

Г. П. Пирог
О. А. Ігнатова

Загальна

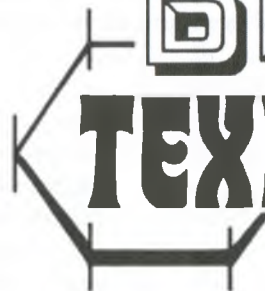
БІО

ТЕХНОЛОГІЯ



Т. П. Пирог
О. А. Ігнатова

Загальна **БІО** **ТЕХНОЛОГІЯ**



Затверджено Міністерством освіти
і науки України як підручник
для студентів вищих навчальних закладів

Т. П. Пирог, доктор біологічних наук

О. А. Ігнатова, кандидат біологічних наук

Рецензенти: **В. С. Підгорський**, академік НАН України, доктор біологічних наук, професор, директор Інституту мікробіології і вірусології НАН України; **В. П. Новіков**, доктор хімічних наук, професор, завідувач кафедри технології біологічно активних сполук, фармації та біотехнології Національного університету «Львівська політехніка»; **Н. Ф. Кігель**, доктор технічних наук, завідувач відділу біотехнології Технологічного інституту молока і м'яса УААН

Пирог Т. П., Ігнатова О. А. Загальна біотехнологія: Підручник. — К.: НУХТ, 2009. — 336 с.

ISBN 978-966-612-083-3

Викладено всі аспекти біотехнології: становлення і розвиток, основні складові та етапи біотехнологічного процесу, основи культивування мікроорганізмів і клітин, принципи регуляції процесів мікробіологічного синтезу, методи виділення цільового продукту залежно від його локалізації, знешкодження відходів біотехнологічних виробництв, біохімічні основи мікробіологічного синтезу, коротка характеристика основних технологій мікробного синтезу, в тому числі й мікробних імунобіологічних препаратів, а також харчової, екологічної та молекулярної біотехнології.

Для студентів вищих навчальних закладів, що навчаються за напрямом «Біотехнологія» і «Біологія», а також для спеціалістів, які працюють у галузі біотехнології.

УДК 631. 147(075.8)

ВСТУП

Певні періоди історії людства характеризуються переважним розвитком якоїсь життєво важливої господарської галузі. Близько 6—8 тисяч років тому людина інтуїтивно почала використовувати процеси бродіння у виробництві хліба, вина і пива. Саме тоді було закладено фундамент сучасної біотехнологічної промисловості.

Термін «біотехнологія» вперше був запропонований у 1917 р. угорським інженером Карлом Ерекі для опису процесу великомасштабного виробництва свинини з використанням цукрових буряків як корму для годівлі свиней. За визначенням Ерекі, біотехнологія — це «всі види робіт, у процесі яких з сировинних матеріалів за допомогою живих організмів виробляються ті чи інші продукти». Проте таке справді точне визначення не набуло значного поширення. Тривалий час термін «біотехнологія» використовувався у двох дуже різних дисциплінах. З одного боку, коли йшлося про промислову ферментацію, а з іншого — про галузь, що нині називається ергономікою. Така неоднозначність закінчилася у 1961 р., коли шведський мікробіолог К. Г. Хеден порекомендував змінити назву наукового журналу «*Journal of Microbiological and Biochemical Engineering and Technology*» («Журнал мікробіологічної і хімічної інженерії і технології»), що спеціалізувався на публікації праць з прикладної мікробіології і промислової ферментації, на «*Biotechnology and Bioengineering*» («Біотехнологія і біоінженерія»). З тих пір біотехнологія тісно пов'язана з дослідженнями в галузі «промислового виробництва товарів і послуг за участю живих організмів, біологічних систем і процесів», фундаментом для яких стала мікробіологія, біохімія та інженерія.

Незважаючи на велику різноманітність агентів, що здійснюють біотехнологічні маніпуляції, основними об'єктами біотехнології все ще залишаються мікроорганізми. До епохи рекомбінантних ДНК найефективнішим методом підвищення продуктивності мікроорганізмів був мутагенез з подальшою селекцією оптимального штаму-продуцента. У 1973 р. американці С. Кoen і Г. Бойер розробили спосіб перенесення генетичної інформації з одного організму в інший. Цей метод, що дістав назву технології рекомбінантних ДНК, дав змогу вченим виділяти конкретні гени і вводити їх в організм нового хазяїна.

З розвитком технології рекомбінантних ДНК природа біотехнології кардинально змінилася. З'явилась можливість створювати, а не просто відбирати високопродуктивні штами, використовувати мікроорганізми і еукаріотичні клітини як «біологічні фабрики» для виробництва інсуліну, інтерферонів, гормону росту, вірусних антигенів і безлічі інших білків. Рослини і тварини стали природними біореакторами, що продукують нові чи змінені генні продукти, які б ніколи не могли бути створені методами мутагенезу і селекції або схрещування. І нарешті, ця нова технологія сприяє розвитку принципово нових методів діагностики і лікування різних захворювань.

Розвиток біотехнології дає змогу істотно інтенсифікувати виробництво, підвищувати ефективність використання природних ресурсів, вирішувати екологічні проблеми, створювати нові джерела енергії. Можливості біотехнології у разі міжнародного співробітництва фахівців можуть бути спрямовані на вирішення світових кризових проблем, пов'язаних із поповненням дефіциту білка й енергії, запобіганням небезпечним захворюванням, охороною навколишнього середовища.

Розробка біотехнологічних процесів пов'язана з великими капіталовкладеннями. Впровадження новітніх біотехнологій є доцільним і перспективним у разі, якщо цільовий продукт не може бути одержаний іншими способами або може бути одержаний у недостатніх кількостях, за вищою ціною. Дослідження в цьому напрямку в основному зосереджені на виробництві фармакологічних препаратів, діагностиків.

Імунна біотехнологія, яка дає змогу розпізнавати і виділяти з суміші окремі клітини, може застосовуватися не тільки безпосередньо в медицині для діагностики й лікування, а й у наукових дослідженнях, фармакологічній, харчовій та інших галузях промисловості, а також використовуватися для одержання препаратів, синтезованих клітинами захисної системи організму.

Велике майбутнє біотехнології пов'язане із протоінженерією — технологією зміни на генетичному рівні властивостей природних та одержання нових білків (наприклад, нових стимуляторів росту рослин, інсектицидів, активних і стійких ферментів, високоякісних харчових продуктів, біосенсорів і біоелементів, медичних приладів).

Із впровадженням біотехнології у видобувну промисловість пов'язаний перехід від важкої індустрії до високих технологій. Біогеотехнологія металів перспективна для вилучення із руд платини та інших дорогоцінних і стратегічно важливих металів, а біотехнологічні методи — для збільшення видобутку нафти, видалення сірки з вугілля, метану із шахт.

Впровадження біотехнології в практику змінює співвідношення в системі людина — виробництво — природа, підвищує продуктивність праці. Широке використання біотехнологічних процесів сприяє стиранню межі між промисловим і сільським виробництвом, оскільки харчові продукти, корми та інша сільськогосподарська продукція виробляються в індустріальних умовах. Так, на фермах встановлюють установки для переробки сільськогосподарських відходів у біогаз, використовуваний для задоволення власних потреб у паливі; впроваджують промислові методи виробництва компонентів кормів.

На сьогодні досягнення біотехнології використовуються у таких галузях:

- харчова, фармацевтична, хімічна, нафтогазова промисловість — використання нових речовин і матеріалів, одержуваних мікробіологічним синтезом і біотрансформацією на основі як природних, так і сконструйованих методами генної інженерії штамів мікроорганізмів;

- екологія — підвищення ефективності екологічного захисту рослин, розробка екологічно безпечних технологій очищення стічних вод, утилізація відходів агропромислового комплексу, конструювання екосистем;

- енергетика — використання нових джерел біоенергії, одержаних на основі мікробіологічного синтезу й модельованих фотосинтетичних процесів, біоконверсії біомаси в біогаз;

- сільське господарство — розробка трансгенних агрокультур, біологічних засобів захисту рослин, бактеріальних добрив, мікробіологічних методів рекультивації ґрунтів, створення ефективних кормових препаратів з рослинної, мікробної біомаси й відходів сільського господарства, репродукція тварин на основі ембріогенетичних методів;

- медицина — розробка медичних біопрепаратів, моноклональних антитіл, діагностикумів, вакцин тощо.

Бурхливий розвиток сучасної біології та біотехнології потребують постійного оновлення навчальної літератури з відповідних дисциплін. Слід зазначити, що досі в Україні не було україномовного підручника, який би охоплював усі аспекти загальної біотехнології (від вивчення біологічних агентів, сировинної та апаратурної бази, узагальненої схеми біотехнологічного процесу, способів культивування клітин мікроорганізмів, рослин і тварин до характеристики конкретних біотехнологічних процесів, у тому числі й таких, що належать до молекулярної біотехнології). Уперше підручник «Загальна біотехнологія» містить розділ, присвячений біогенезу продуктів мікробного синтезу.

У першому розділі підручника розглянуто сучасний стан розвитку біотехнології у різних країнах світу, перспективи розвитку цієї науки, охарактеризовано ринок сучасної біотехнологічної продукції.

Другий розділ присвячено характеристиці складових біотехнологічного процесу (біологічний агент, субстрат, цільовий продукт), третій — характеристиці основних його етапів (передферментаційні процеси, ферментація, виділення цільового продукту).

У четвертому розділі охарактеризовано основні відходи біотехнологічних виробництв, шляхи їх знешкодження.

У п'ятому розділі наведено дані про шляхи біосинтезу препаратів на основі біомаси мікроорганізмів, їх первинних (амінокислоти, органічні кислоти, вітаміни) і вторинних (антибіотики, екзополісахариди, поверхнево-активні речовини) метаболітів, продуктів бродіння (спирти, органічні кислоти, кетони), а у шостому — технологічні особливості одержання найважливіших мікробних метаболітів.

Сьомий розділ описує технології одержання та переробки харчових продуктів із використанням мікроорганізмів.

У восьмому розділі розглянуто біотехнологічні методи для вирішення

проблем навколишнього середовища — переробка відходів, очищення води, усунення забруднень, а також приділено увагу технологіям одержання екологічно чистої енергії.

Дев'ятий та десятий розділи присвячені сучасним напрямам біотехнології, генетичній і клітинній інженерії.

Кожен розділ закінчується контрольними запитаннями для самоперевірки знань.

Наведені у підручнику матеріали є базовими для подальшого вивчення фахових технологічних та інженерних дисциплін (технологія антибіотиків, ферментів, вітамінів, вакцин, пробіотиків тощо, основи проектування, устаткування біотехнологічних виробництв та ін.).

СПИСОК СКОРОЧЕНЬ

АДФ	— аденозиндифосфат
АК	— аспартаткіназа
δ-АЛК	— δ-амінолевулінова кислота (5-амінолевулінова кислота)
АМФ	— аденозинмонофосфат
АП	— ацильований полісахарид
АПБ	— ацилпереносний білок
АС	— антранілатсинтетаза
АТФ	— аденозинтрифосфат
БА	— біологічний агент
БАР	— біологічно-активні речовини
БВК	— білково-вітамінний концентрат
БСК	— біохімічне споживання кисню
ВАТ	— відкрите акціонерне товариство
ГД	— гомосериндегідрогеназа
ГК	— гомосеринкіназа
ГДФ	— гуанозиндифосфат
ГМО	— генно-модифікований організм
ГРЛ	— гормон росту людини
ГТФ	— гуанозинтрифосфат
ДАГФ	— 3-дезоксид- <i>D</i> -арабіногептулозо-7-фосфатсинтаза
ДДПС	— дигідродипіколінатсинтетаза
ДДТ	— дихлордифенілтрихлорметилметан
2,5-ДКГ	— 2,5-дикето- <i>D</i> -глюконова кислота
ДНК	— дезоксирибонуклеїнова кислота
кДНК	— синтезована дезоксирибонуклеїнова кислота, комплементарна мРНК
ЕПС	— екзополісахариди
ЕСК	— ембріональні стовбурові клітини
ІОК	— β-індоліл-3-оцтова кислота
ІФН	— інтерферони
КоА	— коензим А
КДФГ	— 2-кетод-3-дезоксид-6-фосфоглюконат
ККМ	— критична концентрація міцелоутворення
2-КЛГ	— 2-кетод- <i>L</i> -гулонова кислота
НАД	— нікотинамідаденіндинуклеотид
НАДН	— нікотинамідаденіндинуклеотид відновлений
НАДФ	— нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат

НАДФН	— нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат відновлений
НАД(Ф)	— нікотинамідаденіндинуклеотид або нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат
НАД(Ф)Н	— нікотинамідаденіндинуклеотид або нікотинамід- аденіндинуклеотидфосфат відновлений
НАП	— неацильований полісахарид
ПАР	— поверхнево-активні речовини
ПВК	— піровиноградна кислота
ПХХ	— піролохінолінхінон
РНК	— рибонуклеїнова кислота
мРНК	— матрична (інформаційна) рибонуклеїнова кислота
РР	— редукуючі речовини
СР	— сухі речовини
СТГ-РФ	— гіпоталамічний релізінг-фактор соматотропіну
ТДФ	— тимідиндифосфат
УБС	— установка безперервної стерилізації
УДФ	— уридиндифосфат
УМФ	— уридинмонофосфат
УТФ	— уридинтрифосфат
УФ	— ультрафіолет
ФАД	— флавінаденіндинуклеотид
ФМН	— флавінмононуклеотид
ФЕП	— фосфоенолпіруват
Ф	— фосфат неорганічний
ЦТК	— цикл трикарбонових кислот
ЄВФ	— Європейська біотехнологічна федерація
НЕРА	— High Efficiency Particle Absorbption
GMP	— Good Manufacturing Practice, належна виробнича практика
pO_2	— парціальний тиск розчиненого кисню
pCO_2	— парціальний тиск розчиненого діоксиду вуглецю

СТАНОВЛЕННЯ ТА РОЗВИТОК БІОТЕХНОЛОГІЇ

Біотехнологічні принципи людина розробила давно. Такі процеси, як бродіння, заквашування, соління, хлібопекарство, що спричиняються мікроорганізмами, людство використовувало задовго до відкриття самих мікроорганізмів. Проте як окрема галузь науки та промисловості біотехнологія сформувалася у другій половині XX ст. Сам термін «біотехнологія» набув широкого використання у 70-х роках XX ст. (біотехнологія від грец. *біос* — життя, *технос* — мистецтво, майстерність, *логос* — слово, вчення).

Відомо багато визначень, що таке біотехнологія. Згідно з пропозицією Міжнародного союзу теоретичної і прикладної хімії (1981 р.), біотехнологія — це практичне застосування біохімії, мікробіології та хімічної технології у промислових процесах, створення нової продукції і захист навколишнього середовища.

За визначенням Європейської біотехнологічної федерації (ЄБФ) біотехнологія є такою інтеграцією природничих та інженерних наук, за допомогою якої використання клітин, клітинних структур і окремих біомолекул уможливорює одержання якісніших і дешевших продуктів медичного і промислового призначення або проведення інших корисних маніпуляцій.

Отже, у своїй основі біотехнологія є міждисциплінарною галуззю знань, що базується на мікробіології, біохімії, молекулярній біології, біоорганічній хімії, біофізиці, вірусології, імунології, генетиці, інженерних науках і електроніці.

1.1. ІСТОРИЧНА ДОВІДКА

Виникнення, становлення й розвиток біотехнології умовно можна поділити на чотири історичних періоди: емпіричний, етіологічний, біотехнічний і генотехнічний.

Емпіричний (від грец. *εμπειρικός* — досвідчений), або доісторичний, період — найтриваліший, що охоплює приблизно 8000 років, з яких понад 6000 тис. років до н. е. й близько 2000 років н. е. Давні люди інтуїтивно використовували прийоми й способи виготовлення хліба, пива й деяких інших продуктів. Упродовж кількох тисячоліть використовується оцет; перша дистиляція вина здійснена в XII ст., горілку із хлібних злаків одержували в XVI ст., шампанське відоме з XVII ст. У XIV ст. (орієнтовно 1235—1315 pp.) іспанцеві Раймунду Луллію вперше вдалося одержати майже абсолютний етанол перегонкою вина з негашеним вапном.

До того ж самого періоду належить одержання кисломолочних продуктів, квашеної капусти, медових алкогольних напоїв, силосування кормів.

Другий, **етіологічний** (від грец. αιτία — причина), період у розвитку біотехнології охоплює другу половину XIX ст. і першу третину XX ст. (1856—1933). Він пов'язаний із видатними дослідженнями великого французького вченого Луї Пастера (1822—1895) — засновника наукової мікробіології й ряду мікробіологічних дисциплін (промислової, медичної, хімічної, санітарної мікробіології). Пастер розкрив мікробну природу бродіння, довів можливість життя в безкисневих умовах, експериментально спростував твердження про самозародження живих організмів, що існувало тоді, створив наукові основи вакцинопрофілактики й вакцинотерапії, запропонував метод стерилізації, названий за його іменем пастеризацією і т. ін.

Роботи Луї Пастера були продовжені його учнями й співробітниками: Е. Дюкло, Е. Ру, Ш.А. Шамберланом, Ж. Вільєменом, І.І. Мечниковим.

Одночасно з Л. Пастером працював у Німеччині, а пізніше у Франції, видатний міколог А. де Барі (1831—1888) — засновник фізіологічної мікології. Він створив класифікацію, що й нині лежить в основі сучасних класифікаційних схем мікро- і макроміцетів. Де Барі також заснував мікофітопатологію — науку про грибкові захворювання рослин. Під його керівництвом сформувалася плеяда видатних учених, у тому числі в Росії: Ф.М. Бальфур, Й.В. Баранецький, О. Брефельд, М.С. Воронін, А. Кох, А.С. Фамінцин та ін.

Ще однією важливою віхою у розвитку біотехнології стало відкриття у 1892 р. Д.І. Івановським (1864—1920) вірусу тютюнової мозаїки. У 1898 р. Р. Лефлер і П. Фрош відкрили вірус ящура, в 1911 р. Д. Керрол — вірус жовтої лихоманки, Ф. Туорт у 1915 р. й Ф. д'Ерель у 1917 р. — віруси бактерій (бактеріофаги). Ці дослідження стали підґрунтям для становлення вірусології.

Етіологічний період ознаменувався розробкою методів одержання чистих культур мікроорганізмів, а також можливістю їх вирощування на поживних середовищах і практичного використання у багатьох процесах (зокрема, бродильних). У цей період розпочато виготовлення харчових пресованих дріжджів, а також деяких продуктів метаболізму мікроорганізмів (ацетон, бутанол, лимонна й молочна кислоти). У Франції почали функціонувати біоустановки для мікробіологічного очищення стічних вод.

Третій період розвитку біотехнології, **біотехнічний**, розпочався у 1933 р. з публікації наукової праці А. Ключєвера й Л.Х.Ц. Перкіна «Методи вивчення обміну речовин цвілевих грибів», у якій викладено основні технічні прийоми, а також підходи до оцінювання й інтерпретації результатів з глибинного культивування грибів, що стало початком упровадження у біотехнологію герметичного устаткування, здатного забезпечити проведення процесів у стерильних умовах.

Подальший розвиток промислового біотехнологічного обладнання був зумовлений організацією виробництва антибіотиків (1939—1945). Роботами багатьох учених була показана можливість механізації процесів бродіння, культивування мікроорганізмів для одержання практично цінних метаболітів (антибіотиків, амінокислот, вітамінів, ферментів тощо). Біотехнологічні процеси істотно розширили сферу виробництва в харчовій промисловості. Ферментативний каталіз замінив собою деякі реакції в синтезі органічних сполук.

Приблизно за 40 років упродовж третього періоду були вирішені основні завдання з конструювання, створення і впровадження у практику необхідного устаткування, у тому числі й біореакторів. Це устаткування використовується у біотехнології донині.

Четвертий період розвитку біотехнології, **генотехнічний** (від грец. γενετική — походження, виникнення, народження), розпочався у 1972 р. і пов'язаний із становленням **генетичної інженерії**. Цього року П. Берг зі своїми співробітниками (США) створив першу рекомбінантну молекулу ДНК, що остаточно закріпило за біотехнологією найважливіше місце в «табелі про ранги» сучасних наук. Роботи видатних біологів О.О. Баєва, А.М. Белозерського, О. Ейвері, Г. Гамова, Х.Г. Корани, Ф. Жакоба, Ж. Моно, Ю.А. Овчинникова, О.С. Спіріна, Р.В. Петрова й багатьох інших доповнили послідовний ряд найважливіших відкриттів з ідентифікації генів, виділення молекул ДНК із рослинних, мікробних і тваринних клітин, розшифровки генетичного коду й механізмів експресії генів у прокариот.

Проте без фундаментальних робіт Ф. Кріка та Дж. Уотсона (1953) зі встановлення структури ДНК було неможливо досягти сучасних результатів в галузі біотехнології. З'ясування механізмів функціонування й регуляції ДНК, виділення й вивчення специфічних ферментів привело до формування строго наукового підходу розробки біотехнологічних процесів на основі генно-інженерних робіт. У цьому суть генотехнічного періоду.

У 70-і роки ХХ ст., коли було показано можливість введення змін до генотипу організмів, що зробило біотехнологію однією з найбільш економічно вигідних галузей, Європейська біотехнологічна федерація (ЄБФ) поставила за мету:

- поглибити співпрацю біотехнології та споріднених галузей;
- створити у всіх країнах урядові організації, що вивчають можливості біотехнології;
- широко вивчати біотехнологію (середні та спеціальні школи, університети), систематично пропагувати перспективи і досягнення галузі.

Уже в 1982 р. надійшов у продаж людський інсулін, синтезований генно-інженерним штамом *Escherichia coli*. У цей час розробляються і випускаються такі генно-інженерні препарати: інтерферони, фактор некрозу пухлин (TNF), інтерлейкін-2, соматотропний гормон людини і його аналог — соматомедин С та ін.

У 50-і роки ХХ ст. у біології виникає ще один важливий напрям — **клітинна інженерія** і пов'язана з нею **клітинна біотехнологія**. Основоположниками цього напрямку є П. Ф. Уайт (США) і Р. Готре (Франція). У ці й наступні роки в Російській академії наук А. А. Курсанов і Р. Г. Бутенко розгорнули дослідження в галузі клітинної інженерії, залучивши до них багатьох молодих учених галузевих академій і університетів.

Генетична й клітинна інженерія визначили основні напрями сучасної біотехнології, досягнення якої широко використовуються у багатьох галузях науки й виробництва в нашій країні й за кордоном.

Отже, біотехнологію можна умовно поділити на такі дві складові:

- **традиційна** (охоплює технічну мікробіологію, а також біохімічну та інженерну ензимологію). У традиційному, класичному розумінні біотехно-

логія — це наука про методи й технології виробництва різних речовин і продуктів з використанням природних біологічних об'єктів і процесів;

— **новітня** (об'єднує генетичну та клітинну інженерію). Новітня біотехнологія — це наука про генно-інженерні й клітинні методи й технології створення й використання генетично трансформованих біологічних об'єктів для інтенсифікації виробництва або одержання нових видів продукції різного призначення.

На сьогодні біотехнологія, як і інформатизація, є одним з головних науково-практичних напрямів ХХІ ст., що визначають рівень світової цивілізації. Біотехнологічна продукція використовується майже у всіх галузях народного господарства: хімічному виробництві (полісахариди, біокаталіз, біодеградабельні полімери), харчовій промисловості (дріжджі, спирт, глюкозні сиропи, ферменти, амінокислоти), сільському господарстві (кормовий білок, амінокислоти, засоби захисту рослин і тварин), медицині (антибіотики, гормони, вакцини, ферменти, діагностичуми), енергетиці (біоетанол, біогаз, біодизель), екології (біоремедіація, збереження біорізноманіття).

1.2. БІОТЕХНОЛОГІЯ — ПРІОРИТЕТНИЙ НАПРЯМ РОЗВИТКУ ЛЮДСТВА У ХХІ СТ.

Упродовж найближчих років прогнозується значне розширення сфер використання біотехнології у таких важливих галузях, як виробництво напівпровідників (нові матеріали), інформаційні технології (мікроелектронні системи, засоби біоінформатики, біокомп'ютери). Впровадження біотехнологічних методів в окремих галузях якісно змінить виробничу базу.

Крім вирішення існуючих і короткотермінових завдань біотехнологія є засобом для розв'язання довгострокових проблем, зокрема перехід від використання традиційних ресурсів до поновлюваних джерел енергії. Це глобальне геополітичне завдання постало перед людством у зв'язку зі зменшенням природних мінеральних запасів, зміною клімату планети і ростом народонаселення.

Слід зазначити, що світові фінансові круги, керівники держав, провідні вчені та експерти, суспільство вже давно усвідомили ключову роль біотехнології у третьому тисячолітті. Про це свідчать капіталовкладення у цю галузь, зростання ринку біотехнологічної продукції, вдосконалення законодавчої бази тощо. З'явився навіть термін «біоекономіка», тобто економіка, основана на використанні досягнень біології і промислової біотехнології (bio-based economy).

Нині у світі зростає конкуренція в галузі біотехнології. Кожна країна намагається знайти своє місце у цій гонці, отримати свій «біотехнологічний паспорт». На думку експертів, саме рівень і стан розвитку біотехнології буде одним із найважливіших критеріїв оцінки розвитку тої чи іншої держави у ХХІ ст.

Слід зазначити, що на сьогодні на перше місце за темпами зростання серед різних біотехнологій виходить мікробіологічна промисловість. Уже йдеться про третю хвилю біотехнологічної революції. Перша хвиля

виробництво лікарських засобів (інсулін, гормон росту тощо), друга — генно-інженерні рослини, що підкорюють світ, а третя — мікробні біотехнології.

У більшості країн світу, в тому числі й у Росії (Національна програма «Пріоритетні науково-практичні напрями розвитку біотехнології на 2009—2015 рр.») визначено такі ключові напрями розвитку біотехнології у XXI ст.: фундаментальна, фармацевтична, сільськогосподарська, промислова, екологічна, харчова біотехнології; правове, економічне, інформаційне та організаційне забезпечення розвитку біотехнології; матеріально-технічна база біотехнології; підготовка кадрів для біотехнології.

Останнім часом за кордоном у розвитку біотехнології стали використовувати так званий *кластерний* підхід. Йдеться про об'єднання, укрупнення, своєрідну агломерацію у функціональному, а найчастіше — у географічному сенсі різних установ і виробництв навколо інтелектуального мозкового центру (як наприклад, відомого університету типу Гарвардського). Такий підхід успішно реалізований у США, у Європі — Великій Британії, Німеччині, Фінляндії, в Азії — Японії, Південній Кореї, Ізраїлі (останнім часом це намагається реалізувати Сингапур).

1.3. ХАРАКТЕРИСТИКА СВІТОВОГО РИНКУ БІОТЕХНОЛОГІЧНОЇ ПРОДУКЦІЇ

На сьогодні світовий ринок біотехнологічної продукції оцінюється різними експертами від 150 до 200 млрд доларів і може бути охарактеризований так: препарати для харчової промисловості і сільського господарства з річним обсягом продажу близько 45 млрд доларів, насіннєвий матеріал генномодифікованих рослин — 30, фармацевтичні препарати — 26, ферменти для виробництва мийних засобів — 21, лікувально-косметичні засоби, одержані з рослинної і тваринної сировини, — близько 40 млрд доларів.

Передбачається, що до 2010 р. обсяг цього ринку перевищить 2 трлн доларів. Зокрема обсяги продажу фармацевтичної біотехнологічної продукції можуть досягти 45—50 млрд доларів, а серед засобів агрохімії (46 млрд доларів) на частку біотехнології рослинництва припадає не менше як 20 млрд доларів. З 2005 р. на найближчі роки прогнозували щорічний приріст світового обсягу біотехнологічної продукції на рівні 7—8 %. Деякі експерти стверджують, що останніми роками темпи зростання біотехнологічної індустрії становлять від 9 до 22 % на рік.

1.4. ПЕРСПЕКТИВИ РОЗВИТКУ БІОТЕХНОЛОГІЇ У СВІТІ

Із високорозвинутих країн США одні з перших оцінили перспективу розвитку біотехнології. Так, у 1997 р. у США було зареєстровано близько 1000 великих і середніх біотехнологічних компаній. На виробництво біофармацевтичних препаратів було витрачено 7 млрд, а прибуток становив 16 млрд доларів. У 2000 р. кількість біотехнологічних компаній збільшилась до 1300, а їх прибуток — до 19,6 млрд доларів. Прибутки деяких біотехнологічних компаній становлять 1000—1500 % річних! На сьогодні США є виключним

лідером у світі біотехнологій — частка цієї держави на ринку біотехнологічної продукції становить майже 50 %. Щорічно на біотехнологічні дослідження США витрачають десятки мільярдів доларів.

У 2001 р. у США прийнято довгострокову програму з біотехнології до 2025 р. («Закон про біомасу»), кінцевою метою якої є доведення рівня хімічної продукції з поновлюваної сировини до 25 %. Це означає, що четверта частина всіх хімічних продуктів буде вироблятися з вуглеводів, одержуваних ферментативним гідролізом рослинної біомаси, а решта 75 % — із нафти і газу, як і раніше. Головна ідея програми — використовувати для виробництва палива, матеріалів і реагентів соломі та інші відходи сільського виробництва, які тепер спалюють. Одним із ключових завдань програми є розробка способів розкладу лігноцелюлози з подальшим ферментативним гідролізом за участю дешевих целюлаз. Дослідження, проведені до кінця 2003 р., дали змогу здешевити технологію одержання целюлаз у 12 разів. Передбачається, що до кінця 2008 р. ціна на целюлази знизиться у 20 разів.

У рамках програми прогнозується збільшення обсягу виробництва паливного спирту вдвічі: з 6 до 12—15 млн т у 2010 р. Перспективним субстратом для одержання біопалива є солома. Нині у США функціонують пілотні виробництва біоетанолу з соломи, на яких відпрацьовується технологія.

До 2001 р. у всьому світі вироблялося 60 тис. т молочної кислоти, яка використовувалася переважно у харчовій і текстильній промисловості. У 2001 р. тільки у США було вироблено 140 тис. т молочної кислоти. У 2002 р. 70 тис. т кислоти було перероблено у біодеградабельну пластмасу (полілактат), у 2003 р. на одержання полілактату було витрачено 140 тис. т молочної кислоти, у 2007 р. — близько 500 тис. т.

У рамках виконання програми у США налагоджено біотехнологічне виробництво 1,3-пропандіолу — вихідної сполуки для одержання полімеру, з якого виготовляють коврові. Вартість 1 кг 1,3-пропандіолу, одержуваного хімічним синтезом, становить 8 доларів, а біотехнологічного — лише 2,5. Розробляються програми, за якими близько 50 хімічних сполук, використовуваних як сировина для органічного синтезу, будуть одержувати лише з двох кислот мікробного походження — молочної та бурштинової.

На сьогодні у США одним з найперспективніших субстратів для використання у біотехнологічних процесах є гліцерин — побічний продукт, утворюваний у великих кількостях у процесі виробництва біодизелю з рослинної і тваринної сировини. Неможливість використання в інших технологіях такої величезної кількості гліцерину є нині найважливішим фактором, що стримує виробництво біодизелю. Одним із шляхів утилізації гліцерину може бути використання його як джерела вуглецю і енергії під час розробки технологій мікробного синтезу.

Японія займає друге місце після США за рівнем розвитку біотехнологій. Якщо в традиційних галузях біотехнології (виробництво ферментів, антибіотиків, амінокислот) позиції Японії досить сильні, то у використанні методів новітньої біотехнології спостерігалось значне відставання від США. Для його подолання Японія зробила ставку на революційний розвиток біотехнологій. На здійснення 10-річної програми розвитку біотехнології (1981—1990) було асигновано 517,2 млн доларів, а на період з 1991 по 2000 р. — понад 2 млрд

доларів. Для проведення біотехнологічних досліджень на період з 2000 по 2004 рр. уряд Японії виділив (у перерахунку) близько 20 млрд євро. За оцінками експертів обсяг японського ринку біотехнологічної продукції у 2010 р. становитиме 230 млрд доларів.

Останніми роками за кількістю біотехнологічних компаній на друге місце у світі (після США) вийшла Канада. Загальний щорічний прибуток канадських компаній становить майже 4,5 млрд дол.

Ще одним світовим біотехнологічним центром поступово стає Індія. Країна третього світу, яка нещодавно увійшла до світових лідерів у галузі інформаційних технологій, намагається повторити цей революційний прорив уже в іншій наукоємній сфері — біотехнології. У найближчі кілька років планується збільшити обсяги біотехнологічного сектору у 5 разів.

Слід зазначити, що й інші країни Азії також включилися у «біотехнологічну гонку», забезпечивши регіону найвищі темпи зростання біотехнологічної індустрії у світі. Так, Південна Корея проголосила 2002 рік «роком біотехнології»: їй урядом асигновано 259 млн доларів на підготовку молодих учених у цій галузі. Південна Корея приваблює іноземні інвестиції в галузь створенням великих науково-технічних комплексів. У рамках першої в Кореї вільної економічної зони «Інчئون» (INCHEON) виключно для потреб біотехнології створюється комплекс «Біокомплекс Сонгдо», який об'єднуватиме лабораторії з контролю харчових продуктів і лікарських препаратів, виробничі приміщення, госпіталі, міжнародні школи, логістичні центри тощо. При цьому Корея ставить перед своїм біотехнологічним центром досить амбітні й чіткі цілі — до 2010 р. стати сьомим найбільшим «гравцем» у світі, створити 20 нових біотехнологічних продуктів і довести річний обсяг експорту до 10 млрд доларів США.

У Китаї щорічно на біотехнологічні дослідження витрачається понад 1 млрд доларів. Завдяки увазі, яку приділяє держава біотехнологічній галузі, нині Китай є основним постачальником субстанцій для фармацевтичної промисловості багатьох країн світу, у тому числі України й Росії. Так, російська фармацевтична промисловість повністю працює на фасуванні: 90 % субстанцій імпортується з Китаю.

У зв'язку з розвитком біотехнології не можна не згадати досвід Куби, яка нині займає почесне сьоме місце у біотехнологічному рейтингу в світі. Ця маленька країна досягла таких надзвичайних успіхів завдяки тому, що у 1985 р. прийняла відповідну програму піднесення національної біотехнології.

Намагаючись ліквідувати відставання від США, країни Західної Європи постійно збільшують державну допомогу компаніям, що розробляють біотехнології. Так, з 1994 по 1998 р. цим компаніям було виділено 10 млрд євро, з яких 75 % припадало на три країни — Німеччину (3 млрд), Велику Британію (2,5 млрд) і Францію (2 млрд). У 1999 р. державна підтримка біотехнологічної галузі у західно-європейських країнах становила 2 млрд євро.

Останнім часом помітно активізувались у світі дослідження з розробки технологій мікробного синтезу полігідроксикалканатів, яким притаманні властивості звичайних хімічних пластмас. Понад 10 років тому англійська фірма «ICI» організувала промислове виробництво такої пластмаси під назвою «біопол». З біополу виготовляють пляшечки та плівки. Проте вартість

1 кг біополу становила на той час від 5 до 8 доларів (для порівняння: ціна 1 кг поліетилену — менше 1 долара). Використання генно-інженерних штамів дало змогу здешевити технології мікробного синтезу полігідроксиалканатів. Нині його випускають фірми «ICI» (Англія), «Asahi Chem» (Японія), «Bayer» (Корея). Інтерес до полігідроксиалканатів зростає у зв'язку з подорожчанням нафти і газу, а відповідно, й поліетилену. Передбачають, що найближчим часом ціна 1 кг полігідроксиалканатів знизиться до 2—3 доларів, тобто вартість хімічного поліетилену і біотехнологічних аналогів зрівняється.

Розвиваються у світі й традиційні біотехнологічні виробництва амінокислот, полісахаридів, вітамінів. Вітамін B_2 одержують тільки мікробним синтезом. Кілька років тому у Німеччині побудували завод з виробництва 3 тис. т цього вітаміну. Фірма «Bayer» відкрила підприємство такої самої потужності у Кореї. Якщо до недавнього часу для одержання вітаміну С використовували хімічний синтез, і тільки одна стадія була «мікробіологічною», то на сьогодні все стало навпаки — у синтезі аскорбінової кислоти залишилась одна хімічна стадія (окиснення киснем повітря чи перманганатом, хоча, власне, це практично уже не хімія), а решта стадій здійснюється за участю мікроорганізмів.

Щорічно у світі виробляється близько 2 млн т амінокислот, з яких половина загального обсягу виробництва припадає на *L*-глутамінову кислоту, що використовується для одержання глутамату натрію, добре відомого підсилювача смаку й аромату. Ціна глутамату натрію становить 1,3 долара за 1 кг, а конверсія — 60 %, тобто з 1 кг глюкози одержують 600 г глутамату. Деякі амінокислоти мікробного походження настільки здешевіли, що, можливо, їх будуть використовувати як сировину для органічного синтезу полімерів. Наприклад, якщо декарбоксилювати лізин, одержується гексаметилендіамін, з якого можна виробляти капрон собівартістю близько 1 долара за кг.

1.5. ШЛЯХИ РОЗВИТКУ БІОТЕХНОЛОГІЇ В УКРАЇНІ ТА РОСІЇ

Якщо у 1990 р. Радянський Союз займав друге місце у світі за розвитком мікробіологічної промисловості, поступаючись лише США, то на сьогодні країни СНД значно відстають від передових країн світу. Так, тільки за останні роки внесок Росії у загальний обсяг світової біотехнологічної продукції скоротився з 3—5 % до менш як 1 %. Експерти зазначають, що у 2002 р. обсяг російського ринку біопрепаратів становив 1,2—1,4 млрд доларів, з яких на частку російських біотехнологічних виробництв припадало 300—360 млн доларів (близько 30 %), решта — імпорт. Навіть за найоптимістичнішими прогнозами, у 2010 р. Росія зможе виробляти лише 0,25 % світового обсягу біотехнологічної продукції. Такий стан російської біотехнології не відповідає інтелектуальним, кадровим, науково-організаційним і економічним можливостям країни. Упродовж останніх років в Росії практично припинили своє функціонування підприємства, що випускали антибіотики, вітаміни, кормовий білок. Так, виробництво ферментів знизилось у 6, антибіотиків — у 12, а кормового білка — у 25 разів. Якщо США випускають близько 700 високотехнологічних генно-інженерних продуктів, то Росія —

лише чотири. Тільки чотири російських підприємства виробляють обмежену кількість препаратів медичного призначення на основі генної інженерії. Так, частка Росії становить 0,02 % світового виробництва генно-інженерних препаратів для медицини. Імпортозалежність Росії за найважливішими видами біотехнологічної продукції надзвичайно велика: за інсуліном — майже на 100, за антибіотиками — понад 90 %.

