обробці їжі і тривалому зберіганні готових харчових продуктів. Збереження вітаміну С забезпечує правильна кулінарна обробка овочів і плодів. Овочі не слід подовгу залишати на повітрі очищеними і розрізаними, при варінні їх треба закладати в киплячу воду безпосередньо після очищення. Заморожені овочі необхідно опускати в киплячу воду, так як повільне відтавання збільшує втрату вітаміну С.

Харчові джерела вітаміну С. Найбільш багаті аскорбіновою кислотою: ківі, шипшина, червоний перець, цитрусові, чорна смородина, цибуля, томати, листові овочі (салат, капуста, брокколі, брюссельська капуста, цвітна капуста, і т.д.), печінку, нирки, картопля.

Також вітамін С можна купити в магазині в таблетованій вигляді.

Добова потреба у вітаміні С. Добова потреба людини у вітаміні С залежить від ряду причин: віку, статі, вагітності, кліматичних умов, шкідливих звичок. Середня добова доза вітаміну С - 70-100 мг. Курці і старі люди мають підвищену потребу у вітаміні С (одна викурена сигарета руйнує 25 мг С).

Корисні властивості вітаміну С. Аскорбінова кислота є потужним антиоксидантом. Вітамін С зміцнює імунну систему людини, а також охороняє її від вірусів і бактерій, прискорює процес загоєння ран, впливає на синтез ряду гормонів, регулює процеси кровотворення і нормалізує проникність капілярів, бере участь в синтезі білка колагену, що необхідно для росту клітин тканин, кісток і хрящів організму, регулює обмін речовин, виводить токсини, покращує жовчовиділення, відновлює внешнесекреторную функцію підшлункової і щитовидної залози.

Корисні властивості вітаміну С. Вітамін С уповільнює процес старіння організму, знижує інтоксикацію організму у алкоголіків і наркоманів.

Аскорбінова кислота застосовується як загальнозміцнюючий засіб при різних хворобах.

Шкідливі властивості вітаміну С. Сам по собі вітамін С є безпечним. Але при застосуванні аскорбінової кислоти у величезних кількостях може розвинути алергічна реакція у вигляді свербіж та дрібного висипу на шкірі. Тим людям, у яких проблеми зі шлунком, наприклад гастрит або виразка, велика кількість цього

вітаміну може викликати ряд ускладнень. Передозування може викликати розлад шлунка, біль в животі, діарею або судоми.

Засвоюваність вітаміну С. Вітамін С краще засвоюється в поєднанні з кальцієм і магнієм.

При гіповітамінозі (дефіциті) З з'являються такі симптоми: серцева слабкість, стомлюваність, задишка, знижується стійкість до різних захворювань (calorizator). У дитинстві затримуються процеси окостеніння.

При гострій нестачі вітаміну С розвивається цинга. Для цинги характерні: набрякання і кровоточивість ясен, розхитування і випадання зубів, часті застуди, варикозне розширення вен, геморої, зайва вага, підвищена стомлюваність, дратівливість, погана концентрація уваги, депресії, безсоння, раннє утворення зморшок, випадання волосся, погіршення зору, крововиливи в м'язах, шкірі, суглобах.

Надлишок вітаміну С в організмі. Вітамін С вважається безпечним навіть у великих кількостях, так як організм легко виводить невикористані залишки вітаміну.

Але все ж надмірне вживання вітаміну С може призвести до:

- діарея;
- нудота;
- блювота;
- печія;
- здуття живота і спазми;
- головний біль;
- безсоння;
- камені в нирках.

Застосування вітаміну С в косметології. Вітамін С широко використовується в косметичних препаратах для уповільнення старіння, загоєння і відновлення захисних функцій шкіри, сприяє відновленню зволоженості і пружності шкіри після впливу сонячних променів.

Взаємодія вітаміну С (Аскорбінової кислоти) з іншими речовинами. Лікувальні властивості вітаміну С значно посилюються при спільному застосуванні

з вітамінами А і Е. Вітамін С знижує потребу у вітамінах В1, В2, В9, А, Е, пантотенової кислоти. Аскорбінову кислоту не слід вживати в сумі з препаратами, де є багато заліза.

Фізіологічна дія аскорбінової кислоти:

- Позитивно впливає на тонус шкіри,
- Допомагає при лікуванні шкірної алергії і дерматиту,
- Сприяє загоєнню ран і опіків,
- Допомагає при лікуванні варикозного розширення вен,
- Зміцнює стінки судин підвищує імунітет,
- Благотворно впливає на склад крові,
- Нормалізує рівень холестерину,
- Сприяє підвищенню гемоглобіну.

Вітамін С є найголовнішим вітаміном продуктів рослинного походження. Найбільше вітаміну містять свіжі фрукти, овочі, зелень. Шипшина, обліпиха, чорна смородина, червоний перець - справжні джерела цього вітаміну.

Слід пам'ятати, що вміст усіх вітамінів, і особливо вітамін С, в рослинах залежить від сорту, району вирощування, характеристики ґрунту, освітлення і т. д. Крім того, вміст вітаміну С знижується при зберіганні, в зв'язку з наявністю в овочах і фруктах ферменту, що руйнує аскорбінову кислоту.

До складу шкірки цитрусових входять біофлавоноїди, які сприяють засвоєнню і утриманню вітаміну С. Вітамін С, що міститься в плодах шипшини, також містить біофлавоноїди і інші ферменти, які допомагають краще його засвоєнню.

Найбільш багаті аскорбіновою кислотою:

- плоди свіжого шипшини (650 мг/100 г),
- болгарського червоного перцю (250 мг/100 г),
- чёрной смородини і обліпихи (200 мг/100 г),
- яблука містять (165 мг/100 г),
- перець зелений солодкий і петрушка (150 мг/100 г),
- брюссельська капуста (120 мг/100 г),

- кріп і черемша (100мг/100 г),
- суниця садова (60 мг/100 г),
- цитрусові (38-60 мг/100 г).

1.4. Висновки до розділу

В роботі встановлено, що аскорбінова кислота (вітамін С) – це водорозчинний вітамін, він допомагає протікати обмінним процесам тканинного обміну в організмі. Також цей вітамін бере активну участь в окисно-відновних реакціях, це дозволяє забезпечити стабільність клітинних мембран.

Аскорбінова кислота приймає активну участь у синтезі сполучної тканини судинної стінки, що запобігає розвитку геморагічного діатезу. В організмі людини аскорбінова кислота не синтезується. Тому, при недостатньому надходженні аскорбінової кислоти з продуктами харчування у людини може розвинутися кровотеча з ясен, слизових оболонок.

Аскорбінова кислота приймає активну участь в обміні глюкози, катаболізмі холестерину, синтезі стероїдних гормонів. При стресах вміст аскорбінової кислоти в організмі значно знижується, що підтверджує участь аскорбінової кислоти у реакціях адаптації. Аскорбінова кислота здатна на антианемічну дію за рахунок впливу на обмін заліза. Відновлює тривалентне залізо у двовалентне, яке транспортується з током крові.

РОЗДІЛ 2

ТЕХНОЛОГІЧНА СХЕМА ОТРИМАННЯ АСКОРБІНОВОЇ КИСЛОТИ

2.1. Технологія виробництва аскорбінової кислоти

Аскорбінова кислота може бути отримана з моносахаридів D- або L-ряду. Відомо кілька методів її синтезу:

1. Бензоїновий метод. В основі лежить конденсація треози і етилглюкієвої кислоти в присутності KCN. Метод неперспективним через дефіцитності сировини, низького виходу.