У Національній програмі «Розвиток біотехнології в Росії на 2006—2015 рр.» зазначається, що такий стан біотехнологічної галузі зумовлений головним чином недостатнім державним фінансуванням науково-практичних розробок у галузі біотехнології. Для порівняння: у Китаї на біотехнологічні дослідження щорічно витрачається понад 1 млрд доларів, у розвинутих країнах (США, Євросоюз) — десятки мільярдів доларів, а в Росії — лише десятки мільйонів. І це за наявності в Росії 57 наукових центрів з величезним кадровим складом і технічним потенціалом.

Крім того, експерти вважають, що відставання Росії у галузі біотехнології зумовлене також такими причинами: відсутність міжвідомчої координації і відповідної державної політики; високий ступінь (понад 80 %) фізичного зносу обладнання біотехнологічних підприємств; використання застарілих технологій; дефіцит інвестиційних ресурсів; випереджальні темпи зростання цін і тарифів на продукцію монопольних підприємств; низький процент реалізації інноваційних проектів; чинні митні правила перешкоджають зовнішньоекономічній діяльності російських виробників біотехнологічної продукції. На думку керівника департаменту маркетингових досліджень центру «Фармексперт» Д. Мелік-Гусейнова, для підтримання і розвитку російської біотехнологічної інфраструктури необхідно розробити механізми державної підтримки інноваційної діяльності в галузі біотехнології, у тому числі створити умови для залучення у сферу біотехнології приватних інвестицій, включаючи механізми приватно-державного партнерства.

На думку члена-кореспондента Російської академії наук В.Г. Дебабова, мікробіологічна промисловість може успішно розвиватись у Росії, оскільки у цій країні багато вільних площ, прісної води, зерна, соломи, деревини, яку можна переробляти, та й енергоресурси поки що дешевші, ніж у Китаї, Європі і США. Одним з можливих шляхів розвитку цієї галузі в Росії є створення умов для роботи великих закордонних фірм і компаній, які могли б відкрити виробництва з одержання глюкозних сиропів із зерна та деревини. Нині таке виробництво налагоджує фірма «Cargill» (США) у Тульській області.

Порівняно з Росією в Україні стан біотехнологічної галузі задовільніший, проте також потребує великої уваги з боку держави. На сьогодні з великих біотехнологічних підприємств в Україні працюють ВАТ «Стиролбіотех» (виробництво хлібопекарських дріжджів і кормового лізину), ВАТ «Біоветфарма» (виробництво кормових антибіотиків і препаратів ветеринарного призначення), ЗАТ «Ензим» (виробництво хлібопекарських дріжджів), ЗАТ НВО «Вітан» (виробництво β -каротину), на стадії відновлення виробництва ферментних та інших біопрепаратів перебуває колишній флагман мікробіологічної промисловості СРСР Ладиженське підприємство «Ензим». Хлібопекарські дріжджі в Україні виробляють 10 підприємств, з яких найбільшим є

Львівське підприємство «Ензим» (річний випуск становить до 3000 т). Періодично функціонують підприємства з виробництва органічних кислот (оцтової, молочної, лимонної) у м. Київ, Харків та Сміла, ВАТ «Запоріжбіосинтез» (випуск кормових антибіотиків). Малотоннажну продукцію (кормові пробіотики, бактеріальні добрива, закваски) виробляє ряд невеликих підприємств (ТОВ «Сільськогосподарське підприємство «Нива», біологічні фабрики у м. Суми, Дніпропетровськ і Харків, Державне дослідне підприємство бактеріальних заквасок тощо).

Щодо структури фармацевтичного біотехнологічного ринку України, то вона відрізняється від структури світового ринку. Так, в Україні найбільший сегмент ринку займають пробіотики, вакцини і сироватки, а далі — білки крові, антибіотики, ферменти і потім генно-інженерні препарати. Слід зазначити, що нині в Україні розвиток сучасних фармацевтичних біотехнологій тільки починається, хоча традиційні біотехнології використовуються у виробництві лікарських препаратів понад 20 років. На сьогодні з 418 обов'язкових імунобіологічних препаратів вітчизняні підприємства виробляють лише близько 40 (9 %), а з 62 препаратів мікробного походження, які належать до першочергових лікарських засобів, — лише 10—12 найменувань. На українському ринку переважають імпорتنі пробіотики (іноземні фірми займають понад 70 % нашого ринку пробіотиків). На частку вітчизняних виробників припадає лише 20—30 % випуску пробіотиків. Такий стан справ є причиною того, що Україна щорічно втрачає близько 3,5 млрд доларів. Пробіотики в Україні виробляють ЗАТ «Біофарма» (Київ), ЗАТ «Біолек» та «Лекхім» (Харків), ВАТ «Дніпрофарм» (Дніпропетровськ).

Серед генно-інженерних препаратів фармацевтичного призначення, що виготовляються в Україні, можна виділити «Лаферон» (НПК «Фармбіотек», Київ) та препарат інсуліну «Хумодар РВ» («Індар», Київ).

Для посилення біотехнологічного сектору у фармацевтичній промисловості України є всі передумови. Так, Україна належить до країн з високим науковим потенціалом і розвинутою фармацевтичною індустрією. Біологічні, медичні та фармацевтичні установи України відомі своїми досягненнями у розробці лікарських засобів і біотехнологічних продуктів. У нас функціонують понад десяток інститутів біологічного профілю Національної академії наук України, п'ять інститутів Академії медичних наук України, вісім інститутів Міністерства охорони здоров'я. В Україні достатньо велика кількість підприємств випускає біотехнологічну продукцію фармацевтичного призначення: «Біофарма», «Індар» та «Фармбіотек» (Київ), «Біолек» та «Лекхім» (Харків), «Дніпрофарм» (Дніпропетровськ), «Біостимулятор» (Одеса).

Отже, є всі підстави сподіватися, що найближчими роками розробка лікарських засобів на основі біотехнологій стане провідним напрямом розвитку фармацевтичної індустрії України, а сприяти цьому буде раціональне використання науково-технічного потенціалу країни і своєчасне включення у процес розвитку біотехнологічної галузі сучасної системи освіти.

КОНТРОЛЬНІ ЗАПИТАННЯ
ДО РОЗДІЛУ 1

1. Дайте визначення поняття «біотехнологія».
2. Охарактеризуйте основні періоди становлення і розвитку біотехнології.
3. Який внесок у розвиток біотехнології зробили вітчизняні вчені?
4. Чим новітня біотехнологія відрізняється від традиційної?
5. Чим займається генна інженерія?
6. Що таке клітинна інженерія?
7. Яка біотехнологічна продукція використовується у народному господарстві?
8. Які довгострокові завдання стоять перед біотехнологією у ХХІ ст.?
9. Які ключові напрями розвитку біотехнології у ХХІ ст.?
10. Охарактеризуйте світовий ринок біотехнологічної продукції.
11. Які основні положення довгострокової програми з біотехнології, прийнятої у США («Закон про біомасу») ?
12. Охарактеризуйте сучасний стан біотехнологічної галузі у Росії.
13. Які перспективи розвитку біотехнології в Україні?

ОСНОВНІ СКЛАДОВІ БІОТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ

Основними складовими біотехнологічного процесу є: біологічний агент; субстрат; цільовий продукт; апаратура; сукупність методів для керування процесом.

2.1. БІОЛОГІЧНІ АГЕНТИ

Номенклатура біологічних агентів, що використовуються в біотехнології, постійно розширюється:

- клітини мікроорганізмів (бактерії, у тому числі актиноміцети, гриби, у тому числі дріжджі, найпростіші), тварин, рослин, у тому числі одержані методами генної та клітинної інженерії;
- віруси, у тому числі бактеріофаги;
- компоненти клітин: протопласти, мембрани, мітохондрії, хлоропласти, внутрішньоклітинні ферменти та ін;
- позаклітинні продукти (ферменти);
- іммобілізовані клітини мікроорганізмів, тварин, рослин, їх компоненти та позаклітинні продукти.

Найважливіше місце серед біологічних агентів займають традиційні з них — клітини мікроорганізмів.

2.1.1. Загальна характеристика мікроорганізмів-продуцентів

Мікроорганізми, які використовуються у біотехнології, належать до різних фізіологічних і таксономічних груп та істотно відрізняються одні від одних за морфолого-культуральними та фізіолого-біохімічними ознаками.

З більш як 100 000 відомих видів мікроорганізмів у промисловості використовують відносно мало — близько 100 видів, до яких належать кілька тисяч штамів. За визначенням Л.І. Воробйової (1987), промисловий штам повинен відповідати таким вимогам:

- рости на дешевих і доступних субстратах;
- характеризуватися високою швидкістю росту і синтезу цільового продукту;
- синтезувати максимум цільового продукту за мінімального утворення побічних;
- бути генетично й фізіологічно стабільним, стійким до фагів і сторонньої мікрофлори, нешкідливим (непатогенним) для людей і навколишнього середовища;

- бажано, щоб продуценти були термофільними, ацидофільними (або алкалофільними), оскільки у цьому разі знижується можливість контамінації сторонньою мікрофлорою;
- технологія продуктів мікробного синтезу повинна бути економічно доцільною.

Надсинтез, тобто здатність мікроорганізму синтезувати певний продукт у кількостях, що перевищують фізіологічні потреби, досить часто зустрічається в природі. Часто той або інший продукт обміну речовин (органічні кислоти, спирти, антибактеріальні речовини), що виділяється мікроорганізмом у навколишнє середовище, є токсичним для інших видів і забезпечує продуцентів успіх у конкурентній боротьбі за джерела живлення. Саме мікроорганізмами з такими властивостями були першими використані у господарській діяльності людини тисячоліття тому, тоді ж було здійснено стихійний відбір найпродуктивніших форм.

У наш час такі природні штами мікроорганізмів, іноді після свідомого відбору, використовують для виробництва мікробної біомаси (мікробного білка), бактеріальних азотних добрив, біопестицидів, у виробництві харчових продуктів та інших галузях. Проте більшість промислових мікроорганізмів представлено штучно селекціонованими штамми.

Отже, у промисловості застосовують три типи штамів: природні штами, вдосконалені природним або штучним відбором; змінені в результаті індукованих мутацій; одержані методами генної або клітинної інженерії.

2.1.2. Принципи селекції мікроорганізмів

Починаючи свідому селекцію мікроорганізмів, людина ставить завдання створити промислові мікроорганізми з незвичайними для диких штамів властивостями. Методологічно це завдання можна вирішити як зміною генетичної інформації мікробної клітини, так і індукцією в генетичній програмі клітини мутацій. На відміну від селекції культурних рослин і свійських тварин, що має тисячолітню історію й багатий досвід, цілеспрямований відбір і селекція мікроорганізмів почалися тільки після пізнання мікросвіту й розвивалися паралельно з науковими досягненнями генетики.

Мікроорганізмам, як об'єктам селекції, притаманні такі особливості:

- вирощування мікробної культури з однієї клітини — звичайний для мікробної селекції прийом — приводить до того, що в руках селекціонера як вихідний матеріал завжди виявляється клон (потомство однієї клітини, що характеризується генетичною однорідністю). Проте внаслідок високої швидкості росту і розмноження такий генетично однорідний клон у результаті спонтанних мутацій швидко перетворюється на популяцію — сукупність клітин з різними генотипами;
- більшість мікроорганізмів є гаплоїдами, тобто мають один набір хромосом, в результаті чого їм не притаманна «прихована» мінливість, що є основою селекції організмів;
- для більшості промислово важливих мікроорганізмів досі не встановлена здатність до гібридизації (статевого розмноження). Це означає, що селекцію клітин можна здійснювати лише вегетативним шляхом;

— мікроорганізми характеризуються дуже швидкою зміною поколінь, тому селекціонер-мікробіолог має значно більше можливостей для відбору штамів з необхідними властивостями. Результати такої роботи можна побачити за лічені дні (на відміну від селекції макроорганізмів, результати якої можуть з'явитися лише через кілька років);

— об'єктом досліджень селекціонера-мікробіолога є величезна кількість особин, що значно розширює його можливості. Відбір певних клонів із сотень і тисяч зразків потребує надзвичайно копіткої роботи, часто з використанням хімічних і біохімічних аналізів, тому такі дослідження за трудомісткістю не поступаються масштабам роботи селекціонера вищих організмів.

Крім суттєвих переваг мікроорганізмів як продуцентів практично важливих метаболітів, вони можуть бути використані як донори генетичної інформації. Так, продуцентами антибіотиків найчастіше є гриби-аскоміцети, а також актиноміцети; надсинтетиками амінокислот — коріне- і бревібактерії; позаклітинних ферментів — дріжджі. Основні етапи селекції мікроорганізмів показано на рисунку.

Потенційними об'єктами селекції можуть бути музейні культури мікроорганізмів, відомі промислові штами, а також штами мікроорганізмів, ізольовані з природних субстратів. Фізіолого-біохімічні властивості мікроорганізмів є орієнтиром у роботі селекціонера для початкового відбору об'єктів з найімовірнішим надсинтезом цільового продукту. Слід зазначити перспективи використання у біотехнологічних процесах екстремофільних форм мікроорганізмів, зокрема термофільних і психрофільних. Наприклад, застосування термофільних продуцентів або одержаних на їх основі термостабільних ферментів і відповідних рекомбінантних штамів виключає необхідність стерилізації поживного середовища. Психрофільні штами та їх метаболіти можуть виявитися корисними у вирішенні широкого кола екологічних проблем.

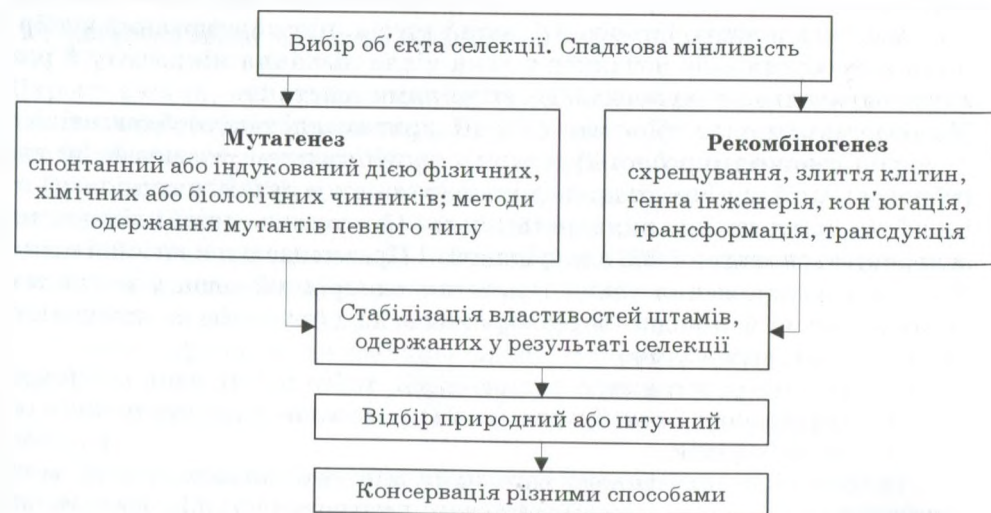


Схема селекції мікроорганізмів

2.2. СУБСТРАТИ (СИРОВИНА)

Субстрати, що використовуються в біотехнології досить різноманітні. До них належать:

- меляса, сік цукрової тростини, гідролізати рослинних полімерів;
- цукри, спирти, органічні кислоти та інші чисті речовини;
- продукти переробки нафти (парафіни);
- напівпродукти — попередники біотрансформації;
- природний газ, водень;
- відходи сільського господарства та легкої промисловості;
- відходи промисловості і тваринництва, у тому числі відходи від переробки фруктів та овочів;
- побутові відходи, стічні води;
- сироватка (молочна);
- картопля, зерно та інші крохмалевмісні продукти;
- рослинні залишки (гичі, зелене листя);
- руда, нафта;
- середовища для культивування клітин тварин і рослин.

Основним субстратом для мікробного синтезу є вуглецевмісна сировина (джерело вуглецю та енергії). Найширше застосовувані у біотехнологічних процесах джерела вуглецю наведено у *табл. 2.1 і 2.2*.

Таблиця 2.1. Основні субстрати, використовувані для мікробіологічного синтезу

Субстрат	Вміст основної речовини	Характеристика
Кристалічна глюкоза	РР 99,5 % у перерахунку на СР	Містить до 9 % води, до 0,07 % зольних речовин, у тому числі заліза не більше як 0,004 %
Технічна сахароза	Сахарози не менше як 99,75 %	Вологість до 0,15 %, вміст зольних речовин не більше як 0,03 %
Технічна лактоза	Лактози не менше як 92 %	Вологість до 3 %, вміст зольних речовин не більше як 2 %, молочної кислоти — 1 %
Гідрол	РР не менше як 70 % у перерахунку на СР	Сиропоподібна рідина. РР представлені в основному глюкозою, вміст зольних речовин до 7 %, рН 4,0
Крохмаль	СР не менше як 80 %	Вміст зольних речовин 0,35—1,2 % у перерахунку на СР
Оцтова кислота	Оцтової кислоти не менше як 60 %	Містить формальдегід і до 1 % мурашиної кислоти
Спирт етиловий синтетичний	Етанолу не менше як 92 %	Містить до 0,21 % ізопропанолу і до 15 мг/л органічних кислот
Вузька фракція рідкого парафіну	n-Алканів 87—93 %	Містить до 0,5 % ароматичних вуглеводнів і до 0,5 % сірки

Примітка. РР — редукуючі речовини, СР — сухі речовини.

Таблиця 2.2. Побічні продукти, використовувані як сировина для мікробного синтезу

Продукт	Характеристика	Область застосування
Сульфітний луг	СР 4,0—4,5 %, у тому числі РР 3,3—3,5 %	Виробництво кормових дріжджів
Картопляна барда	СР 4,3—4,5 %, у тому числі РР 2,0 %	Те саме
Зернова барда	СР 7,3—8,1 %, у тому числі РР 2,5 %	» »
Гідрол	СР 76—78 %, у тому числі зброджувані цукри 50 %	Виробництво дріжджів, антибіотиків
Солодове сусло	СР 15—20 %, у тому числі РР (мальтоза, декстрини) 8—12 %	Вирощування дріжджів, бактерій, актиноміцетів
Молочна сироватка	СР 6,5—7,5 %, у тому числі лактоза 4,0—4,8 %, білки 0,5—1,0, жири 0,05—0,4 %, вітаміни	Вирощування дріжджів, одержання етанолу
Депротейнізований сік рослин	СР 5—8 %, у тому числі РР 0,8—2,0 %, амінокислоти, вітаміни	Виробництво кормових дріжджів
Депротейнізований картопляний сік	СР 4—5 %, у тому числі РР 0,5—1,0 %, амінокислоти, вітаміни	Виробництво хлібопекарських дріжджів, антибіотиків
Гідролізат деревинних відходів	СР 6—9 %, у тому числі РР 3—4 %, органічні кислоти 0,3 %	Виробництво кормових дріжджів
Гідролізат торфу (упарений)	СР 48—52 %, у тому числі РР (галактоза, глюкоза, маноза, ксилоза, рамноза) 26—33 %, гумінові речовини	Те саме
Пшеничні висівки	СР 90—92 %, у тому числі екстрактивні речовини 48—50 %, крохмаль 25—30, білки 11—13, жири 2,5—3,0, целюлоза 15—17 %	Виробництво ферментів

Більшість органічних субстратів, використовуваних у біотехнології (крім лактози, сахарози і крохмалю) без певної попередньої обробки, малопридатні для мікробного синтезу. Проте целюлозовмісна сировина після хімічного або ферментативного гідролізу й очищення від інгібіторів та баластних домішок (фенол, фурфурол, оксиметилфурфурол тощо) може використовуватися у

біотехнологічному виробництві. Кам'яне вугілля, природний газ і деревина можуть бути сировиною для хімічного синтезу оцтової кислоти і технічних спиртів, які, у свою чергу, є чудовою сировиною для мікробіологічної промисловості.

Під час катаболізму вуглецевих субстратів велике значення має структура вуглецевого скелета (прямий, розгалужений чи циклічний), а також ступінь окиснення вуглецю у молекулі. Легкодоступними для мікроорганізмів є цукри (особливо гексози), багатоатомні спирти (гліцерин, маніт тощо).

Донедавна існувала думка, що органічні кислоти важко засвоюються мікроорганізмами, проте нині відомо багато штамів, які асимілюють органічні кислоти, особливо в анаеробних умовах. Низькомолекулярні спирти (метанол, етанол) є перспективними субстратами завдяки істотному збільшенню їх ресурсів у результаті розвитку технології хімічного синтезу. Багато дріжджів родів *Candida*, *Hansenula*, *Rhodospiridium*, *Endomycopsis* та ін. здатні асимілювати етанол. Дріжджі родів *Pichia*, *Candida*, *Torulopsis*, а також бактерії родів *Methylobomonas*, *Protaminobacter*, *Flavobacterium* здатні використовувати метанол як єдине джерело вуглецю та енергії. Біомаса метаноласимілювальних мікроорганізмів характеризується високим вмістом білка (60—70 %).

У 1939 р. В.О. Таусон виявив мікроорганізми, здатні використовувати *n*-алкани і деякі фракції нафти як джерело вуглецю і енергії. Характерною особливістю вуглеводнів порівняно з іншими субстратами є низька розчинність у воді. Цим пояснюється той факт, що тільки деякі види мікроорганізмів здатні асимілювати вуглеводні. Максимальна розчинність *n*-алканів у воді становить лише 60 мл/л, зі збільшенням ланцюга розчинність знижується.

У виборі сировини враховують не тільки фізіологічні потреби мікроорганізму-продуцента, а й вартість сировини.

2.2.1. Відходи виробництва як субстрати

Багато побічних продуктів виробництва раніше вважалися відходами, зокрема високомолекулярні парафіни. Їх спалювали, викидали в море. Зараз парафіни визнані цінною сировиною для хімічної і мікробіологічної промисловості. У каналізацію зливали воду після замочування кукурудзяних зерен у процесі їх переробки на крохмаль і глюкозу. Тепер цю воду випарюють, одержуючи екстракт, і використовують його у мікробіологічній промисловості. Успішно використовують відходи хімічного виробництва (суміш карбонових кислот — бурштинової, кетоглутарової, адипінової тощо), сульфітний луг, зернову і картопляну барду, мелясу, соапсток, гідрол тощо. Комплексне використання всієї побічної продукції виробництва далеке від досконалості. У нашій країні щорічно залишається невикористаною або нерационально використовується близько 1 млн т лактози, що міститься в сироватці і скотинах. У США з усієї кількості молочної сироватки, утворюваної у процесі виробництва сиру (щорічно 15 млн т), половина втрачається зі стічними водами. Тимчасом відомо, що з 1 т сироватки можна одержати близько 20 кг повітряно-сухої біомаси дріжджів. Крім того, із сепарованої

бражки можна виділити додатково близько 4 кг білка. Нераціонально використовується картопляний сік, одержуваний під час виробництва крохмалю, а також альбумінове молоко, одержуване з сирної сироватки.

У мікробіологічній промисловості широко застосовуються меляса (побічний продукт цукрового виробництва) і гідрол (побічний продукт виробництва глюкози з крохмалю). Меляса характеризується високим вмістом цукрів (43—57 %), зокрема сахарози. До складу бурякової меляси входять, мг/кг: біотин — 0,03—0,04, пантотенова кислота — 50—110, інозит — 800—5700.

Одним із найперспективніших субстратів для використання у біотехнологічних процесах є гліцерин — побічний продукт, велика кількість якого утворюється у процесі виробництва біодизелю з рослинної і тваринної сировини. Так, під час одержання 100 л біодизелю утворюється (як продукт трансестерифікації рослинних олій і тваринних жирів) до 10 л гліцерину. Неможливість використання в інших технологіях такої величезної кількості гліцерину є найважливішим фактором, що стримує виробництво біодизелю у світі.

У майбутньому необхідно врахувати потенційні можливості постійно відновлювальних сировинних ресурсів — первинних продуктів фотосинтезу, у першу чергу — гідролізатів деревини і депротеїнізованого соку рослин.

2.2.2. Характеристика деяких комплексних середовищ

Комплексні середовища зазвичай містять різні природні продукти, багаті на органічні сполуки, а також відходи ряду виробництв. Такі середовища значно дешевші, доступніші і тому частіше використовуються в промисловості. Їхніми компонентами можуть бути висівки, борошно різних злаків, меляса, гідрол, кукурудзяний екстракт, вижимки плодів і овочів, різна макуха, замочувальні води, барда спиртових заводів, картопляна мезга та інші відходи картопле- і кукурудзяно-крохмального виробництва, а також інших харчових виробництв.

Для поверхневого культивування використовують **пшеничні висівки**. Вони повинні бути великолопатовими, без гіркого чи кислуватого присмаку. Висівки містять, %: крохмаль — 16—20, білок — 10—12 (у тому числі найважливіші амінокислоти: метіонін — 0,19, цистеїн — 0,30, аргінін — 1,0, лізин — 0,60, триптофан — 0,30), жир — 3,0—4,0, клітковину — 10—30, вільні елементи (Na — 0,09, K — 1,00, Ca — 0,16, P — 0,94), мікроелементи і деякі інші речовини. Пшеничні висівки — дорога сировина, тому їх можна частково замінити іншими компонентами. Такі додаткові компоненти можуть відігравати роль розрихлювачів чи збагачувати середовище необхідними ростовими і поживними речовинами. Їх прикладом є солодові паростки, мезга круп'яних культур, буряковий гніт, деревний пил та тирса, вижимки плодів, овочів і ягід.

Під час обробки кукурудзяного зерна у крохмале-патоковому виробництві в замочувальні води переходить до 8 % сухої речовини. **Кукурудзяний екстракт** — це замочувальні води, випарені в дво- або трикорпусних вакуум-випарних апаратах до вмісту сухої речовини 48—50 %. Непостійність скла-

ду кукурудзяного екстракту є його суттєвим недоліком. Кукурудзяний екстракт містить велику кількість меланоїдинів і тому має темно-коричневий колір. Він стабільний під час зберігання і широко застосовується у біотехнологічних виробництвах.

Кукурудзяний екстракт є джерелом азотистих речовин, що становлять 40—50 % загального вмісту сухої речовини в екстракті. Вуглеводи є нестабільним компонентом екстракту і під дією молочнокислих бактерій можуть повністю перетворюватися на молочну кислоту, вміст якої при цьому збільшується до 25 %. Екстракт у великих кількостях містить фосфор, калій і магній. Вміст зольних елементів становить 15—20 % сухої речовини екстракту, а вміст фосфору може досягати 5 %. Екстракт містить усі необхідні для мікроорганізмів мікроелементи, вітаміни групи В, ростові фактори і біостимулятори.

Крохмаль картопляний і кукурудзяний випускається чотирьох ґатунків (вищий, I, II і III). Основна відмінність крохмалів різного ґатунку полягає у вмісті зольних елементів, що підвищується від вищого до III з 0,35 до 1,20 %. Підвищується також кислотність на суху речовину з 18 до 30, збільшується кількість зруйнованих крохмальних зерен. Кукурудзяний крохмаль містить, %: крохмаль — 98,5—98,8, білок — 0,60—0,35, жир — 0,62—0,70, золу — 0,17—0,12, розчинні речовини — 0,01—0,05, інші сухі речовини — 0,10—0,13.

Гідрол є відходом виробництва глюкози з крохмалю. Це густий темний сироп, що містить від 67 до 72 % цукрів, редукуючих речовин (вуглеводів). Гідрол нестандартний за складом. Основним вуглеводом гідролу є глюкоза, вміст якої досягає 80 % загальної суми редукуючих речовин. Гідрол містить деяку кількість органічних кислот, рН гідролу — близько 4,0, зольність — близько 7 %. Мінеральні речовини гідролу представлені фосфором, магнієм, натрієм, залізом.

Сосве борошно випускається трьох видів: незнежирене, напівзнежирене і знежирене. Це борошно є багатим джерелом азотистих речовин, особливо білків. У ньому міститься близько 25 % вуглеводів, майже немає крохмалю і глюкози (0,5—1,0 %), але є сахароза (5—10 %), пентозани, мальтоза, рафіноза, геміцелюлози, декстрини. Мінеральний склад соєвого борошна багатий і різноманітний, зольні елементи становлять 4,5—6,5 %. Серед них — калій, магній, кальцій, натрій, залізо, кремній, сірка, хлор, мідь, марганець, цинк, нікель, фосфор. У соєвому борошні містяться вітаміни групи В, D, A.

Склад **кукурудзяного борошна** залежить від сорту перероблюваної кукурудзи. Кукурудзяне борошно містить 67—70 % крохмалю і близько 10 % інших вуглеводів (клітковина, пентозани і т.ін.). Білка у кукурудзяному борошні порівняно мало — 10—12 %, зольні елементи становлять лише 0,3—1,0, а жир — близько 4 %.

Солодові паростки утворюються у процесі обробки висушеного солоду у пивоварінні. Вони містять значну кількість вільних амінокислот, азотистих речовин (до 24 %), зольних елементів (близько 8 %), клітковини (14 %), екстрактивних безазотистих речовин (42 %). Солодові паростки можуть містити до 5—6 % зернових домішок — уламків зерен солоду. Солодові паростки можна вносити до середовища безпосередньо чи у вигляді екстракту.

Пивна дробина є відходом пивоваріння. Її вихід становить 22 % сухої маси сировини, що надходить у варильне відділення. Пивна дробина може використовуватися у нативному стані (вологість 83 %) чи у сухому вигляді, якщо мікробіологічне виробництво організовано на пивоварному заводі. Дробина має жовтувато-коричневий колір, приємний свіжий запах. Вона містить, %: білкові речовини — 26—27, жир — 7—8, клітковину — 17—18, зольні елементи — 4—5, безазотисті екстрактивні речовини — близько 44.

Відходом пивоваріння, використовуваним у біотехнології, є також **осадові пивні дріжджі**. Їх вихід за вологості 85 % становить 1,5—2 л на 10 дал пива. Відвар дріжджів чи їх автолізат може бути прекрасним збагачувачем поживних середовищ, джерелом біологічно активних і легкозасвоюваних речовин. Пивні дріжджі багаті на білкові речовини (45—55 %), вуглеводи (30—40 %), вони містять також значну кількість мінеральних речовин (зольність 7—9 %). За умови використання пивних дріжджів як компонента поживних середовищ необхідним є обов'язкове очищення від хмельових гірких речовин.

Як сировину для біотехнологічних виробництв також можна використувати **біомасу** інших мікроорганізмів, наприклад, плазмолізовані кормові дріжджі, пропіонової бактерії (відхід виробництва вітаміну B_{12}), екстракти з міцеляльних мас тощо. Біомаса різних організмів має практично однаковий склад, проте різниться вмістом і набором ростових речовин і стимуляторів. Нині намітилася тенденція успішного використання гідролізатів біомас мікроорганізмів як компонента поживних середовищ.

Для приготування поживних середовищ можуть використовуватись відходи спиртового виробництва, наприклад, **фільтрат барди**. Для цього фільтрат збагачують заторною масою чи борошном і для нейтралізації додають крейду. Фільтрат барди є нестандартним, проте ефективним компонентом середовища.

Як складові поживних середовищ може використовуватися **картопля** або її відвар. Картопля містить велику кількість води (до 75 %), а основна частина сухої речовини припадає на крохмаль. Залежно від року, сорту й умов вирощування картоплі вміст крохмалю може варіювати від 8 до 27 %, у середньому становить 18—19 %. У картоплі вміст азотистих речовин не перевищує 2 %, клітковини — 1—1,5 %, зольних елементів — 0,8—1 % (K, Na, Mg, Ca, Fe, Si). У незначних кількостях виявлені мікроелементи — марганець, мідь, кобальт, нікель, йод та ін. Картопля містить також вітаміни C і A.

Буряковий гніт — подрібнені цукрові буряки після екстрагування з них сахарози і деяких інших речовин на дифузійних установках цукрових заводів. У його складі виявлено до 66 % безазотистих екстрактивних речовин (у тому числі пектинові речовини і геміцелюлозу), а також білок — близько 3 %, клітковину — 22 % і зольні елементи — 4 %.

До рідко використовуваних компонентів поживних середовищ належить **казеїн** і його гідролізат, рибне борошно, рисові висівки, картопляна мезга, вижимки плодів, ягід і овочів.

2.3. ПРОДУКТИ БІОТЕХНОЛОГІЇ

За допомогою біотехнології в наш час одержують три групи продукції:

медичну — антибіотики, гормони, вітаміни, лізоцим, інтерферон, інсулін, інтерлейкіни, фактори росту, моноклональні тіла, напівсинтетичні вакцини, живі вакцини тощо;

промислову — розчинники, бактеріальні добрива, пестициди, рідке та газоподібне паливо, речовини для біоконверсії рослинної та тваринної сировини, очищення стічних вод тощо;

продовольчу — мікробний білок, незамінні амінокислоти, пептиди, цукрозамінники, нуклеотиди, нуклеозиди, ферменти, органічні кислоти, спирти, полісахариди, харчові продукти.

КОНТРОЛЬНІ ЗАПИТАННЯ ДО РОЗДІЛУ 2

1. Які основні складові біотехнологічного процесу?
2. Які біологічні агенти використовуються в біотехнології?
3. Охарактеризуйте основні вимоги до промислових штамів мікроорганізмів.
4. Що означає термін надсинтез?
5. Які особливості притаманні мікроорганізмам як об'єктам селекції?
6. Які типи штамів мікроорганізмів використовуються у біотехнологічних виробництвах?
7. Як здійснюється селекція мікроорганізмів?
8. Які субстрати використовуються у біотехнології?
9. Охарактеризуйте побічні продукти інших виробництв, використовуваних як субстрати у біотехнології.
10. Які комплексні середовища використовуються для поверхневого культивування мікроорганізмів?
11. Які відходи крохмале-патокowego виробництва використовуються як субстрати у біотехнології?
12. Які відходи пивоваріння використовуються як субстрати для біотехнологічних виробництв?
13. Охарактеризуйте комплексні середовища.
14. Охарактеризуйте три групи біотехнологічної продукції.

Мета будь-якої біотехнології, — базуючись на знанні біохімічних і фізіологічних процесів, у межах генетично детермінованих властивостей конкретного продуцента одержати максимальний вихід цільового продукту за мінімальних затрат. Незважаючи на різноманітність біологічних агентів (відповідно — режимів), біотехнологічні процеси можна уявити вигляді узагальненої схеми (рис. 3.1), яка охоплює передферментаційні процеси, процес ферментації (виробничого біосинтезу), одержання продуктів.

1. ПЕРЕДФЕРМЕНТАЦІЙНІ ПРОЦЕСИ

Передферментаційні процеси складаються з підготовки поживного середовища, повітря, біологічного агента, апаратури та комунікацій.

1.1. Підготовка поживного середовища

Поживне середовище готується в спеціальному реакторі. Транспортування і розування компонентів поживних середовищ здійснюється за допомогою приладів з арсеналу харчової, хімічної та інших галузей промисловості (насоси, транспортери, елеватори, дозатори і т.ін.).

Рідкі компоненти поживних середовищ (кукурудзяний екстракт, зелена атока, меляса, гідрол, рослинні олії, риб'ячий жир) доставляють у залізничних цистернах і зберігають у спеціальних збірниках на складах заводів. Їх транспортують комунікаціями за допомогою вакууму, стисненого повітря або перекачують насосами. Рідкі компоненти дозують за масою або за об'ємом відповідно до пропису середовища і контрольних показників кожної партії цього нестандартного виду сировини.

Сипкі компоненти середовищ із транспортної тари забирають або в спеціальні бункери, або зберігають на складах у вихідній упаковці. Для транспортування сипких компонентів використовують стрічкові і гвинтові конвеєри, елеватори, пневматичний транспорт.

Процес приготування поживних середовищ (незалежно від його складовості) завжди дуже відповідальний, оскільки якість і склад поживного середовища на 50 % визначають результат.

Рідкі поживні середовища готуються в апаратах-змішувачах, оснащених ішалками, куди завантажують окремі компоненти у певній послідовності, визначеній регламентом.



Рис. 3.1. Узагальнена схема біотехнологічного процесу

Складні комплексні середовища, які, крім мінеральних компонентів і цукрів, містять борошно, крохмаль, кукурудзяний екстракт, готують у кількох змішувачах. Кукурудзяний екстракт зазвичай нейтралізують кип'ятінням з крейдою. Борошно, крохмаль попередньо заварюють і ретельно перемішують, уникаючи утворення великих грудок, що можуть спричинити нестерильність. У зв'язку з цим реактори повинні бути оснащені барботерами для подавання пари.

Часто для зниження в'язкості поживного середовища з високим вмістом кукурудзяного борошна або крохмалю останні частково гідролізують за допомогою амілолітичного ферменту — орізину (продуцент — *Aspergillus oryzae*) з подальшою його інактивацією нагріванням. Іноді необхідність проведення такої операції зумовлена фізіологічними особливостями продуцента.

У виробництві хлібопекарських дріжджів м'ясні середовища спеціально освітлюють. Під час виробництва пива і етанолу у процесі варіння середовища відбувається оцукрювання крохмалю. У процесі виробництва кормових дріжджів з використанням гідролізатів з останніх видаляється фурфурол.

Якщо середовище містить малорозчинні інгредієнти, один з етапів підготовки є емульгування.

У зв'язку з тим, що здебільшого поживні середовища містять як рідку, так і тверду фазу, виникає необхідність тонкого подрібнювання твердих компонентів — висівків, борошна грубого помелу, рибно-кісткового борошна, соєвої макухи. Для цього з високою ефективністю використовують роторно-пульсаційний апарат (РПА), через який пропускають суспензію компонента

середовища перед заварюванням або після нього. Завдяки цій процедурі не тільки руйнують грудки, що утворилися під час заварювання, а й підвищують ступінь використання сировини.

У реалізації нестерильних процесів (виробництво кормових дріжджів, етилового спирту і т.ін.) підготовка поживного середовища нескладна. Проте більшість біотехнологічних процесів здійснюють в асептичних умовах, тому передбачають використання стерильних поживних середовищ.

Розчини вуглеводів потребують м'яких режимів стерилізації, тому їх готують і стерилізують окремо, змішуючи з основним середовищем тільки у ферментаторі перед внесенням інокуляту.

Деякі види сировини, наприклад соєве борошно, спричиняють підвищене піноутворення, тому у процесі стерилізації до таких середовищ додають жир як піногасник. Слід зазначити, що за присутності жирів у середовищі підвищується стійкість спор, у зв'язку з чим жири вводять до складу середовищ лише за технологічною необхідністю. Усі жирові компоненти необхідно стерилізувати окремо, наприклад, у вигляді водно-масляної або водно-жирової емульсії з господарським милом.

Для розчинення компонентів поживного середовища найчастіше використовують артезіанську, рідше — водопровідну воду. У великотоннажних виробництвах кормових дріжджів і білково-вітамінних концентратів (БВК) використовують оборотну воду, одержану у замкнутому циклі цього виробництва. У виробництві кровозамінників використовують тільки апірогенну воду (бідистилят).

3.1.1.1. Стерилізація поживних середовищ. Стерилізація (знепліднення) — це звільнення будь-якого матеріалу від живих мікроорганізмів або їх форм спокою (спор). Якщо у стерильне середовище чи мікробну культуру потрапили інші мікроорганізми, то йдеться про **контамінацію (забруднення, інфікування)**.

Ефективність різних агентів, використовуваних для знищення мікроорганізмів, характеризують **величиною D_{10}** (час, необхідний для загибелі 90 % клітин певної популяції у певних умовах).

Повна або часткова стерилізація поживних середовищ здійснюється за допомогою вологого жару, сухого жару, фільтрації.

Вологий жар. Найефективнішим методом стерилізації є використання вологого жару. Вегетативні клітини більшості бактерій і грибів гинуть через 5—10 хв при температурі 60 °С, спори дріжджів і грибів — при температурі вище 80 °С, а спори бактерій — вище 120 °С (15 хв). Для досягнення температур, вищих від точки кипіння води, користуються автоклавом. При доступі повітря певному тиску відповідає значно нижча температура. Загибель мікроорганізмів під дією вологого жару залежить від температури, а не від тиску. Тому під час автоклавування слід вимірювати температуру, а не тиск, хоча, зважаючи на простоту та безпеку, вимірюють тиск. Температура й тривалість стерилізації залежать від складу поживного середовища. Так, молоко, желатинові середовища та середовища, які містять цукри, вітаміни тощо стерилізують при температурі 112—115 °С і тиску 0,05 МПа впродовж 20—30 хв, м'ясо-пептонні середовища — при 120 °С (0,075—0,1 МПа) — 20—30 хв, розчини солей — при 131 °С (0,15 МПа) впродовж 40—60 хв.

Сухий жар. У процесі стерилізації сухим жаром бактеріальні спори переносять вищі температури і довше, ніж у процесі стерилізації вологим жаром. Тому жаростійкий скляний посуд, порошки, масла стерилізують упродовж 2 год при 160 °С у сухому стерилізаторі. Стерилізація жаром базується на коагуляції клітинних білків.

Фільтрація. Розчини, що містять термолабільні речовини, стерилізують фільтрацією (так звана холодна стерилізація). При цьому використовують мембранні фільтри з різним діаметром пор, що дає можливість затримувати на них організми різної величини та форми.

Хімічна стерилізація. Для зберігання термолабільних речовин, що містяться в поживних середовищах, в практику була введена стерилізація β-пропіолактоном. Він значно активніший, ніж окис пропілену, але водночас йому притаманна канцерогенна дія. β-пропіолактон додавають у концентрації 0,2 % в готові поживні середовища, які потім інкубують 2 год при 37 °С. Напої стерилізують також диетилпірокарбонатом (0,003—0,02 %).

Теоретичні основи стерилізації. Характеристикою процесу стерилізації є питома швидкість загибелі мікроорганізмів k — відносна кількість (частка) мікроорганізмів, що гинуть за одиницю часу,

$$k = -\frac{1}{N} \frac{dN}{d\tau}, \quad (3.1)$$

де N — кількість особин у популяції; τ — тривалість стерилізації, хв. Після інтеграції і подальшого потенціювання, враховуючи, що при $\tau = 0$, $N = N_0$, одержимо:

$$k = \frac{1}{\tau} \ln \frac{N_0}{N} \quad \text{та} \quad N = N_0 \exp^{-k\tau}. \quad (3.2)$$

Питома швидкість загибелі мікроорганізмів не залежить від їх концентрації, а залежить від температури стерилізації, виду мікроорганізму, характеристики об'єкта, що стерилізується тощо.

Якщо процес стерилізації здійснюється при різній температурі (кілька етапів процесу), і, отже, за різних значень питомої швидкості загибелі, то інтеграл для виразу питомої швидкості загибелі можна записати так:

$$\ln \frac{N}{N_0} = \int_0^{\tau} k d\tau \quad \text{або} \quad N = N_0 \exp \left(- \int_0^{\tau} k d\tau \right), \quad (3.3)$$

де N_0 — кількість живих мікроорганізмів перед стерилізацією (при $\tau = 0$). Учені Ф.Х. Дейндорфер і А.Е. Хемфрі запропонували ліву частину цього рівняння позначити ∇ (набла) і назвати критерієм стерилізації. При постійній температурі $k = \text{const}$ критерій стерилізації

$$\nabla = k\tau. \quad (3.4)$$

Щоб розрахувати ефективність прийнятого режиму стерилізації, слід узяти зі спеціальної таблиці значення k , яке зазвичай встановлюється за експериментальними даними для найтермостійкішого еталонного мікроорганізму — *Bacillus stearothermophilus* 1518 — залежно від температури. Для розрахунку і обґрунтування режиму стерилізації за неізотермічних умов реального виробництва використовують наближений метод Т. Річардса. Метод

3. ЕТАПИ БІОТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ

випускає враховувати критерії стерилізації при нагріванні об'єкта (∇_n), що ерилізується, витримки його при температурі стерилізації (∇_n) і охолодження (∇_{ox}).

Обробляючи численні експериментальні дані, Т. Річардс зазначає, що об'єкта при температурі нижче як 100°C малорезультативна і становить близько 2 % загального критерію стерилізації. Був проведений розрахунок критерію стерилізації ∇_n і ∇_{ox} в інтервалі від 100 до 125°C за швидкості нагріву $^\circ\text{C}$ за 1 хв. Пізніше Д. Уенг із співробітниками розраховував значення критерію стерилізації для температури 143°C , тобто для таких температур, що використовуються в даний час для стерилізації.

Якщо темп нагрівання або охолодження відрізняється від прийнятого при складанні таблиці (1°C за 1 хв), то для розрахунку дійсного критерію стерилізації можна використовувати співвідношення:

$$\nabla = \nabla_n \frac{\tau}{t_{st} - 100}, \quad (3.5)$$

де ∇ — табличне значення; τ — тривалість зміни температури від 100°C до t_{st} ; t_{st} — температура стерилізації, $^\circ\text{C}$. Ефект стерилізації визначається за сумою критеріїв стерилізації:

$$\sum \nabla = \nabla_n + \nabla_b + \nabla_{ox}. \quad (3.6)$$

Кількість життєздатних клітин, що залишилися, розраховуватиметься як:

$$N = N_0 \exp\left(-\int_0^\tau k d\tau\right) = N_0 \exp(-\sum k \Delta\tau) = N_0 \exp(-\sum \nabla). \quad (3.7)$$

Теплову стерилізацію середовищ (за способом її проведення) поділяють на періодичну і безперервну. За періодичного способу стерилізації нагрівання, витримку й охолодження середовища здійснюють послідовно в одному апараті. Це може бути ферментатор, посівний апарат або спеціальний стерилізатор. Середовище нагрівають в апараті до необхідної температури, витримують при цій температурі строго визначений час і охолоджують водою, подаваною до сорочки апарата або змішувика. Такий метод простий і надійний, проте має свої недоліки:

- погіршується якість поживного середовища через тривалий вплив високої температури (може відбуватися карамелізація вуглеводів, деструкція вітамінів, утворення потенційних інгібіторів, наприклад аміноцукрів);
- великі витрати пари та неможливість регенерації тепла;
- труднощі автоматизації порівняно з безперервною стерилізацією.

Під час безперервної стерилізації кожен процес (нагрівання, витримка, охолодження) здійснюється в спеціально призначених для цього апаратах: нагрівнику, видержувачі, теплообміннику, що утворюють установку безперервної стерилізації (УБС). Безперервна стерилізація має такі переваги порівняно з періодичною:

- за такого способу стерилізації кожен елементарний об'єм середовища (нескінченно малий об'єм, що містить одну спору) перебуває під дією високої температури короткий час;

- завдяки вищій температурі стерилізації і короткій експозиції де-струкція компонентів поживного середовища мінімальна;
- процес нагрівання всього об'єму поживного середовища триваліший, що забезпечує рівномірніше завантаження котельні;
- легкий контроль і керування процесом;
- можлива часткова регенерація тепла.

Безперервне нагрівання середовища може бути здійснене без прямого контакту з теплоносієм у трубчатому, пластинчатому або спіральному теплообміннику. Проте найчастіше середовище нагрівається до потрібної температури упродовж кількох секунд прямим інжектуванням пари в парових контактних нагрівачах. Найпоширенішими є такі конструкції теплового інжектора, в який подають вихровим насосом нестерильне поживне середовище і пару під тиском 0,3—0,6 МПа. Продуктивність нагрівників становить, м³/год: 5, 10, 15, 20, 25, 50. Підбирають нагрівник залежно від об'єму середовища, яке необхідно простерилізувати, так, щоб час операції стерилізації всього об'єму середовища становив 40—120 хв. Після цього середовище подають у видержувач — проточний апарат безперервної дії, що працює за принципом витіснення попередніх об'ємів середовища наступними. За час проходження через видержувач елементарного об'єму поживного середовища спори в цьому об'ємі гинуть. Отже, принцип роботи видержувача можна описати таким рівнянням:

$$\tau \text{ витримки} = \tau \text{ відмирання термостійких спор} = \tau \text{ заповнення.}$$

За конструктивними особливостями видержувачі поділяють на два типи — емнісні та трубчаті. Для забезпечення ламінарного (поршневого) режиму проходження рідини в емнісному видержувачі, зниження швидкості потоку на центральній осі і зменшення застійних зон у корпусі треба передбачити спеціальні пристрої для введення середовища, які б забезпечували рівномірний розподіл потоку, і пристрої для рівномірного виведення середовища.

Найпростішим за конструкцією і надійним є емнісний видержувач місткістю не менше як 2 м³ з подаванням середовища згори по трубі, опущеній до днища апарата. Днище при цьому відіграє роль відбійника, що розбиває струмінь рідини, а стерильне середовище виходить через перфороване кільце, розміщене у верхній частині видержувача. Проте в процесі роботи емнісного видержувача можливе виникнення пульсацій, що спричиняють викиди нестерильних порцій середовища.

Трубчаті видержувачі великого діаметра і довжини поділяють на секції і розміщують вертикально, як колонні апарати. Видержувачі з діаметром труби 150—200 мм згортають у вигляді об'ємної або плоскої спіралі і встановлюють над нагрівником. Усі видержувачі повинні бути покриті шаром ізоляції для запобігання тепловтратам.

При високій температурі середовище перебуває у видержувачі строго визначений розрахунковий час, а потім його потрібно дуже швидко охолодити до температури ферментації, інакше в середовищі можливі деструктивні зміни. Теплообмінник, використовуваний для реалізації такого процесу, повинен мати не тільки високі теплообмінні характеристики, а й таку конс-

уક્તિ, яка б забезпечила стерильність середовища, тобто він має бути герметичним.

Найпоширеніший вітчизняний теплообмінник — типу «труба в трубі», ці як за кордоном використовують ефективніші пластинчаті і спіральні теплообмінники. Використання пластинчатих теплообмінників неможливе в охолодження в'язких середовищ, що містять тверду фазу.

У наш час найчастіше використовують УБС. До 70 % витраченого на нагрівання тепла можна повернути, якщо додатково встановити теплообмінник-куператор, у якому стерильне середовище, що пройшло через видержувач, має температуру 130—140 °С, нагріває нестерильне поживне середовище до 5—125 °С, а потім доохолоджується в теплообміннику-доохолоджувачі до температури ферментації. При цьому суттєво знижується витрата пари на нагрівання нестерильного середовища до температури стерилізації і витрата на охолодження стерильного середовища.

Усі апарати УБС виготовляють з нержавіючої сталі, а найнадійнішою апаратурою є силфонна нержавіюча. Перед початком стерилізації всю систему УБС стерилізують водяною парою, після чого стерилізують концентрат поживного середовища. Для видалення залишків середовища із системи і для зведення концентрату через УБС пропускають воду. Перед вимкненням УБС її знову стерилізують.

Сипкі середовища, використовувані для поверхневого культивування мікроорганізмів, стерилізують парою, інфрачервоними променями або за допомогою хімічних речовин. Компонентами таких середовищ є висівки, біомас, буряковий гніт, деревний пил, солома. Компоненти попередньо ретельно подрібнюють і змішують в оптимальних співвідношеннях.

У промисловості сипкі середовища найчастіше стерилізують глухою або парою, що умовно можна назвати стерилізацією. Насправді деструкція спор відбувається лише на поверхні твердих грудок середовища. Спори, що містяться в глибині грудки, можуть вижити. Рівень стерильності таких середовищ відносно невисокий, проте достатній для проведення ферментації.

Термічний метод стерилізації поживних середовищ у даний час домінує. Холодна стерилізація (ультрафільтрація) застосовується для термолабільних компонентів. Ці середовища не повинні містити нерозчинних речовин.

1.2. Підготовка стерильного стисненого повітря

Одним із важливих завдань біотехнології є одержання великої кількості стерильного повітря, необхідного для аерації під час культивування аеробних мікроорганізмів. Стерильне повітря також використовують для вентиляції приміщень цехів так званої стерильної зони, де в асептичних умовах здійснюють, наприклад, останні стадії очищення готового продукту. В атмосферному повітрі, поряд з інертними газами, азотом, киснем, двоокисом вуглецю, містяться пари води і дрібнодисперсні частки. Понад 30 % (за масою) часток мають розмір 1—2 мкм і близько 50 % — менше як 0,5 мкм. До складу дисперсних часток, поряд з частками пилу, кіптяви, входять клітини і спори мікроорганізмів як у вільному, так і в сорбованому на пилових частках вигляді. Температура і вологість зовнішнього повітря, кількість у ньому часток

і мікроорганізмів непостійні і залежать від пори року (мікроорганізмів улітку в 10 разів більше, ніж узимку), погодних умов (найбільша кількість пилу і, відповідно, мікроорганізмів припадає на суху вітряну погоду), географічного розташування підприємства, висоти забору повітря тощо.

Особливо багато мікроорганізмів над поверхнею землі, з висотою концентрація їх зменшується і стає постійною на рівні близько 30 м над землею.

Найпростіший спосіб стерилізації повітря полягає у фізичному видаленні мікроорганізмів фільтрацією через волокнисті або мембранні фільтри (набивні фільтри з надтонким волокном, скловолокном, тканиною Петрянова, фільтри з пористого фторопласту).

3.1.2.1. Способи очищення повітря. Очищення повітря можна досягти принципово різними методами, що забезпечують або знищення мікроорганізмів, або їх видалення. Одним із найефективніших способів стерилізації повітря є опромінення ультрафіолетовими променями. Цей метод використовується для знезараження повітря в боксах.

Вітчизняним і закордонним досвідом показано, що технологічно й економічно виправданим у промисловості є очищення повітря за допомогою волокнистих і пористих матеріалів. Таким способом вдається одержати повітря зі ступенем чистоти 99,9999 %. Завислі в повітрі частки затримуються волокнистим матеріалом завдяки інерційному і дифузійному механізму осадження. Загалом механізм інерційного осадження базується на тому, що частки, рухаючись за інерцією у повітряному потоці, який обтікає нитку волокна на своєму шляху, відхиляються від потоку повітря й осаджуються на волокні. Інерційне осадження ефективніше на порівняно грубих волокнах для відносно великих часток і за високої швидкості повітря. Дифузійне осадження відбувається завдяки броунівському руху, помітному для малих часток. Частки, що рухаються поблизу волокон, дифундують у випадкових напрямках і можуть затримуватися на поверхні волокон. Цей ефект осадження збільшується зі зменшенням діаметра волокна фільтрувального матеріалу, діаметра частки і швидкості повітря.

3.1.2.2. Характеристика фільтрувальних матеріалів. Оскільки механізми осадження мають різну природу і зазвичай один із них переважає над іншим, необхідно застосовувати фільтрувальний матеріал різної структури для ефективного очищення повітря. Так звані головні фільтри заповнюють грубшим волокном і на цих фільтрах видаляється близько 98 % мікроорганізмів-контамінантів. На наступному рівні — індивідуальні фільтри, заповнені надтонким волокном або мембранами, що забезпечують видалення решти 2 % контамінантів.

Основними вимогами до фільтрувальних волокон є висока пилоємність і здатність до ефективного функціонування за малих перепадів тиску до і після фільтра.

У головних фільтрах для грубого очищення використовують такі фільтрувальні матеріали: грубе базальтове волокно; високооб'ємний нетканий фільтрувальний матеріал, або тканину Камінської. Особливістю цього матеріалу є те, що в прядильний розчин під час його виготовлення вводять антисептик гексахлорофен, тому фільтри, заповнені такою тканиною, не піддаються стерилізації; скловату.

3. ЕТАПИ БІОТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ

В індивідуальних фільтрах для тонкого очищення повітря використовують фільтри Петрянова із тканиною Петрянова, що складається з ультратонких полімерних волокон, сформованих у вигляді тканини на марлевій складці. Нині виготовляють багато видів таких фільтрів.

Для індивідуальних фільтрів використовують також базальтове надвоєно, з якого виготовляють базальтовий папір і картон.

Останніми роками для тонкого очищення повітря використовують тверді пористі перегородки з пластмас і металокераміки. Перевагою цих матеріалів порівняно з волокнистими є стабільність структури, стійкість до підвищених температур, простота конструктивного оформлення, легкість обслуговування фільтрів. Істотний недолік — високий перепад тиску. Найширше застосування знаходять фільтрувальні матеріали з фторопласту і металоєраміки у вигляді втулок ФЕП — фільтрувального елемента патронного пу.

Фільтр НЕРА (High Efficiency Particle Absorbption) — волокнистий матеріал, складений у вигляді гармошки. Волокна діаметром 0,65—6,5 мкм відстанню між ними 10—40 мкм виготовляються з паперу і скловолокна одноразового користування) або фторопласту (expanded Poly Tetra Fluor hylene). Паперо-скловолокнянні фільтри уловлюють частинки розміром 0,3 мкм, фторопластові — 0,04—0,06 мкм. Фторопластові фільтри миють, тому вони не вимагають заміни.

Для стерилізації повітря рекомендують використовувати також мембрани з діаметром пор 0,45 мкм. Пористість мембран досягає 80 %. Видалення мікроорганізмів за допомогою мембрани ґрунтовано на ефекті «сита». В основному фільтрувальні мембрани постачає фірма «Мілліпор» (США). У Росії (Володимир) налагоджено випуск мембран «Владіпор». Мембрани не потребують високого тиску, проте для їхньої надійної роботи потрібно строго виконувати умови стерилізації. Стерилізувати мембрани можна лише насиченою водяною парою, від перегрітої пари в мембранах з'являються тріщини, і вони виходять з ладу.

3.1.2.3. Технологічна схема стиснення й очищення повітря. Система складається з трьох послідовно з'єднаних підсистем: очищення від пилу і стиснення; приведення повітря до термодинамічного стану з певною температурою і вологістю для утворення аерозолі; відділення аерозолі у фільтрах грубого і тонкого очищення.

Перша підсистема. Атмосферне повітря забирають турбокомпресором через забірну шахту на висоті 20—30 м, де стабільна концентрація мікроорганізмів. Насамперед повітря потрапляє у фільтри попереднього очищення, в яких звільняється від грубого аерозолі — пилу. Фільтри попереднього очищення не тільки захищають компресори від забруднення, а й істотно знижують кількість контамінантів, які могли б потрапити у другу підсистему.

Після цього повітря стискають у турбокомпресорі до 0,35—0,5 МПа. Тиск повітря за компресором визначають із розрахунку тиску на подолання пору в системі підготовки повітря, тиску стовпа рідини у ферментаторі і тиску в ньому 0,13—0,14 МПа. Стиснення повітря в компресорі приводить до підвищення його температури до 120—250 °С і збільшення місту вологи на одиницю об'єму.

Друга підсистема. У разі високого вмісту вологи у вихідному атмосферному повітрі під час його охолодження конденсується ще більше вологи. Осідання вологи на фільтрах неприпустиме, оскільки це призводить до злипання волокон і утворення каналів, що значно погіршує осадження часток. Крім того, на зволжених волокнах фільтрів можливе розмноження осілих мікроорганізмів, що супроводжується додатковим забрудненням повітря.

Щоб забезпечити випадання вологи в краплевловлювачі, повітря «переохолоджують» до температури 25—40 °С в теплообмінному апараті. Надалі, для забезпечення надійної роботи фільтрів другого і третього рівнів, повітря нагрівають до температури 70—90 °С. При таких температурах не відбувається конденсація пари води на волокнах фільтра. З цією метою повітря після краплевловлювача підігрівають у теплообміннику, при цьому допускається часткове підмішування гарячого повітря після компресора. Кількість підмішуваного повітря визначається умовами відносної вологості, яка не повинна перевищувати 40 %.

Третя підсистема. Складається з двох фільтрів другого і третього рівнів очищення. Фільтр другого рівня, або головний фільтр, зазвичай розміщений на території заводу поруч із цехом. На головному фільтрі очищають повітря для усіх ферментаторів цеху. З головного фільтра повітря колектором подається в індивідуальні фільтри третього рівня, встановлені на кожному ферментаторі незалежно від його місткості.

Конструкція індивідуального фільтра залежить від типу використовуваного фільтрувального матеріалу. У процесі експлуатації фільтрів необхідна їхня стерилізація. Найефективнішим способом є нагрівання вологою парою і витримка впродовж певного часу при температурі 125—130 °С. Вища температура спричиняє деструкцію герметизуючих прокладок у фільтрах. Після стерилізації фільтрувальний матеріал висушують гарячим повітрям.

У закордонних системах очищення повітря значно підвищена надійність роботи за рахунок установки додаткового ступеня очищення і дублювання основного устаткування. Крім того, для великих ферментаторів застосовують автономні системи очищення повітря, що полегшує задачу підтримання термодинамічного режиму, оскільки вони не потребують великої довжини трубопроводів. У фільтрах використовують стандартні фільтрувальні елементи, виготовлені промисловим способом.

3.1.2.4. Очищення відпрацьованого повітря. У процесі ферментації як відхід виробництва утворюється велика кількість відпрацьованого повітря, яке викидається в атмосферу. З відпрацьованим повітрям в атмосферу потрапляють органічні сполуки: аміни, альдегіди, жирні кислоти, кетони, спирти, ефіри тощо. Відносна вологість повітря, що виходить із ферментатора, наближається до 100 %. Крім того, воно містить культуральну рідину у вигляді дрібних крапель, а вміст клітин продуцента залежить від його виду, тривалості ферментації і становить від $1 \cdot 10^3$ до $1 \cdot 10^5$ клітин у 1 м^3 .

На сьогодні для очищення відпрацьованого повітря використовують кілька методів, що принципово відрізняються від методів очищення повітря. Метод каталітичного допалювання належить до енергоємних. Суть його полягає у прокачуванні відпрацьованого повітря при температурі 320—350 °С

3. ЕТАПИ БІОТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ

рез комбінований каталізатор, що складається із шарів піролюзиту та палієвого каталізатора. Ступінь знешкодження повітря досягає 87—98,5 %.

Менш енергоємним є метод рідкофазного окиснення із застосуванням як окисників перманганату калію або гіпохлориту натрію. Відпрацьоване повітря під час проходження скрубера зрошується розчином гіпохлориту натрію, 20%-м розчином їдкого натру, водою і викидається в атмосферу. Зрошувальні розчини обертаються в замкненому циклі. Відпрацьовані розчини мінують один раз на тиждень. Ефективність очищення досягає 90—95 %. Щодо ліком методу є накопичення невеликої кількості стічних вод, які потрібно утилізувати. Такі установки успішно працюють, наприклад, в Італії у виробництві пеніциліну, цефалоспориноу С та інших антибіотиків.

Відомий також метод із застосуванням сітчастих фільтрів. Фільтр складається з циліндричного корпусу з кришкою і днищем, усередині вміщено льотувальний елемент, виготовлений із металевих сіток трикотажного плетіння з дроту діаметром 0,28 мм із нержавіючої сталі. Повітря, проходячи через фільтр, звільняється від крапель культуральної рідини з мікроорганізмами. Для підвищення ефективності очищення на ряді заводів функціонує схема, що складається з циклону і сітчастого фільтра «Ц-ФС». Ефективність цієї системи становить 99,97 %.

1.3. Підготовка біологічного агента

Перший етап біотехнологічного процесу — підготовка біологічного агента, тобто посівного матеріалу. *Посівним матеріалом* називають чисту культуру мікроорганізму, одержану шляхом її послідовного пересівання з пробірки в колбу, а потім у посівні апарати (інокулятори), об'єм яких поступово збільшується (як правило, від стадії до стадії у 10 разів).

Перша стадія вирощування посівного матеріалу здійснюється в заводській мікробіологічній лабораторії. При цьому ставиться завдання зберегти вихідний штам у незмінному стані. Необхідно періодично розсівати культуру і перевіряти її однорідність як за морфологічними, так і фізіологічними показниками, оскільки у процесі тривалого зберігання можливе виникнення спонтанних нерегульованих мутацій.

Фізіологічну активність продуцентів перевіряють так. Музейну культуру розсівають до ізолюваних колоній на чашках Петрі. Ізолювані колонії пересівають у 40—60 пробірок зі скошеним агаризованим середовищем. Из пробірок 5—6 пробірок відбирають одну і пересівають у колби з рідким поживним середовищем. Після вирощування в колбах аналізують показники синтезу певної біологічно активної речовини, продуцентом якої є даний мікроорганізм. Відбирають варіант з найвищими показниками, розсівають на чашки Петрі до ізолюваних колоній, які потім пересівають у пробірки зі скошеним агаризованим середовищем і зберігають при 3—4 °С. Пересіви здійснюють через певні проміжки часу (зазвичай 3—4 місяці).

Для приготування необхідної кількості посівного матеріалу на заводі створюють цех чистої культури, що постадійно вирощує посівний матеріал в асептичних умовах. Технологія одержання виробничого посівного матеріалу залежить від виду мікроорганізму-продуцента і способу його культивування.

3.1.3.1. Зберігання вихідних штамів продуцентів. Жоден із відомих способів зберігання живих культур мікроорганізмів не дає повної гарантії стабільності штаму і його продуктивності.

Найпоширенішим способом зберігання штамів мікроорганізмів є зберігання в пробірках на скошеному агаризованому середовищі (див. підрозділ 3.1.3).

Слід зазначити, що за частих пересівів деяких мікроорганізмів (1 раз на 3—4 місяці) можуть виникати мутантні форми з характеристиками, що відрізняються від властивостей вихідного штаму.

Триваліший час можна зберігати штами мікроорганізмів під шаром вазелінової олії. Для цього доцільно використовувати вазелінову олію медичного призначення. Вона не повинна містити токсинів і окиснених продуктів. Шар олії повинен бути лише на ~1 см вище агарового зрізу, інакше можлива загибель мікроорганізмів через нестачу кисню. Олію попередньо стерилізують під тиском 0,15 МПа упродовж 1,5 год. Після вирощування в пробірках культуру заливають охолодженою стерильною олією. Для такого способу зберігання найкращим середовищем вважається картопляно-мальтозний агар.

Відомі способи зберігання культур при температурах від -11 до -14 °C. За таких умов багато культур мікроорганізмів зберігають активність упродовж 10—16 місяців без пересівів.

Перспективним варто визнати спосіб зберігання культур мікроорганізмів у ліофілізованому стані. Культуру мікроорганізму вносять у захисне середовище, наприклад сахарозо-желатинове, вміщують у стерильні ампули, закривають стерильними ватними тампонами і швидко заморожують при температурах від -35 до -78 °C. Потім ампули переносять у вакуум-сушильний апарат і висушують під залишковим тиском 13,33—1,33 Па упродовж 25—30 год. Ампули з висušеними культурами запакують в атмосфері інертного газу. Ліофільно висušені культури можуть зберігатися понад 5—6 років, без втрати фізіологічних властивостей.

Штами-продуценти ферментів можуть зберігатися на зерні або в ґрунті. Для цього ґрунт стерилізують і вміщують у нього культуру продуцента. Для поновлення культури змив з ґрунту висівають на чашки Петрі. Якщо продуцент зберігають на пшоні, то очищене від домішок пшоно кип'ятять у мінімальній кількості води (0,8 л на 1 кг пшона), розпарюють 30 хв. Остигле пшоно по 15—16 мм засипають у стерильні флакони місткістю 250 мл, стерилізують під тиском 0,1 МПа упродовж 40 хв. На стерильне розпарене пшоно засівають 2 мл густої суспензії конідій або 3 мл дводобового вегетативного міцелію, вирощеного в колбах на качалці. Культуру продуцента вирощують за періодичного струшування при температурі 25—30 °C. Вирощену культуру висушують до вологості 7—8 % у вакуумі при 25 °C упродовж 60—70 год і в такому вигляді зберігають від 1 до 3—5 років.

Складніша задача підтримувати культури генетично змінених мікроорганізмів, наприклад штамів, що несуть плазмідні гібриди. Для подібних вихідних культур підбирають такі методи зберігання, що дають найменші зміни в часі.

Збереження продукуючої здатності мікроорганізмів поліпшується у тому разі, якщо консервація проводиться за низької активності культури та

івності захисних середовищ, що підбираються індивідуально (поживний ьйон, сахароза і глутамат натрію; глюкоза із сироваткою крові ссавців, кі середовища, на яких вирощували мікроорганізми тощо).

Багато дослідників зазначають, що кисень навколишнього повітря зниє виживання висушених мікробних клітин. Тому дуже важливо висуше-культуру мікроорганізмів «пакувати». Необхідно, щоб пакування було метичним і забезпечувався вакуум чи був присутній інертний газ.

Існує так званий метод α -висушування — під вакуумом безпосередньо зкого середовища. Для α -висушування також використовують різні «носії»: рильні смужки фільтрувального паперу, волокна целюлози, кварцові льки, таблетки крохмалю тощо. Проте цей метод не завжди гарантує до-тній ступінь виживання мікроорганізмів.

Останніми роками, особливо в національних колекціях (США — ATCC; меччина — DSM та ін.), поряд з ліофілізацією культуру зберігають у рід-му азоті при наднизьких температурах. Так, грибні культури успішно зрігають у замороженому стані в атмосфері рідкого азоту при температу-х від -165 до -196 °C. Мікроскопічні гриби заморожують у 10%-му водно-розчині гліцерину в запаяних ампулах. Ампули з замороженими культу-ми вміщують у контейнер з рідким азотом, де їх зберігають 5 і більше ків. Проте цей метод потребує складного устаткування і його використову-ть тільки у великих колекціях і для культур, що не витримують ліофільно-висушування (*Micromonospora*, *Micropolyspora*, деякі неспороутворюваль-міцеліальні гриби і ряд інших мікроорганізмів).

3.1.3.2. Одержання посівного матеріалу. Підготовка посів-го матеріалу для поверхневого культивування. Такий спосіб застосову-ть в основному для культивування мікроскопічних грибів. Посівний ма-ріал у цьому разі може бути одержаний у вигляді культури, вирощеної на ільному поживному середовищі і у вигляді культури, вирощеної на рідко-середовищі глибинним способом. Незалежно від виду посівного матеріалу іслідовність операцій однакова: приготування поживного середовища; сте-ілізація поживного середовища і апаратури; охолодження середовища з-триманням правил асептики до температури росту культури; засівання се-довища штамом-продуцентом; вирощування продуцента; консервування осівного матеріалу.

Приготування поживного середовища зводиться до точного дозування сремих компонентів середовища та їх змішування у визначеній послідов-ості. Цей процес можна здійснювати в спеціальній місткості — змішувачі ю в апараті, призначеному для стерилізації. Умови стерилізації залежать д складу середовища і його стану. Всю апаратуру і комунікації стерилізу-ть гострою парою під надлишковим тиском $0,15$ — $0,35$ МПа. Охолоджува-і середовище можна стерильним холодним повітрям або холодною водою erez глухі поверхні теплообміну. Середовище засівають водною суспензією родуцента з дотриманням правил асептики.

Інокулят вирощують у спеціальному цеху. Готовий посівний матеріал онсервують або висушуванням, або зберіганням при низьких температурах. ерміни зберігання встановлюються для кожного продуцента експеримен-ально.

Якщо посівну культуру готують на щільному поживному середовищі, то найчастіше для цього використовують зволожені пшеничні висівки. Іноді до середовища додають солодові паростки, деревний пил, буряковий гніт. Залежно від особливостей продуцента вологість середовища після стерилізації становить 45—56 %.

Музейну культуру продуцента для відновлення спочатку пересівають на 1—1,5 мл зволжених стерильних висівок у пробірці. Пробірку вміщують у термостат і вирощують при оптимальній температурі до рясного утворення конідій. Далі вміст пробірки переносять у 3—4 колби місткістю 0,75—1 л із 40—100 мл пухкого вологого стерильного середовища і вирощують продуцент при оптимальній температурі до певного фізіологічного стану.

Підготовлений у достатній кількості у колбах посівний матеріал використовують для засівання поживних середовищ, які попередньо стерилізують у біксах під тиском 0,15 МПа упродовж 60 хв. Засіяне середовище розміщують у стерильних кюветах. Зазвичай посівні кювети виконуються з оцинкованого неперфорованого заліза, вони мають прямокутну форму з одним чи двома отворами, що закриваються ватно-марлевими серветками. Трьох колб посівної культури достатньо для засіву 20—25 кювет. Засіяне середовище розкладають у посівні кювети шаром завтовшки 0,8—1,2 см; між кюветою і кришкою прокладають шар непроклеєного паперу для запобігання можливій конденсації вологи на кришці і створення зон зайвого зволоження. Закриті кювети вміщують у спеціальні камери на стаціонарні чи стежні етажерки. У камері підтримують вологість і температуру, оптимальні для даного мікроорганізму. Камери заповнюють кюветами з розрахунку не більш як 1—2 кг засіяного середовища (за сухою масою) на 1 м³ камери, повітрообмін у такій камері повинен бути 2—3 м³/(м³·год).

Готовий посівний матеріал знімають із кювет за допомогою ручного маніпулятора і у вологому стані вміщують у стерильні пакети, які відправляють на зберігання в камеру з температурою не вище як 4 °С до закінчення його мікробіологічної і біохімічної перевірки. Тривалість зберігання посівного матеріалу не повинна перевищувати 3—4 дні, оскільки волога культура навіть при низькій температурі поступово стає малопридатною для одержання активної виробничої культури. В одержаному таким способом інокуляті повинно бути не менше як 0,7 млрд спор в 1 г і він не повинен містити сторонньої мікрофлори.

Якщо посівний матеріал задовольняє усі вимоги, його передають з холодного приміщення у відділення підготовки посівної суспензії. Посівний матеріал змішують у спеціальній посудині зі стерильною водою і невеликою кількістю поверхнево-активної речовини для підвищення змочування спор. Така суспензія і є готовим посівним матеріалом.

Крім кюветного способу одержання посівного матеріалу, існують розробки з одержання інокуляту у вигляді поверхневої культури на механізованих установках.

Підготовка посівного матеріалу для глибинного культивування. Для засівання виробничого середовища під час глибинного способу культивування посівний матеріал готують також глибинним способом. Вигляд посівного матеріалу залежить від продуцента: для грибів і актиноміцетів — це

міцеліальна маса, а для бактерій — суспензійна культура (як правило, в експоненційній фазі росту).

Етапи одержання посівної культури такі: відновлення музейної культури на агаризованому середовищі; вирощування культури на рідкому середовищі в колбах на качалці; культивування продуцента в малому, а потім, якщо потрібно, у великому інокуляторі.

Посівна доза для засівання глибинною культурою порівняно велика — від 1 до 15 %, тому число стадій і об'єм інокуляторів визначаються тільки потужністю підприємства й оптимальною нормою витрати посівного матеріалу для даного продуцента.

Вихідний продуцент із пробірки пересівають у скляні матраци з великою кількістю агаризованого середовища. З матраців культуру змивають стерильною водою й у вигляді суспензії використовують для засіву колб. Частіше засівають колби із пробірок. Колби встановлюють на качалки, що струшують рідину в колбах і сприяють розчиненню кисню в середовищі, забезпечуючи нормальні умови життєдіяльності мікроорганізмів. Готову культуру з колб зливають в одну посудину, дотримуючись правил асептики, і переносять у малий інокулятор зі стерильним охолодженим середовищем. Засівання здійснюють у полум'ї факела через посівний патрубок інокулятора. Після засівання у малий інокулятор через індивідуальний фільтр подають стерильне повітря. Піногасник стерилізують і охолоджують у спеціальній посудині і подають у малий інокулятор у разі потреби. Для великого інокулятора середовище готують у спеціальних апаратах, де його стерилізують, охолоджують приблизно до 30—40 °C і подають у стерильний охолоджений до 60—70 °C великий інокулятор, доводять температуру середовища до оптимальної для продуцента. Після цієї операції готову культуру з малого інокулятора передавляють стерильним повітрям у великий інокулятор.

Культивування на всіх стадіях здійснюється при оптимальній температурі та аерації. Зазвичай готовий посівний матеріал відразу ж передають на виробництво. Якщо ж виникають непередбачені затримки, то посівний матеріал безпосередньо в інокуляторі охолоджують до 8—10 °C, проте зберігають не більше 2—3 год, інакше його якість може різко погіршитися.

Посівний матеріал обов'язково підлягає мікробіологічному та біохімічному контролю. Посівний матеріал вважається активним, якщо він забезпечує нормальну тривалість культивування на виробничому середовищі і досягнення максимального накопичення продукту за цей час. Він не повинен містити сторонньої мікрофлори.

3.1.3.3. Дозування і фізіологічний стан посівного матеріалу. Занижені дози посівного матеріалу призводять до різкого збільшення тривалості культивування. У зв'язку з цим для кожного виробничого штаму встановлюється оптимальне дозування посівного матеріалу. Для забезпечення нормального розвитку мікроскопічних грибів під час поверхневого способу культивування в стерильних умовах достатньо внести 0,02—0,05 % посівної спороносної культури з титром 10^6 спор на 1 г. У заводських умовах, де часто неможливо досягти повної стерильності виробничих середовищ, посівний матеріал вносять з розрахунку 0,2—1,0 % від маси сировини.