2. Ціангідриновий метод. Аскорбінову кислоту отримують, виходячи з L-ліксози або L-ксилози. Практичного застосування не має через відсутність сировини, синтез якого з D-глюкози дуже складний.

3. Отримання аскорбінової кислоти з бурякового «жому» (відходи виробництва цукру з буряка). Метод запропонований американцями в 1904 р. Метод потребує значного вдосконалення: з 100 кг жому отримують всього 2,5 кг аскорбінової кислоти.

4. Частково мікробіологічний метод отримання аскорбінової кислоти з D-глюкози. Включає 5 стадій, в т. ч. 3 хімічних. В основі методу лежить окислення D-глюкози оцтовокислими бактеріями до кальцієвої солі 5-кето-0-глюконової кислоти, яку перетворюють на L-аскорбінову кислоту. Метод привертає увагу обмеженим застосуванням хімічних реагентів. Однак вихід продукту низький, а процеси мікробіологічного синтезу важко керовані.

5. Метод Рейхштейна. Синтез L-аскорбінової кислоти з 2-кето-L-гексонової кислоти. Основна сировина (D-глюкоза) і допоміжні реагенти, що застосовуються для синтезу, використовуються в харчовій і хімічній промисловості. Метод знайшов застосування в багатьох країнах.

Цей метод складається з 6 стадій (1 стадія мікробного синтезу):

1 стадія. Отримання D-сорбіта з D-глюкози методом каталітичного відновлення воднем.

2 стадія. Отримання L-сорбози з D-сорбіту шляхом його глибинного аеробного окислення оцтовокислими бактеріями.

3 стадія. Отримання діацетон-L-сорбози з L-сорбози шляхом її ацетонування.

4 стадія. Отримання гідрату діацетон-2-кето-L-гулонової кислоти шляхом окислення діацетон-L-сорбози.

5 стадія. Отримання L-аскорбінової кислоти з гідрату діацетон-2-кето-L-гулонової кислоти.

6 стадія. Отримання медичної аскорбінової кислоти. Перекристалізація технічної аскорбінової кислоти.

Вихід продукту в перерахунку на глюкозу становить в цілому до 54% [11].

У колбу на 250 мл, забезпечену магнітною мішалкою, вносили 0,3772 г (0,007 г • моль) міченого ціаністого натрію із загальною активністю 20 МКюрі і питомою активністю 53,02 МКюрі/г, 0,613 г їдконого натру (0,015 г моль) і 35 мл дистильованої води. До отриманого розчину протягом 20 хв в струмі азоту поступово додавали 1,532 г (0,01 г • моль) розчину 1-ксілозона; суміш перемішували струмі азоту протягом 10 хв. По закінченні цього часу, додавали концентрованої соляної кислоти стільки, щоб розчин став 2,5 N (близько 22,4 мл концентрованої соляної кислоти), а потім в розчин вносили 1,532 г немічених аскорбінової кислоти. Колбу закривали герметично і реакційну масу під невеликим тиском нагрівали в атмосфері азоту протягом 24 год при температурі лазні 50 - 51 °С.

В результаті реакції відбувався гідроліз іміноаскорбінової кислоти до 1-аскорбінової кислоти. Після гідролізу розчин випаровували у вакуумі в струмі азоту при 30 °С. утворення сиропу залишок розчиняли в 250 мл води і фільтрують.

Зміст 1-аскорбінової кислоти після гідролізу визначали титруванням фарбою Тильманса (2,124 г). Розчин поділяли на три рівні частини і кожну з них пропускали зі швидкістю 0,5 мл / хв через колонку (1 • 60 см), що містила шар аніоніти АН-2Ф (примітка 1).

l-Аскорбінову кислоту адсорбувати на колонках, а потім елюювали 1N соляною кислотою. Кінець елюювання l-аскорбінової кислоти визначали за допомогою фарби Тильманса. Після пропускання через аніоніт розчину в ньому містилося 1,623 г l-аскорбінової кислоти. Потім розчин випаровували у вакуумі в струмі азоту при 30 °С, залишок був сиропообразною масою коричневого кольору. Після титрування в ній містилося 1593 р l-аскорбінової кислоти. Її розчиняли в 76 мл безводного спирту і до розчину додавали 1020 мл абсолютного, вільного від перекисів ефіру. Утворився в невеликій кількості пластівчастий осад відфільтровують, фільтрат упарюють в колбі ємністю 500 мл в струмі азоту при 30 °С до початку виділення кристалів l-аскорбінової кислоти.

Після цього розчин залишали в холодильнику на кілька днів. Виділилися кристали l-аскорбінової кислоти фільтрують і промивали сумішшю абсолютного спирту і лигроїна (1: 1) до тих пір, поки фільтрат не ставав безбарвним. Після сушіння в вакуум-ексикаторі над сірчаною кислотою отримано 574,8 мг (питома активність 10 МКюрі/г. Загальна активність дорівнює приблизно 6 МКюрі) аскорбінової кислоти, що становить 41,18% по відношенню до кількості l-аскорбінової кислоти, визначеної в розчині титруванням; радіохімічний вихід 30%, температура плавлення 183 - 185 °С.

Чистоту, рівну 93,37%, визначали фарбою Тильманса. У маточнику залишалось близько 60% l-аскорбінової кислоти. Для виділення її до маточнику додавали кілька разів розчин немічених l-аскорбінової кислоти в безводному метиловий спирт, спирт відганяли у вакуумі до невеликого обсягу і розчин залишали в холодильнику на ніч. На наступний ранок фільтрували аскорбінову кислоту. В описаному досвіді немічених аскорбінову кислоту додавали п'ять разів; отримано 4,16 МКюрі аскорбінової кислоти.

Таким чином, всього з досвіду отримували 10,16 МКюрі (6,0+ 4,16), 50% виходу.

Примітка 1. Для приготування колонки з смоли марки АН-2Ф смолу заливали на день-два дистильованою водою і багаторазово декантірували. Після цього смолу промивали таким же способом 10% -ним розчином оцтової кислоти і, нарешті,

водою до нейтральної реакції. Потім через колонку пропускали розчини немічених аскорбінової кислоти і 200 мл розчину водного аміаку (2 N), Аніоніт відмивали водою до нейтральної реакція, а потім 350 мл 10% -ного розчину оцтової кислоти. Таким чином, аніоніт був приготований в ацетатної формі.