У разі використання міцеліального посівного матеріалу його кількість збільшується до 1,5—2,5 %. Використання глибинного посівного матеріалу зазвичай подовжує процес поверхневого вирощування виробничої культури, проте він вигідніший, оскільки за його використання полегшується праця робітників, спрощується процес одержання стандартної посівної культури і скорочуються посівні площі цеху. Дозування глибинної посівної культури залежить від фізіолого-біохімічних властивостей штаму продуцента. Якщо це спорова культура, то витрата посівного матеріалу залежить від титру інокуляту і зазвичай становить від 0,2 до 1,0 %, для мікроскопічних грибів — 1,0—2,5 %. Для продуцентів з ослабленою вегетацією та актиноміцетів посівна доза зростає до 5—6 %, а в деяких випадках — до 15—20 %. Як посівний матеріал використовують зазвичай культуру, вирощену на рідкому поживному середовищі до середини експоненційної фази росту (18—24 год). Тривалість вирощування посівного матеріалу та його фізіологічний стан (фазу росту) і дозу визначають експериментально для кожного продуцента.

3.1.4. Підготовка апаратури та комунікацій

Для поверхневого культивування стерилізують апаратуру для підготовки посівного матеріалу (місткості для засівання кювет, воду для підготовки посівної суспензії, посівні комунікації), а також виробничі кювети. Кювети і скляний посуд стерилізують у посівному відділенні сухою парою при температурі 160 °C не менш як 60 хв. Апаратуру й комунікації стерилізують гострою парою при температурі 105—120 °C під надлишковим тиском 0,05—0,1 МПа.

Приміщення, особливо посівні бокси, стерилізують опроміненням за допомогою спеціальних бактерицидних ламп.

Стерилізація апаратів і комунікацій має велике значення й за глибинного способу культивування. Найретельніша стерилізація може не дати ефекту, якщо порушено герметичність устаткування. Створено спеціальні прилади для виявлення навіть незначних порушень герметичності.

Під час стерилізації устаткування існує небезпека навіть при високих температурах не досягти стерильності, тому що в процесі теплової обробки внутрішніх порожнин апаратів відбувається конденсація пари на стінках. Повітря, що виділяється з парогазової суміші, покриває стінки апарата повітряною плівкою, у результаті чого умови нагрівання стінки погіршуються. Погано піддаються стерилізації різні патрубки й люки, тому що в них утворюються повітряні пробки. Для підвищення ефективності стерилізації під час конструювання апаратури варто скоротити кількість зварювань, збільшити діаметр і зменшити висоту штуцерів відведення і підведення.

Всі вентилі перед установкою перевіряють гідравлічним тиском 0,3 МПа. Для герметизації фланців і вентилів використовують особливі прокладки з пароніту, обробленого графітом, для герметизації кришок апаратів використовують шнур із прогумованої тканини діаметром до 19 мм, а для завантажувальних люків — гуму завтовшки 14 мм. Герметичність з'єднань перевіряють під надлишковим тиском пари 0,15—0,2 МПа.

Перед заповненням апарата середовищем ретельно перевіряють ущільнення мішалки, тому що в процесі стерилізації щільність насадки може змінитися.

Особливу увагу приділяють стерилізації апаратури і комунікації для подачі піногасника. Стерилізацію цих вузлів проводять при 125—135 °С упродовж 1,5—2 год. На стадії стерилізації провадиться постійний мікробіологічний контроль стерильності поживного середовища, яке подається у ферментатор, повітря, піногасника тощо.

На мікробіологічну чистоту перевіряють відділення стерилізації, його стіни й підлогу, апаратуру, комунікації, а також руки працівників.

3.2. ПРОЦЕС ФЕРМЕНТАЦІЇ (ВИРОБНИЧИЙ БІОСИНТЕЗ)

Розрізняють два принципово різні процеси одержання мікробних метаболітів. Перший — *ферментація*, у процесі якої певні метаболіти утворюються безпосередньо під час культивування мікроорганізмів-продуцентів. Другий — *ферментативний каталіз*, який здійснюють виділені із природних об'єктів (частіше мікроорганізмів) ферменти або клітини мікроорганізмів з необхідними ферментними системами. У промислових або напівпромислових установках мікроорганізми часто використовуються у вигляді іммобілізованих клітин, фіксованих на полімерних носіях у спеціально підготовлених скляних кульках або включених у полімерні гелі. Серед продуктів мікробного синтезу найпомітніше місце за обсягами виробництва займають вторинні метаболіти (наприклад, антибіотики).

За біохімічною сутністю процес ферментації багато в чому імітує передферментацію і тому цей термін умовний.

У процесі ферментації необхідним є також використання стерильних поживних середовищ, повітря і біореакторів, вибір яких зумовлений морфологічними та фізіолого-біохімічними особливостями продуцентів. Мікроорганізми у вигляді суспензії певної густини подають з інокулятора(-ів) у промисловий біореактор, чи ферментатор, у якому міститься стерильне рідке поживне середовище. При цьому у поживне середовище разом з продуцентом не повинні потрапити сторонні мікроорганізми — всі з'єднання у системі повинні бути герметично закриті.

Об'єм ферментатора на 70—80 % заповнюють інокульованим середовищем, 20—30 % об'єму заповнюють газами (інертним — для анаеробів, повітрям — для аеробів).

Аерація рідини сприяє піноутворенню, яке знижує якість ферментації, тому використовують піногасіння або механічне (установка у верхній частині ферментатора спеціальної додаткової мішалки), або фізико-хімічне (використання ПАР для зниження поверхневого натягу на межі розділення фаз «газ — рідина»).

Тривалість ферментації становить від 4—5 до 14 діб і довше і залежить від особливостей мікроорганізмів-продуцентів.

У процесі ферментації дозовані потоки поживних середовищ, посівного матеріалу (засівної біомаси, інокуляту) подаються у біореактор (фермента-

тор). Із ферментатора відводиться культуральна рідина (культуральна рідина — багатофазна система, що містить клітини продуцента, залишки компонентів поживного середовища і продукти метаболізму), тепло, відпрацьоване повітря (гази).

Вимірюються (та підтримуються, в разі потреби) необхідні для даного продуцента параметри культивування (рН, концентрація розчиненого кисню). Під час ферментації кожні 4—8 год відбирають проби культуральної рідини і здійснюють мікробіологічний і хіміко-технологічний контроль.

3.2.1. Основні варіанти культивування біологічних агентів

Розрізняють такі види аеробного й анаеробного культивування: періодичне, безперервне; глибинне та поверхневе (на рідких і щільних середовищах); стерильне та умовно-стерильне; з використанням біокаталітичних реакцій (реактор повного перемішування); іммобілізовані системи (ферменти, біомаса та ін.); культивування рослинних і тваринних тканинних клітин (рис. 3.2).

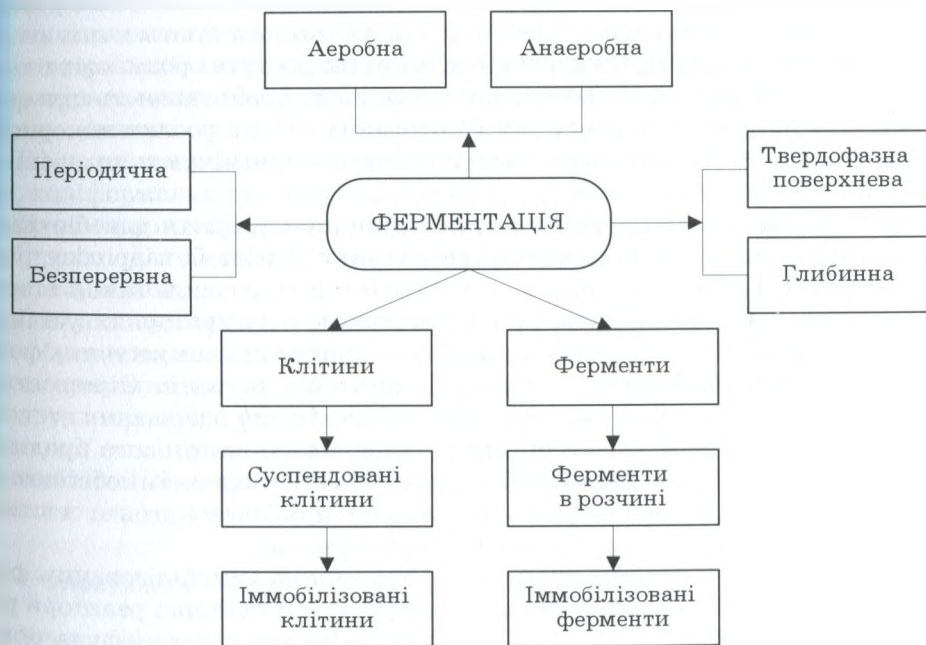


Рис. 3.2. Варіанти ферментації

Генетично модифіковані мікроорганізми, клітини рослин, тварин і людини є найскладнішими для біотехнологів. Для них розробляються спеціальні конструкції біореакторів. До них належать:

— біореактори з рухомими мікроносіями для поверхнево-залежних культур тканин (отримання інтерферону);

- мембранні біореактори для вирощування клітинних культур, іммобілізації бактерій і дріжджів (виробництво вірусних вакцин, моноклональних антитіл, етанолу і т.ін.);
- проточні колони з іммобілізованими БА (одержання етанолу, моноклональних антитіл);
- біореактори киплячого шару (очищення стічних вод тощо).

3.2.2. Іммобілізація

Методи іммобілізації універсальні для всіх типів біокаталізаторів — індивідуальних ферментів, клітин, субклітинних структур, комбінованих препаратів.

Поряд з іммобілізацією ферментів останнім часом все більшу увагу приділяють іммобілізації клітин і субклітинних структур. Це пояснюється тим, що у разі використання іммобілізованих клітин відпадає потреба у виділенні й очищенні продуктів мікробного синтезу; уможливується одержання поліферментних систем, що здійснюють багатостадійні безперервні процеси.

У промислових процесах все частіше використовують клітини у стані спокою. Справді, багато високовартісних продуктів синтезуються зазвичай у стаціонарній фазі росту продуцентів. Клітини, що ростуть і розмножуються, порушують структуру носія, вивільняються з нього і забруднюють цільовий продукт. Для пригнічення росту іммобілізованих клітин рослин використовують дефіцит фітогормонів, а ріст клітин бактерій пригнічують додаванням антибіотиків.

Іммобілізовані клітини мікроорганізмів використовують для біотрансформації органічних сполук, поділу рацемічних сумішей, гідролізу ряду складних ефірів, інверсії сахарози, відновлення й гідроксилювання стероїдів. Іммобілізовані хроматофори використовують у лабораторних установках для синтезу АТФ, а пурпурові мембрани — для створення штучних фотоелектричних перетворювачів — аналогів сонячних батарей. Створюється реактор на основі іммобілізованих клітин дріжджів для одержання етанолу з меляси, у якому дріжджі зберігали б здатність до спиртового бродіння впродовж 1800 год. Із більш як 2000 відомих нині ферментів іммобілізована й використовується в інженерній ензимології приблизно десята частина (переважно оксидоредуктази, гідролази й трансферази).

Для здійснення хімічних процесів за допомогою іммобілізованих ферментів застосовують колонні, трубчаті, пластинчаті й танкерні реактори різного об'єму й продуктивності. Іммобілізовані ферментні системи функціонують у біореакторі у вигляді нерухомої фази, через яку проходить середовище із субстратом, що підлягає хімічному перетворенню (гетерогенний каталіз). У таких реакторах поряд з безперервним режимом використовується й періодичний. Для ефективного перемішування й газообміну біореактор оснащують мішалкою. Для запобігання можливому uszkodженню біокаталізатора працюючою мішалкою гранули носія закріплюють особливим способом. Наприклад, у біореакторі «кошикового» типу мішалка обертається в порожньому циліндрі сітчастої структури (кошик), в середині якої закріплено

імобілізований фермент. У внутрішньому об'ємі трубчатих реакторів розміщені порожнисті волокна, заповнені біокатализатором. Ступінь перетворення субстрату в продукт (наприклад, fumarату амонію в аспартат) у таких реакторах досягає 90 %.

3.2.3. Піногасники

Процеси піноутворення і піногасіння відіграють важливу роль під час аеробного глибинного культивування мікроорганізмів. За збалансованих пінних режимів збільшується міжфазна контактна поверхня і досягається інтенсивний масобмін між середовищем і аеруючим повітрям. Спінювання поживного середовища, стійкість піни та її реологічні властивості (поверхневий натяг, поверхнева в'язкість) залежать від складу середовища (вмісту вуглеводів, ліпідів, білків, структурують солей), режимів стерилізації та аерації середовища тощо.

Для створення стійких режимів піноутворення застосовують механічні й хімічні піногасники, а також їхні комбінації. Хімічні піногасники (поверхнево-активні речовини) поділяються на жирові й синтетичні. Жирам притаманні піногасні властивості за відносно високих концентрацій — 0,2—1,0 % об'єму середовища і вище. Крім того, для багатьох мікробіологічних процесів жири необхідні як додаткові поживні речовини. У процесі асиміляції мікроорганізмами жири розщеплюються до жирних кислот, які змінюють рН середовища.

Ефективними є синтетичні піногасники (силікони, пропіноли, контрамін, поліформаль), що випускаються для харчової промисловості.

Для кожного конкретного процесу мікробного синтезу експериментально підбирають оптимальний піногасник і визначають його концентрацію і режим дозування.

Для піногасіння використовують натуральні жири й олії, що також можуть бути джерелом живлення для мікроорганізмів. Найчастіше використовують тваринні жири, олеїнову кислоту, соняшникову, соєву, бавовняну, кукурудзяну олії. З усіх наведених піногасників найраціональнішим є використання як піногасника олеїнової кислоти, оскільки інші олії мають харчову цінність і використовуються в харчовій промисловості. Поступово вони замінюються синтетичними піногасниками.

3.2.4. Флокулянти

У деяких мікробіологічних процесах доцільно стимулювати флокуляцію (конгломеризацію) клітин продуцента, наприклад, для ефективнішого фракціонування або з метою утримання клітин в умовах неперервної ферментації. Застосовують хімічні неорганічні флокулянти (хлорид кальцію, солі фосфорної кислоти) та органічні синтетичні аніонні, катіонні чи неіоногенні поліелектроліти. За присутності відповідних неорганічних флокулянтів утворюється осад фосфату кальцію, на якому адсорбуються клітини продуцента. З аніоноактивних поліелектролітів використовують співполімер акриламиду й натрієвої солі акрилової кислоти. Катіоноактивні поліелектроліти

наприклад, цетазолакриламід із співполімером — катіоногеним мономером) осаджують білкові речовини ферментаційного середовища (до 20 мг на 1 мг іоліелектроліту), на них також адсорбуються клітини.

3.2.5. Ріст і розвиток клітинних популяцій

Поняття «ріст» означає збільшення кількості клітин, «клітинна популяція» — популяція будь-яких клітин, використовуваних у біотехнології (як бактеріальних, так і еукаріотичних, наприклад клітин рослин і тварин), «клітинна культура» — ізолювана культура клітин еукаріотичних організмів (рослин, тварин, людини). Вивчення кінетичних особливостей розвитку клітинних популяцій неможливе без розуміння закономірностей розвитку однієї клітини. Такі закономірності описуються клітинним циклом (період від поділу до поділу). Клітинний цикл еукаріотичних клітин має чотири основні фази:

— мітоз (М-фаза), в якій відбувається поділ материнської клітини на дві дочірні;

— G_1 -фаза — проміжок часу від кінця М-фази до початку синтезу ДНК;

— S-фаза — період синтезу ДНК;

— G_2 -фаза — проміжок часу від кінця S-фази до початку М-фази.

Сукупність G_1 -, S- і G_2 -фаз називається *інтерфазою*.

Тривалість клітинного циклу може становити від 0,5—2 год (для мікробних і ембріональних клітин) до кількох десятків років (гепатоцити, нейрони). Відмінності у тривалості клітинного циклу для різних клітин зумовлені різною тривалістю G_1 -фази. Навіть за умови використання синхронних культур у однорідних клітин можуть відбуватися випадкові зміни тривалості G_1 -фази, що супроводжується десинхронізацією процесів клітинного поділу.

3.2.5.1. Крива росту клітинної популяції. При внесенні у поживне середовище клітини ростуть доти, доки вміст якого-небудь необхідного компоненту не стане мінімальним або не вичерпається, після чого ріст припиняється. Якщо впродовж усього цього часу в середовище не вносити ніяких поживних речовин і не виводити продукти метаболізму, то одержимо так звану періодичну культуру (популяцію клітин в обмеженому життєвому просторі).

Крива, що описує залежність логарифму кількості живих клітин від тривалості культивування, називається *кривою росту* (рис. 3.3).

Така крива має S-подібну форму, на ній можна виділити кілька основних фаз росту: початкову (лаг-фазу), експоненційну, стаціонарну та відмирання. Крива росту є практично однаковою як для бактеріальної популяції, так і для популяції еукаріотичних клітин. Незначні відмінності стосуються кількості фаз (часто на кривій росту виділяють не чотири, а п'ять чи шість фаз) та їх назви. Так, перша фаза росту називається лаг-фазою (найчастіше), латентною фазою або індукційним періодом. На кривій росту клітинної культури між фазами експоненційного і сповільненого росту виділяють фазу лінійного росту.

Експоненційний ріст і його графічне зображення на прикладі бактеріальної популяції детально описано в підручниках з мікробіології, тому не будемо розглядати це питання, а лише коротко охарактеризуємо фази кривої росту.

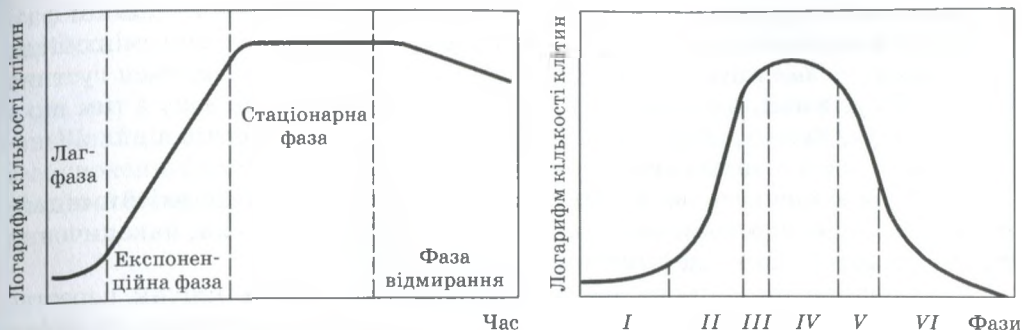


Рис. 3.3. Крива росту клітинної популяції.

Фази росту: I — ляг-фаза; II — експоненційна; III — сповільненого росту; IV — стаціонарна; V — відмирання; VI — виживання

Ляг-фаза. Починається з моменту посіву клітин у свіже поживне середовище. У цей період клітини адаптуються до даних умов культивування. Тривалість ляг-фази залежить від передісторії інокуляту та його віку, а також від того, наскільки придатним для росту є дане середовище і умови культивування (рН, температура, концентрація розчиненого кисню). Наприклад, якщо джерело вуглецю та енергії в новому середовищі відрізняються від тих, які були в середовищі під час одержання посівного матеріалу, то адаптація до нових умов передбачає синтез нових ферментів, які раніше були не потрібні і тому не синтезувались. Утворення нових ферментів індукуються новим субстратом.

Прикладом впливу субстрату на синтез ферментів є дияуксія. Це явище послідовного використання двох субстратів, або явище двофазного росту (рис. 3.4). Із суміші глюкози та сорбітолу бактерії спочатку споживають глюкозу. Ферменти метаболізму сорбітолу утворюються тільки після повного вичерпання глюкози.

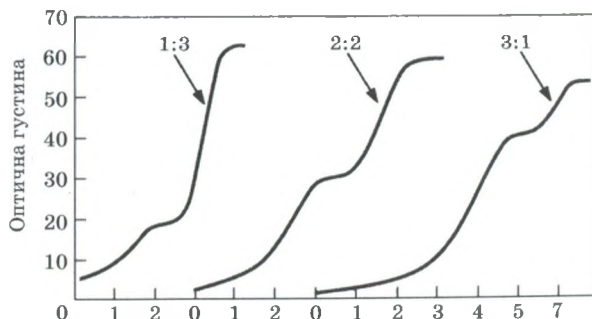


Рис. 3.4. Двофазний ріст (дияуксія) *Escherichia coli* на середовищі з глюкозою та сорбітолом у різних співвідношеннях

Експоненційна фаза. Ця фаза характеризується максимальною швидкістю поділу клітин. У цій фазі процеси росту проходять збалансовано (тобто подвоєння біомаси супроводжується подвоєнням кількості білка, ДНК, РНК та ін.). Можна сказати, що культура в експоненційній фазі складається із

«стандартних» клітин. Але треба мати на увазі, що і в експоненційній фазі клітини періодичної культури зазнають змін, оскільки постійно змінюється середовище — зменшується концентрація субстрату, збільшується густина клітинної суспензії, накопичуються продукти обміну. У зв'язку з тим що в цій фазі швидкість поділу відносно постійна, вона найзручніша для визначення швидкості поділу та швидкості росту.

Фаза сповільненого росту. Настання цієї фази зумовлене якісними змінами поживного середовища (споживання поживних речовин, накопичення продуктів метаболізму, дефіцит кисню, зміна pH).

Стаціонарна фаза. Вона настає тоді, коли кількість клітин перестає збільшуватись, тобто характеризується рівновагою між клітинами, що утворюються, та клітинами, що гинуть. У стаціонарній фазі спостерігається максимальна біомаса і максимальна сумарна кількість клітин.

Фаза відмирання. Характеризується зниженням кількості живих клітин, підвищенням гетерогенності популяції. Іноді клітини лізуються під дією своїх власних ферментів (автоліз).

Фаза виживання. Характеризується наявністю окремих життєздатних клітин в умовах загибелі більшості клітин популяції. Якщо такі клітини пересіяти в свіже поживне середовище, вони починають активно рости та ділитися. Такі виживані клітини характеризуються низькою інтенсивністю процесів метаболізму.

3.2.5.2. Параметри росту періодичної культури. Основними параметрами кривої росту (рис. 3.5) є біомаса, швидкість росту та тривалість лаг-фази (у разі, якщо ріст періодичної культури аналізують за збільшенням біомаси, а не за кількістю клітин).

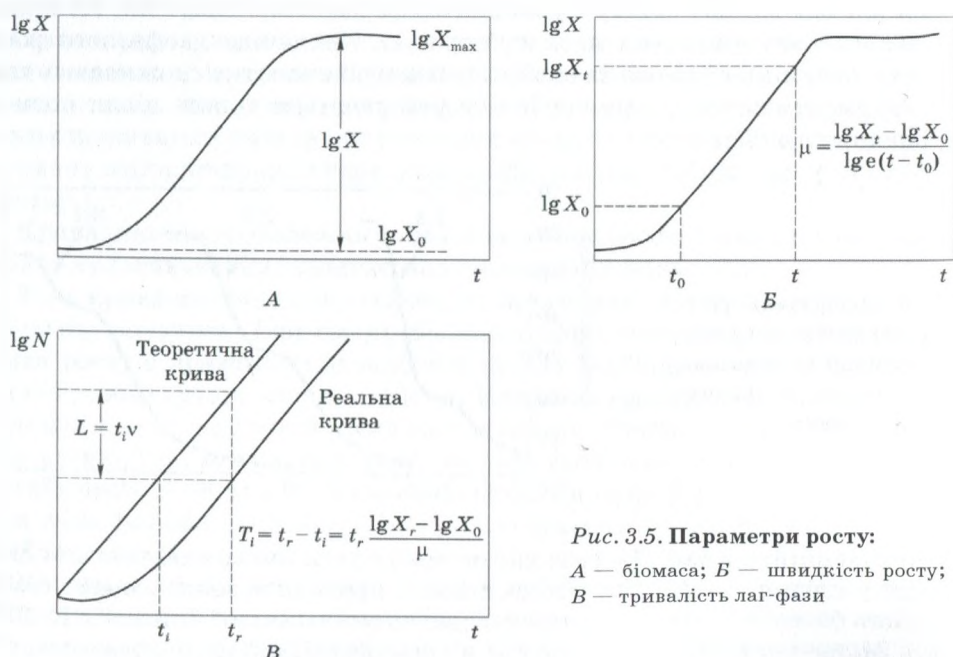


Рис. 3.5. Параметри росту:

A — біомаса; B — швидкість росту;
B — тривалість лаг-фази

Біомаса — це різниця між максимальною та вихідною біомасою бактерій:

$$X = X_{\max} - X_0 \quad (3.8)$$

Швидкість експоненційного росту — це міра швидкості росту клітин в експоненційній фазі. Її визначають за формулою виходячи з початкової та кінцевої біомаси X_0 та X_t у моменти часу t_0 та t :

$$\mu = \frac{\lg X_t - \lg X_0}{\lg e(t - t_0)} = \frac{\ln X_t - \ln X_0}{t - t_0}, \quad (3.9)$$

де $\lg e = 0,43429$.

Тривалість подвоєння визначається за формулою

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu}. \quad (3.10)$$

Тривалість лаг-фази (T_l) — визначають як проміжок часу між моментом t_l , в який культура досягла певної біомаси X_l , і моментом t_l , в який вона могла б досягти такої самої біомаси, якби відразу ж після інокуляції починався експоненційний ріст.

3.2.5.3. Ріст у безперервній культурі. Ріст у хемостаті. Теорія і практика безперервного культивування розроблена для мікробних культур, зокрема бактеріальної популяції.

Швидкість росту бактерій може змінюватися за зміни складу поживного середовища, наприклад у відповідь на зміну концентрації субстрату. Цю властивість бактерій наочно ілюструє хемостатна культура. У процесі безперервного хемостатного культивування, на відміну від періодичного, у культиватор (ферментатор) постійно подається свіже поживне середовище і концентрація одного з субстратів підтримується на рівні, що лімітує ріст. Одночасно відбувається постійний відтік культури, так що її об'єм у культиваторі не змінюється.

Хемостатній культурі притаманні дві несподівані особливості. По-перше, за постійного притоку свіжого середовища густина клітин (концентрація біомаси) підтримується на постійному рівні (рис. 3.6). По-друге, стаціонарна концентрація клітин X залишається практично незмінною навіть за великих змін швидкості потоку (f , л/год). Проте за швидкості потоку, вищого за певне значення, стаціонарна концентрація клітин починає різко знижуватися, досягаючи нуля за критичної швидкості потоку, що відповідає максимальній питомій швидкості росту $\mu_{\max}$ періодичної культури того самого організму. Залишкова концентрація субстрату у культурі зазвичай дуже низька, проте вона збільшується гіперболічно з підвищенням швидкості потоку пропорційно зниженню концентрації клітин (див. рис. 3.6).

Встановлення (підтримання) постійної густини бактерій (steady state) за даної швидкості потоку можна пояснити тим, що за стаціонарного стану культури швидкість зміни біомаси ($+dX/dt = \mu X$) у постійному об'ємі культури V дорівнює швидкості їх вимивання:

$$-\frac{dX}{dt} = \frac{f}{V} X. \quad (3.11)$$

Отже, стаціонарний стан описується таким рівнянням:

$$\mu X = \frac{f}{V} X. \quad (3.12)$$

Швидкість розбавлення D дорівнює

$$D = f/V, \quad (3.13)$$

де f — швидкість потоку, л/год; V — об'єм культиватора.

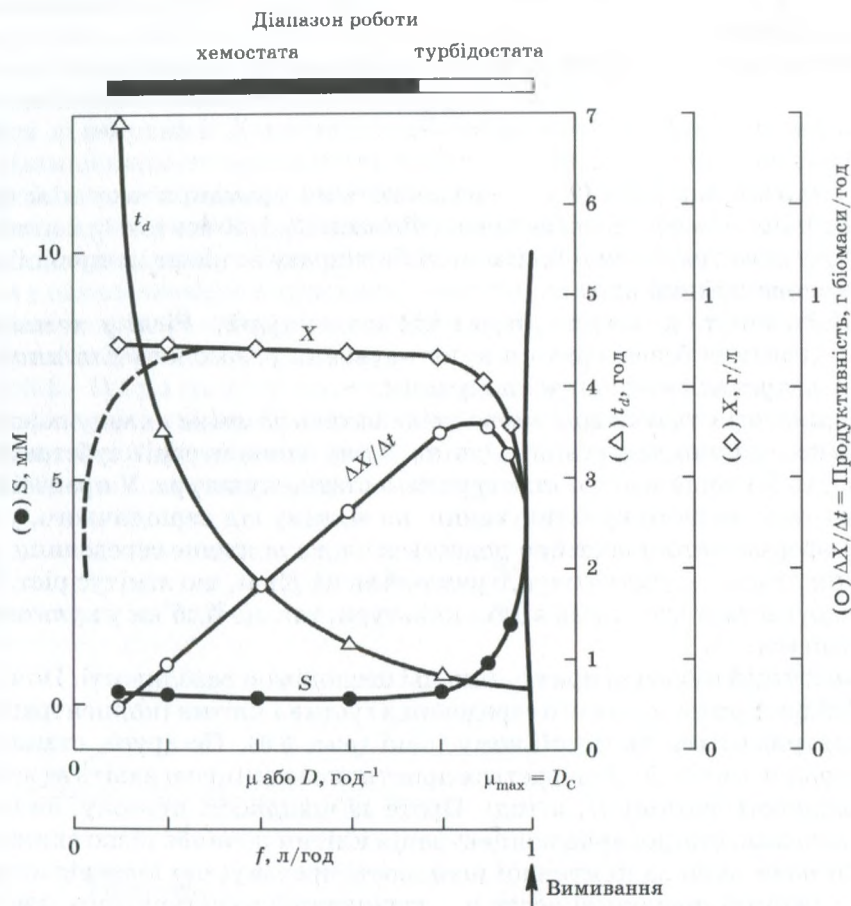


Рис. 3.6. Біомаса X (або кількість клітин) і концентрація лімітувального субстрату S за стаціонарного стану безперервної культури залежно від швидкості потоку f , швидкості розбавлення D і питомої швидкості росту μ .

Критична швидкість розбавлення D_c дорівнює $\mu_{\max}$, тобто питомій швидкості росту даних бактерій у періодичній культурі. t_d — тривалість генерації, $\Delta X/\Delta t$ — продуктивність хемостату. На графіку показано теоретично розраховані значення для культури об'ємом 1 л при $\mu_{\max} = 1$ год⁻¹; значення Y , що дорівнює 0,5 г біомаси на 1 г спожитого субстрату; концентрації субстрату (глюкози) у резервуарі 10 мМ (1,8 г/л) і K_s для глюкози 0,1 мМ. Реальні величини X за низьких значень μ показані штриховою лінією. DX відображає швидкість відтоку, або вихід біомаси (продуктивність, г біомаси на одиницю часу)

Підставляючи цей вираз для f у рівняння (3.12), одержуємо рівняння (3.14), в якому швидкість розбавлення D можна розглядати як частоту оновлення всього об'єму культури за одиницю часу:

$$\mu = D. \quad (3.14)$$

Зміна біомаси бактерій dX/dt у культиваторі складається з двох швидкостей — росту і розбавлення культури:

$$dX/dt = \mu X - DX, \quad (3.15)$$

причому у стані динамічної рівноваги культури μ дорівнює D . Стабільність такого стану у хемостаті визначається тим, що ріст лімітований концентрацією одного з субстратів. Якщо за постійної швидкості розбавлення D концентрація субстрату у резервуарі S_R підвищується, то відбувається встановлення нової рівноважної концентрації клітин X , але не збільшення рівноважної питомої швидкості росту μ . Спочатку після підвищення S_R культура росте швидше і густина її збільшується, проте швидко досягається новий рівноважний стан, за якого клітини за рахунок збільшення їхньої кількості споживають практично весь субстрат у міру його надходження; отже, швидкість розбавлення знову визначає швидкість росту.

Після зміни швидкості розбавлення відбувається саморегуляція системи і досить швидко досягається нове значення μ . Цей дивний феномен можна пояснити на основі гіперболічної залежності μ від концентрації субстрату S (рис. 3.7), відомої як рівняння Моно:

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_S + S}, \quad (3.16)$$

де K_S — константа спорідненості організму з субстратом, що чисельно дорівнює такій концентрації лімітувального субстрату, за якої швидкість росту становить половину максимальної величини ($\mu_{\max}/2$). Величини K_S зазвичай перебувають у мікромольному діапазоні.

Залежність швидкості росту бактерій і активності ферментів від концентрації субстрату описуються однаковими функціями (рівняння (3.16) і рівняння Міхаеліса — Ментен):

$$V = V_{\max} \frac{S}{K_M + S}, \quad (3.17)$$

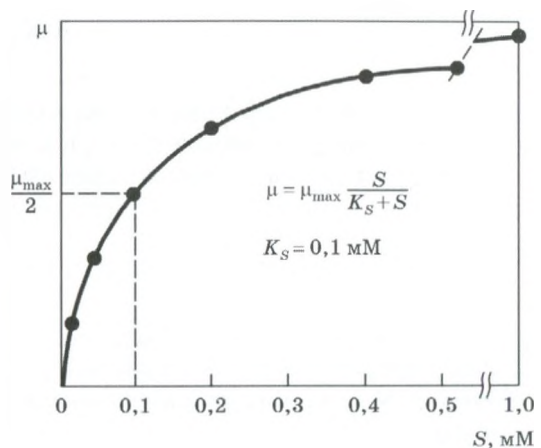


Рис. 3.7. Залежність питомої швидкості росту μ від концентрації лімітувального субстрату S згідно з рівнянням Моно

3. ЕТАПИ БІОТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ

Величина K_M дорівнює такій концентрації субстрату, за якої швидкість ферментативної реакції становить половину максимальної. Очевидно, швидкість росту визначається швидкістю найповільнішої реакції метаболізму, часто швидкістю транспорту субстрату через мембрану за участю переносника. Тому залежність швидкості росту від притоку субстрату описується кривою насичення, в якій S є концентрацією субстрату у культурі (а не в середовищі, що подається в культиватор). Концентрацію субстрату в хемостаті можна вирахувати з рівняння (3.18), одержаного перетворенням рівняння (3.16):

$$S = K_S \frac{\mu}{\mu_{\max} - \mu}. \quad (3.18)$$

Оскільки за рівноваги у хемостаті $\mu = D$, рівняння (3.18) можна записати у вигляді:

$$S = \frac{K_S D}{\mu_{\max} - D}. \quad (3.19)$$

Отже, за рівноваги концентрація субстрату в хемостаті S не залежить від його концентрації в резервуарі (S_R), а визначається лише величинами K_S і D та даною $\mu_{\max}$. Концентрація субстрату в резервуарі (тобто у свіжому середовищі, яке подається) S_R впливає лише на густину культури X :

$$X = Y(S_R - S) = Y \left(S_R - \frac{K_S D}{\mu_{\max} - D} \right), \quad (3.20)$$

де Y — економічний коефіцієнт.

Чим більше клітин утворюється у процесі використання даної кількості субстрату ($S_R - S$), тим більше енергії бактерії можуть одержати за його споживання.

Культивування в хемостаті має такі переваги:

- дає змогу наблизитись до ідеальної ситуації, коли клітини тривалий час перебувають у фазі експоненційного росту за постійної концентрації субстрату та інших незмінних умов;
- дає змогу визначати важливі показники росту, такі як K_S , $\mu_{\max}$ і будь-які інші, пов'язані з μ , а також вивчати фізіологічну реакцію культури на лімітування поживними речовинами;
- хемостат є корисною моделлю для дослідження росту у багатьох природних місцях існування;
- дає змогу виявляти переважно використовувані субстрати з їх суміші, також конкуренцію або співіснування двох чи трьох видів за даних умов росту;
- дає змогу здійснювати підживлення токсичними субстратами у вищих концентраціях;
- забезпечує відбір мутантів з нижчими значеннями K_S лімітувального субстрату або вищим значенням $\mu_{\max}$;
- дає змогу досліджувати стабільні двокомпонентні культури, наприклад синтрофні асоціації.

Ріст у турбідостаті. Культивування у турбідостаті базується на автоматизованому підтриманні постійної заданої концентрації клітин регулю-

ванням швидкості подавання свіжого середовища відповідно до зміни густини культури. Всі субстрати при цьому містяться в культиваторі у надлишку. Ріст у турбідостаті найстабільніший за умови наближення питомої швидкості росту μ до $\mu_{\max}$, тобто зміна швидкості потоку приводить до зміни біомаси, відповідно до рівня якої здійснюється регуляція системи. Ріст у хемостаті за таких умов найменш стабільний. На практиці найскладнішою проблемою за умов культивування у турбідостаті є постійний моніторинг концентрації біомаси. Зазвичай її визначають за показниками, безпосередньо пов'язаними з ростом і метаболізмом клітин, наприклад за концентрацією CO_2 у газовій суміші на виході з культиватора.

3.2.5.4. Економічний коефіцієнт. Концентрацію біомаси (X), утвореної за споживання одного моля енергетичного субстрату (субстрат катаболізму, S_E), називають *молярним економічним коефіцієнтом* Y :

$$dX/dS_E = Y. \quad (3.21)$$

Якщо ріст лімітований концентрацією субстрату катаболізму, величина Y в експоненційній фазі росту, як правило, постійна. Використовується також економічний коефіцієнт $Y_{\text{АТФ}}$, який показує концентрацію біомаси у перерахунку на 1 моль використаної АТФ. Зв'язок між Y і $Y_{\text{АТФ}}$ описується рівнянням

$$Y = nY_{\text{АТФ}}, \quad (3.22)$$

де n — кількість моль АТФ, утворених у процесі споживання 1 моль катаболізованого субстрату S_E , використовуваного як джерело енергії.

Показник Y використовують для розрахунку кількості АТФ (n), утвореної у процесі катаболізму 1 моль S_E . Припускаючи, що склад клітин і потреби в АТФ для біосинтезу їх компонентів однакові у всіх бактерій за умов росту на ідентичних енергетичних субстратах, можна використовувати для розрахунків одне й те саме значення $Y_{\text{АТФ}}$. Проте залежно від використовуваного джерела вуглецю величина $Y_{\text{АТФ}}$ може суттєво змінюватися. Розрахунки, що базуються на дослідженні шляхів біосинтезу, показують, що необхідна для синтезу клітинних компонентів кількість АТФ у грубому наближенні обернено пропорційна кількості атомів вуглецю у сполучі, яка використовується як джерело вуглецю (порівнювати можна лише субстрати з подібним ступенем відновлення). Отже, за умов росту на середовищі з лактатом чи ацетатом як джерел вуглецю величина $Y_{\text{АТФ}}$ буде у два чи три рази нижча, ніж у процесі культивування на середовищі з глюкозою.