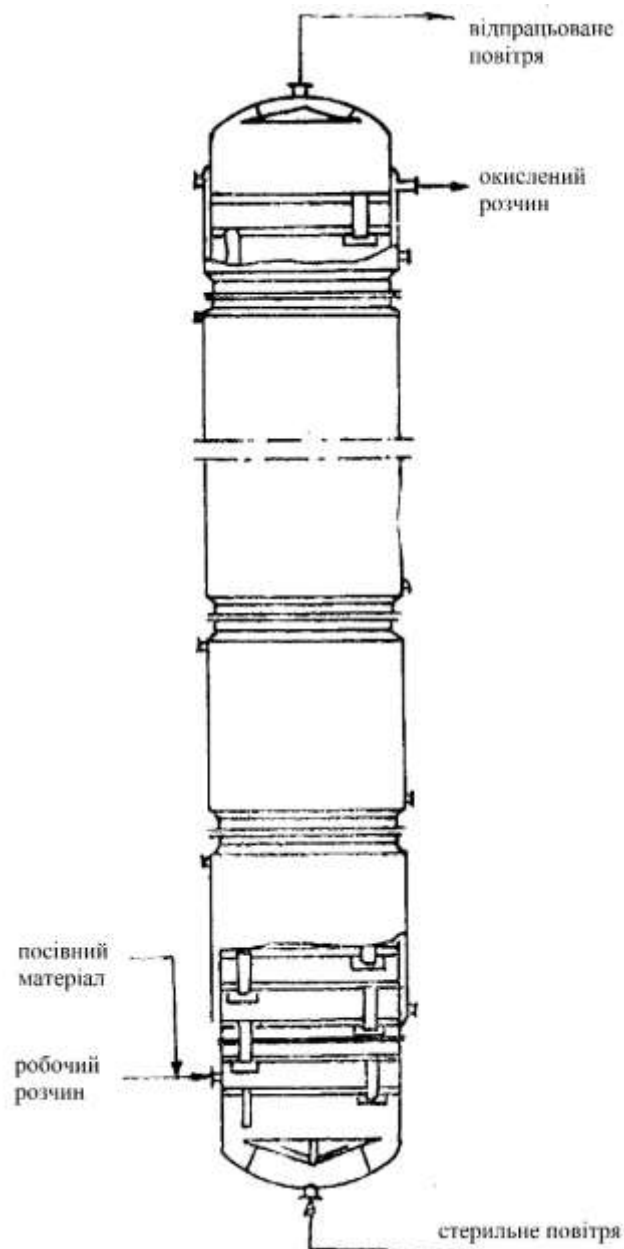


Рис. 2.1. Колонний ферментатор з сітчастими тарілками (установка типу УНФ-100)

2.2. Мікробіологічний метод отримання аскорбінової кислоти

Важливою частиною мікробіологічного синтезу отримання вітамінів є поживне середовище. Основною сировиною для виробництва є меляса (чорна патока) — відход бурякоцукрового виробництва. Вона є темно-коричневим сиропом щільністю близько 1,4 із вмістом сухих речовин 73—80 %. До складу сухих речовин входить 46—52 % цукру до ваги меляси і 27—28 % нецукрів.

Для якості меляси велике значення має її доброякісність, тобто відношення вмісту цукру в % до загальної кількості сухих речовин. Доброякісність хорошої меляси 60—65 % [7].

Склад меляси сильно міняється залежно від кліматичних і ґрунтових умов вирощування буряка, умов її зберігання, а також від умов зберігання меляси на цукрових і дріжджових заводах.

На якість меляси впливає також вміст в ній золи. Меляса (із вмістом золи менше 7,5%) непридатна для виробництва. Кількість мікроорганізмів в 1 г меляси не повинна перевищувати 15 000.

Велике значення для якості меляси має її реакція (pH). Повноцінними є нейтральні, слабокислі і слаболужні меляси (pH 6,5—8,5).

В процесі зберігання меляси, нормальної по кількості мікроорганізмів (до 15000 мікроорганізмів в 1 г, відбувається деяка втрата цукру в результаті хімічного перетворення його; при цьому втрати цукру більше в перші два місяці після зливу меляси і значно менше в подальші місяці її зберігання [7].

Склад меляси непостійний. Він міняється не тільки в різні періоди цукрового виробництва, але і протягом доби під час зберігання. У сховищах меляса розшаровується і молекули одного шару дуже поволі дифундують в шари сусідніх пластів. Для ефективною переробки її необхідно ретельно перемішати для отримання гомогенної маси.

Гомогенізацію проводять безпосередньо в сховищах шляхом багатократного перемішування різними способами.

Існуючі способи освітлення меляси, можуть бути розділені на хімічні та механічні, причому останнім часом починають переважати механічні.

Хімічні способи. Ці способи зв'язані із застосуванням сірчаної кислоти і суперфосфату, сприяючих коагуляції і осадженню крупних зважених частинок і колоїдів меляси, і підрозділяються на кислотно-холодний і кислотно-гарячий способи.

Кислотно-холодний спосіб. У заторний чан набирають воду і мелясу (на 1 т меляси близько 0,75 м³ води), потім суміш (затор) розмішують мішалкою і всипають хлорне вапно (суміш Ca(OCl)₂, CaCl₂ 0,9 кг активного хлору на 1 т меляси), після чого розмішують ще 30 хв і витримують 30 хв. За цей час мікроби, шкідники дріжджового виробництва, під дією хлору стають неактивними і поступово гинуть.

Після витримки включають мішалку, вливають сірчану кислоту (близько 6 л щільністю 1,84 на 1 т меляси), розмішують 30 хв додають воду до вмісту сухих речовин в мелясі 20—40 % по цукрометру (залежно від прийнятої на заводі концентрації), затор розмішують ще 30 хв, потім зупиняють мішалку і дають затору відстоятися протягом 10—12 год для випадання осаду.

Кислотно-гарячий спосіб. Освітлення проводять по тій же схемі, що і при кислотно-холодному способі, до моменту вторинного додавання води.

При кислотно-гарячому способі в заторний чан наливають гарячу воду і доводять до кипіння за допомогою пари, яку пропускають через затор. Кип'ятять 30 хв, після чого затору дають відстоятися протягом 6—8 год для випадання осаду. Для цього способу потрібно на 7 л менше сірчаної кислоти, чим при кислотно-холодному способі, а при використанні хорошої не інфіцированої меляси хлорне вапно не потрібне.

Механічні способи освітлення меляси. Освітлення здійснюється за допомогою кларифікаторів, в яких зважені частинки відділяються під дією відцентрової сили, що перевершує в десять тисяч разів величину сили тяжіння, яка виникає при охолодженні меляси. Освітлення меляси за допомогою кларифікаторів широко застосовується в промисловості. В результаті механічного освітлення економиться меляса; допоміжні матеріали, пара, скорочується час освітлення [7].

2.3. Приготування розчинів допоміжних речовин

Крім освітленої меляси, в апарат поступають розчини живильних солей для активного росту бактерій необхідно додавати азот, фосфор, калій, магній, ростові речовини, а також питну воду та повітря і основного активатора біосинтезу ергостерну (попередника вітаміну D₂) ацетату натрію.

У промисловості в якості джерела азоту використовують сірчистокислій амоній, аміачну воду та діамонійфосфат; джерелом фосфору – діамонійфосфат; калію – хлористий калій та вуглекислий калій (поташ); джерелом магнію – сірчистокислій магній, магній хлористий, епсоміт; джерелом ростових речовин – дестибіотин та кукурудзяний екстракт.

Приготування гарячої води. Гарячу воду використовують для приготування поживних середовищ, розчину мінеральних солей, миючих і дезінфікуючих розчинів, емульсії піногасника, при стерилізації поживних середовищ, для мийки обладнання, комунікацій і приміщень, а також для теплоносіїв в теплообмінних апаратів.

Гарячу воду готують з технічної води, нагріваючи її паром в теплообміннику до температури (70±10) °С. Конденсат пару від теплообмінника, ємнісного обладнання дільниці приготування поживних середовищ, охолоджують в теплообміннику і збирають в збірник, потім насосом передають на дільницю приготування розчину меляси.

Підготовка сірчаної кислоти. Сірчану кислоту використовують для підкислення питної води, яку використовують для розбавлення меляси.