За звичайних умов культивування субстрат (наприклад, глюкоза) одночасно використовується і для одержання енергії, і для реакцій біосинтезу. При визначенні Y , тобто біомаси у перерахунку на 1 моль субстрату, витраченого для одержання енергії (S_E), та частина субстрату, яка була використана як джерело вуглецю (S_C), тобто на біосинтез, повинна бути вирахована із загальної кількості спожитого субстрату (рівняння (3.23)). Частку субстрату S_C/S , використану як джерело вуглецю, можна розрахувати за рівнянням (3.24), одержаного об'єднанням рівнянь (3.23), (3.25) і (3.26).

$$S = S_E + S_C; \quad (3.23)$$

$$\frac{S_c}{S} = \left(1 + \frac{24a}{nY_{\text{АТФ}}} \right)^{-1}; \quad (3.24)$$

$$X = 24aS_c; \quad (3.25)$$

$$\frac{X}{S_E} = nY_{\text{АТФ}}. \quad (3.26)$$

Рівняння (3.25) показує, що утворена біомаса (X) дорівнює подвоєній масі вуглецю (молекулярна маса 12 г/моль) використаного субстрату, оскільки вуглець становить половину сухої речовини клітин. Кількість атомів вуглецю у молекулі субстрату позначено як a . Рівняння (3.26) одержано об'єднанням рівнянь (3.21) і (3.22) і заміною величини dX/dS_E на X/S_E .

Згідно з рівнянням (3.24) частка субстрату, використана як джерело вуглецю (S_c/S), по суті є функцією виходу АТФ (n), оскільки величина $a/Y_{\text{АТФ}}$ приблизно однакова за використання, наприклад, глюкози, малату, лактату чи ацетату як джерела вуглецю. Залежність S_c/S зображена графічно як функція n за значення $a/Y_{\text{АТФ}} = 0,6$ моль АТФ/г клітин на рис. 3.8. Ця величина відповідає значенню $Y_{\text{АТФ}}$, рівному 10 г біомаси/моль АТФ, характерному для росту багатьох бактерій на середовищі з глюкозою у процесі періодичного культивування.

Як видно з рис. 3.8, у процесі утворення 2 (30) моль АТФ на 1 моль субстрату в катаболічних реакціях бактерії використовують як джерело вуглецю 12 % (30 %) субстрату. Ці два значення відповідають двом основним типам метаболізму глюкози: молочнокислому чи спиртовому бродінню (2 моль АТФ) і повному окисненню глюкози до CO_2 (30 моль АТФ).

3.2.5.5. Витрати енергії на підтримання. Значення $Y_{\text{АТФ}}$, розраховані за рівнянням (3.22) для відомої величини n і визначеної у періодичній культурі концентрації біомаси, виявляються значно нижчими, ніж значення $Y_{\text{АТФ}}$, розраховані теоретично на основі аналізу біосинтетичних реакцій. Така різниця пояснюється витратами енергії на підтримання, тобто споживанням АТФ чи енергетичних еквівалентів АТФ у процесах, не пов'язаних з ростом клітин. Вважається, що частка еквівалентів АТФ, витрачених на підтримання, тим менша, чим вища швидкість росту. Ця гіпотеза підтверджена експериментально на безперервній культурі. Вимірювання

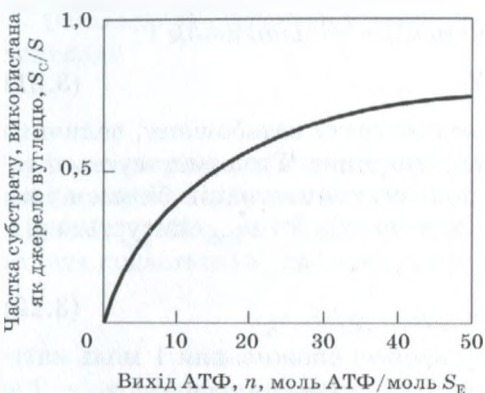


Рис. 3.8. Частка субстрату, використана як джерело вуглецю (S_c/S), залежно від виходу АТФ у катаболічних процесах.

Субстрат витрачається і на шляхах катаболізму, і в реакціях біосинтезу. Крива побудована за рівнянням (3.13) для $a/Y_{\text{АТФ}} = 0,6$ моль АТФ/г клітин

величини Y за збільшення швидкості росту показує зазвичай лінійну залежність між $1/Y$ і $1/\mu$ (рис. 3.9).

Таку залежність можна пояснити, базуючись на таких двох припущеннях:

1. Частина катаболізованого субстрату S_E використовується на підтримання (S_M), решта (S_P) — на забезпечення ендергонічних реакцій біосинтезу (рівняння (3.27)). Диференціюванням рівняння (3.27) одержуємо рівняння (3.28).

$$S_E = S_M + S_P; \quad (3.27)$$

$$dS_E/dt = dS_M/dt + dS_P/dt. \quad (3.28)$$

2. Швидкість споживання частки субстрату, що становить S_M , пропорційна густині культури:

$$dS_M/dt = m_s X. \quad (3.29)$$

Величину m_s називають коефіцієнтом підтримання. Підставкою рівняння $dX/dt = \mu X$ і рівняння (3.21) в рівняння (3.28) можна одержати рівняння Перта (3.30), де $Y_{\max}$ — кількість утворених клітин у перерахунку на 1 моль спожитого субстрату S_P :

$$1/Y = 1/Y_{\max} + m_s X. \quad (3.30)$$

Згідно з рівнянням (3.30) залежність між $1/Y$ і $1/Y_{\max}$ є лінійною, що підтверджують експериментальні дані (див. рис. 3.9). Максимальний економічний коефіцієнт, розрахований із урахуванням витрат енергії на підтримання ($Y_{\max}$), визначають шляхом екстраполяції виміряних значень Y на безкінечно велике значення μ ($1/\mu = 0$). У деяких експериментах визначена таким чином величина $Y_{\max}$ виявилась близькою до значень, розрахованих за рівнянням (3.22) з використанням відомого значення n і теоретично визначеної на основі біосинтетичних потреб клітин величини $Y_{\text{АТФ}}$. Нахил прямої (тангенс кута, m_s) на рис. 3.9 характеризує кількість катаболізованого субстрату, що використовується на підтримання, в розрахунку на одиницю часу і маси клітин, тобто коефіцієнт підтримання. Кількість АТФ, необхідної клітинам для цієї ж мети, позначають $m_{\text{АТФ}}$ (табл. 3.1).

На жаль, якихось інших незалежних методів визначення m_s , за допомогою яких можна було б підтвердити справедливості припущень, на яких базується рівняння Перта, немає. Деякі експериментально одержані для різних бактерій значення коефіцієнта підтримання наведено у табл. 3.1.

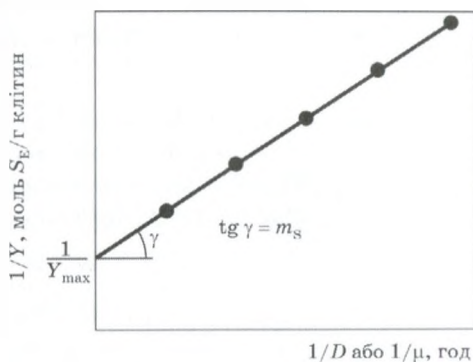


Рис. 3.9. Залежність економічного коефіцієнта Y від швидкості розбавлення D у гіпотетичному експерименті з використанням хемостата.

Точки одержано на основі експериментально визначених величин X і S_E

Таблиця 3.1. Величина коефіцієнта підтримання у різних бактерій

Бактерії	Умови культивування	m_s , мкмоль субстрату · (г сухих клітин) ⁻¹ год ⁻¹	m_{ATP} , мкмоль АТФ · (г сухих клітин) ⁻¹ год ⁻¹
<i>Escherichia coli</i>	Глюкоза, аеробні умови	0,2—0,4	4,0—8,0
<i>Escherichia coli</i>	Глюкоза, бродіння	2,3	6,9
<i>Paracoccus denitrificans</i>	Глюкоза, аеробні умови	0,08	2,7
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Ацетат, аеробні умови	0,25—0,6	2,5—6,3
<i>Klebsiella aerogenes</i>	Глюкоза, аеробні умови	0,35	6,9
<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	Етанол + сульфат	4,3	4,3
<i>Nitrosomonas europea</i>	Аміак + O ₂	1,5	1,5
<i>Desulfohalobium propionicus</i>	Етанол + сульфат	0,9	0,9
<i>Propionigenium modestum</i>	Сукцинат, бродіння	0,87	0,29

3.2.5.6. Кількісне визначення ферментів за величинами швидкості росту і економічного коефіцієнта. **Ферменти катаболізму.** Швидкість споживання катаболічного субстрату dS_c/dt в експоненційній фазі росту зв'язана з μ і Y такою залежністю:

$$dS_c/dt = (\mu/Y)X. \quad (3.31)$$

Співвідношення μ/Y називається **метаболічним коефіцієнтом** і відображає швидкість споживання субстрату бактеріями, яка пропорційна специфічній активності ферментів його катаболізму. Порівняння активності ферментів, розрахованої на основі метаболічного коефіцієнта, з експериментально визначеною активністю дає змогу встановити шлях катаболізму субстрату у досліджуваних бактерій. Припустимо, що реальна активність ферментів у клітинах близька до V_{max} , тоді активність ферменту A (моль субстрату, спожитого за одиницю часу) в розрахунку на 1 г сухої речовини клітин (X) дорівнює μ/Y (має таку саму розмірність, як і A/X):

$$A/X = \mu/Y. \quad (3.32)$$

Якщо відома кількість оборотів ферменту T (тобто кількість моль субстрату, перетвореного на продукт за одиницю часу), можна визначити молярну концентрацію ферменту E в розрахунку на 1 г біомаси:

$$V_{max} = ET. \quad (3.33)$$

Активність ферментів (величини V_{max} , визначені у безклітинних екстрактах, рівняння (3.32) і (3.33)) повинні перевищувати розраховані за рівнянням (3.31), оскільки малоімовірно, що у клітинах, які ростуть, ферменти функціонують за насичених концентрацій субстратів.

Ферменти анаболізму. Швидкість синтезу клітинного компонента K (dK/dt) в експоненційній фазі росту можна визначити, знаючи μ і вміст цього компонента в клітинах, моль/г біомаси:

$$dK/dt = \mu K. \quad (3.34)$$

Рівняння (3.34), одержане шляхом заміни X у рівнянні $dX/dt = \mu X$ на K (за припущення, що склад клітин бактерій незмінний упродовж росту), можна використовувати для розрахунку специфічної активної ферментів біосинтезу. Порівняння розрахованої таким чином активності з визначеною експериментально (у безклітинних екстрактах) може бути корисним підходом для встановлення шляхів біосинтезу, що функціонують у тих чи інших бактерій.

3.2.5.7. Напівбезперервне культивування. Цей спосіб культивування інакше називається *періодичним культивуванням з підживленням*. Суть його полягає у тому, що в періодичну культуру безперервно добавляють основний субстрат, експоненційно збільшуючи швидкість його подавання. Це дає змогу подовжити експоненційну фазу росту, щоб можна було періодично відбирати частину культури для її використання. Напівбезперервне культивування застосовують, наприклад, у тому разі, якщо субстрат за високих концентрацій є токсичним. За такого способу вдається одержати вищу біомасу або вихід продукту, ніж за умов звичайного періодичного культивування, і це не потребує великої кількості додаткового обладнання. Отже, забезпечуючи культуру основними поживними речовинами у кількості, що постійно збільшується відповідно до потреб організму, але не створюючи їх надлишку, у періодичній культурі можна досягти дуже високої концентрації біомаси (до 150 г/л). Якщо біомаса використовується як біокатализатор, її можна повертати у культиватор після відділення від середовища (зворотний зв'язок через біомасу). Якщо дослідника цікавить продукт, а не клітини, корисним виявляється діалізне культивування, за якого культура, що перебуває у спеціальній посудині, сполучається через діалізну мембрану з рециркульованим середовищем, з якого постійно видаляються продукти обміну. Мембрана є проникною для поживних речовин і продуктів обміну, проте не для клітин.

Переваги діалісної культури такі: можливість досягнення високої концентрації біомаси, послаблення інгібування кінцевим продуктом і відділення метаболітів від клітин, можливість дослідження чистих культур у природних середовищах та вивчення взаємодії між двома чистими культурами.

3.2.5.8. Принципові відмінності між періодичною та безперервною культурами. Періодичну культуру можна розглядати як замкнуту систему (якоюсь мірою подібну до багатоклітинного організму), яка в своєму розвитку проходить кілька фаз (лаг-фаза, експоненційна та ін.). Умови існування у всіх цих фазах різні. Автоматичне регулювання в періодичній культурі навряд чи можливе.

Безперервна культура — це відкрита система, яка намагається досягти динамічної рівноваги. Фактор часу певною мірою виключається. Для організмів створюються незмінні умови середовища. Легко піддається автоматичному регулюванню.

3.2.5.9. Синхронні культури. Для вивчення синтезу окремих компонентів клітини в процесі її поділу, проведення цитогенетичних і генетичних досліджень використовують синхронні культури. Це культури, в яких певний час всі клітини діляться одночасно (синхронно) за рахунок однакової готовності до росту та поділу окремих особин. Синхронізація культури досягається фізичними та хіміко-біологічними методами:

фізичні — температурна дія, диференційне центрифугування, диференційне фільтрування, чергування світлових і темнових режимів у фотосинтезувальних бактерій. За диференційного центрифугування або фільтрування можна відділити клітини легкої фракції (менших розмірів), які діляться синхронно впродовж кількох перших генерацій. Ці два методи синхронізації культур найбільш м'які;

хіміко-біологічні — вирощування бактерій на неповноцінних поживних середовищах з наступним перенесенням їх у повноцінні середовища, вимушене голодування бактерій.

3.2.6. Вплив умов культивування на ріст мікроорганізмів

Ріст мікроорганізмів залежить від температури, рН, редокс-потенціалу та інших факторів (табл. 3.2). Негативні фактори затримують ріст і утворення цільового продукту, і навіть спричиняють відмирання частини клітин.

У промисловості в основному використовують мікроорганізми-мезофіли, що мають оптимальну температуру близько 30 °С. Останнім часом підвищений інтерес викликають термофільні мікроорганізми, які менш чутливі до контамінації й мають вищі кінетичні характеристики. Крім того, термофіли продукують термостабільні речовини, наприклад ферменти, для яких сфери практичного застосування значно ширші.

Таблиця 3.2. Основні фактори, що визначають ріст і біосинтетичну здатність продуцентів

Фактор	Роль у життєдіяльності продуцента	Методи керування
Склад і концентрація поживних речовин	Забезпечення процесу енергетичного і конструктивного метаболізму	Визначення оптимального складу поживного середовища; підживлення під час ферментації; безперервність процесу; багатостадійність із урахуванням потреб продуцента за фазами розвитку та ін.
Концентрація продукту й інгібіторів	Сповільнює біохімічні реакції	Осадження продукту у міру накопичення; ферментація з діалізом; ферментація під розрідженням з випарюванням леткого продукту та ін.
рН	Оптимізує швидкість біохімічних реакцій (інтервал 3,5—9,0)	Регулювання додаванням кислоти або лугу
Температура	Оптимізує швидкість біохімічних реакцій (інтервал 20—70 °С)	Охолодження або підігрівання культуральної рідини за допомогою теплообмінників і температури подаваних у біореактор субстратів

Закінчення табл. 3.2

Фактор	Роль у життєдіяльності продуцента	Методи керування
Осмотичний тиск або активність води	Визначає ступінь доступності води для мікроорганізмів (0,6—0,998)	Використання середовищ із оптимальною концентрацією поживних речовин або вологістю щільного середовища; підтримання на постійному рівні під час ферментації розведенням водою або додаванням окремих компонентів
Концентрація розчиненого кисню	Для аеробів забезпечує аеробний метаболізм; є акцептором H^+ ; інгібує розвиток анаеробів	Для аеробних процесів регулюють інтенсивністю аерації або додаванням до газової суміші кисню; при атмосферному тиску й $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ у 1 л середовища розчиняється $0,28\text{ мМ } O_2$. Анаеробні процеси реалізують у безкисневому середовищі, що досягається продуванням N_2 і CO_2 або добавками відновників (цистеїну, аскорбінової кислоти та ін.)
Концентрація діоксиду вуглецю	Джерело вуглецю для автотрофів, для гетеротрофів під час росту на вуглеводах для функціонування анаеротичних реакцій (карбосилування та ін.)	Для процесів з використанням автотрофних мікроорганізмів (наприклад фотосинтезувальних) збагачення газової суміші CO_2
Перемішування середовища	Рівномірний розподіл поживних речовин і біомаси по всьому об'єму середовища	Організують макро- і мікроперемішування в біореакторах за допомогою механічних мішалок, барботажних, циркуляційних та інших систем. Аерація сприяє перемішуванню, а піноутворення — флотації продуцента; флокуляція сприяє осадженню біомаси
В'язкість середовища	Визначає дифузію поживних речовин і перемішування клітин продуцента	Регулювання компонентами середовища, характером і концентрацією біомаси, а також наявністю деяких полімерних екстрацелюлярних продуктів. В'язкість впливає на перемішування й аерацію, для чого потрібні спеціальні технічні засоби

Істотний вплив на ріст культури й утворення продукту має кислотно-лужна реакція середовища. Найчастіше промислові мікроорганізми культивують за $pH\ 4-8$. Деякі дріжджі й мікроскопічні гриби краще ростуть у кислому середовищі при $pH\ 3-4$, і цю властивість можна використовувати для пригнічення бактеріальної інфекції.

3.2.7. Оцінювання процесу ферментації

Культивування мікроорганізмів (точніше, клітин мікроорганізмів) відбувається у трифазному середовищі — рідина, газ, тверда речовина.

Мікроорганізми в результаті секреції продуктів обміну речовин постійно змінюють середовище культивування, а самі процеси метаболізму у свою чергу швидко реагують на зміни в середовищі. Треба враховувати здатність багатокomпонентного поживного середовища утворювати стійку піну, що потребує регулювання режимів піноутворення. Крім того, у результаті інтенсивного обміну речовин у мікроорганізмів частина хімічної енергії, зв'язаної під час ферментації, виділяється у вигляді тепла. У процесі асиміляції 1 кг цукру мікроорганізми виділяють 4—6 МДж тепла. На біохімічних заводах працюють десятки ферментерів, від яких відводять зайве тепло.

Для оцінювання реального ферментаційного процесу використовують ряд кінетичних показників, наведених у *табл. 3.3*. На практиці під час культивування мікроорганізмів у культуральній рідині контролюють концентрацію ростового субстрату S (джерело вуглецю), біомаси X і цільового продукту P . За цими показниками обчислюють питому швидкість росту, продуктивність системи за біомасою і продуктом, а також, у разі потреби, економічні коефіцієнти.

Процес ферментації можна оцінювати за різними показниками, використовуючи для цього відповідні розрахункові формули.

Таблиця 3.3. Основні показники процесу ферментації

Показник	Позначення та одиниці вимірювання	Розрахункова формула	Примітка
Концентрація: біомаси субстрату продукту	X , г/л S , г/л P , г/л	$X_1 = X_0 e^{\mu(t_1 - t_0)}$	Для експоненційної фази росту $e = 2,718$
Питома швидкість росту	μ , год ⁻¹	$\mu = \frac{X_1 - X_0}{X_1(t_1 - t_0)}$	—
Коефіцієнт розведення	D , год ⁻¹	$D = \mu$	Для безперервного процесу
Продуктивність за біомасою	Q_x , г/(л·год)	$Q_x = \frac{X_1 - X_0}{t_1 - t_0}$	Для періодичного процесу
		$Q_x = DX$	Для безперервного процесу
Те саме за продуктом	Q_p , г/(л·год)	$Q_p = \frac{P_1 - P_0}{t_1 - t_0}$	Для періодичного процесу
		$Q_p = DP$	Для безперервного процесу

Закінчення табл. 3.3

Показник	Позначення та одиниці вимірювання	Розрахункова формула	Примітка
Питома швидкість споживання субстрату	q_s , г/(л·год)	$q_s = \frac{S_1 - S_0}{X_1(t_1 - t_0)}$	—
Вихід продукту від субстрату	$Y_{p/s}$, г/г	$Y_{p/s} = \frac{q_p}{q_s} = \frac{P_1 - P_0}{S_0 - S_1}$	—
Вихід біомаси від субстрату	$Y_{x/s}$, г/г	$Y_{x/s} = \frac{\mu}{q_s} = \frac{X_1 - X_0}{S_0 - S_1}$	—
Питома швидкість утворення продукту	q_p , г/(л·год)	$q_p = \frac{P_1 - P_0}{X_1(t_1 - t_0)}$	—

3.2.8. Основні технологічні прийоми регуляції процесів мікробіологічного синтезу

Основним завданням мікробіологічного синтезу є підвищення продуктивності, збільшення активності, досягнення надсинтезу цільового продукту. Одним із шляхів вирішення цих завдань може бути створення нового високодуктивного штаму-продуцента методами генетики й селекції або конструюванням нового геному методами генної інженерії. У процесі відбору або створення нового штаму можуть бути сформульовані такі вимоги до продуцента:

- оптимальна швидкість росту у ферментерах;
- стабільність фізіологічних показників;
- максимальна асиміляція поживних речовин і максимальна трансформація ростового субстрату у цільовий продукт;
- зміни в структурі геному, що виключають введення індуктора в середовище (у процесі біосинтезу індукцибельних ферментів);
- мінімальний синтез інших метаболітів;
- відсутність серед продуктів метаболізму токсичних метаболітів (алергени, онкогени, високотоксичні антибіотики);
- високий вихід цільового продукту;
- висока швидкість синтезу цільового продукту.

Максимальний прояв потенційних властивостей продуцента можливий за умови відповідності технологічного процесу його фізіологічним особливостям.

Регуляція технологічних процесів мікробіологічного синтезу базується на регуляції характерних для даного процесу біохімічних реакцій, здійснюваних продуцентом у конкретних умовах культивування. До них належать

шляхи асиміляції основних вуглеце- і азотвмісних компонентів середовища, реакції синтезу низькомолекулярних метаболітів, реакції енергетичного метаболізму. Знання механізмів регуляції синтезу необхідне як під час одержання ферментів як цільових продуктів, так і у процесі синтезу низькомолекулярних сполук, наприклад вторинних метаболітів. Труднощі у виявленні факторів регуляції пов'язані з тим, що більшість метаболітів разом з їхньою участю в конструктивному й енергетичному метаболізмі виконують і регуляторні функції.

У мікробних клітинах функціонують різні системи регуляції обміну речовин (табл. 3.4). Принципові відмінності між ними полягають у тому, що одні з них регулюють синтез ферментів, інші — їхню активність.

Таблиця 3.4. Механізми регуляції метаболізму

Вид регуляції	Коротка характеристика
Регуляція метаболітами	Активність ферментів і їхня кількість не змінюються. Інтенсивність метаболізму залежить від концентрацій метаболітів
	Ферментна регуляція
Регуляція кінцевим продуктом	Надлишок кінцевого продукту інгібує активність першого ферменту метаболічного шляху за типом зворотного зв'язку, а також знижує швидкість синтезу ферментів, які беруть участь в утворенні цього продукту
Регуляція в результаті обмеженого протеолізу	Обмежений протеоліз може індукувати фізіологічну функцію шляхом перетворення білка-попередника в його біологічно активну форму або забезпечує припинення якої-небудь біологічної активності
Регуляція шляхом зворотного фосфорилування	Циклічний перехід ферментів, що каталізують ключові стадії метаболізму, з фосфорильованих форм у дефосфорильовані
Регуляція шляхом ковалентної модифікації	Здійснюється посттрансляційною модифікацією амінокислот у складі білків. У бактерій здійснюється шляхом зворотного аденілювання, уридилування й ацетилування
Алостеричні регуляції	Базуються на зміні конформації ферменту, що супроводжується зміною його активності
	Генна регуляція
Позитивна регуляція транскрипції	Регулювальні фактори активують промотор. Промотор лактозного оперону активується під дією цАМФ і білка БАК, якщо в клітині немає глюкози

Закінчення табл. 3.4

Вид регуляції	Коротка характеристика
Негативна регуляція транскрипції	Характерна для генів, об'єднаних в оперон. Інтенсивність транскрипції регулюється в результаті взаємодії оператора з білком-репресором. Під час синтезу репресибельного ферменту репресор блокує оператор, у процесі синтезу індукцибельного ферменту — звільняє оператор
Посттранскрипційна регуляція	В еукаріот тільки частина РНК, що утворюється в ядрі, потрапляє в цитоплазму. У процесингу повністю руйнується більша або менша частина синтезованих молекул
Регуляція трансляції	Відбувається на етапі ініціації за допомогою факторів ініціації

Посередниками в регуляції є низькомолекулярні сполуки, які або синтезуються клітиною, або надходять у клітину з навколишнього середовища.

Основні дані про механізми регуляції були отримані на мутантних штаммах або в дослідях *in vitro* на моделях. Останні не завжди можуть відтворити умови, близькі до *in vivo*.

3.2.8.1. Індуктори. Одним із найпоширеніших способів підвищення активності ферментів є введення в середовище індукторів. Індуктор і репресор — це речовини, що змінюють швидкість синтезу білків (фізіологічні сигнали). При цьому, найімовірніше, з регуляторним апаратом взаємодіє не сам індуктор, а його метаболіт або навіть речовина іншого походження, конформація якої змінюється за наявності індуктора. Метаболіти, що змінюють швидкість синтезу білків у результаті безпосередньої взаємодії з регуляторним апаратом оперона, називаються *істинними індукторами*. Мікробіологи часто використовують компоненти середовища як фактори, що підвищують рівень активності тих чи інших ферментів у клітинах продуцента.

Застосування терміна «індукція» не завжди коректне. Здебільшого може йтися лише про первинний фізіологічний сигнал. Справжній (істинний) індуктор локалізований у клітині, отже необхідною є наявність відповідної транспортної системи для перенесення даної речовини в клітину.

На відміну від індукцибельних синтез конститутивних ферментів не залежить від наявності індукторів. Прикладами таких конститутивних ферментів можуть бути ферменти центрального метаболізму, які практично однакові для більшості мікроорганізмів.

Під час мікробіологічного синтезу ферментів як індуктори зазвичай використовують субстрати дії ферменту. Проте у процесі метаболізму і синтезу відповідного ферменту відбувається деградація індуктора, порушення його структури. Для уникнення подібної ситуації й забезпечення максимального синтезу ферменту упродовж тривалого часу запропоновано вводити у середовища речовини, стерично подібні до індуктора, тобто їхні структурні анало-

ги, які можуть виконувати функції індуктора, але при цьому не асимілюють-ся клітиною (або асимілюються дуже повільно).

Для того щоб природні індуктори зробити менш доступними ензиматичному розщепленню, їх можна модифікувати приєднанням до них полімерів або жирних кислот.

3.2.8.2. Катаболітна репресія. Мікробіологам добре відомий так званий «глюкозний ефект», коли високі концентрації глюкози пригнічують ріст і ускладнюють асиміляцію інших джерел вуглецю. Сутність цього процесу полягає в інгібуванні за наявності глюкози транскрипції генів, що детермінують синтез ферментів, необхідних для катаболізму лактози або інших енергетичних субстратів. Сама по собі глюкоза не спричиняє безпосередньої інгібувальної дії. Інгібітор, відповідальний за глюкозний ефект у клітинах *E. coli*, є продуктом її розщеплення, тобто катаболітом глюкози, а саме явище одержало назву *катаболітної репресії*. Який саме інтермедіат катаболізму глюкози зумовлює катаболітну репресію, дотепер не встановлено.

До вуглеводів, підданих катаболітній репресії, можуть бути віднесені не тільки лактоза, а й галактоза, мальтоза та ін. Це зумовлено біохімічними особливостями асиміляції вуглеводів, відмінних від глюкози. Відомо, що кожен із цих вуглеводів, перш ніж залучитися до метаболізму, ензиматично перетворюється на один із початкових продуктів гліколізу, наприклад глюкозо-6-фосфат або фруктозо-6-фосфат. Таке перетворення викликає необхідність синтезу ферментів, що забезпечують утворення даних продуктів.

Слід зазначити, що ефективність дії якого-небудь джерела вуглецю як катаболітного репресора залежить не від його хімічної структури, а винятково від його ефективності як джерела живлення. Тому сполуки, що є активними катаболітними репресорами для одних мікроорганізмів, можуть бути малоактивними для інших. Класичним прикладом середовища, в якому одночасно наявні лактоза й глюкоза, є середовище для біосинтезу пеніциліну. Внаслідок катаболітної репресії синтезу ферменту, що гідролізує лактозу, цей субстрат не асимілюється, поки вміст глюкози не досягне мінімальної концентрації, за якої катаболітна репресія неможлива. За оптимального співвідношення лактози й глюкози підтримується необхідний для біосинтезу пеніциліну рівень рН середовища, накопичуються необхідні для синтезу проміжні метаболіти. У тих процесах, де аналогічне рішення неприйнятне, уникнути катаболітної репресії можна дробним введенням глюкози або іншого джерела вуглецю упродовж ферментації.

3.2.8.3. Аlostерична регуляція ферментів. Аlostеричні регулятори виконують найважливіші функції в регуляції каталітичної активності. Префікс *ало* означає «інший». Він свідчить, що на ферменті, крім ділянки зв'язування субстрату, є одна або кілька ділянок зв'язування іншої сполуки (або сполук). Низькомолекулярні речовини, зв'язувані білком, прийнято називати *лігандами*. Так часто називають і невеликі білки. Ліганди, що зв'язуються з аlostеричними ділянками, називають *алостеричними ефекторами*, або *алостеричними регуляторами*. Вони зазвичай стерично відмінні від субстрату, на який діє даний фермент. Тому молекули субстрату й регулятора не можуть конкурувати за одну й ту саму ділянку ферменту.

Дія ефекторів, як правило, спостерігається за певної концентрації субстрату. Позитивні ефектори під час зв'язування з алостеричним центром фермента збільшують його активність, негативні — знижують в результаті зміни конформаційної структури ферменту. Однією з істотних особливостей алостеричної регуляції є її миттєва дія. Алостеричний ліганд практично миттєво зв'язується з регуляторним центром за рахунок нековалентних взаємодій. Регулятор вивільняється з комплексу (з ферментом), якщо його концентрація в середовищі знижується. При цьому фермент повертається у вихідний стан. Алостеричні ферменти, як правило, мають четвертинну структуру.

Механізми регуляції активності ферментів за допомогою алостеричних ефекторів, очевидно, найпоширеніші в мікробних клітинах. Одним із проявів алостеричного механізму є активація попередником. Це сполука, яка у нативному або незначно модифікованому вигляді включається до молекули синтезованої речовини.

Поширенішим, ніж активація, попередником, типом регуляції є інгібування за типом негативного зворотного зв'язку, коли накопичення кінцевого продукту даного метаболічного ланцюга призводить до «вимикання» необхідних для його синтезу ферментів. Найчастіше пригнічується активність першого ферменту даного ланцюга біосинтезу.

Порушення системи регуляції біосинтезу в мікробній клітині тих або інших сполук, зокрема амінокислот, є основним прийомом одержання промислових продуцентів.

Як правило, методами генної інженерії намагаються зняти інгібувальний ефект, тобто одержати новий продуцент зі зміненою системою саморегуляції. Одним із технологічних прийомів, які дають змогу досягти надсинтезу певного продукту за умови збереження здатності продуцента до саморегуляції, є виведення кінцевого продукту (ефектора) із сфери реакції. Найпростішим рішенням є переведення продукту в нерозчинний стан. Інший шлях — використання мембранної технології.

3.2.8.4. Механізм регуляції біосинтезу продуктів, синтезованих у другій фазі. Багато промислово важливих продуктів біосинтезу накопичуються після споживання основних компонентів середовища і зниження швидкості росту, тобто у другу фазу. Поняття про двофазність мікробіологічного синтезу було уперше сформульовано на прикладі ацетоно-бутилового бродіння. Пізніше було запропоновано фазу росту називати *трофофазою*, а другу (продуктивну) — *ідіофазою*.

Трофофаза відповідає періоду молодості культури, друга — періоду зрілості. Упродовж трофофази спостерігається швидкий ріст і розмноження міцелію або бактеріальних клітин. Культуральна рідина в цей період багата на вуглеводи, азот і неорганічний фосфор. Продуктів метаболізму мікроорганізмів немає або вони містяться у вкрай незначних кількостях. Упродовж цієї фази утворюються переважно окиснені продукти.

Ідіофаза починається з моменту сповільнення росту мікроорганізму. У цей період культуральна рідина збагачена продуктами метаболізму, у ній практично немає вуглеводів і неорганічного фосфору. На початку цієї фази клітини характеризуються максимальною здатністю до синтезу цільового

продукту. У мікробних клітинах переважають відновлювальні біохімічні процеси. Після завершення фази, коли рівень біомаси не змінюється, починається автоліз. Як правило, процес промислової ферментації практично закінчується на початку — всередині ідіофази, оскільки під час автолізу цільовий продукт може зазнавати ферментативної деградації, а також відбувається розпад біомаси, що суттєво утруднює її відділення фільтрацією або іншим способом видалення. Збільшення тривалості першої фази й скорочення другої, якими б причинами це не було зумовлено, веде до зниження кількості синтезованого продукту. Сприятливим фактором переходу культури в другу фазу є практично повне використання з середовища фосфору.

Найбільше особливості двофазності процесу досліджено для деяких типів бродінь і біосинтезу вторинних метаболітів, зокрема антибіотиків. В основі такої двофазності лежать механізми регуляції, за допомогою яких ферменти синтезу антибіотиків починають функціонувати в клітині тільки наприкінці трофофази. До настання цього часу ділянки генів (оперони), що контролюють синтез ферментів ідіофази, перебувають у репресованому стані, внаслідок чого не відбувається зчитування необхідної для синтезу інформації, тобто не здійснюється транскрипція. Після дерепресії починається синтез ферментів, необхідних для утворення метаболітів ідіофази.

Назвати який-небудь один механізм регуляції досить важко. Ймовірно, що один і той самий процес регулюється кількома механізмами:

- індуктор, необхідний для дерепресії генів ідіофази накопичується наприкінці (чи після) трофофази або вводиться у цей момент екзогенно;

- певний продукт первинного метаболізму пригнічує активність одного з ферментів шляхів біогенезу вторинних метаболітів. Зникнення цієї сполуки супроводжується дерепресією генів, що функціонують упродовж ідіофази;

- споживання легкодоступного ростового субстрату пригнічує гени ідіофази в результаті катаболітної репресії. Вичерпання таких інтермедіатів призводить до дерепресії генів ідіофази;

- активність ферментів ідіофази пригнічується високою концентрацією рівня АТФ у клітині;

- РНК-полімераза під час трофофази може ініціювати транскрипцію тільки генів цієї фази внаслідок неможливості зв'язування промоторною ділянкою оперона, який забезпечує синтез ферментів вторинного метаболізму. Після завершення трофофази відбувається конформаційна зміна РНК-полімери, в результаті якої стає можливою взаємодія із промоторною ділянкою, що ініціює транскрипцію й синтез ферментів ідіофази;

- оскільки утворення різних мікробних метаболітів відбувається у багатьох різних біогенетичних шляхах, можливе одночасне функціонування кількох систем, що регулюють синтез кількох продуктів.

3.2.8.5. Попередники вторинних метаболітів. Розшифровка шляхів біогенезу багатьох практично важливих мікробних метаболітів дала змогу використовувати під час ферментації технологічний прийом, відомий як введення попередників. При цьому в середовище вносять попередники — сполуки, близькі за структурою до певних фрагментів молекули цільового продукту. Цей прийом може використовуватися на етапах біогенезу,

які здійснюють ферменти з низькою специфічністю. Найкраще розроблено такий прийом у виробництві пеніциліну. Відомо, що молекули пеніцилінів складаються з «ядра» — 6-амінопеніциланової кислоти і радикала, який визначає терапевтичну цінність препарату й специфічність його дії на патогенні мікроорганізми. Одним із таких радикалів є фенілоцтова кислота. Показано, що за введення у середовище фенілоцтової кислоти спостерігається посилення синтезу пеніцилінів. Однією з важливих умов уведення попередника у молекулу синтезованої речовини є можливість його транспортування в клітину, де відбувається синтез.

Іншим прикладом використання попередників біосинтезу є одержання вітаміну B_{12} . У цьому разі попередником є 5,6-диметилбензimidазол (5,6-ДМБ). Відомо, що поряд із справжнім (істинним) вітаміном B_{12} можуть синтезуватися псевдовітаміни, що містять у нуклеотидній частині замість 5,6-ДМБ похідні аденіну. За умови введення екзогенного 5,6-ДМБ на 1—3 доби росту продуцента синтезується тільки справжній вітамін B_{12} .

Велика група антибіотиків, відома під загальною назвою актиноміцини, містить речовини, що різняться складом амінокислот у пептидних ланцюжках. У цьому разі можлива заміна амінокислот структурно близькими сполуками. Найчастіше спостерігаються заміни валін — лейцин — ізолейцин.

Введення попередників дає змогу регулювати процес біосинтезу, спрямовуючи реакції у бік утворення необхідних продуктів. Слід зазначити, що й за відсутності попередників у середовищі культивування мікроорганізми здатні синтезувати наведені сполуки.

3.2.8.6. Регуляція рН у процесі ферментації. Відомо, що в деяких біотехнологічних процесах оптимальні умови для синтезу біомаси і цільових продуктів біосинтезу не збігаються, що часто потребує регуляції рН у ході ферментації. Вибір поживного середовища, яке б забезпечило регулювання рН, є дуже складним процесом, хоча й можливим. Деякі мікроорганізми здатні самі регулювати рН середовища у процесі свого росту. Так, бактерії, що утворюють під час зброджування вуглеводів нейтральні продукти, можуть упродовж усього періоду росту підтримувати необхідний рівень рН. У цьому разі вуглеводи можуть перетворюватися на органічні кислоти, що супроводжується зниженням рН, після цього починають функціонувати ферментні системи, що забезпечують утворення нейтральних продуктів, зокрема спиртів.

На практиці для уникнення закислення середовища використовують крейду. У цьому разі більшість синтезованих органічних кислот утворюють із іонами кальцію нерозчинні або малорозчинні солі.

Рівень рН середовища значною мірою залежить від мінерального складу поживного середовища. Так, споживання амонійного азоту зазвичай супроводжується закисленням середовища внаслідок транспортування іонів амонію антипортом із протоном. Протилежний ефект (підвищення рН) відбувається під час споживання як джерела азоту нітратів або органічного (аміного) азоту.

Значення рН визначає ступінь дисоціації наявних у середовищі солей. Так, у кислому середовищі слабкі кислоти існують у вигляді недисоційованих молекул, а в лужному — іонів. При цьому для кожної кислоти й солі є

певна критична зона рН, у межах якої кислота може переходити з дисоційованого стану у недисоційований.