Підготовка розчину аміаку водного. Аміак водний використовують для рН-статування в процесі вирощування бактерій. Аміак водний проходить процес фільтрації, після чого фільтрат аміачної води подають на виробництво.

Зі збірників насосами аміачну воду подають через фільтри тонкої очистки з фторопластовими елементами з розміром пор 20 мкм в колектор подачі аміачної води до ферментерів.

Водну витяжку суперфосфату готують таким чином. Суперфосфат відважують в потрібній за розрахунком кількості і передають в сольовий чан, де заливають водою, в співвідношенні 1:10. Потім суміш нагрівають до кипіння і перемішують мішалкою протягом 2 год, після чого дають відстоятися протягом 2-3 год. Отриману водну витяжку направляють в чистий чан, звідки вона і подається в апарати, шлам спускають в спеціальний збірник. На деяких заводах водну витяжку суперфосфату готують без нагрівання, особливо за наявності в суперфосфаті фтору.

Кукурудзяний екстракт відважують і поміщають в спеціальний чан, де його розводять водою в співвідношенні 1 : 1, і кип'ятять протягом 30 хв для знищення сторонньої мікрофлори. Прокип'ячений екстракт подають в апарат в необхідній кількості [7].

Солодове сусло використовують в процесі отримання чистої культури бактерій. Його отримують з пивоварних заводів у вигляді, що не хмелить, або готують на заводі шляхом зцукрення ячмінного солоду крупного помелу. На 1 л води беруть 250 г солоду. Суміш підігрівують до 57 °С і витримують протягом 1 год, потім температуру поступово підвищують до 63 °С і витримують до тих пір, поки весь крохмаль не оцукриться.

Щоб встановити кінець процесу оцукрення, краплю оцукрюючої маси (затору) сполучають з краплею йоду на білому склі: за наявності крохмалю з'являється синє забарвлення.

Після закінчення зцукрення суміш доводять до кипіння, потім фільтрують через чисте полотно. При цьому отримують сусло із змістом сухих речовин 12—14 % по цукрометру.

З сусла готують живильне середовище для розмноження чистої культури бактерій. На деяких заводах використовують тільки солодове сусло, його розводять водою до 12 % по цукрометру, розливають в колби і стерилізують в автоклаві 30 хв при 0,5 ат. На інших заводах до солодового сусла додають розчини цукрів і вітамінів.

Приготування стерильного піногасника. У виробництві в якості піногасника використовують олеїнову кислоту, соняшникову олію, лапрол, структол.

Готують емульсію з масовою часткою піногасника 5 – 10 %. Для цього в збірник набирають воду ($1,9 \pm 0,05$) м³ води, нагрівають її до температури (50 ± 5) °С подачею пару в «сорочку» збірника, при постійному перемішуванні мішалкою. Насосами подають нагріту воду на циркуляцію через роторний апарат для гідродинамічного перемішування. Під час циркуляції у збірник подають піногасник. Готову емульсію передають в збірник-стерилізатор. Стерилізація піногасника проходить при температурі 126 - 140 °С і тиску від 0,18 до 0,27 МПа протягом 1 год. Стерильний піногасник під тиском стерильного стисненого повітря передають в колектор піногасника.

Стерилізація компонентів. Стерилізацію компонентів для приготування поживних середовищ на різних стадіях вирощування бактерій проводять сумісно, в залежності від того, які компоненти входять до складу того чи іншого середовища.

У виробництві для накопичення біомаси бактерій найчастіше використовується глибинне культивування, що є необхідною технологічною стадією. Ефективність цього процесу залежить від якості поживного середовища, маткової культури і параметрів режиму культивування, які визначаються технічним рівнем обладнання.

Лактобактерії характеризуються високою вимогливістю до якості поживних субстратів, які є джерелом енергії і речовин, необхідних їм для побудови клітини [39]. Вони потребують повного набору готових амінокислот, водорозчинних вітамінів групи В, азотистих основ, мінеральних елементів, вуглеводів, неорганічних сполук і т.д. Цим можна пояснити відносно багатоконпонентний склад поживних середовищ, які традиційно використовують для культивування молочнокислих бактерій [40].

Розробляються нові поживні середовища, модифікуються вже відомі і широко застосовувані: молочно-дріжджове середовище (МДС), модифіковане гідролізатно-молочне середовище (ГМС) і т.д. [41].

Для культивування лактобактерій найбільш широко використовуваним є класичне MPC- середовище (to DE MAN, ROGOSA and SHARPE, for microbiology), запропоноване Де-Меном та іншими співавторами в 1960 році для накопичення,

культивування і виділення лактобацил з будь-якого матеріалу, а також його різні модифікації: середовище MRS, середовище PC для виділення лактобацил і лактококів, середовище з Твін-80 [41]. MPC-середовище (МОЗЕРА-РОГОЗА-ШАРПА) відповідає німецькому стандарту DIN-Norm 10109 і нормативним документам №35 LMBG (06.00 / 35) контролю продуктів.

Принцип дії середовища: містить полісорбат, ацетат, магній, марганець - ростові фактори для лактобацил, а також багату поживну основу. Оскільки середовище слабо селективне, на ньому можуть рости види *Pediococci*, *Leuconostoc* та інші бактерії.

Наступною основною стадією у виробництві після культивування є стадія стабілізації бактеріальної культури, яка повинна забезпечити збереження життєздатності клітин у препараті протягом усього терміну придатності.

Для стабілізації бактеріальної маси в технології традиційно використовують ліофілізацію - висушування із замороженого стану. Збереження життєздатності клітин забезпечується за рахунок природної, виробленої в процесі еволюції здатності мікроорганізмів впадати в анабіоз в посушливий період. Ліофілізовані культури можуть підтримуватися в живому стані протягом ряду років при позитивних температурах, зберігаючи при цьому всі біологічні властивості, з мінімальними втратами за кількістю живих клітин.

Висушені і заморожені мікроби вимагають обов'язкового застосування протекторів, що захищають мембранні структури клітин від втрати води. Найбільш значні успіхи у підвищенні виживання мікробів в процесі ліофільного висушування були досягнуті завдяки підбору ефективних захисних середовищ.

З метою заміни масла какао, було вивчено кілька видів харчових жирів з різними добавками. Вибір був зроблений на користь гідрованого жиру на бавовняному маслі, що забезпечує високе збереження біфідо- і лактобактерій.

В якості альтернативного технологічного варіанта представляє інтерес до методу стабілізації рідких бактеріальних суспензій за допомогою компонентів носіїв, що забезпечують анабіоз живих клітин. В якості стабілізуючих композицій можуть виступати гідрофільні компоненти мазевих і супозиторних основ. Сутність

запропонованого рішення в тому, що до складу м'яких лікарських форм вводять рідку культуру штамів, застосовуваних у виробництві, а стабілізація рідкої бактеріальної культури здійснюється шляхом її переведення в гелевидний стан за допомогою ПАР (поверхнево-активні речовини). В якості ПАР використовується Na-КМЦ (натрій карбоксиметилцелюлоза) і аеросил, що мають лужний характер, і забезпечують отримання стійкого гелю. [42].

Підвищення та розширення спектра біологічної активності може бути досягнуто за рахунок розробки комплексних препаратів на основі спеціально підібраних бактеріальних композицій, що включають сумісні і взаємодоповнюючі штами. Створення препаратів множинного мікробного складу є перспективним напрямком в бактеріотерапії (Альошкін, Тихонова, 2002; Соколова та ін., 2002).

Проблема підвищення ефективності виробництва препаратів передбачає вирішення завдань, пов'язаних з удосконаленням всіх стадій технологічного процесу, включаючи накопичення біомаси, стабілізацію бактеріальних культур і безпосереднє виготовлення лікарських форм.

2.4. Обладнання для виробництва аскорбінової кислоти

Для глибинного культивування використовують ферментатори: ферментатор з механічним перемішуванням барботажного типу (див. рис.2.2).

Даний тип широко застосовується для стерильних процесів вирощування мікроорганізмів – продуцентів біологічно активних речовин.

Ферментатор з пневматичним перемішуванням і аеруванням.

В ферментаторі вихорова - система аерації з засмоктуванням повітря мішалкою через порожнистий вал, трубу-інжектор і т. д. Є конструкції ферментаторів, в яких стерильне повітря подається по кришці апарату вентилятором.

Ферментатор з турбінними мішалками. Ферментатор з механічним перемішуванням і обертовими аераторами.

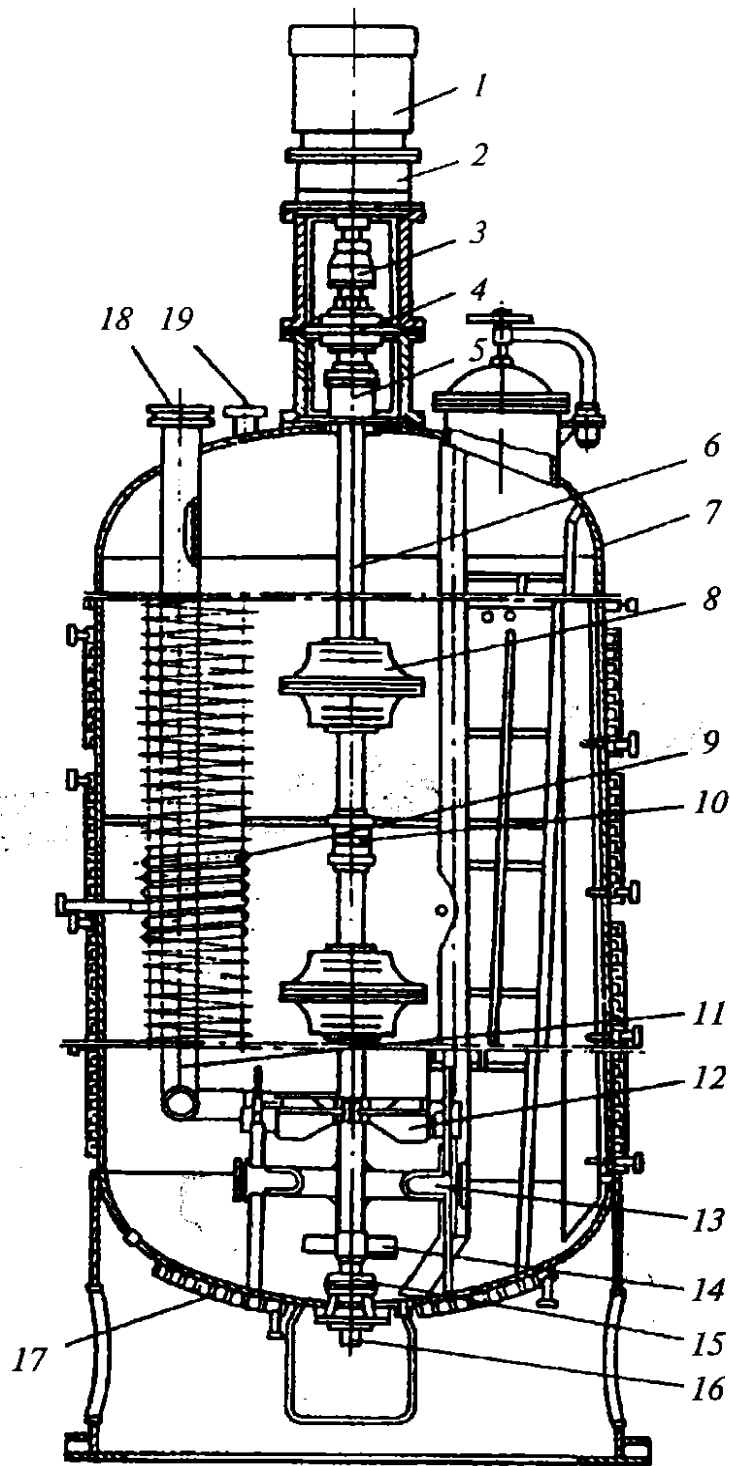


Рис. 2.1. Ферментатор з механічним перемішуванням барботажного типу

Бактофугування здійснюється з використанням сепараторів-бактофуг, які працюють за тім же принципом, що і молокоочищувачі. Концентрат біомасі бактерій відділяється за допомогою відцентрової сили обертання барабана (більше 16000 об/хв.). Неодмінною особливістю бактофуг є соплове розвантаження осаду бактеріальної суспензії.

Машина для наповнення і запаювання ампул .

Машина призначена для наповнення ампул рідкими або дрібно-гранульованими речовинами і запаювання ампул за допомогою газового пальника. Укладання їх в прямокутні касети типу АП 16-4-0.

Ліофілізацію проміжного продукту здійснюють в ліофільній сушильній установці марки ТГ - 50, а попереднє заморожування проводять в установці глибокої заморозки. В комплект ТГ - 50 входять:вакуумна установка, в тому числі: сушильна камера, конденсатор, пластинчато-роторний вакуум-насос, термостат; холодильна установка;розподільна шафа.

2.5. Висновки до розділу

Встановлено, що аскорбінова кислота може бути отримана з моносахаридів D- або L-ряду. Відомо кілька методів її синтезу:

1. Бензоїновий метод.
2. Ціангідриновий метод.
3. Отримання аскорбінової кислоти з бурякового «жому» (відходи виробництва цукру з буряка).
4. Частково мікробіологічний метод отримання аскорбінової кислоти з D-глюкози. Включає 5 стадій, в т. ч. 3 хімічних.
5. Метод Рейхштейна. Цей метод складається з 6 стадій (1 стадія мікробного синтезу):
 - 1 стадія. Отримання D-сорбіта з D-глюкози методом каталітичного відновлення воднем.
 - 2 стадія. Отримання L-сорбози з D-сорбіту шляхом його глибинного аеробного окислення оцтовокислими бактеріями.
 - 3 стадія. Отримання діацетон-L-сорбози з L-сорбози шляхом її ацетонування.
 - 4 стадія. Отримання гідрату діацетон-2-кето-L-гулонової кислоти шляхом окислення діацетон-L-сорбози.

5 стадія. Отримання L-аскорбінової кислоти з гідрату диацетон-2-кетогулонової кислоти.

6 стадія. Отримання медичної аскорбінової кислоти. Перекристалізація технічної аскорбінової кислоти.

Мікробіологічний метод відкриває великі перспективи у сфері синтезу аскорбінової кислоти.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ РОБОТИ

3.1. Загальна характеристика *Gluconobacter oxydans*

Gluconobacter oxydans (див. рис. 3.1) – грам-негативна бактерія, що належить до сімейства *Acetobacteraceae*. *G. oxydans* – облігатний аероб, тобто використовує кисень як термінальний акцептор електронів при диханні. *Gluconobacter* поширений в "солодких" нішах, наприклад, в зрілих фруктах, плодах, сидр, пиво, вино. Ця бактерія не патогенна для людини та інших тварин, але здатна до породження бактеріальної гнилі яблук і груш.