Для підтримання необхідного рівня рН найчастіше використовують луг (переважно ідкий натр) і кислоти (сірчану й соляну). Найзручніше застосовувати концентровані розчини лугів і кислот (близько 20 %), інакше об'єм середовища у ферментері може істотно змінитися. Як правило, процес регуляції рН автоматизований, необхідні інгредієнти подаються за сигналом датчика, пов'язаного із системою вимірювання рН.

У ряді випадків рН регулюється подаванням у ферментер розчину глюкози або інших подібних джерел живлення. Це не завжди доцільно, тому що режим уведення глюкози як ростового субстрату може не збігатися з її використанням як титрувального агента. Аналогічна ситуація може виникнути у процесі використання розчину сечовини.

Відоме дробне введення газоподібних аміаку й вуглекислого газу з балонів безпосередньо через редуктор і барботер разом із повітрям. Кислотність середовища у цьому разі регулюється досить м'яко в невеликому інтервалі значень рН. За використання вуглекислого газу знижується ефективність аерації в результаті зменшення парціального тиску кисню в газовій суміші. Слід зазначити, що для багатьох процесів за підвищення розчиненого вуглекислого газу спостерігається пригнічення росту і синтезу цільового продукту. У мікробіологічних процесах регулювання рН зазвичай здійснюється в інтервалі, близькому до нейтрального.

3.2.8.7. Регульовальна функція фосфатів. Співвідношення концентрацій джерел вуглецю й азоту в середовищі. Під час біосинтезу більшість продуктів метаболізму мікроорганізмів поживні середовища містять неорганічний фосфор у вигляді фосфат-іонів. Вони необхідні для росту мікроорганізмів і здійснення синтезу багатьох життєво важливих сполук, наприклад олігонуклеотидів. Проте фосфат-іони за певних умов можуть негативно впливати на активність деяких ензиматичних систем. Так, встановлено такий негативний вплив фосфат-іонів у процесі синтезу деяких антибіотиків, амінокислот, а також ряду метаболітів з циклічною структурою. Надлишок фосфатів у середовищі спричиняє інгібування активності глюкозо-6-дегідрогенази — фермента, що переключає метаболізм із гліколітичного на гексозомонофосфатний шлях — основного постачальника НАДФН для конструктивного метаболізму. За надлишку фосфат-іонів може спостерігатися пригнічення активності фосфатази, яка каталізує утворення необхідних фосфорильованих інтермедіатів біосинтезу багатьох цільових продуктів.

Зазвичай надлишок фосфатів у середовищі сприяє утворенню біомаси, а накопичення продуктів починається за зниження концентрації фосфат-іонів.

Одним із фізіологічних шляхів регуляції біосинтезу є зміна співвідношення концентрацій джерел вуглецю й азоту в середовищі. Величина співвідношення визначається характером цільового продукту біосинтезу. Прикладом може бути надлишковий синтез клітиною жирних речовин, що спостерігається за високої концентрації вуглеводів і низької — джерела азоту. Під час одержання лимонної кислоти вміст вуглеводів у середовищі пови-

нен бути у 50—70 разів вищий, ніж азоту. У цьому разі гриб *Aspergillus niger* спочатку використовує поживні речовини для утворення міцелію, після чого неасимільовані вуглеводи піддаються так званому окисному бродінню, або «неповному окисненню».

Як було зазначено, у деяких процесах мікробіологічного синтезу високі концентрації глюкози пригнічують певні ферментативні реакції в результаті катаболічної репресії. Тому у процесі розробки технології співвідношення концентрацій вуглецю і азоту встановлюється експериментально для кожного конкретного продуцента.

3.2.8.8. Апаратурне оформлення біотехнологічного процесу. **Біореактори.** Промислове виробництво біопрепаратів — складний комплекс взаємопов'язаних фізичних, хімічних, біофізичних, біохімічних, фізико-хімічних процесів, який потребує використання великої кількості устаткування різного типу, пов'язаного між собою матеріальними і енергетичними потоками, що утворюють технологічні лінії.

Основним апаратним елементом біотехнологічного процесу є біореактор — ферментер (рис. 3.10). Біореактори призначені для культивування мікроорганізмів, накопичення біомаси, синтезу цільового продукту. Біореактори виготовляють із високолегованих марок сталі, іноді з титану. Внутрішня поверхня біореактора повинна бути відполірована.

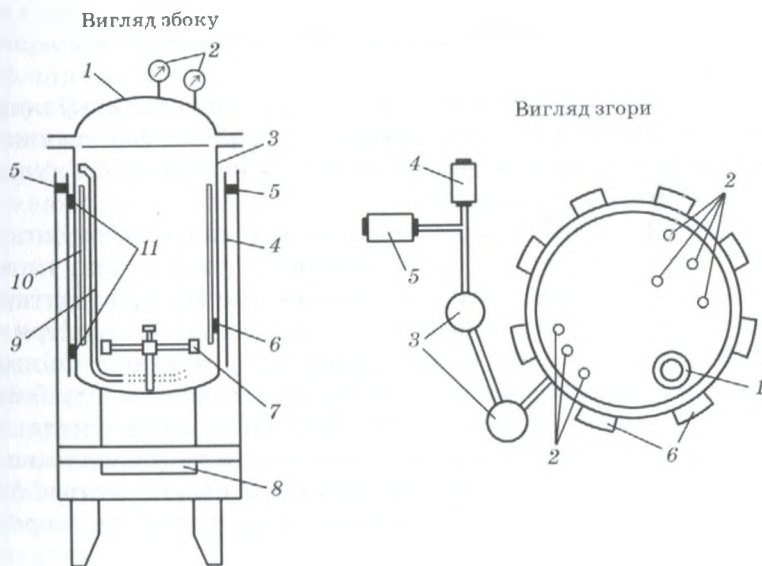


Рис. 3.10. Схема біореактора (за А.Я. Самуїленко, Е.А. Рубану):

вигляд збоку: 1 — кришка; 2 — манометри паровий і повітряний; 3 — місткість; 4 — парова сорочка; 5 — вузол кріплення і повороту біореактора; 6 — датчик температури; 7 — турбінна лопатева мішалка; 8 — двигун з магнітним приводом; 9 — газорозподільний барботер; 10 — перегородка (відбійники); 11 — вхід і вихід теплоносія з парової сорочки;

вигляд згори: 1 — оглядове вікно; 2 — штуцери із заглушками для дробного введення інгредієнтів; 3 — вхідний і вихідний стерилізувальні повітряні фільтри; 4 — клапан для виходу повітря з біореактора; 5 — запобіжний клапан; 6 — замочні пристосування

Типові ферментери є вертикальними посудинами різної місткості (малі — від 1 до 10, багатотоннажні — понад 1000 л) з мінімальною кількістю штуцерів і передавальних пристроїв. У біореакторах повинні бути забезпечені оптимальні гідродинамічні і масообмінні умови.

Ферментери оснащені паровою сорочкою, мішалками, барботерами, стерилізувальними повітряними фільтрами, відбійниками, що забезпечують необхідні температурний, газовий і гідродинамічний режими в біореакторі (тобто процеси масо- і теплообміну). У біореакторах є пробовідбирачі культуральної рідини у процесі біосинтезу. Можуть бути й інші конструктивні особливості, що враховують специфіку конкретного біотехнологічного процесу. Роботу окремих вузлів контролюють вимірювальні прилади, що фіксують як параметри технологічного процесу, так і окремі фізико-хімічні показники культивування (температуру стерилізації і культивування, швидкість обертання мішалки, тиск, витрату повітря або газів на аерацію, піноутворення, рН, pO_2 , pCO_2 середовища тощо).

Тип біореактора, чистота обробки внутрішніх стінок апарата й окремих його вузлів, місткість, коефіцієнт заповнення, поверхня тепловіддачі, спосіб відведення тепла, тип мішалок, пристроїв для аерації, арматура, спосіб піногасіння — далеко не повний перелік окремих елементів, які окремо і у взаємозв'язку впливають на процес культивування мікроорганізмів і клітин.

Біореактори поділяють на три основні групи:

- 1) реактори з механічним перемішуванням;
- 2) барботажні колони, через які для перемішування середовища пропускають повітря;
- 3) ерліфтні реактори з внутрішньою або зовнішньою циркуляцією. Перемішування і циркуляція культуральної рідини в них забезпечується потоком повітря, за рахунок якого між верхнім і нижнім шарами культуральної рідини виникає градієнт щільності.

Біореактори з механічним перемішуванням використовують найчастіше, оскільки вони дають змогу легко змінювати технологічні умови й ефективно постачати клітинам повітря, що визначає характер розвитку мікроорганізмів та їх біосинтетичну здатність. У таких реакторах повітря подають у культуральне середовище під тиском через розбризкувач — кільце з великою кількістю маленьких отворів. При цьому утворюються дрібні бульбашки повітря і за рахунок механічного перемішування забезпечується їх рівномірний розподіл. Для забезпечення такого самого результату використовують мішалки — одну або кілька. Мішалки розбивають великі бульбашки повітря, розносять їх по всьому реактору і збільшують час перебування в культуральному середовищі.

Ефективність розподілу повітря залежить від типу мішалки, кількості обертів, фізико-хімічних властивостей середовища. У процесі інтенсивного перемішування культуральної рідини відбувається її спінювання, тому робочий об'єм біореактора не перевищує 70 % загального об'єму. Вільний простір над поверхнею розчину використовується як буферна зона, в якій накопичується піна, що запобігає втраті культуральної рідини. У пінистій рідині умови аерації кращі, ніж у щільних розчинах (за умови безперервного перемішування і циркуляції шару піни, тобто за унеможливлення перебування

мікроорганізмів поза культуральною рідиною). Водночас спінювання може призвести до перезволоження фільтрів у отворах, через які повітря виходить із біореактора, зменшення потоку повітря і потрапляння у ферментер сторонніх мікроорганізмів.

Конструктивні особливості *барботажних колон і ерліфтних біореакторів* забезпечують таким типам ферментерів деякі переваги перед реакторами з механічним перемішуванням. Барботажні колонії економічніші, оскільки перемішування в них відбувається висхідними потоками повітря рівномірно по всьому об'єму. Відсутність механічної мішалки виключає один з шляхів проникнення в біореактор сторонніх мікроорганізмів. У барботажних біореакторах не виникає сильних гідродинамічних збурень (зсувів шарів рідини культурального середовища один відносно одного).

Зниження впливу зсувних чинників є важливим фактором для культивування, наприклад, рекомбінантних мікроорганізмів. Такі клітини є менш міцними, ніж нативні (нетрансформовані); клітина відповідає на зовнішні дії зниженням кількості синтезованих білків, зокрема рекомбінантних; під впливом зсувових ефектів можуть змінюватися фізико-хімічні властивості клітин, що ускладнює подальшу роботу з ними (погіршуються умови виділення і очищення рекомбінантних білків).

У *барботажних колонах* повітря подають під високим тиском у нижню частину біореактора; у міру піднімання дрібні бульбашки повітря об'єднуються, що супроводжується їх нерівномірним розподілом. Крім того, подання повітря під високим тиском призводить до сильного піноутворення.

В *ерліфтних біореакторах* повітря подають у нижню частину вертикального каналу. Піднімаючись, повітря захоплює за собою рідину до верхньої частини каналу, де розміщений газорідний сепаратор (тут частково виходить повітря). Щільніша деаерована рідина опускається по іншому вертикальному каналу до дна реактора і процес повторюється. Отже, в ерліфтному біореакторі культуральне середовище разом з клітинами циркулює безперервно.

Ерліфтні біореактори випускаються у двох конструктивних варіантах: у першому це місткість з центральною трубою, яка забезпечує циркуляцію рідини (реактори з внутрішньою циркуляцією), у другому культуральне середовище проходить через окремі незалежні канали (реактор із зовнішньою системою циркуляції).

Ерліфтні біореактори ефективніші, ніж барботажні колонії, особливо для суспензій мікроорганізмів з високою щільністю чи в'язкістю. Перемішування в ерліфтних ферментерах інтенсивніше і вірогідність злипання бульбашок мінімальна.

Для стерилізації біореактора застосовують пару під тиском. У середині біореактора не повинно бути «мертвих зон», недоступних для пари під час стерилізації. Стерилізації підлягають всі клапани, датчики, вхідні й вихідні отвори.

Стерильність забезпечується і герметизацією біотехнологічного устаткування, що працює в асептичних умовах. Стерильна передача рідини здійснюється через штуцери парового затвора. Технологічна обов'язка біореактора виключає контамінацію культуральної рідини сторонньою мікрофлорою і

можливість потрапляння продуктів біосинтезу в навколишнє середовище. Основні агенти, які контамінують, наприклад клітинні культури, — бактерії, дріжджі, гриби, найпростіші, мікоплазми, віруси. Джерелами контамінації є повітря, пил, поживні середовища, робочі розчини, устаткування, робочий персонал.

3.3. ВИДІЛЕННЯ ПРОДУКТІВ МІКРОБНОГО СИНТЕЗУ

Кінцевим продуктом мікробного синтезу може бути біомаса клітин або певний метаболіт. Залежно від місця переважного накопичення цільового продукту відходом виробництва є культуральна рідина або клітини продуцента. *Культуральна рідина* — це суміш клітин, розчинних продуктів їх метаболізму, нерозчинних компонентів, утворених після автолізу частини мікробних клітин, а також залишки компонентів поживного середовища. Характеристику культуральної рідини (концентрація клітин і продуктів метаболізму, в'язкість, морфологія клітин і клітинних елементів) обов'язково враховують під час вибору способу відділення біомаси клітин від рідкої фази.

Способи виділення цільового продукту

Клітини	Розчинний метаболіт
Седиментація і декантація	Екстракція
Фільтрування	Сорбція
Центрифугування	Осадження
Відстоювання	Хроматографія
Флотація	Виділення за допомогою мембран

3.3.1. Відділення біомаси

Вихідним матеріалом для виділення продуктів мікробіологічного біосинтезу є культуральна рідина. Незалежно від локалізації продукту (позаклітинний чи внутрішньоклітинний метаболіт) першою стадією підготовки культуральної рідини для подальшої переробки є відділення біомаси. Фракціонуванням на біомасу та рідку частину (фугат) отримують живу (хлібні дріжджі, бактеріальні добрива та інші), ослаблену (вакцини) або інактивовану (кормовий білок) клітинну масу і продукти різного ступеня очищення від фугату.

Центрифугування — примусове осадження часток (речовин) за рахунок збільшення швидкості відцентрових сил. У технологіях мікробного синтезу використовують різні типи центрифуг: осаджувальні, шнекові, безперервної дії з вивантаженням осаду через сопла, саморозвантажні сепаратори тощо. Центрифугування дає змогу виділяти з культуральних рідин біомасу бактерій, дріжджів, міцеліальних грибів. Високов'язкі культуральні рідини попередньо розбавляють водою (іноді теплою або гарячою) у кілька разів, після чого здійснюють центрифугування — сепарування. Утворення високов'язкої культуральної рідини характерне під час біосинтезу екзополісахаридів (ксантан, пулулан та ін.).

Сепарування має такі переваги перед фільтруванням та іншими методами:

— немає потреби в застосуванні фільтрувальних елементів, що дає змогу непотрібну для подальшої переробки фракцію використовувати як кормову добавку;

— матеріал обробляється з найменшими втратами активної речовини;

— процес легше піддається автоматизації, агрегати займають менше місця, легше мити устаткування.

Сепарування використовується у процесі одержання хлібопекарських і кормових дріжджів, медичних антибіотиків, етилового спирту, ферментів, амінокислот, продуктів із зелених водоростей, вакцин, вітаміну B_{12} , стимуляторів росту і засобів захисту рослин, а також багатьох інших продуктів хіміко-фармацевтичної, медичної, мікробіологічної і харчової промисловості.

Фільтрування менш енергоємний, проте одночасно і менш ефективний процес порівняно з сепарацією. Фільтруванню піддаються далеко не всі культуральні рідини; багато які з них характеризуються здатністю до засмічення пор фільтрувального матеріалу. Іноді спеціально змінюють мікроорганізм-продуцент, щоб культуральна рідина піддавалася фракціонуванню фільтруванням. Фільтрувати малі об'єми культуральної рідини можна на рамних фільтрах, великі об'єми — на барабанних вакуум-фільтрах. Процес фільтрування можна істотно прискорити (у 10—100 разів), якщо культуральну рідину піддати попередній тепловій обробці, додати флокулянти (глинозем, хлорид кальцію, поліелектроліти і т.ін.). Якщо біомаса клітин чинить виражений опір фільтруванню, то використовують фільтрувальний шар на підкладці. Осад мікробних клітин здатний до ущільнення, тому з часом швидкість фільтрування знижується. Для уникнення перепадів у швидкості фільтрування шар клітинної маси (наприклад міцелію) зрізують ножем.

Для фільтрування використовують фільтр-преси різної конструкції, барабанні вакуумні фільтри, стрічкові фільтр-преси та інші конструкції.

Седиментація (осадження) відбувається в полі гравітаційних сил. Її використовують для відділення конгломератів типу «кефірних зерен» у деяких процесах молочнокислого чи змішаного бродіння (молочнокислого і спиртового), а також під час біологічної обробки відходів активним мулом.

Мікробні клітини легко коагулюють під впливом екзогенних полікатионів чи полімерів. Утворювані пластівці разом із клітинами досить легко відокремлюються седиментацією. Відомі виробничі штами дріжджів здатні до флокуляції та утворення осадів.

Декантацію, чи злив, надосадової рідини (декантат, супернатант) можна замінити вакуум-відсмоктуванням.

Відстоювання реалізують у традиційних процесах бродіння, а також у великомасштабних процесах переробки відходів. Це, так би мовити, продовження процесу седиментації.

Флотацію (від англ. *floatation* — спливання) використовують, наприклад, для концентрування мікобактерій туберкульозу з патологічного матеріалу в діагностичних цілях. У технологіях мікробного синтезу флотацію застосовують у виробництві білка деяких одноклітинних мікроорганізмів, а

також у пивоварінні. Пінна флотація відповідальна за утворення стійкої піни на пиві за рахунок концентрування розчинених білків на межі поділу «повітря—рідина».

3.3.2. Виділення цільового продукту

3.3.2.1. Попередня обробка культуральної рідини. Одержані після відділення біомаси фільтрати містять разом з цільовим продуктом органічні і неорганічні речовини, білки як у розчиненому, так і в колоїдному стані. Власне кажучи, культуральна рідина — це колоїдна система, коагуляцію якої можна спричинити додаванням електролітів і неелектролітів, зміною температури, механічним впливом і дією акустичного поля. Колоїдні і зважені частки мають негативний заряд, їм притаманна електрофоретична рухомість, тому ефективним способом коагуляції колоїду може бути обробка його катіоногенними коагулянтами.

Для виділення, очищення й фракціонування біологічно активних речовин, наприклад антибіотиків, усе частіше використовують полімерні реагенти-флокулянти. На відміну від неорганічних електролітів і теплової обробки флокулянти дають змогу здійснювати попереднє очищення культуральних рідин у «м'якших» умовах.

У процесі виділення ферментів до стадії попередньої обробки культуральної рідини можна віднести процес осадження сульфатами протаміну чи стрептоміцину, нуклеїнових кислот, які ускладнюють подальше фракціонування білка. Для відносно термостабільних білків використовується термообробка.

3.3.2.2. Виділення цільового продукту з біомаси. Якщо цільові продукти містяться в біомасі (внутрішньоклітинні метаболіти), необхідною технологічною операцією є її дезінтеграція. Методи дезінтеграції мікробних клітин можна поділити на фізичні (механічні), хіміко-екстрактивні, фізіолого-біохімічні. Дезінтеграція може бути одно- і багатоопераційною.

Для механічної дезінтеграції використовуються балістичні дезінтегратори, гомогенізатори високого тиску, млини, ультразвукові апарати. Проте для дезінтеграції мікроорганізмів найчастіше застосовуються хіміко-екстрактивні та фізіолого-біохімічні методи (наприклад, розщеплення клітин за допомогою літичних ферментів).

3.3.2.3. Одержання концентратів. Однею з перспективних товарних форм продуктів біотехнології є концентрати. Для одержання мікробних концентратів культуральну рідину зневоднюють. У вигляді концентратів випускаються ферменти, амінокислоти, вітаміни тощо. Основною особливістю концентратів є наявність у них, крім цільового продукту, ряду супутніх речовин — залишків поживного середовища, агентів регулювання рН і піногасіння, водорозчинних побічних метаболітів та ін.

Концентрати можуть бути рідкі, порошкоподібні та у вигляді сумішей із наповнювачами.

Кормові біомаси (інактивовані) одержують шляхом сепарування культуральної рідини, плазмолізу клітинної маси, випарювання, висушування та

розфасування. Хлібопекарські дріжджі виготовляють без стадій плазмолізу та випарювання.

3.3.2.4. Процеси очищення та концентрування цільового продукту. Основні процеси очищення і концентрування продуктів біотехнології: вакуум-випарювання, виморожування, осадження, мембранні процеси, сорбція, кристалізація і сушіння.

Вакуум-випарювання як спосіб концентрування дуже поширений у хімічній і фармацевтичній промисловості. У процесі одержання мікробних метаболітів концентрація цільових продуктів у вихідних розчинах здебільшого дуже низька (менше як 1 %), тому застосування методів осадження чи безпосереднього висушування неекономічне.

Біологічно активні речовини, синтезовані мікроорганізмами, як правило, характеризуються високою термолабільністю. Щоб уникнути втрат під час випарювання, до апаратури ставлять суворі вимоги: низька температура випарювання, короткочасний контакт із теплоносієм, можливість організації безперервного процесу, особливі конструкції, що забезпечують випарювання в'язких рідин.

Як для концентрування, так і для знесолення розчинів усе ширше впроваджується *виморожування*. Концентрування виморожуванням базується на перетворенні води у кристали льоду з наступним їх механічним відділенням. Незважаючи на можливі втрати, експлуатація виморожувальних установок значно дешевша, ніж випарних апаратів. Особливо перспективний цей метод для одержання високоочищених ферментних препаратів.

Осадження білків із водних розчинів базується на зміні їхньої розчинності з додаванням певних речовин. Осадження широко використовують у технології мікробного синтезу для одержання білків (наприклад ферментів), полісахаридів, ряду антибіотиків тощо. Білки виділяють висолюванням, зміною рН до ізоелектричної точки, зниженням діелектричної проникності розчину, зниженням ступеня сольватації білкових молекул та іншими процедурами.

Найчастіше використовують метод висолювання білків концентрованими розчинами солей. Ще наприкінці XIX ст. було встановлено, що різні іони можна розмістити в ряд за зменшенням висолювальної здатності (ліотропні ряди, чи ряди Гофмейстера).

Найчастіше як висолювальний агент використовують сульфат амонію.

Високов'язкі екзополісахариди (аубазидан, декстран, ксантан, пулулан та ін.) виділяють осадженням етанолом чи ацетоном, тобто органічними розчинниками, що змішуються з водою. Альгінати — поліаніонні полімери вуглеводної природи у вигляді гелю осаджуються розчином кальцію хлориду.

Деякі осаджувачі утворюють із розчиною діючою речовиною нерозчинні солі, що випадають в осад за наявності органічного розчинника.

Для одержання очищених ферментних препаратів у лабораторії широко використовують *метод висолювання білків*. Осадження білка залежить від ряду факторів, що впливають на їхню розчинність, в основному від величини рН і концентрації розчину. Використання фракційного висолювання сірчанокислим амонієм особливо доцільне у разі ферментного комплексу і може успішно конкурувати з осадженням органічними розчинниками.

Відоме застосування *флотоагентів* (толуолу, рідких парафінів та ін.). Серед реагентів, здатних специфічно зв'язувати й осаджувати ферменти, значну роль відіграють розчинні синтетичні чи природні полімери та поліелектроліти.

У процесі одержання ферментів, зокрема гідролаз, для обробки культуральних рідин рекомендовано використовувати танін і білкові добавки — желатин, казеїн, сироватку, чи пептон, желатин з додаванням таніну. Крім цих полімерів, осаджувати білки здатні й інші заряджені полімери, такі як ДЕАЕ-декстран, сульфат декстрану, поліетиленімін, сульфат протаміну.

Осадження органічними розчинниками з одночасним охолодженням є одним із поширених способів концентрування ферментних розчинів. Такий метод має ряд переваг перед висолюванням, зокрема можливість регенерації, що суттєво підвищує його ефективність. Проте органічні розчинники не здатні до вибіркового осадження білків.

Екстракцію здійснюють органічними розчинниками з клітин (тверда фаза), наприклад, антибіотику гризеофульвіну ацетоном, або бензилпеніциліну при рН 2,0—3,0 бутилацетатом із культуральної рідини після відділення клітин продуцента (система «рідина—рідина»), або ферментів (зокрема пулуланази) у двофазних водних системах, наприклад, глюкану-декстрану і несумісного з ним поліетиленгліколю (ПЕГ-6000).

Хроматографічний розподіл біологічно активних речовин використовують у різних варіантах: гель-хроматографія, у тому числі й гель-фільтрація — хроматографія на молекулярних ситах, іонообмінна хроматографія та афінна хроматографія.

Гель-хроматографія базується на різній здатності молекул різного розміру проникати крізь пори нейтрального гелю. Цей метод успішно використовують для розподілу суміші речовин, що різняться за молекулярною масою. Прикладом можуть бути полідисперсні білки і полісахариди.

У *іонообмінній* хроматографії іонообмінна смола — це нерухомий шар, тоді як розчин суміші білків — рухомий шар. Так, білки в катіонній формі зв'язуються з катіонообмінною карбоксиметилцелюлозою (КМЦ), що несе негативні заряди на целюлозній матриці. Наступну елюцію білків здійснюють за допомогою буферних розчинів різної іонної сили. Першими елюються білки, слабше зв'язані з КМЦ.

Подібний процес проводять і на аніонообмінниках. Найчастіше використовуваним аніонітом є диетиламіноетилцелюлоза (ДЕАЕ-целюлоза).

У разі *афінної* хроматографії використовують високу специфічність таких природних речовин, як ферменти, антитіла і лектини. Ферменти утворюють комплекси з інгібіторами, антитіла — з відповідними антигенами (імуносорбційна хроматографія), лектини — з особливими рецепторами клітинних стінок.

Метод виділення різних речовин чи клітин за допомогою мембран усе ширше застосовується в біотехнології. Діаметр молекул чи частинок є визначальним чинником у виборі зворотного осмосу чи ультрафільтрації (табл. 3.5).

Впровадження *мембранних процесів* дає змогу інтенсифікувати технологію концентрування біологічно активних речовин, зменшуючи при цьому втрати каталітичної активності. Основою розробки сучасних економічних

Таблиця 3.5. Наближені розміри (діаметр) деяких молекул і клітин

Молекули, клітини	Молекулярна маса, Да	Діаметр, мкм
Вода	18	0,0002
Органічні кислоти	100 — 500	0,0004 — 0,0008
Монози і біози	180 — 400	0,001 — 0,0008
Деякі антибіотики	100 — 300	0,0006 — 0,0012
Протеїни і глікани	10000 до 1 млн	0,01 — 0,002
Клітини деяких бактерій		0,3 — 1
Клітини дріжджів і міцеліальних грибів		1 — 10

мембранних процесів стало одержання і наступне вдосконалення високоселективних ацетатцелюлозних і синтетичних мембран.

Серед рідинофазних мембранних процесів розрізняють: діаліз, електродіаліз (переважно з використанням іонообмінних мембран), ультрафільтрацію, зворотний осмос.

Явище врівноважування хімічних потенціалів якої-небудь речовини в розчині й у чистому розчиннику, розділених непроникною для речовини мембраною, називають *осмосом*.

Якщо розчин піддати дії надлишкового тиску, який перевищує осмотичний тиск, то спостерігається перенесення розчинника проти градієнта концентрації (з розведеного розчину в чистий розчинник). При цьому відбувається збільшення концентрації розчиненої речовини, тобто *зворотний осмос*.

До осмотичних процесів належить *діаліз*, під час якого відбувається безперервна дифузія малих молекул у циркулюючий розчинник із утриманням великих молекул. При цьому відсутнє перенесення розчинника проти градієнта концентрації. Діаліз використовують, наприклад, у процесах очищення антигенних препаратів — протеїнів, глікопротеїнів чи складніших комплексів. За допомогою діалізу через різні мембрани звільняють розчини від неорганічних солей.

Ультрафільтрація, яка функціонально нагадує звичайну фільтрацію, — перший фізичний прийом концентрування дуже розведених розчинів, широко використовуваний як у біотехнології, так і в наукових дослідженнях. Ультрафільтрація має ряд переваг:

- виключається денатурація білка, оскільки процес проходить без фазових перетворень при будь-якій температурі, коли суміш перебуває у рідкому стані і розчинена речовина не піддається дії робочого тиску;

- можливе одночасне концентрування й очищення від мінеральних і низькомолекулярних органічних речовин;

- незначні витрати енергії;

- ультрафільтраційні установки характеризуються простотою конструкції та експлуатації.

Недоліком ультрафільтрації є емпіричний підхід до вибору мембран. Теоретично передбачити ультрафільтраційні властивості складних багатоком-

понентних розчинів неможливо, оскільки мембрани зазвичай стандартизують чистими речовинами з визначеною молекулярною масою. Ультрафільтрацію використовують для концентрування й очищення молекул з діаметром від 1 до 100 нм (окремих ферментів) від низькомолекулярних домішок. Розчинник при цьому частково видаляється.

На практиці часто використовують комбінацію різних методів для поділу клітин і молекул біологічно активних речовин.

Останніми десятиліттями проводяться дослідження із застосування сорбційних методів для виділення продуктів мікробного синтезу. *Сорбція* — це поглинання певним агентом газів, пари чи розчинених речовин із навколишнього середовища. Розрізняють адсорбцію (сорбція на твердих поверхнях), абсорбцію (поглинання речовини рідким сорбентом), хемосорбцію (поглинання газу в результаті хімічної взаємодії між сорбентом і газом), десорбцію (процес, зворотний сорбції, тобто виділення речовини з сорбенту). З адсорбентів найвідомішими є активоване деревне вугілля, кізельгур, силікагель, целюлоза. Всі адсорбенти повинні мати велику питому поверхню. Так, 1 г активованого вугілля має поверхню від 600 до 1700 м², завдяки чому йому притаманні висока поглинальна здатність.

Іонообмінну сорбцію на катіонообмінній смолі з карбоксильними групами використовують для виділення аміноглікозидного антибіотика стрептоміцину. Стрептоміцин елюють (десорбують) підкисленою водою, смола при цьому регенерується.

У ряді випадків іонообмінники можна додавати безпосередньо в культуральну рідину для вибіркової сорбції зарядженої речовини.

Теорія і практика застосування іонного обміну найінтенсивніше розвивалися у виробництві амінокислот і антибіотиків. Підбір іонітів і режимів сорбції, регенерації, промивання специфічні для конкретного процесу.

Ряд продуктів мікробіологічного синтезу, зокрема органічні кислоти і деякі амінокислоти, можуть бути виділені з культуральних рідин *прямою кристалізацією*. Застосування методу прямої кристалізації можливе тільки у разі безбарвної культуральної рідини і відсутності у ній баластних речовин. За наявності у середовищах меляси кристалізація органічних кислот і амінокислот потребує великих витрат і економічно недоцільна.

Кристалізації з метою виділення цільового продукту напівпродукти можуть бути піддані різного ступеня очищенню і концентруванню.

Зневоднення термочутливих продуктів мікробного біосинтезу — технологічно складний процес. Під час вибору методу й режиму *сушіння* матеріалів різної природи основним критерієм є якість сухого продукту. Застосування теплового висушування потребує досліджень термостійкості цільового продукту.

Для висушування різних медичних препаратів усе частіше застосовується *сублімаційний метод*. Сублімаційне висушування захищає біологічні матеріали в процесі їхнього зберігання, тому що без вологи багато хімічних, фізичних і ферментативних процесів гальмуються чи взагалі припиняються. Сублімаційне (ліофільне) сушіння — найпрогресивніший метод зневоднення біологічних препаратів.

КОНТРОЛЬНІ ЗАПИТАННЯ
ДО РОЗДІЛУ 3

1. Які процеси називаються передферментаційними?
2. Як проводиться підготовка поживного середовища для культивування мікроорганізмів?
3. Які види стерилізації використовують для поживних середовищ?
4. Що таке критерій стерилізації?
5. У чому полягає наближений метод розрахунку і обґрунтування режиму стерилізації?
6. Назвіть способи очищення повітря.
7. Дайте характеристику фільтрувальних матеріалів.
8. Що таке фільтри НЕРА?
9. Як проводиться підготовка стерильного стисненого повітря?
10. Як очищується відпрацьоване технологічне повітря?
11. Охарактеризуйте методи зберігання промислових штамів продуцентів.
12. Як готується посівний матеріал для поверхневого культивування?
13. Як готується посівний матеріал для глибинного культивування?
14. Яка кількість посівного матеріалу вважається оптимальною?
15. Як проводять підготовку апаратури та комунікацій для виробничого біосинтезу?
16. Охарактеризуйте основні варіанти культивування.
17. Які піногасники застосовують під час культивування мікроорганізмів?
18. Що таке флокулянти та для чого вони застосовуються?
19. Як Ви розумієте поняття «ріст», «клітинна популяція», «клітинна культура»?
20. Охарактеризуйте чотири основні фази клітинного циклу еукаріотичних клітин.
21. Що таке періодична культура?
22. Охарактеризуйте фази росту періодичної культури.
23. Що таке діауксія?
24. Чим зумовлене настання стаціонарної фази росту?
25. Назвіть параметри кривої росту.
26. У чому полягає суть безперервного культивування?
27. Які є режими безперервного культивування?
28. Які особливості притаманні хемостатній культурі?
29. Що таке швидкість потоку і швидкість розбавлення?
30. Як співвідносяться μ і D у стані динамічної рівноваги хемостатної культури?
31. Як відбувається саморегуляція хемостатної культури?
32. Охарактеризуйте рівняння Моно і Міхаеліса—Ментен.
33. Назвіть переваги хемостатного культивування.

34. Охарактеризуйте ріст у турбідостаті.
35. Як пов'язані між собою молярний економічний коефіцієнт Y і економічний коефіцієнт $Y_{\text{АТФ}}$?
36. Як визначаються економічні коефіцієнти Y і $Y_{\text{АТФ}}$?
37. Як можна визначити частку субстрату, використовуваного як джерело вуглецю?
38. Як можна визначити частку субстрату, використовуваного для одержання енергії?
39. Як Ви розумієте термін «витрати енергії на підтримання»?
40. Як можна визначити коефіцієнт підтримання?
41. Що таке метаболічний коефіцієнт?
42. Як за величинами швидкості росту і економічного коефіцієнта можна кількісно визначити ферменти катаболізму і анаболізму?
43. Охарактеризуйте напівбезперервне культивування.
44. Назвіть принципові відмінності між періодичною та безперервною культурами.
45. Які культури називаються синхронними?
46. Які фактори визначають ріст і біосинтетичну здатність продуцентів?
47. За якими показниками оцінюється ферментаційний процес?
48. На чому базується регуляція технологічних процесів мікробіологічного синтезу?
49. Що таке індуктори?
50. У чому полягає катаболітна репресія?
51. Як відбувається алостерична регуляція ферментів?
52. Що таке попередники вторинних метаболітів? Для чого вони використовуються?
53. Як здійснюється регуляція рН у процесі ферментації?
54. У чому полягає регульовальна функція фосфатів?
55. Яку роль відіграє співвідношення концентрацій джерел вуглецю й азоту в середовищі?
56. Що таке культуральна рідина?
57. Які методи відділення біомаси вам відомі? Охарактеризуйте ці методи.
58. Що таке флотація?
59. Як здійснюється попередня обробка культуральної рідини?
60. Охарактеризуйте методи виділення цільового продукту з біомаси.
61. Як одержують концентрати?
62. Охарактеризуйте основні процеси очищення та концентрації цільового продукту.
63. Як здійснюється сублімаційне висушування?

ЗНЕШКОДЖЕННЯ ВІДХОДІВ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ВИРОБНИЦТВ

Відходи біотехнологічних виробництв зазвичай розкладаються в природних умовах під дією різних факторів (біологічних — мінералізація за участю мікроорганізмів, хімічних — окиснення, фізико-хімічних — завдяки комплексному впливу, наприклад, променистої енергії та хімічних речовин).

До *твердих відходів* біотехнологічних виробництв відносять:

- мікробну масу, відокремлену від культурального фільтрату, що надходить на подальші стадії виділення цільового продукту;
- шлами (від нім. *schlamm* — бруд), наприклад, біомасу після екстракції з неї цільового продукту;
- залишки курячих ембріонів після культивування, наприклад, вірусу грипу;
- деякі тканеві культури ссавців;
- осади зі стічних вод.

Відходами пивоваріння, наприклад, є дріжджові клітини (0,25—0,40 кг на 1 гл пива), солодова й хмелева дробина, білковий осад із сепараторів. Хмелевій дробині притаманний гіркий присмак, тому вона не використовується як кормова добавка. Такі залишки або спалюють (що нерентабельно), або піддають біологічному знешкодженню.

У спиртовому виробництві відходом є барда, склад якої залежить від якості використовуваної сировини (зерно, картопля). Зернокартопляна барда містить 91—93 % води і на сухий залишок припадає 7—9 %. Останній складається із зольних елементів — 6—12 %, загального азоту — 21—23, ліпідів — 2—8, целюлози — 9—10 та безазотистих екстрактивних речовин — 50—59 %. Віджата або висушена барда використовується як добавка до корму для сільськогосподарських тварин.

У виробництві етанолу, пива, хлібного квасу використовують солод — пророщене зерно (ячмінь, овес, просо, пшениця, жито — на спиртових заводах; ячмінь — на пивоварних заводах; жито і ячмінь — у виробництві квасу). У процесах одержання солоду утворюються відходи у вигляді очищень, сплаву, солодових паростків, які з успіхом використовуються у тваринництві, а також з метою одержання ряду біологічно активних речовин (у першу чергу — ферментів).

Якість твердих відходів певною мірою диктує вибір методу їхнього знезараження. Так, патогенні мікроорганізми повинні бути знешкоджені повністю і найефективнішим способом для цього є спалювання. Якщо відходом є біомаса стрептоміцетів, то їх достатньо знезаразити нагріванням з подальшим вивезенням на ферми для використання як кормових добавок або органічного добрива.

Якщо за технологічною схемою тверді й рідкі відходи подаються у вигляді змішаного стоку, то спочатку їх грубо розділяють, а потім видаляють вологу з наступною передачею ущільненої біомаси клітин на знешкодження наведеними способами.

Аналогічно знешкоджують тверді відходи рослинного або тваринного походження: токсичні спалюють, нетоксичні утилізують.

У процесі знешкодження твердих відходів стерилізацією необхідно враховувати антигенні особливості біомаси (здатність до утворення антитіл *in vivo*). У кожному разі необхідно виключити сенсibiliзувальну (від лат. *sensibilis* — чутливий) дію її на макроорганізм, щоб уникнути виникнення алергійних захворювань.