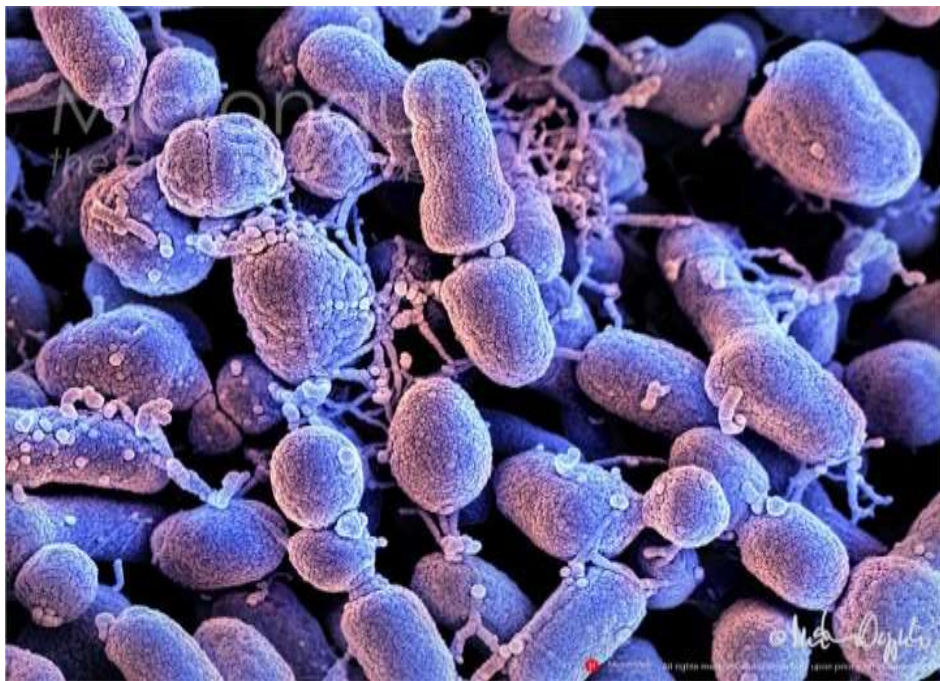


Рис. 3.1. Мікрофотографія *Gluconobacter oxydans*

Gluconobacter oxydans – уксусно-кислі бактерії, які характеризуються неповним окисленням широкого діапазону вуглеводів і спиртів. Це неповне окислення веде до утворення безлічі продуктів з хорошим кількісним виходом, що робить бактерію *G. oxydans* важливим об'єктом для промислового використання.

Штами *Gluconobacter* можуть бути використані в промисловості для виробництва L-сорбози (вітаміну C) з D-сорбіту; D-глюконової кислоти, 5-кето і 2-кетоглюконової кислоти з D-глюкози; дигідроксиацетона з гліцерину. *G. Oxydans* також важливий в біотехнології при виробництві антидіабетичного препарату Miglitol [36].

Геном цієї бактерії був секвенований з метою визначення послідовностей тих самих корисних ферментів, які синтезують промисловоцінні продукти (вітамін C, дигідроксацетон і т.д.). Надалі гени цих ферментів можна було б клонувати в плазмідний вектор. І тим самим трансфіковані бактерії-продуценти і отримувати в більшій кількості цінних харчів [37].

Аеробні мікроорганізми зазвичай окисляють свої джерела вуглецю до вуглекислого газу і води. Під час цього процесу генеруються енергія і проміжні метаболіти, необхідні для біосинтезу. Навпаки, багато бактерії оцтової кислоти не повністю окислюють свої субстрати навіть при нормальних умовах росту. Серед них – α -протеобактерія *G. oxydans*. *G. oxydans* відомий своїм неповним окисленням широкого кола вуглеводів і спиртів у процесі, який називається окислювальним бродінням. Відповідні продукти (альдегіди, кетони та органічні кислоти) виділяються майже повністю в середовище. Організм здатний рости у висококонцентрованих цукрових розчинах і при низьких значеннях рН. Високі швидкості окислення корелюють з низьким виробництвом біомаси, що робить штами *G. oxydans* придатними для промислового застосування[38].

Штами *G. oxydans* використовуються для виробництва L-сорбози з D-сорбітолу (синтез вітаміну C) 3 і 6-аміно-L-сорбози з 1-аміно-D-сорбітолу для синтезу протидіабетичного препарату Miglitol. Вони також можуть бути використані промислово для отримання D-глюконової кислоти, і кетоглюконових кислот з D-глюкози і дигідроксиацетона з гліцерину. Штами цього роду також продукують аліфатичні, ароматичні карбонові та тіокарбонові кислоти, які знаходять застосування як ароматизуючі інгредієнти. Крім того, вважається, що ферменти *Gluconobacter* і цілі клітини ідеально підходять для використання в якості біологічного елемента в сенсорних системах для виявлення спиртів, цукрів і

поліолів. Природні місця існування *G. oxydans* – це квіти і плоди. Мікроорганізми також містяться в алкогольних напоях (вина і пива) і безалкогольних напоях, де викликає неприємні смаки і псування [39, 40].

3.2. Удосконалення технології отримання біологічно активних форм аскорбінової кислоти

На рис. 3.2. наведена схема отримання аскорбінової кислоти.

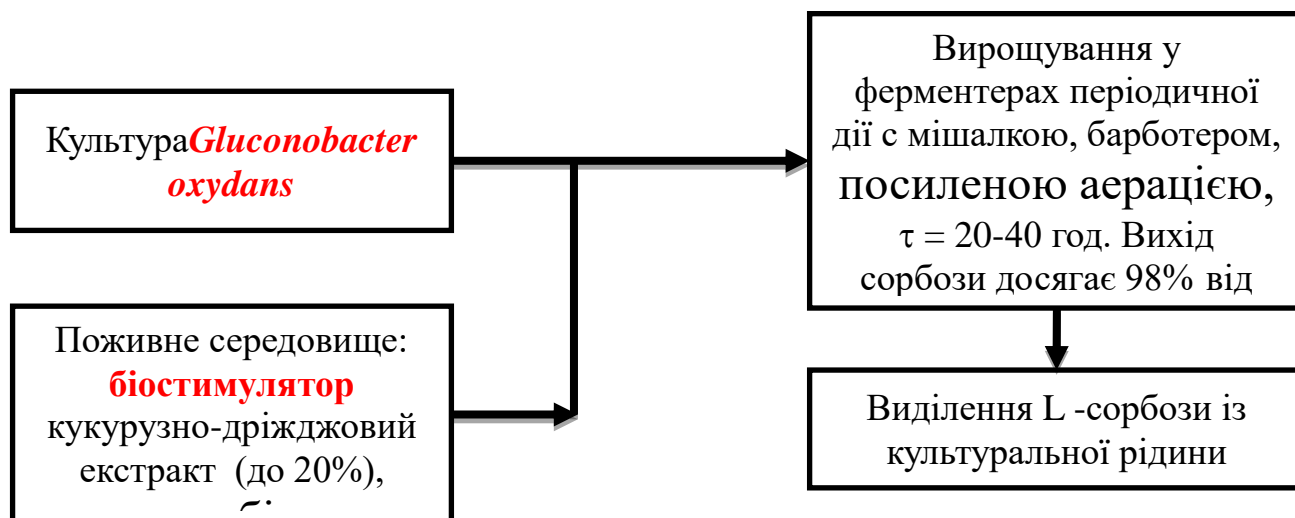


Рис. 3.2.Схема отримання аскорбінової кислоти

- Приготування дріжджового біостимулятора, дріжджового автолизата і розведеної сірчаної кислоти.
- Приготування і вирощування посівного матеріалу.
- Проведення процесу біохімічного окислення в виробничому ферментаторі.
- Виділення кристалічної L-сорбози з окисленого розчину.
- Технологічний процес окислення D-сорбіту в L-сорбозу.

Біостимулятор готують із дріжджів, вилучають необхідні компоненти із дріжджових клітин за допомогою автолізу. Поживним середовищем для робочої культури є очищений розчин D-сорбіту і біостимулятора.

Після цього глибинну культуру стерильно переносять в посівні ферментатори. Культуру з інокулятора перевіряють на чистоту і ступінь окислення, яка не повинна бути нижче 30%.

Процес ферментації ведуть двома способами:

- періодичним
- безперервним

Безперервний спосіб ферментації включає 2 стадії:

- безперервне культивування оцтовокислих бактерій при біохімічному окисленні D-сорбіту,
- безперервне виділення кристалічної L-сорбози з окисленого розчину.

Найбільш ефективно процес ферментації здійснюється в колонному ферментері (установка типу УНФ-100).

В апарат з певною швидкістю, безперервно подається робоча культура, стерильне середовище (водний розчин сорбіту з концентрацією D-сорбіту 22%), а також стиснене повітря.

Процес проводиться при $t=30-36^{\circ}\text{C}$, $p = 0,2-0,5 \text{ атм}$, $pH=4-4,5$, $\tau=28-39 \text{ год}$.

Окислений розчин безперервно відводиться з верхньої частини колонного ферментатора до збірки, а потім надходить на доокислення в періодично діючі ферментатори, де глибина окислення підвищується з 70-80% до 95%. Окислений розчин сорбіту з вмістом сухих речовин 20-25% направляють на очищення.

Отже, проаналізувавши 3 основні способи виробництва вітаміну С, можемо сказати, що найбільш доцільно використовувати мікробіологічний метод синтезу. Цей метод найбільш безпечний та економічно вигідний за всіма досліджуваними показниками у порівнянні з іншими способами (див. рис. 3.3).

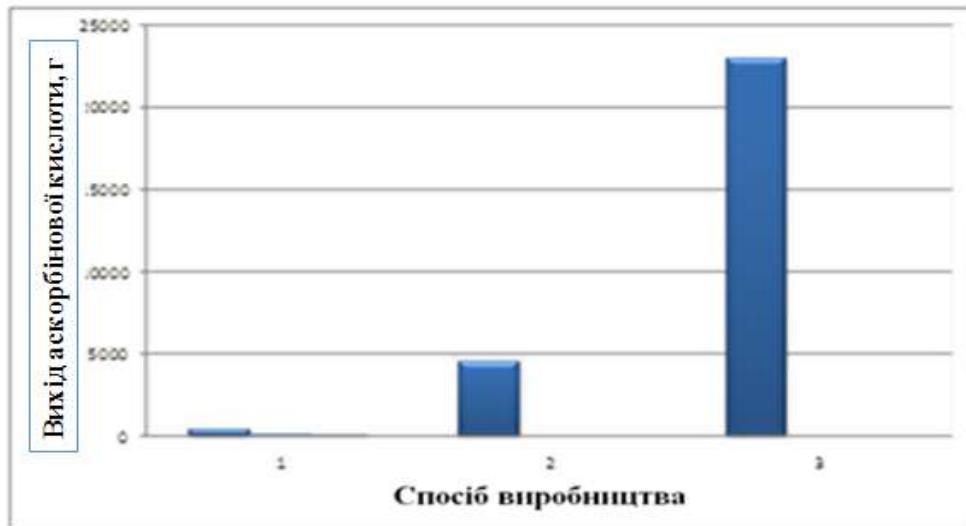


Рис. 3.3. Продуктивність виробництва аскорбінової кислоти:
 1 – з рослинної сировини, 2 – хімічний синтез, 3 – мікробіологічний синтез

3.3. Висновки до розділу

Удосконалено технологічну схему отримання аскорбінової кислоти за рахунок використання *Gluconobacter oxydans* – укусно-кислих бактерій, які характеризуються неповним окисненням широкого діапазону вуглеводів і спиртів, а також додаванням до аоживного середовища біостимулятора. Технологія складається з декількох етапів:

- Приготування дріжджового біостимулятора, дріжджового автолизата і розведеної сірчаної кислоти.
- Приготування і вирощування посівного матеріалу.
- Проведення процесу біохімічного окислення в виробничому ферментаторі.
- Виділення кристалічної L-сорбози з окисленого розчину.
- Технологічний процес окислення D-сорбіту в L-сорбозу.

ВИСНОВКИ

1. Проаналізовано, що аскорбінова кислота (вітамін С) – водорозчинний вітамін, який сприяє оптимальному перебігу тканинного обміну. Бере активну участь в окисно-відновних реакціях.
2. Встановлено, що аскорбінову кислоту отримують з рослинної сировини, хімічним синтезом та за допомогою мікроорганізмів. Зараз чітко простежується тенденція до зменшення кількості хімічних стадій за рахунок залучення біотехнологічних методів. Найбільш досконала стадія в промисловому синтезі аскорбінової кислоти – трансформація D-сорбіта в L-сорбозу, здійснювана мікробіологічним окисленням.
3. Удосконалено технологічну схему отримання аскорбінової кислоти за рахунок використання *Gluconobacter oxydans*– уксусно-кислих бактерій, які характеризуються неповним окисленням широкого діапазону вуглеводів і спиртів, а також додаванням до поживного середовища біостимулятора.

СПИСОК БІБЛОГРАФІЧНИХ ПОСИЛАНЬ ВИКОРИСТАНИХ

ДЖЕРЕЛ

1. Гусев М. В. Микробиология: учебник / Гусев М. В. – Москва : Изд-во Академия, 2003. – 464 с.
2. Волгарев М. Н. Обеспеченность организма человека витаминами и пути его улучшения / М. Н. Волгарев, В. Б. Спиричев // Теоретические и клинические аспекты науки о питании. – 1984. – № 2. – С. 36-41.
3. Vitamin C helps genes to kill off cells that would cause cancer – [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://www.newscientist.com/article/2144410-vitamin-c-helps-genes-to-kill-off-cells-that-would-cause-cancer/>.
4. Воробьева Л. И. Микробиологический синтез витаминов / Воробьева Л. И. – Москва : Изд-во МГУ, 1982. – 16 с.
5. Николаевский В. В. Антиоксидантные свойства биологически активных веществ растительного происхождения / В. В. Николаевский, И. К. Иванов // Актуальные вопросы курортной терапии. – Пятигорск, 1985. – С. 51–53.
6. Аркадьева З. А. Промышленная микробиология / Аркадьева З. А., Безбородов А. М. – Москва : Изд-во Высшая школа, 1989. – 688 с.
7. Букин Ю. В. Молекулярно-биологические основы и перспективы витаминной профилактики рака / Ю. В. Букин // Вопросы онкологии. – М., 1986. – Т. 32, № 11. – С. 35-47.
8. Вальдман А. Ф. Витамины в животноводстве / Вальдман А. Ф. – Рига : Изд-во Знание, 1977. – 145 с.
9. Державна Фармакопея України / ДП «Науково-експертний фармакопейний центр». 1-е вид, доп. 2. – Харків: Вид-во ДП «Науково-експертний фармакопейний центр», 2008. – 620 с.
10. Історія виникнення вітаміну С – [Електронний ресурс]. – Режим доступу: medprosvita.com.ua/istoriya-viniknennya-vitaminu/.