В аеротенках очисних споруд, де відбувається знешкодження відходів, лімітувальними факторами є якість і площа біологічної плівки, утвореної мікро- і макрофлорою, мікро- і макрофауною. *Аеротенки* — величезні резервуари із залізобетону, в яких очищення відбувається за допомогою активного мулу, до складу якого входять бактерії і найпростіші. Всі організми розвиваються в результаті споживання органічних речовин стічних вод і надлишку кисню, що надходить з повітрям. Бактерії утворюють конгломерати і синтезують ферменти, необхідні для деградації органічних речовин. Мул з такими конгломератами осідає, відділяючись від очищеної води. Інфузорії, джгутикові, амеби, коловертки й найпростіші живляться завислими бактеріями (планктоном).

Під час анаеробного метаногенезу практично всі органічні речовини (за винятком лігніну) можуть бути субстратами, які трансформуються до метану й діоксиду вуглецю. Метан використовують як паливо, вуглекислоту — у харчовій промисловості у вигляді «сухого льоду». Твердий залишок (приблизно 40 % вихідної кількості) — це гумус, використовуваний як добриво у сільському господарстві.

Рідкі відходи біотехнологічних виробництв досить різноманітні за своїм складом. Це пояснюється неповним використанням біологічними агентами компонентів поживних середовищ, наявністю різних продуктів метаболізму, розчинників, використовуваних, наприклад, для екстракції цільових продуктів тощо. Наприклад, сульфитні луги, утворювані на підприємствах целюлозно-паперової промисловості в результаті гідролізу деревини і використовувані для вирощування кормових дріжджів, містять у середньому сульфонату лігніну — 50—60 %, цукрових сульфокислот — 7—8, різних цукрів — близько 18, діоксиду сірки — 10, солей кальцію — 8 %. Після значного видалення сульфїту й відповідної підготовки (розведення, внесення деяких поживних інгредієнтів) луг використовують для вирощування адаптованої раси дріжджів. Біомаса дріжджів є цільовим продуктом, а відходом — культуральна рідина.

Рідкі відходи дріжджових заводів, на яких для вирощування дріжджів використовують м'ясне сусло, містять органічні й мінеральні речовини, мг/л: етанол — 0,45, вуглеводи — 1,0, загальний азот — 0,8, азот неорганічний — 0,13, зольні елементи — 5,4. Біологічне споживання кисню (БСК) таких відходів становить близько 20 000 частин O_2 на 1 млн, тобто приблизно стільки, скільки й БСК для каналізаційних вод. Відходи, що утворюються

в результаті споживання 1000 т м'яси, аналогічні побутовим стокам міста з населенням близько 0,5 млн жителів. Подібні рідкі відходи піддають мікробіологічній обробці (анаеробній або аеробній).

Стічні води бродильних підприємств нерівноцінні: деякі з них можуть бути названі умовно чистими, оскільки вони майже не відрізняються від споживаної у виробництві природної води (конденсати, вода з теплообмінників). Інші води забруднені неорганічними й органічними домішками, які потрапляють із сировини (забруднення у процесі транспортування, миття картоплі, буряків), з устаткування (миття технологічної апаратури).

Чисті води можуть бути використані повторно в технологічних процесах або спрямовані в чисті водойми; забруднені води звільняють від механічних домішок, а потім знешкоджують.

У виробництві антибіотиків, крім води, використовують вуглеводи й вуглеводмісні продукти, масла, соєве борошно, кукурудзяний екстракт, нітрати, солі амонію, сірко- і фосфоровмісні сполуки, попередники антибіотиків (наприклад, амід фенілоцтової кислоти як попередник пеніциліну; *n*-пропанол як попередник еритроміцину тощо), неорганічні кислоти й луги, органічні екстрагенти та ін.

Відмінною рисою біотехнологічних процесів, які включають виділення метаболітів із культуральних рідин, є невірноважене співвідношення цільового продукту й рідини (частіше — 1:100, 1:200, тобто 1; 0,5 % і менше). У подібних виробництвах кількість рідких відходів значно більша, ніж твердих. Якщо тверді відходи містяться у великих кількостях у стічній воді, їх відокремлюють, зневоднюють і знешкоджують.

Залежно від якості стічних вод можливе їхнє очищення до певного рівня (наприклад, одержання оборотної води, яка повторно використовується у тому самому біотехнологічному виробництві).

Схема біологічного очищення стічних вод така:

- розчинені органічні речовини видаляють за допомогою активного мулу в аеротенках або в результаті аеробної обробки, на біологічних краплинних фільтрах;

- нітрати знешкоджують за допомогою бактерій-денітрифікаторів (*Pseudomonas* spp., *Bacillus licheniformis*, *Paracoccus denitrificans*, *Thiobacillus denitrificans*);

- солі фосфорної кислоти коагулюють і осаджують;

- тверді (щільні) осади, що утворилися, концентрують, зневоднюють (фільтруванням, центрифугуванням, відстоюванням на піщаному шарі), а потім спалюють або використовують як добриво.

Отже, у процесі обробки стічних вод до рівня чистої води можна виділити такі етапи: відділення легко осаджуваних часток, масляних плівок (грубе очищення), відділення часток і розчинених органічних речовин (відносно тонке очищення) і, нарешті, відділення всіх інших домішок (тонке очищення). За грубого очищення відділяються частки розміром 100 мкм і більше, за відносно тонкого — від 1 до 100, за тонкого — від 0,1 нм до 1 мкм.

Тонкого очищення стічних вод послідовно досягають фільтруванням через піщані шари, хлоруванням, фільтруванням через активоване вугілля, прогріванням, рідинним екстрагуванням, виморожуванням, зворотним ос-

мосом, іонним обміном. Якщо при цьому утворюються осади (тверді речовини), то їх об'єднують з іншим осадом і знешкоджують як описано вище.

Для біотехнологічних виробництв необхідно передбачати роздільні системи стоків — технологічних і комунальних.

На сучасному етапі розвитку біотехнологічних виробництв далеко не завжди (і не скрізь) здійснюють не тільки тонке очищення стічних вод, а й відомі випадки, коли неочищені стоки скидаються у водойми або ґрунт. У цьому разі порушується біологічна рівновага у природних («живих») водоймах. Це відбувається за рахунок таких факторів: зміни ступеня аерації води, підвищення концентрації органічних субстратів, зміни кількості неорганічних речовин (фосфор, сірка), рН, температури.

Ступінь аерації води помітно зменшується у разі потрапляння в неї стоків, що містять різні речовини, здатні «поглинати» розчинений у воді кисень, інакше кажучи, здатних окиснюватися. Маслянисті відходи можуть фізично заважати проникненню кисню у водойму. Мінералізація органічних речовин також потребує підвищених концентрацій розчиненого кисню. У такій ситуації мікроорганізми, які споживають органічні сполуки, конкурують із рибами й іншими водними істотами за кисень, проте оскільки забруднені стічні води можуть надходити безперервно, то живі істоти не витримують цієї «конкурентної боротьби» і гинуть.

Надходження у водойми підвищених концентрацій фосфору й сірки призводить до утворення нерозчинних осадів фосфорних солей і сульфідів, в результаті чого із кругообігу виводяться такі елементи-органогени, як фосфор і сірка.

Фізіологічні значення рН і температури добре відомі для різних груп організмів. Можна уявити реакцію мікро- і макрофлори, мікро- і макрофауни на постійні температурні стрибки або зміни рН середовища існування. У таких ситуаціях нормальні мешканці водойм гинуть або внаслідок популяційного тиску одних видів на інші, або внаслідок виникнення екстремальних (від лат. *extremus* — крайній) умов.

Розчинність чистого кисню у воді становить 48 частин на 1 млн частин води при 14 °С. При такій самій температурі й насиченні води повітрям (вміст кисню у повітрі — 20,9 %) розчинність кисню становить приблизно 10 частин на 1 млн. У природних водоймах розчинність кисню ще нижча. Наприклад, у морській воді солоністю 3,4 % розчиняється кисню 80 % розчиненого в чистій воді, тобто 38,4 частини на 1 млн. Отже, можна прогнозувати суттєві втрати розчиненого кисню в природних водоймах, куди скидаються стоки біотехнологічних виробництв. Все це негативно позначається на водних екосистемах.

Слід зазначити, що через неможливість ідентифікації кожного компонента в стоках аналізують тверді залишки, загальний азот, органічний вуглець і біохімічне споживання кисню (БСК). Опираючись на експериментальні дані, отримані в результаті проведених аналізів, видають рекомендації з обробки рідких стоків. БСК₅ означає кількість спожитого розчиненого кисню під час інкубації стоків упродовж 5 днів при температурі 20 °С. Розчинений кисень визначають різними методами — хімічним, біологічним або фізико-хімічним. БСК можна виразити в міліграмах кисню на 100 мл або на

1 л проби, у частинах на 1 млн та в мілілітрах кисню на 1 л проби при 0°C та $1,01 \cdot 10^5$ Па. Якщо, наприклад, БСК води більше 10 частин на 1 млн, то вона непридатна для споживання людиною. БСК для неочищених стоків у виробництві пеніциліну становить 32 000 частин на 1 млн.

Забруднені води й промислові стоки повинні проходити обробку для знешкодження й очищення перед надходженням їх у природні водні резервуари. Наявність у стоках (воді) інгібіторів або токсичних речовин для мікроорганізмів негативно позначається на правильності вимірювання БСК, а у разі потрапляння таких стоків до аеротенків або у природні накопичувачі, що містять мікрофлору й мікрофауну, порушується процес їхнього знешкодження. З небезпечних токсичних речовин та інгібіторів можна назвати солі важких металів, поверхнево-активні речовини (ПАР), фенольні сполуки та ін.

На жаль, немає інформації про кількість відходів усіх біовиробництв у світі, але, безсумнівно, вони приголомшливо великі. Підраховано, наприклад, що на 1 т лимонної кислоти утворюється 150—200 кг сухого міцелію *Aspergillus niger* і 7 м³ фільтрату. Кількість твердих і рідких відходів світового виробництва антибіотиків (30 000 т на рік) значно більша. Так, з одного апарата об'ємом 50 м³ у виробництві пеніциліну може бути одержано близько 1 т міцелію (у перерахунку на суху масу).

Біотехнолог зобов'язаний забезпечувати безвідходність біотехнологічних виробництв для підтримання нормальної екологічної ситуації.

КОНТРОЛЬНІ ЗАПИТАННЯ ДО РОЗДІЛУ 4

1. Що таке відходи біотехнологічних виробництв?
2. Які методи знезараження твердих відходів Вам відомі?
3. Дайте визначення поняття «аеротенки».
4. Які процеси відбуваються в аеротенках очисних споруд?
5. Охарактеризуйте за складом рідкі відходи біотехнологічних виробництв.
6. Охарактеризуйте основні етапи біологічного очищення стічних вод.
7. Як досягають тонкого очищення стічних вод?
8. За рахунок яких факторів порушується біологічна рівновага у природних водоймищах?
9. Якими методами визначається розчинений кисень?
10. Які показники визначають у стоках біотехнологічних виробництв?
11. Що означає БСК₅?

5.1. ОСОБЛИВОСТІ ТА ЗАКОНОМІРНОСТІ МІКРОБНОГО СИНТЕЗУ

Мікробний синтез є невід’ємною і найважливішою складовою сучасної біотехнології. Практично всі основні досягнення біотехнології базуються прямо чи опосередковано на використанні мікроорганізмів або продуктів їх обміну.

Мікробіологічний синтез — це синтез структурних компонентів мікробних клітин або продуктів їх метаболізму з низькомолекулярних сполук. Основні особливості мікробного синтезу такі:

1) синтез здійснюється ферментними системами самої клітини, відбувається переважно внутрішньоклітинно, незалежно від локалізації цільового продукту після проведення технологічних операцій з його одержання;

2) синтез здійснюється з низькомолекулярних попередників, які під час реакцій синтезу повинні бути активовані;

3) синтез є енергозалежним процесом;

4) шляхи синтезу пов’язані з процесами катаболізму, проте можуть суттєво від них відрізнятися і переважно здійснюватися іншими ферментними системами.

Завдання мікробного синтезу полягає у тому, щоб одержати максимум цільового і мінімум інших продуктів. Для досягнення надсинтезу необхідно порушити нормальну регуляцію шляхів метаболізму. Цього можна досягти за допомогою генетичних методів, зокрема генно-інженерними методами, або зміною умов культивування. Як правило, ефекту надсинтезу досягають поєднанням цих методів.

5.1.1. Класифікація продуктів мікробного синтезу

У процесі вивчення біогенезу найважливіших продуктів біотехнології ми будемо їх класифікувати так.

Препарати на основі біомаси мікроорганізмів. До них належать вакцини, пробіотики, бактеріальні добрива, хлібопекарські дріжджі, білкові продукти.

Продукти метаболізму мікроорганізмів. Їх у свою чергу можна поділити на такі групи: первинні метаболіти (амінокислоти, органічні кислоти, вітаміни); вторинні метаболіти (антибіотики, екзополісахариди, поверхнево-активні речовини тощо); продукти бродіння (спирти, органічні кислоти, кетони); ферменти.

Детальніша інформація про препарати на основі біомаси мікроорганізмів наведена у табл. 5.1.

Таблиця 5.1. Характеристика препаратів на основі біомаси

Група препаратів	Назва препаратів	Характеристика мікроорганізмів		
		Представники	Тип метаболізму	Тип живлення
Пробіотики	Біоспорин, субалін, бактерин SL, ендоспорин	Бактерії роду <i>Bacillus</i>	Окиснювальний	Хемоорганогетеротрофія
	Біфідумбактерин, біфілонг	Бактерії роду <i>Bifidobacterium</i>	Бродильний	Те саме
	Колібактерин	<i>Escherichia coli</i>	Окиснювальний	» »
	Лактобактерин, лактосан, лактин-К	Бактерії роду <i>Lactobacillus</i>	Бродильний	» »
Бактеріальні добрива	Ризобін, ризоторфін (нітрагін)	Симбіотичні азотфіксувальні бактерії роду <i>Rhizobium</i>	Окиснювальний	» »
	Азотобактерин	Вільно існуючі азотфіксувальні бактерії роду <i>Azotobacter</i>	Окиснювальний	» »
	Фосфобактерин	Бактерії роду <i>Bacillus</i>	Те саме	» »
Хлібопекарські дріжджі	Хлібопекарські дріжджі	Дріжджі <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	» »	» »
Білкові продукти	Гапрін	Метано-окиснювальні бактерії роду <i>Methylococcus</i>	» »	» »
	Кормові дріжджі	<i>Saccharomyces, Candida, Rhodotorula, Trichosporon</i>	» »	» »
	Спіруліна	Ціанобактерії <i>Spirulina platensis</i>	» »	Фотолітоавтотрофія

Вакцини — це імунобіологічні препарати, що використовуються для створення активного специфічного імунітету. Застосовують їх переважно для профілактики, але іноді й для лікування інфекційних захворювань. Діючою речовиною вакцин є специфічний антиген. Як антигени використовують живі або інактивовані мікроорганізми (бактерії, віруси); виділені з мікроорганізмів специфічні, так звані протективні, антигени; утворювані мікроорганізмами антигенні речовини (вторинні метаболіти) — токсини; хімічно синтезовані антигени, аналогічні природним; антигени, одержані методами генної інженерії.

Живі вакцини (табл. 5.2) конструюються на основі ослаблених штамів мікроорганізмів, що втратили вірулентність, проте зберігають антигенні властивості. Живі вакцини за умови введення в організм приживляються, розмножуються, спричиняють генералізований вакцинальний процес і формування специфічного імунітету до патогенного мікроорганізму, з якого одержано атенуований штам.

Таблиця 5.2. Живі вакцини

Інфекції, для профілактики яких використовуються вакцини	Збудники захворювань	
	Бактерії	Віруси
Бруцельоз	<i>Brucella melitensis</i> <i>Brucella abortus</i> <i>Brucella suis</i>	—
Лихоманка Ку	<i>Coxiella burnetti</i>	—
Сибірка	<i>Bacillus anthracis</i>	—
Туберкульоз	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	—
Висипний тиф	<i>Rickettsia provazekii</i>	—
Туляремія	<i>Francisella tularensis</i>	—
Чума	<i>Yersinia pestis</i>	—
Грип	—	РНК-вмісні віруси родини Orthomyxoviridae, під <i>Influenzavirus</i> (вірус грипу типу А і В), під <i>Influenza C</i> (вірус грипу типу С)
Кір	—	РНК-вмісні віруси родини Paramyxoviridae, під <i>Morbillivirus</i>
Жовта лихоманка	—	РНК-вмісні віруси родини Flaviviridae
Епідемічний паротит	—	РНК-вмісні віруси родини Paramyxoviridae, під <i>Paramyxovirus</i>
Поліомієліт	—	РНК-вмісні віруси родини Picornaviridae, під <i>Enterovirus</i>

Примітка. «—» — немає.

Інактивовані вакцини (табл. 5.3) — це інактивовані фізичними (температура, ультрафіолетове чи іонізуюче опромінення) або хімічними (формалін, фенол, β -пропіолактон) методами культури патогенних чи вакцинних штамів бактерій і вірусів. Інактивацію здійснюють у таких умовах, щоб зберегти антигенні властивості мікроорганізмів, але позбавити їх життєздатності.

Таблиця 5.3. Інактивовані вакцини

Інфекції, для профілактики яких використовуються вакцини	Збудники захворювань	
	Бактерії	Віруси
Холера	<i>Vibrio cholerae</i> <i>Vibrio eltor</i>	—
Лептоспіроз	<i>Leptospira icterohaemorrhagiae</i> <i>Leptospira grippotyphosa</i> <i>Leptospira pomona</i> <i>Leptospira canicola</i>	—
Кашлюк	<i>Bordetella pertusis</i>	—
Висипний тиф	<i>Rickettsia provazekii</i>	—
Черевний тиф	<i>Salmonella typhi</i>	—
Сказ	—	РНК-вмісні віруси родини Rhabdoviridae, під <i>Lyssavirus</i>
Грип	—	РНК-вмісні віруси родини Orthomyxoviridae, під <i>Influenzavirus</i> (вірус грипу типу А і В), під <i>Influenza C</i> (вірус грипу типу С)
Кліщовий енцефаліт	—	РНК-вмісні віруси родини Flaviviridae, під <i>Flavivirus</i>
Гепатит А	—	РНК-вмісні віруси родини Picornaviridae, під <i>Hepatovirus</i>
Герпес	—	ДНК-вмісні віруси родини Herpesviridae, під <i>Simplexvirus</i>

Примітка. «—» — немає.

Субклітинні та субвіріонні вакцини (табл. 5.4) складаються з антигенів, одержаних із мікроорганізмів різними способами, переважно хімічними. У зв'язку з цим такі вакцини називають також *хімічними*.

Таблиця 5.4. Субклітинні та субвіріонні вакцини

Інфекції, для профілактики яких викорис- товуються вакцини	Збудники захворювань	
	Бактерії	Віруси
Назофарингіт, менінгокок- цемія, цереброспинальний епідемічний менінгіт	<i>Neisseria meningitidis</i>	—
Гонорея	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	—
Холера	<i>Vibrio cholerae</i>	—
Пневмонія	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	—
Черевний тиф	<i>Salmonella typhi</i>	—
Гепатит В	—	ДНК-вмісні віруси родини Hepadnaviridae, під Orthohaepadnavirus

Примітка. «—» — немає.

Загальну схему синтезу продуктів біотехнології на основі біомаси бак-
терій показано на *рис. 5.1*.

Характеристику найважливіших первинних метаболітів мікроорганізмів наведено у *табл. 5.5*. Продуценти первинних метаболітів є хемоорганотрофами і характеризуються окиснювальним типом метаболізму.

Таблиця 5.5. Найважливіші первинні метаболіти мікроорганізмів

Група метаболітів	Назва	Продуцент
Аміно-кислоти	Лізин	<i>Brevibacterium flavum</i>
	Глутамінова кислота	<i>Corynebacterium glutamicum</i>
	Пролін	<i>Corynebacterium glutamicum</i>
	Лейцин	<i>Brevibacterium flavum</i>
	Триптофан	<i>Bacillus subtilis</i>
Органічні кислоти	Лимонна кислота	<i>Aspergillus niger</i>
	Оцтова кислота	<i>Acetobacter suboxydans</i>
	Ітаконова кислота	<i>Aspergillus terreus</i>
	Глюконова кислота	<i>Aspergillus niger</i>
Вітаміни	Ціанкобаламін (B ₁₂)	<i>Propionibacterium shermanii</i>
	Рибофлавін (B ₂)	<i>Eremothecium ashbyii</i>
	β-каротин (попередник вітаміну А)	<i>Blacheslea trispora</i>
	Ергостерин (вихідний продукт для одержання вітаміну D ₂)	<i>Saccharomyces carlsbergensis</i>
	Аскорбінова кислота	<i>Acetobacter suboxydans</i>
		(здійснює перетворення D-сорбіту на L-сорбозу)

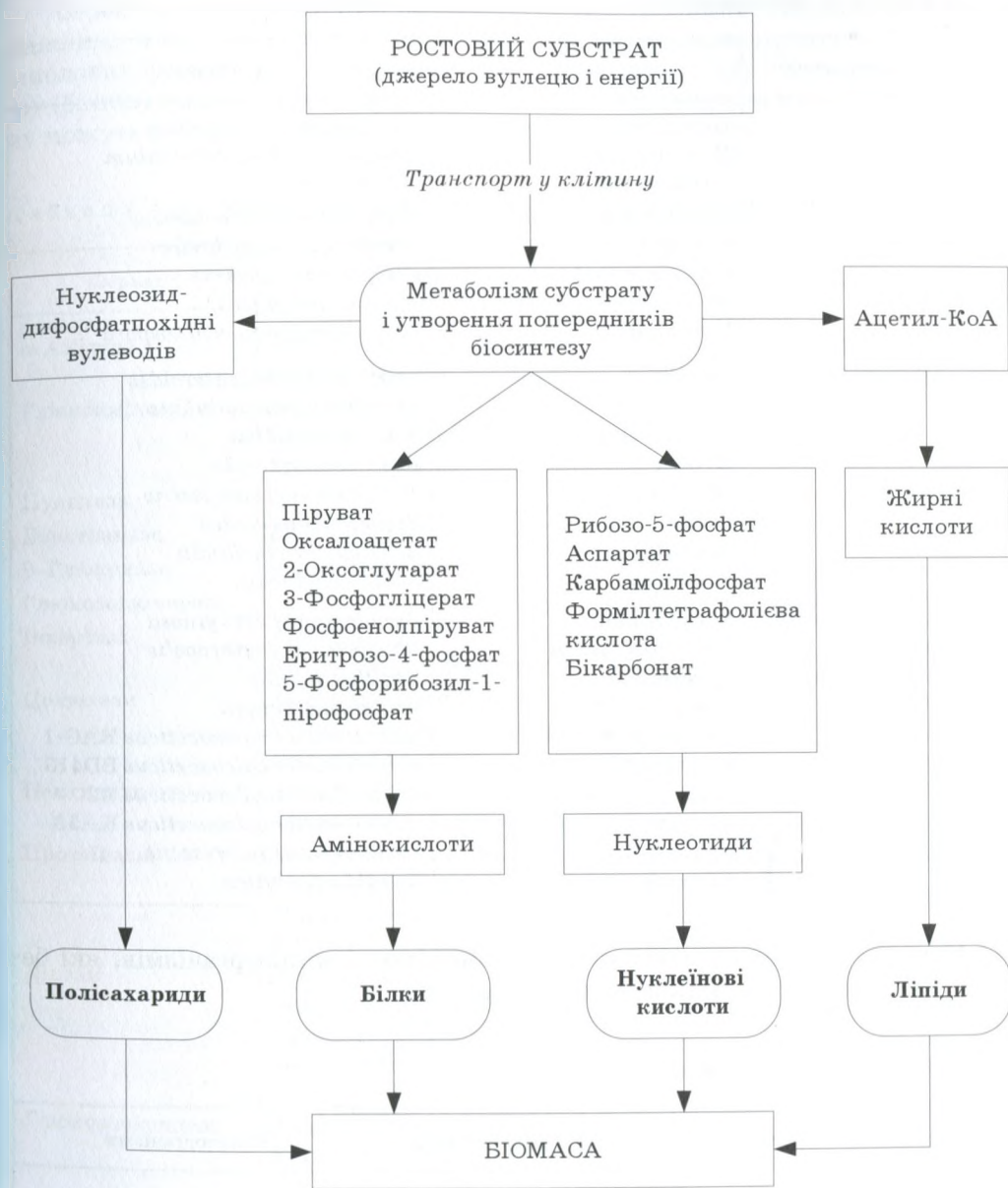


Рис. 5.1. Загальна схема синтезу біомаси бактерій

У табл. 5.5 серед важливих органічних кислот не наведено молочну кислоту, оскільки вона є продуктом молочнокислого бродіння і за запропонованою класифікацією належить до іншої групи метаболітів.

Деякі практично цінні вторинні метаболіти мікроорганізмів наведено у табл. 5.6.

Таблиця 5.6. Найважливіші вторинні метаболіти мікроорганізмів

Група метаболітів	Назва	Продуцент
Антибіотики	Пеніцилін	<i>Penicillium chrysogenum</i>
	Цефалоспорин	<i>Cephalosporium acremonium</i>
	Грамїцидин	<i>Bacillus brevis</i>
	Тетрациклін	<i>Streptomyces aureofaciens</i>
	Еритроміцин	<i>Streptomyces erythreus</i>
	Стрептоміцин	<i>Streptomyces griseus</i>
	Поліміксин	<i>Bacillus polymyxa</i>
	Гентаміцин	<i>Micromonospora echinospora</i>
Екзополісахариди	Декстран	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
	Пулулан	<i>Aureobasidium pullulans</i>
	Склероглюкан	<i>Sclerotium rolsii</i>
	Курдлан	<i>Alcaligenes faecalis</i>
	Ксантан	<i>Xanthomonas campestris</i>
	Гелан	<i>Pseudomonas elodea</i>
	Альгінат	<i>Azotobacter vinelandii</i>
	Етаполан	<i>Acinetobacter</i> sp.
Поверхнево-активні речовини (біосурфактанти)	Рамноліпіди	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	Трегалозоліпіди	<i>Rhodococcus erythropolis</i>
	Сурфактин	<i>Bacillus subtilis</i>
	Фосфоліпіди	<i>Acinetobacter</i> spp.
	Емульсан RAG-1	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> RAG-1
	Емульсан BD4	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> BD413
	Біодисперсан	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> A2
	Алазан	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> KA53
	Емульсан 378	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
	Ліпозан	<i>Candida lipolytica</i>

Перелік найважливіших продуктів бродіння і мікроорганізмів, які беруть участь в їх утворенні, наведено у табл. 5.7.

Таблиця 5.7. Продукти бродіння

Типи бродіння	Продукт бродіння	Мікроорганізми
Спиртове	Етанол	<i>Sacharomyces cerevisiae</i> <i>Zymomonas mobilis</i>
Спиртове за присутності бісульфіту	Гліцерин	<i>Sacharomyces cerevisiae</i>
Гомоферментативне молочнокисле	Молочна кислота	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> <i>Streptococcus bovis</i>
Ацетоно-бутилове	Ацетон, 2-Пропанол, Бутанол	<i>Clostridium butyricum</i> <i>Clostridium acetobutyricum</i>

Серед практично цінних метаболітів, синтезованих мікроорганізмами, важливе місце займають ферменти. Найактивнішими продуцентами промислових ферментів є мікроміцети і бактерії (табл. 5.8). Біосинтез ферментів (білків) розглядатимемо окремо, оскільки ці продукти мікробного синтезу можуть бути як первинними, так і вторинними метаболітами.

Таблиця 5.8. Мікроорганізми — продуценти промислових ферментів

Фермент	Гриби	Бактерії
α -Амілаза	<i>Aspergillus oryzae</i> <i>Aspergillus niger</i>	<i>Bacillus licheniformis</i> <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
Глюкоамілаза	<i>Aspergillus niger</i> <i>Rhizopus niveus</i> <i>Endomycopsis</i> sp.	—
Пуланаза	—	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
Декстраназа	<i>Penicillium</i> sp.	—
β -Глюконаза	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
Глюкозоізомераза	—	<i>Actinoplanes missouriensis</i>
Інвертаза	<i>Aspergillus</i> sp. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	—
Целюлази	<i>Aspergillus niger</i> <i>Trichoderma roseum</i> <i>Trichoderma viride</i>	—
Пектинази	<i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus awamori</i>	—
Протеїнази	<i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus oryzae</i> <i>Mucor mihei</i> <i>Mucor rouxii</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus licheniformis</i> <i>Bacillus stearothermophilus</i>
Ліпази	<i>Aspergillus oryzae</i> <i>Aspergillus awamori</i> <i>Candida cylindrica</i> <i>Mucor mihei</i> <i>Rhizopus</i> sp.	—
Глюкозооксидаза	<i>Aspergillus niger</i> <i>Penicillium vitale</i> <i>Penicillium notatum</i>	—
Каталаза	<i>Aspergillus</i> sp.	—
Деацетилаза	<i>Aspergillus</i> sp.	—
Аспартаза	—	<i>Escherichia coli</i>
Фумараза	—	<i>Escherichia coli</i>
Пеніцилінамідаза	—	<i>Escherichia coli</i>

Примітка. «—» — немає.

Неповні окиснення. Більшість аеробних мікроорганізмів у процесі дихання окиснюють органічні поживні речовини до CO_2 та води. Оскільки в молекулі CO_2 досягається найвищий ступінь окиснення вуглецю, то відбувається *повне окиснення*. Цей тип дихання відрізняють від *неповних окиснень*, за яких як продукти обміну виділяються частково окиснені органічні сполуки.

Кінцевими продуктами неповних окиснень можуть бути оцтова, глюконова, фумарова, лимонна, молочна кислоти та інші сполуки. Оскільки ці продукти подібні до тих, що утворюються у процесі бродіння, неповні окиснення часто називають «*окиснювальним бродінням*». Проте цей термін у наш час вживається дуже рідко.

Неповними окисненнями в біотехнології є такі важливі процеси, як утворення органічних кислот бактеріями та грибами; утворення амінокислот бактеріями; трансформація речовин мікроорганізмами; утворення вторинних метаболітів (антибіотиків, полісахаридів, вітамінів, лектинів та ін.).

Отже, продукти мікробного синтезу можна класифікувати і так: продукти на основі біомаси мікроорганізмів; продукти неповних окиснень; продукти бродіння.

КОНТРОЛЬНІ ЗАПИТАННЯ ДО ПІДРОЗДІЛУ 5.1

1. Які особливості притаманні мікробному синтезу?
2. Як можна класифікувати продукти мікробного синтезу?
3. Які препарати на основі біомаси мікроорганізмів Ви знаєте?
4. Що таке вакцини? Які типи вакцин Ви знаєте?
5. Чим різняться між собою живі та інактивовані вакцини?
6. Охарактеризуйте субклітинні та субвіріонні вакцини. Чому їх також називають хімічними?
7. Як відбувається синтез продуктів на основі біомаси бактерій?
8. Дайте характеристику первинних метаболітів мікроорганізмів. Які мікроорганізми використовуються для їх одержання?
9. Які вторинні метаболіти мікроорганізмів Ви знаєте?
10. Чим первинні метаболіти відрізняються від вторинних?
11. Які практично важливі продукти бродіння можна одержати за допомогою мікроорганізмів?
12. Які ферменти можна одержати за допомогою мікроорганізмів?
13. Що таке неповні окиснення?

5.2. БІОСИНТЕЗ ПРЕПАРАТІВ НА ОСНОВІ БІОМАСИ. СИНТЕЗ КОМПОНЕНТІВ МІКРОБНОЇ КЛІТИНИ

Якщо продукти мікробного синтезу — це препарати на основі біомаси мікроорганізмів (пробіотики, бактеріальні добрива, хлібопекарські дріжджі, білкові продукти), то їх біогенез включає синтез основних органічних сполук, що входять до складу мікробної клітини. Тому розглянемо біосинтез низькомолекулярних сполук (мономерів) — амінокислот, нуклеотидів, вуглеводів і жирних кислот, які є будівельними блоками для синтезу полімерів (білків, полісахаридів, нуклеїнових кислот, ліпідів), з яких складається мікробна клітина. Слід зазначити, що шляхи біосинтезу амінокислот, нуклеотидів і жирних кислот є практично однаковими як у про-, так і еукаріот. Оскільки ці дві групи мікроорганізмів принципово різняться між собою за будовою і складом клітинної стінки, то і шляхи біосинтезу вуглеводів — основних складових цього структурного компоненту клітини — у них відмінні.

Одна з особливостей мікробного синтезу полягає у тому, що цей процес енергозалежний. Тому перед тим як перейти до вивчення шляхів біосинтезу компонентів мікробної клітини, проаналізуємо витрати АТФ на синтез макромолекул, що входять до її складу.

5.2.1. Потреби в АТФ для утворення бактеріальних клітин із глюкози

Понад 95 % клітинного матеріалу мікроорганізмів складається з макромолекул. На частку білків припадає приблизно 52 %, нуклеїнових кислот — 19 % маси сухої речовини. Близько 3 % становлять низькомолекулярні органічні сполуки та солі.

Вміст макромолекул у бактеріальних клітинах

Макромолекули	Кількість, г / 100 г сухих клітин
Білки	52,4
Полісахариди	16,6
Ліпіди	9,4
РНК	15,7
ДНК	3,2
Разом	97,3

З наведених далі даних про витрати енергії на утворення бактеріальних клітин з глюкози (потреба в АТФ для синтезу макромолекул, з яких складається клітина) видно, що основна кількість АТФ, одержаного в дихальному ланцюгу, витрачається на полімеризацію амінокислот. Значна кількість енергії потрібна для утворення нуклеозидмонофосфатів, а також на забезпечення транспортних процесів.

Потреба в АТФ для утворення бактеріальних клітин із глюкози

Молекули	Кількість АТФ, ммоль, потрібних для синтезу макромолекул, які містяться в 1 г сухих клітин
Полісахариди	2,1
Білки:	
Глюкоза → Амінокислоти	1,4
Полімеризація амінокислот	19,1
Ліпіди	0,1
РНК:	
Глюкоза → Нуклеозидмонофосфати	3,5
Полімеризація	0,9
ДНК:	
Глюкоза → Дезоксинуклеозидмонофосфати	0,9
Полімеризація	0,2
АТФ, необхідна для транспортних процесів	5,2
АТФ, необхідна для обороту РНК	1,4
Загальна потреба в АТФ	34,8

5.2.2. Біосинтез амінокислот

Більшість мікроорганізмів здатні синтезувати *de novo* всі 20 амінокислот, з яких складаються білки. Вуглецеві скелети амінокислот будуються з проміжних продуктів обміну, аміногрупи вводяться прямим амінуванням або трансамінуванням. Переведення неорганічного азоту в органічні сполуки завжди відбувається через аміак. Нітрати, нітрити, молекулярний азот (джерела азоту в поживних середовищах) попередньо відновлюються до аміаку (асиміляційна нітратредукція) і тільки після цього включаються до складу органічних сполук (рис. 5.2, а, б, в).

Лише небагато амінокислот утворюються в результаті *прямого амінування* вільними іонами амонію. У первинній асиміляції аміаку беруть участь *L-глутаматдегідрогеназа* та *L-аланіндегідрогеназа*, які здійснюють відновлювальне амінування 2-оксокислот (пірувату та 2-оксоглутарату) (рис. 5.2, д, е). АТФ у цьому процесі участі не бере. Утворення глутаміну з глутамату каталізується *глутамінсинтетазою* і потребує витрат АТФ (рис. 5.2, г). За допомогою *глутаматсинтази* аміногрупа глутаміну може бути перенесена на 2-оксоглутарат з утворенням глутамату (рис. 5.2, ж).

Решта амінокислот отримує свою аміногрупу від первинних амінокислот у результаті *трансамінування*. З вільних амінокислот у цитоплазмі кількісно переважає глутамінова кислота (більше половини всього «пулу» амінокислот).

Всі необхідні для синтезу білків 20 амінокислот утворюються з певних метаболічних попередників (рис. 5.3).



Рис. 5.2. Найважливіші шляхи асиміляції азоту:

іони амонію, що містяться у поживному середовищі, безпосередньо поглинаються клітинами (а). Іони нітрату під час асиміляційної нітратредукції (б), а молекулярний азот під час фіксації азоту (в) відновлюються до іонів амонію. В органічні сполуки амонійний азот перетворюється або за участю АТФ утворенням глутаміну, або без витрат АТФ прямим відновлювальним амінуванням 2-оксоглутарату чи пірувату

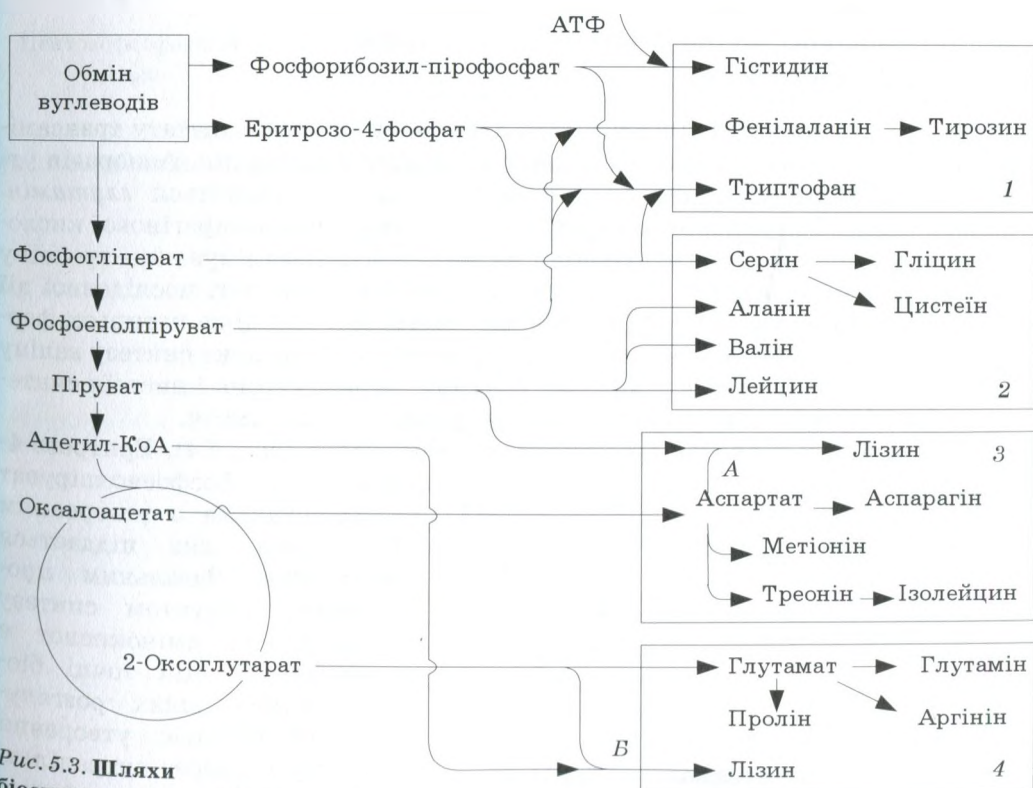


Рис. 5.3. Шляхи біосинтезу амінокислот:

родини амінокислот: 1 - ароматичних амінокислот і гістидину; 2 - піруватна; 3 - аспартатна; 4 - глутаматна. Шляхи біосинтезу лізину: А - діамінопіримідиновий; Б - аміноадипіновий

Як видно з наведених даних, субстратами для синтезу амінокислот є кілька сполук — піруват, оксалоацетат, 2-оксоглутарат, 3-фосфогліцерат, фосфоенолпіруват, еритрозо-4-фосфат і 5-фосфорибозил-пірофосфат. Оксалоацетат є відправною точкою для синтезу шести амінокислот, 2-оксоглутарат — попередником синтезу чотирьох, а піруват — трьох амінокислот. На рис. 5.3 показано два можливі шляхи синтезу лізину: А — діамінопімеліновий і Б — аміноадипіновий.