11. Вітаміни групи В – [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://www.esc.lviv.ua/vitaminy-hrupy-v/>.
12. Mitic S. S. Rapid and Reliable HPLC Method for the Determination of Vitamin C in Pharmaceutical Samples Tropical / Mitic S. S., Kostic D. A., Naskovicokic D. C., Mitic M. N. // J. Pharm. Res. – 2011. – Volume 10 (1). – P. 105–111.
13. Кричковская Л. В. Природные антиоксиданты / Л. В. Кричковская [и др.] – Харьков : Изд-во Модель Вселенной, 2001. – 376 с.
14. Акимова Т. А. Экология / Акимова Т. А., Хаскин В. В. – Москва : Изд-во ЮНИТИ, 2008. – 231 с.
15. Лашко Н.П. Хімія харчових добавок та вітамінів: Навчально-методичний посібник для студентів IV курсу біологічного факультету спеціальності «Хімія» / Лашко Н.П., Ткачук О.В. – Запоріжжя: Вид-во ЗНУ, 2014. – 127 с.
16. McEntyre C. J. A high performance liquid chromatographic method for the measurement of total carnitine in human plasma and urine / McEntyre C. J., Lever M., Storer M. K. // Clin. Chim. Acta. – 2004. – Volume 344. – P. 123–130.
17. Медичний словник та медична термінологія – [Електронний ресурс]. – Режим доступу: http://medterms.com.ua/publ/medichni_termini_na_literu_v/vitamin_c/3-1-0-1434.
18. Одинец А. Г. Сырье и добавки / А. Г. Одинец, А. Т. Сейсенова // Пищевая промышленность. – 2001. – № 8. – С. 2–4.
19. He G. X. Improved high-performance liquid chromatographic method for analysis of L-carnitine in pharmaceutical formulations / He G. X. Dahl T. // J. Pharm. Biomed. Anal. – 2000. – Volume 23. – P. 315–321.
20. Позняковский В. М. Пищевые ингредиенты и биологически активные добавки. Учебник / Позняковский В. М., Чугунова О. В., Тамова М. Ю. – Москва: Изд-во ООО «Научно-издательский центр ИНФРА-М», 2017. – 143 с.
21. Холл Дж.Н. Глобальне розмаїття споживання фруктів та овочів / Дж.Н. Холл, С. Мур, С.Б. Харпер, Дж.У. Лінч // Американський журнал профілактичної медицини. – 2009. – № 36(5). – С. 402-409.

22. Сабадишин Р.О. Медична біологія. Підручник для студентів вищих медичних навчальних закладів I-II рівнів акредитації / Сабадишин Р.О., Бухальська С.Є. – Вінниця: Вид-во Нова Книга, 2008. – 368 с.
23. Qadir M. A. Development and Validation of New HPLC Method for Simultaneous Estimation of L-Lysine Hydrochloride and L-Carnitine-L-Tartrate in Pharmaceutical Dosage Form / Qadir M. A., Ahmed M., Hussain W. A., Tahir M. S. // Indian J. Pharm. Sci. – 2015. – Volume 77 (4). – P. 434–438.
24. Laura S. H. Determination of L-and D carnitine in dietary food supplements using capillary electrophoresis tandem mass spectrometry / Laura S. H. [and other] // Food Chem. – 2010. – Volume 120. – P. 921–928.
25. Смирнов М.И. Витамины / Смирнов М.И. – Москва : Изд-во Медицина, 1974. – 156 с.
26. Слободская Н. С. Биологически активные добавки: значение и применение / Н. С. Слободская // Журнал ГрГМУ – 2015. – № 4. – С. 119–122.
27. Тюренкова И.Н. Растительные источники витаминов / Тюренкова И.Н. – Волгоград : Изд-во Волгоград, 1999. – 45 с.
28. Хавинсон В. Х. Свободнорадикальное окисление и старение / В. Х. Хавинсон [и др.] – Санкт-Петербург : Изд-во Наука 2003. – 327 с.
29. Вітаміни та речовини, що помилково називають вітамінами – [Електронний ресурс]. – Режим доступу: http://lifebio.wiki/%D0%B2%D0%B8%D1%82%D0%B0%D0%BC%D0%B8%D0%BD_%D1%81.
30. Воробьева Л. И. Промышленная микробиология / Воробьева Л. И. – Москва : Изд-во МГУ, 1989. – 294 с.
31. Хасанов В. В. Методы исследования антиоксидантов / В. В. Хасанов, Г. А. Рыжова, Е. Р. Мальцева // Химия растительного сырья. – 2004. – № 3. – С. 16.
32. Шнайдман Л. О. Производство витаминов из растительного и животного сырья / Шнайдман Л. О. – Москва : Изд-во Пищепромиздат, 1985. – 323 с.
33. Чому дієтична добавка «Nutrilite» – [Електронний ресурс]. – Режим доступу: http://www.nutrilite.ua/uk_ua/supplements.html#%D1%87%D0%BE%D0%BC%D1%83-%D0%B4%D1%96%D1%94%D1%82%D0%B8.

34. Parbhunath O. L. Optimization and Validation of a Reverse-Phase High Performance Liquid Chromatography Assay with Ultra-Violet Detection for Measuring Total L-Ascorbic Acid in Food and Beverage Products / Parbhunath O. L., Rautenbach F., Davison G., Marnewick J. L. // J. Anal. Bioanal. Tech. – 2014. – Volume 5. – P.201-206.
35. Бочков И.А., Н.М. Овчарова // Журн. микробиол. 1991.- N. 8.- С .71-74.
36. Блинов Н.П. Химическая микробиология / Н.П. Елинов. Москва: Высш. шк., 1989.-448 с.
37. Tanaka R. The effect of the ingestion of fermented milk with *Lactobacillus* *cassi* microbiol ecology in healthy volunteers // Gut Flora and Health – Past, Present and Future. – London, New York : Roual Society of Medicine Press Limited, 2006. – P. 37–45.
38. Несчисляев, В. А. Универсальная защитная среда для лиофилизации пробиотических препаратов / В. А. Несчисляев, Е. В. Орлова, И. А. Бахтин // Казан. мед. журн. – 2010. – Т. 91, № 1. – С. 122-124.
39. Березов Т. Т., Коровкин Б. Ф. Биологическая химия: Учебник.– 3-е изд., перераб. и доп.– М.: Медицина, 1998.– 704 с.: ил
40. Благодатская В.М. Накопление сухого вещества и концентрация витайнов в клетках дрожжей. – “Микробиология”, 2007, т. 30 вып. 3, с. 421.
41. Волова Т. Г. Биотехнология / Т. Г. Волова. – Новосибирск: Изд-во Сибирского отделения Российской Академии наук, 1999. – 252 с.