Мікрободорості, гриби, дріжджі синтезують лізин через аміноадипінову, бактерії — через діамінопімелінову кислоти.

Попередники біосинтезу амінокислот

Попередник	Амінокислота
Піруват	Аланін, валін, лейцин
Оксалоацетат	Аспартат, аспарагін, метіонін, лізин, треонін, ізолейцин
2-Оксоглутарат	Глутамат, глутамін, аргінін, пролін
3-Фосфогліцерат	Серин, гліцин, цистеїн
Фосфоенопіруват, еритрозо-4-фосфат	Фенілаланін, тирозин, триптофан
5-Фосфорибозил-1-пірофосфат + АТФ	Гістидин

Аланін та аспартат синтезуються з пірувату та оксалоацетату трансамінуванням з використанням глутамату як донора аміногрупи. Аспарагін утворюється в реакції, аналогічній реакції, що каталізується *глутамінсинтетазою*. Відновлення аспартату дає напівальдегід аспарагінової кислоти — попередник лізину, треоніну та метіоніну. Дезамінування треоніну приводить до утворення 2-оксобутирату, який в результаті послідовної дії чотирьох ферментів перетворюється на ізолейцин. Під дією чотирьох ферментів піруват перетворюється на валін; проміжний продукт синтезу валіну служить попередником в утворенні лейцину. Серин, гліцин і цистеїн синтезуються з 3-фосфогліцерату, а пролін та аргінін — з глутамату.

Складнішим є синтез ароматичних амінокислот (рис. 5.4). Еритрозо-4-фосфат і фосфоенолпіруват конденсуються з утворенням C_7 -сполуки, яка піддається циклізації. Загальним проміжним продуктом синтезу ароматичних амінокислот є хоризмат. У цій точці біосинтетичний шлях розгалужується на два: утворення триптофану через антранілат; утворення тирозину та фенілаланіну через префенат (рис. 5.4).



Рис. 5.4. Біосинтез ароматичних амінокислот

5.2.3. Біосинтез нуклеотидів

Попередниками **піримідинових нуклеотидів** є карбамоїлфосфат та аспартат (рис. 5.5). Конденсація цих сполук дає карбамоїласпартат, який піддається циклізації і перетворюється на 4,5-дигідрооротат. Дегідрування цієї сполуки приводить до утворення оротату — першого проміжного продукту, який містить піримідинове кільце. Рибозо-5-фосфат, утворений у пентозофосфатному циклі, активується перетворенням у 5-фосфорибозил-1-пірофосфат. Реакція 5-фосфорибозил-1-пірофосфату з оротатом дає оротидинмонофосфат, який далі декарбоксилується в уридинмонофосфат.

Синтез **пуринових нуклеотидів** проходить складнішим шляхом (рис. 5.6).

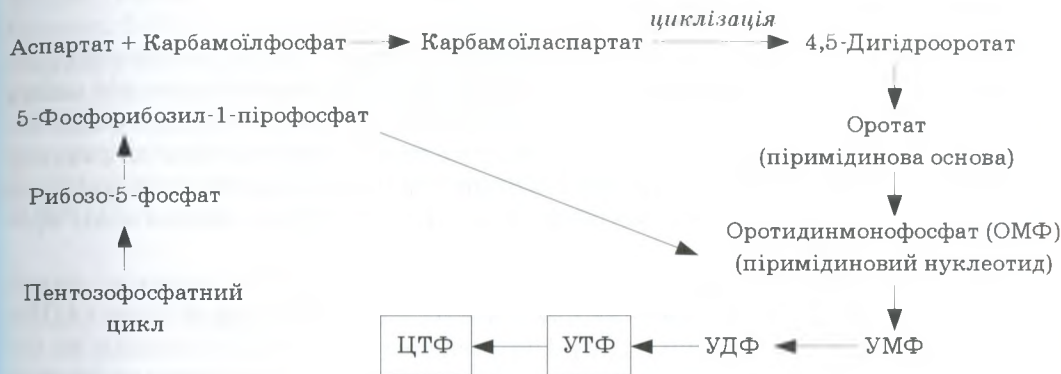


Рис. 5.5. Схема біосинтезу піримідинових нуклеотидів

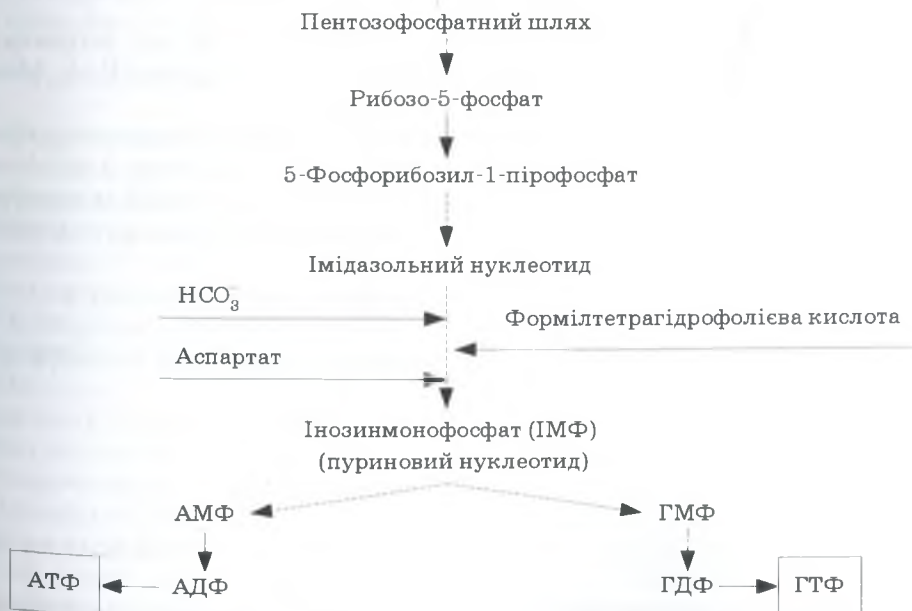


Рис. 5.6. Схема біосинтезу пуринових нуклеотидів

У результаті метаболічного шляху, який починається з 5-фосфорибозил-1-пірофосфату, утворюється імідазольний нуклеотид. Три атоми піримідинового кільця, необхідні для утворення пуринового кільця з імідазольного нуклеотиду, надходять із бікарбонату, аспартату та формілтетрагідрофолієвої кислоти. Замикання кільця дає інозинмонофосфат (пуриновий нуклеотид, ІМФ). Декілька додаткових реакцій приводять від ІМФ до АМФ або до ГМФ, і нарешті утворюються АТФ та ГТФ. Відновлення рибонуклеотидів до дезоксирибонуклеотидів відбувається на рівні дифосфатів. Відновлювальним агентом у цій реакції є флавопротеїдтіоредоксин; його відновлена форма регенерується за рахунок НАДФН.

5.2.4. Біосинтез жирних кислот

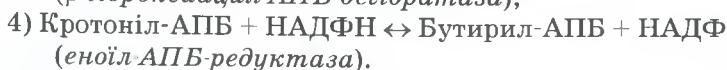
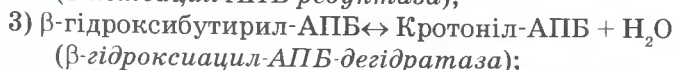
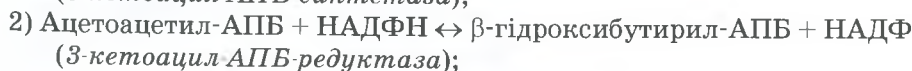
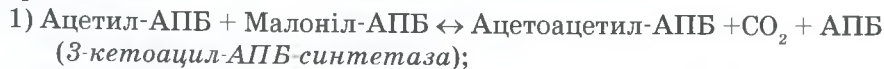
Більшість жирних кислот, що входять до складу бактеріальних ліпідів, містять 16 або 18 атомів вуглецю. Ці кислоти є або насиченими, або мають один чи більше подвійних зв'язків. Попередником жирних кислот є ацетил-КоА. Проте подовження ланцюга у даному разі не відбувається за рахунок конденсації двох молекул ацетил-КоА з наступною подальшою конденсацією утвореної C_4 -сполуки з ацетил-КоА. У біосинтезі жирних кислот є дві принципи відмінності:

1. КоА-похідні не є субстратами ферментів, що беруть участь у синтезі жирних кислот. Замість них використовується ацилпереносний білок (АПБ), що містить як простетичну групу 4¹-фосфопантетеїн, тобто є схожим на кофермент А. Перша реакція у синтезі жирних кислот — це утворення ацетил-АПБ:



2. Ацетил-АПБ функціонує у синтезі жирних кислот як затравка, а C_2 -фрагменти приєднуються до цієї затравки у формі малоніл-КоА. Малоніл-КоА синтезується з ацетил-КоА двома етапами.

Для подовження ацил-АПБ на два атоми вуглецю необхідно чотири ферменти. Спочатку ацетил-АПБ реагує з малоніл-АПБ з утворенням ацетоацетил-АПБ, який потім відновлюється до β -гідроксибутирил-АПБ. Відщеплення води дає кротноіл-АПБ, а наступне відновлення приводить до утворення бутирил-АПБ:



Точкою розгалуження синтезу насичених і ненасичених жирних кислот є β -гідроксидеканоіл-АПБ.

Основними субстратами для утворення *фосфатидних кислот* є 3-фосфогліцерин та ацил-АПБ. 3-Фосфогліцерин утворюється з діоксиацетонфосфа-

ту — проміжного продукту гліколізу. Фосфатидні кислоти утворюються в результаті перенесення ацильного залишку від ацил-АПБ на 3-фосфогліцерин. Більша частина фосфатидних кислот (через стадію утворення складних ефірів із спиртами) використовується для синтезу *фосфоліпідів*.

5.2.5. Утворення вуглеводів — компонентів клітинної стінки прокариот і еукаріот

Клітинна стінка прокариот. Якщо субстратом є глюкоза, то продукти її катаболізму — глюкозо-6-фосфат, фруктозо-6-фосфат, фруктозо-1,6-дифосфат; у пентозофосфатному циклі утворюються рибулозо-5-фосфат, ксилулозо-5-фосфат, рибозо-5-фосфат. У разі неуглеводних субстратів такі вуглеводи, як глюкозо-6-фосфат, фруктозо-6-фосфат, фруктозо-1,6-дифосфат, синтезуються в реакціях глюконеогенезу. Взаємоперетворення моносахаридів відбувається через нуклеозиддифосфатсахариди (наприклад, через УДФ-похідні).

Як приклад розглянемо біосинтез окремих компонентів клітинної стінки у грамнегативних бактерій *E. coli*.

Одним із попередників ліпополісахариду клітинної стінки *E. coli* є *УДФ-галактоза*, яка утворюється з глюкозо-6-фосфату:

Глюкозо-6-фосфат → Глюкозо-1-фосфат;

Глюкозо-1-фосфат + УТФ → УДФ-глюкоза + ФФ;

УДФ-глюкоза → УДФ-галактоза.

Другим попередником ліпополісахариду клітинної стінки є *гексозаміни*, що утворюються з фруктозо-6-фосфату. Фруктозо-6-фосфат перетворюється на глюкозамін-6-фосфат за рахунок глутаміну як донора аміногрупи:

Фруктозо-6-фосфат + Глутамін → Глюкозамін-6-фосфат + Глутамат.

Із глюкозамін-6-фосфату утворюються інші гексозаміни.

УДФ-N-ацетилмурамова кислота та **УДФ-N-ацетилглюкозамін** — попередники пептидоглікану — також синтезуються з глюкозамін-6-фосфату (рис. 5.7). Спочатку фосфатна група переноситься з положення 6 у положення 1 з утворенням глюкозамін-1-фосфату. Наступна реакція з ацетил-КоА дає N-ацетилглюкозамін-1-фосфат, який зв'язується з УДФ. На останньому етапі УДФ-N-ацетилглюкозамін реагує з фосфоенолпіруватом, утворюючи УДФ-N-ацетилмурамову кислоту.

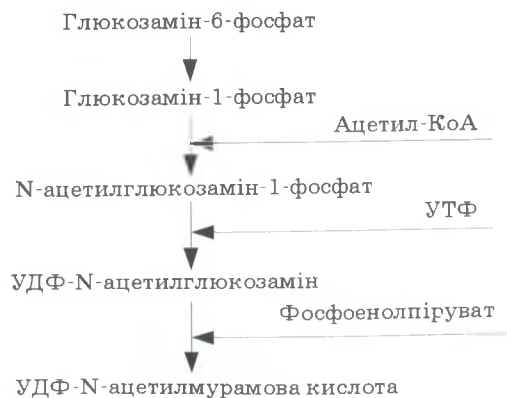


Рис. 5.7. Синтез попередників пептидоглікану

Будівельним блоком пептидоглікану є УДФ-N-ацетилмураміл-пентапептид. Пентапептид синтезується з УДФ-N-ацетилмурамової кислоти в результаті послідовних реакцій з L-аланіном+АТФ, D-глутаматом+АТФ, мезодіамінопімелатом+АТФ та D-аланіл-D-аланіном+АТФ.

Клітинні стінки дріжджів. До складу клітинних стінок дріжджів входять переважно полісахариди, структурними одиницями яких є глюкоза та маноза. Так, глюкан клітинних стінок хлібопекарських дріжджів (*Saccharomyces cerevisiae*) складається із скелета, в якому залишки глюкози з'єднані β -1,6-зв'язками. Бокові ланцюги мають β -1,3-зв'язки. Кількість повторюваних одиниць у бокових ланцюгах може досягати семи, кількість структурних одиниць у молекулі глюкану може бути від кількох десятків до кількох тисяч. Скелет іншого полісахариду — манану, виділеного з клітинних стінок хлібопекарських дріжджів, містить залишки манози, з'єднані α -1,6-зв'язками. Манан має багато розгалужень від лінійної структури, в них маноза з'єднана α -1,2- та α -1,3-зв'язками.

У клітинних стінках дріжджів *Candida albicans* скелет також складається із залишків манози, з'єднаних α -1,6-зв'язками. У молекулах мананів деяких дріжджів одночасно зустрічаються α - і β -зв'язки (*Pichia pastoris*). Деякі манани містять фосфор.

Крім гомополімерів, у клітинних стінках дріжджів присутні гетерополімери, що складаються з манози та галактози. Ці полісахариди називаються *галактомананами* (роди *Trichosporon*, *Torulopsis*). У складі клітинних стінок деяких дріжджів виявлено також амінополісахарид хітин.

УДФ-галактоза утворюється з глюкозо-6-фосфату (див. вище), маноза — з фруктозо-6-фосфату:

Глюкозо-6-фосфат $\rightarrow$ Фруктозо-6-фосфат;

Фруктозо-6-фосфат $\rightarrow$ Манозо-6-фосфат;

Манозо-6-фосфат $\rightarrow$ Манозо-1-фосфат;

Манозо-1-фосфат + ГТФ $\rightarrow$ ГДФ-маноза + Ф.

Клітинні стінки грибів. Клітинна стінка грибів містить близько 80—90 % полісахаридів, зв'язаних з білками, ліпідами, поліфосфатами, пігментами. Вона складається з кількох шарів (зовнішнього та внутрішніх, або первинної та вторинної клітинної стінки). Матричні (скелетні) структури (або первинна стінка) складаються з хітину (хітозану) та целюлози, зовнішній шар (вторинна стінка), як правило, — з глюканів з різними типами зв'язку у різних таксонів грибів.

Структурними елементами амінополісахариду хітину є залишки N-ацетилглюкозаміну, з'єднані між собою β -1,4-зв'язками. Полісахариди, що містять аміноцукри чи їх похідні, називаються *мукополісахаридами*. Хітозан — це дезацетильована похідна хітину. Целюлоза — полімер, що складається з β -1,4-глюкози. Утворення N-ацетилглюкозаміну відбувається як описано вище.

Як і в клітинах дріжджів, у клітинних стінках грибів містяться глюкани та манани. У складі клітинних стінок грибів виявлено також полісахариди,

що містять глюкуронову кислоту, а також гетерополісахариди, що містять манозу, галактозу, глюкозу, глюкуронову кислоту. Глюкуронова кислота утворюється з глюкозо-6-фосфату:

Глюкозо-6-фосфат $\rightarrow$ Глюкозо-1-фосфат;

Глюкозо-1-фосфат + УТФ $\rightarrow$ УДФ-глюкоза + Ф;

УДФ-глюкоза + 2 НАД(Ф)Н $\rightarrow$ УДФ-глюкуронова кислота + 2 НАД(Ф).

При розгляді компонентів клітинної стінки як одного з критеріїв для класифікації грибів за таксонами вищих рангів було виявлено, що багато з них в основі будови мають характерні пари полісахаридів. Наприклад, целюлозо-хітиновий комплекс переважає у клітинних стінках багатьох видів зигоміцетів, целюлозо-глюкановий — у ооміцетів, хітозан-хітиновий — у деяких видів ооміцетів, хітино-глюкановий — у хітридіоміцетів, аскоміцетів, базидіо- та дейтеромицетів.

КОНТРОЛЬНІ ЗАПИТАННЯ ДО ПІДРОЗДІЛУ 5.2

1. Які біосинтетичні процеси у мікроорганізмів потребують найбільших витрат енергії (АТФ)?
2. Як у мікроорганізмів відбувається асиміляційна нітратредукція?
3. Які амінокислоти утворюються в результаті прямого амінування?
4. Які амінокислоти утворюються в результаті трансамінування?
5. Назвіть попередників синтезу амінокислот.
6. Які є шляхи біосинтезу лізину у мікроорганізмів?
7. Як відбувається синтез ароматичних амінокислот?
8. Назвіть основні етапи синтезу піримідинових і пуринових нуклеотидів.
9. Які особливості притаманні біосинтезу жирних кислот?
10. Як відбувається синтез фосфатидних кислот і фосфоліпідів?
11. Як синтезуються попередники пептидоглікану (N-ацетилмурамова кислота та N-ацетилглюкозамін)?
12. Як відбувається утворення вуглеводних попередників ліпополісахаридів клітинної стінки у грамнегативних бактерій?
13. Як синтезуються вуглеводні компоненти клітинної стінки у еукаріот?
14. Які особливості притаманні синтезу вуглеводів під час вирощування мікроорганізмів на вуглеводних і неуглеводних субстратах?

5.3. БІОСИНТЕЗ ПЕРВИННИХ МЕТАБОЛІТІВ

5.3.1. Первинні і вторинні метаболіти

Первинними метаболітами називаються продукти обміну, необхідні для росту і життєдіяльності продуцента. До вторинних належать метаболіти, які не є необхідними для росту і розмноження продуцента. Вторинним метаболітам притаманні також такі ознаки: ці сполуки синтезуються тільки деякими видами мікроорганізмів; переважно утворюються після припинення росту; здатність до синтезу часто втрачається в результаті мутацій; часто утворюються у вигляді комплексів подібних сполук.

Прикладом первинних метаболітів є органічні кислоти, амінокислоти, вітаміни. Вторинні метаболіти — антибіотики, екзополісахариди, поверхнево-активні речовини.

Донедавна вважали, що характерною ознакою вторинних метаболітів є активний їх синтез після припинення росту мікроорганізмів (у стаціонарній фазі). Проте нині встановлено, що навіть такі «класичні» вторинні метаболіти, як антибіотики, можуть синтезуватись одночасно з ростом продуцента. Так, утворення протипухлинного антибіотика ландоміцину Е (продуцент *Streptomyces globisporus* 3-1) починається з перших годин росту культури, а максимальна його кількість досягається у стаціонарній фазі.

У мікроорганізмів-продуцентів таких вторинних метаболітів, як екзополісахариди, синтез цих сполук може бути пов'язаний із ростом, наприклад, у *Methylocystis parvus* OBVP, частково пов'язаний — *Xanthomonas*, *Methylomonas methanolica* і не пов'язаний — *Alcaligenes*, *Rhizobium*. У більшості продуцентів час досягнення максимальної питомої швидкості росту і синтезу вторинних метаболітів не збігається. Як правило, максимальна швидкість синтезу полісахаридів спостерігається наприкінці експоненційної і початку стаціонарної фази росту. Проте концентрація екзополісахаридів у культуральній рідині досягає найвищого значення під кінець процесу культивування. Тому багато хто з дослідників однією з характерних особливостей вторинних метаболітів вважають те, що швидкість їх утворення досягає максимуму після припинення росту продуцента, тобто саме у стаціонарній фазі.

Слід зазначити, що залежно від умов вирощування мікроорганізмів продукти їх синтезу можуть бути класифіковані як первинні і як вторинні метаболіти. Так, субстратами для синтезу поверхнево-активних речовин (ПАР) є переважно вуглеводні (*n*-алкани) — нерозчинні у воді сполуки, і у зв'язку з цим синтез ПАР мікроорганізмами можна розглядати як життєво важливу функцію, а саме — емульгування важкодоступних субстратів і переведення у форму, доступну для засвоєння. З цього погляду біо-ПАР можна розглядати як первинні метаболіти. Проте, крім вуглеводнів, як субстрати для синтезу ПАР можуть бути використані і водорозчинні сполуки (глюкоза, етанол). У таких випадках утворення ПАР не є життєво необхідною функцією, і їх можна розглядати як вторинні метаболіти. Разом з тим для мікробних ПАР, так само як і для екзополісахаридів, характерним є досягнення максимальної швидкості їх синтезу у стаціонарній фазі росту продуцентів. На основі

цієї ознаки більшість дослідників відносить мікробні ПАР до вторинних метаболітів.

Незважаючи на різні підходи і погляди щодо належності продуктів мікробного синтезу до первинних чи вторинних метаболітів, на сьогодні у більшості мікробіологів, фізіологів і біотехнологів сформувалася досить стійка позиція, згідно з якою до первинних метаболітів слід відносити амінокислоти, органічні кислоти і вітаміни, а до вторинних — антибіотики, екзополісахариди, ПАР, токсини, лектини. Ферменти мікроорганізмів можуть належати як до первинних, так і до вторинних метаболітів.

5.3.2. Біосинтез органічних кислот

5.3.2.1. Утворення оцтової кислоти. Усім оцтовокислим бактеріям притаманна здатність утворювати кислоти неповним окисненням цукрів або спиртів.

Оцтовокислі бактерії — це грамнегативні палички з перитрихально (*Acetobacter*) чи полярно (*Gluconobacter*) розміщеними джгутиками, які здатні до деякої рухливості. Характеризуються високою стійкістю до кислот. У природних умовах вони, як правило, існують на рослинах. Серед оцтовокислих бактерій розрізняють групи *peroxydants* і *suboxydants*. Група *peroxydants* — організми, які накопичують кислоту тільки як проміжний продукт. У організмів *suboxydants* оцтова кислота не піддається подальшому окисненню. Між цими двома групами існує багато проміжних форм, здатних окиснювати оцтову кислоту дуже повільно. Типовими представниками групи *suboxydants* є *Gluconobacter suboxydants* і *Acetobacter suboxydants*. До групи *peroxydants* належать *A. aceti*, *A. pastorianum*, *A. xylinum*.

Оцтовокислі бактерії утворюють оцтову кислоту у процесі росту на середовищі з етанолом. Етанол окиснюється НАД⁺-залежними алкоголь- та ацетальдегіддегідрогеназами з утворенням ацетату та двох молекул НАДН. Утворений НАДН використовується для одержання АТФ у дихальному ланцюгу. На рис. 5.8 показано метаболічну ситуацію, характерну для *Gluconobacter suboxydants*. У цих бактерій ацетил-КоА не може бути окиснений у циклі трикарбонових кислот. Хоча слід зазначити, що нездатність до окиснення ацетил-КоА зумовлена невтратою ЦТК як такого. Насправді, у *Gluconobacter suboxydants* виявлена активність *цитратсинтази*, *цис-аконітази*, *ізоцитратдегідрогенази*, проте ці ферменти використовуються для синтезу глутамату. 2-Оксоглутуратдегідрогеназа у них відсутня. Група *suboxydants* позбавлена також *ізоцитратліази* і *малатсинтази* (ферментів гліоксилатного циклу), і природа анаплеротичної послідовності, необхідної для утворення оксалоацетату і фосфоенолпірувату, у цих бактерій досі не встановлена.

Інші оцтовокислі бактерії (*Acetobacter aceti*, *A. xylinum*, *A. peroxydants*) відрізняються від *G. suboxydants* тим, що в умовах повного вичерпання етанолу, вони використовують накопичений ацетат і окиснюють його до CO₂. Швидкість такого окиснення ацетату дуже невисока у *A. aceti* і *A. xylinum* і помірна у *A. peroxydants*. У цих видів функціонує повний цикл трикарбонових кислот.



Рис. 5.8. Схематичне зображення метаболізму у *Gluconobacter suboxydans*.

Деякі реакції ЦТК є біосинтетичними, цикл у цілому не розривається. Реакції утворення оксалоацетату невідомі

Крім етанолу, оцтовокислі бактерії окиснюють велику кількість інших спиртів до відповідних кислот і кетонів:

Пропанол → Пропіонат.

Ізопропанол → Ацетон.

Гліцерол → Діоксиацетон.

Глюкоза → Глюконат.

Глюконат → 5-Кетоглюконат.

Ці організми нездатні до синтезу катаболічних ферментів, необхідних для високоактивного розщеплення цих субстратів. У результаті кислоти й спирти виділяються у середовище. Оцтовокислі бактерії характеризуються наявністю піролохінолінхінон (ПХХ)-залежної глюкозодегідрогенази.

Особливий інтерес викликає здатність оцтовокислих бактерій окиснювати *D*-сорбітол до *L*-сорбози. Сорбоза потрібна у великих кількостях для синтезу вітаміну С.

5.3.2.2. Утворення органічних кислот грибами. Для грибів характерним є окиснювальний тип метаболізму. Та це не означає, що вони нездатні до анаеробного розщеплення вуглеводів, тобто не можуть їх

зброджувати (спиртове бродіння здійснюється якраз дріжджами!), але в анаеробних умовах тривалий ріст грибів неможливий.

У природних місцях існування грибів ніколи не накопичуються проміжні продукти їх життєдіяльності. За браком поживних речовин гриби одержують максимум енергії та утворюють клітинні речовини за рахунок повного окиснення та асиміляції субстратів. У лабораторних і промислових умовах для синтезу органічних кислот грибам створюють умови, які «дезорганізують» їх метаболізм. Такими умовами є надлишок вуглеводного субстрату та вилучення з поживного середовища деяких мікроелементів (залізо, марганець, мідь, магній, калій, кальцій).

Відомо, що грибам притаманна потужна гліколітична система. У «вузьких місцях» метаболічних шляхів відбувається накопичення проміжних продуктів, які прямо чи після незначних хімічних модифікацій виділяються у середовище. Слід зазначити, що найбільші відхилення в обміні речовин виникають за надлишку субстрату. У багатьох випадках достатньо видалити який-небудь необхідний мікроелемент, щоб проміжні продукти почали накопичуватися у середовищі.

Глюконову кислоту утворюють аспергіли і пеніцили. Глюконова кислота є продуктом ферментативного окиснення глюкози *глюкозооксидазою* (рис. 5.9). У *Aspergillus niger* цей процес може відбуватися з високим виходом (до 95 %) навіть у 30—35%-х розчинах глюкози за умови нейтралізації кислоти. Для регуляції рН використовують їдкий натр, тому глюконову кислоту одержують у вигляді глюконату натрію.

Глюкозооксидаза є ферментом, що містить як простетичну групу ФАД. У процесі окиснення глюкози під дією цього ферменту як проміжний продукт утворюється глюконолактон, який далі спонтанно або за допомогою іншого ферменту — *глюконолактонази* — приєднує воду і перетворюється на глюконову кислоту (див. рис. 5.9). Відновлена глюкозооксидаза переносить водень на кисень повітря з утворенням перекису водню, який далі під дією каталази може розщеплюватися на воду і кисень.

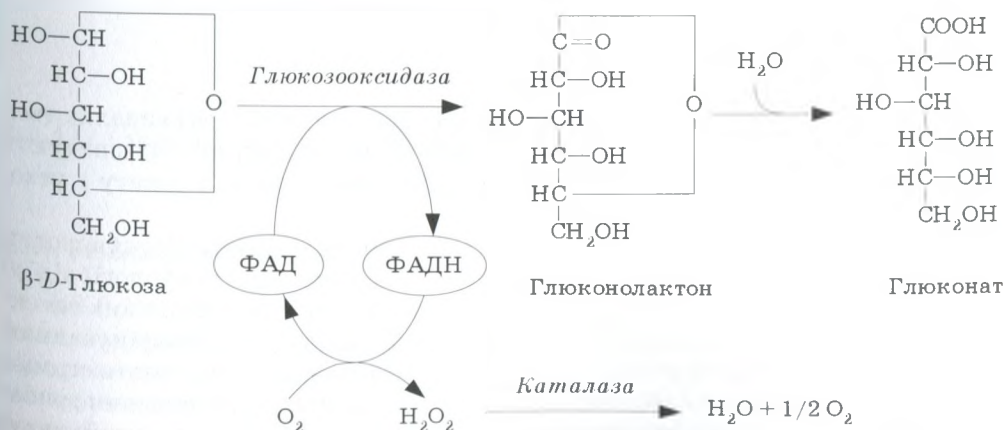


Рис. 5.9. Утворення глюконової кислоти з глюкози

Механізм утворення кислот у грибів. В утворенні різних кислот з глюкози беруть участь реакції циклу трикарбонових кислот (рис. 5.10).

Яблучна (малат), фумарова, бурштинова (сукцинат), лимонна (цитрат) кислоти утворюються безпосередньо у ЦТК і виділяються в середовище. Щавлева кислота (оксалат) утворюється в результаті гідролізу оксалоацетату (фермент *оксалоацетатгідролаза*). Попередником ітаконової кислоти є *цис*-аконітат, його декарбоксилювання приводить до утворення ітаконової кислоти.

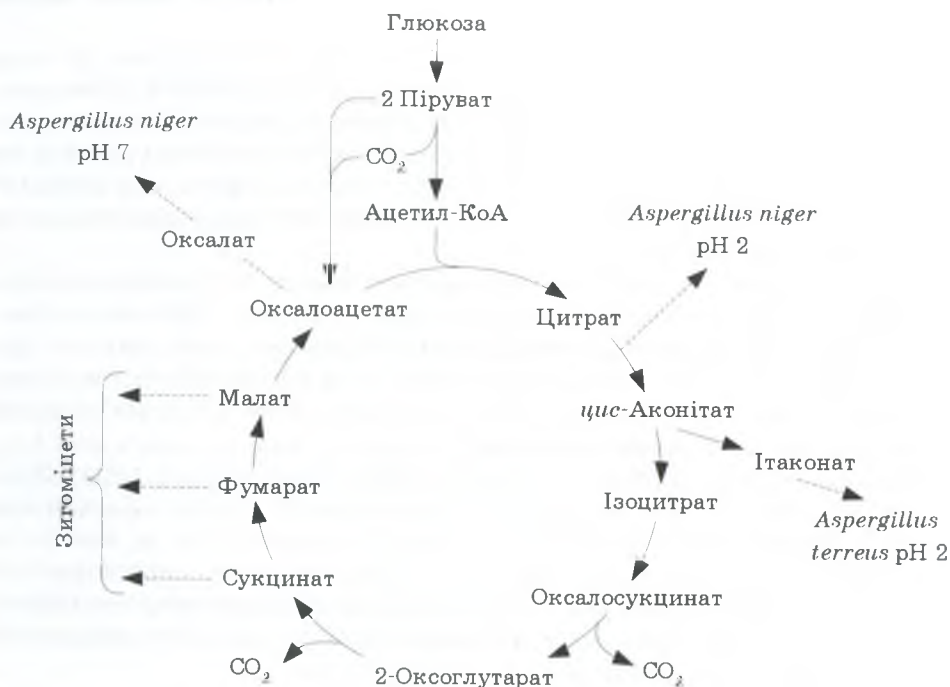


Рис. 5.10. Утворення органічних кислот у грибів

Якщо проміжні продукти (у даному разі органічні кислоти) видаляються з циклу, то повинні функціонувати анаплеротичні реакції, які забезпечують ЦТК оксалоацетатом. Такою реакцією є карбоксилювання пірувату з утворенням оксалоацетату.

Виробництво лимонної кислоти за участю грибів — давній біотехнологічний процес. Воно було налагоджено у 1893 р. Розвиток цієї технології відбувався у тісному взаємозв'язку з розробкою багатьох фундаментальних аспектів мікробіології. Спочатку основні проблеми були пов'язані з інфікуванням процесу. Було встановлено, що запобігти цьому можна, якщо вести процес за дуже низьких значень рН, і це майже ніяк не впливає на утворення грибами кислоти. Перші варіанти процесу базувалися на поверхневому культивуванні грибів, проте у 1950 р. було освоєно глибинне культивування. Про-

Властивості і використання амінокислот

Амінокислота	Використання і властивості
Аланін	Підсилювач смаку й аромату
Аргінін	Лікування захворювань печінки
Аспарагін	Діуретик
Аспарагінова кислота	Підсилювач смаку й аромату, синтез підсолоджувачів
Валін	Розчини для внутрішньовенних ін'єкцій
Гістидин	Лікування виразок, антиоксидант
Гліцин	Синтез підсолоджувачів
Глутамін	Лікування виразок
Глутамінова кислота	Підсилювач смаку й аромату
Ізолейцин	Розчини для внутрішньовенних ін'єкцій
Лейцин	Розчини для внутрішньовенних ін'єкцій
Лізин	Кормова і харчова добавка
Метіонін	Кормова добавка
Пролін	Розчини для внутрішньовенних ін'єкцій
Серин	Косметична промисловість
Тирозин	Розчини для внутрішньовенних ін'єкцій, попередник <i>L-DOPA</i>
Треонін	Кормова добавка
Триптофан	Розчини для внутрішньовенних ін'єкцій, антиоксидант
Фенілаланін	Інфузії, синтез підсолоджувачів
Цистеїн	Виробництво хліба, лікування бронхіту, антиоксидант

Щорічно у світі виробляється близько 2 млн т амінокислот, з яких половина загального обсягу виробництва припадає на *L*-глутамінову кислоту, що використовується для одержання глутамату натрію — добре відомого підсилювача смаку і аромату.

Амінокислоти мають велике значення для збалансованого білкового харчування. Деякі харчові та кормові продукти не містять у своєму складі необхідної кількості незамінних амінокислот, зокрема лізину. Для ліквідації такого дисбалансу незамінні амінокислоти використовують у чистому вигляді.

У промисловому масштабі амінокислоти одержують або екстракцією з білкових гідролізатів, або хімічним синтезом, або як продукти метаболізму грампозитивних бактерій, які належать до родів *Corynebacterium* і *Brevibacterium*. Суттєвою перевагою мікробного одержання амінокислот є те, що у цьому разі синтезуються біологічно активні *L*-форми амінокислот.

5.3.3.2. Особливості синтезу амінокислот мікроорганізмами. Більшість мікроорганізмів здатні синтезувати *de novo* всі 20 амінокислот, з яких будуються білки. Вуглецеві скелети амінокислот будуються з проміжних продуктів обміну, аміногрупи вводяться шляхом *прямого амінування* або *трансамінування* (див. підрозділ 5.2.2).

Всі необхідні для синтезу білків 20 амінокислот утворюються з певних метаболічних попередників (див. *рис. 5.3*). Субстратами для синтезу амінокислот є кілька сполук — піруват, оксалоацетат, α -кетоглутарат, 3-фосфогліцерат, фосфоенолпіруват, еритрозо-4-фосфат та 5-фосфорибозил-пірофосфат.

Регуляція синтезу амінокислот. Амінокислоти є первинними метаболітами, необхідними для процесів конструктивного метаболізму, тому досягти їх надсинтезу можна лише, використовуючи *ауксотрофні* та *регуляторні мутанти*. Це пояснюється тим, що контроль за швидкістю біосинтезу кожної амінокислоти здійснюється за типом зворотного зв'язку як на рівні генів, відповідальних за синтез відповідних ферментів (репресія), так і на рівні самих ферментів, здатних під дією надлишку утворюваної кислоти змінювати свою активність (ретроінгібування). Такий контроль виключає перевиробництво (надсинтез) амінокислот, і їх виділення з клітини можливе лише у мікроорганізмів з порушеною системою регуляції.

Регуляція синтезу ферментів. Утворення анаболічних ферментів (у даному разі — ферментів, що беруть участь у синтезі амінокислоти) регулюється шляхом репресії кінцевим продуктом. З погляду економії вигідно, щоб ферменти певного біосинтетичного шляху не синтезувались, якщо його кінцевий продукт є у середовищі. Тому за наявності такого кінцевого продукту (амінокислоти) або за його накопичення знижується швидкість синтезу всіх ферментів, специфічних для даного біосинтетичного шляху (*рис. 5.12*).

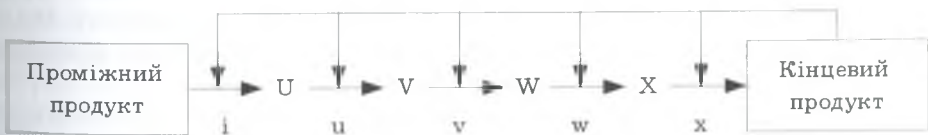


Рис. 5.12. Репресія синтезу ферментів кінцевим продуктом (схематичне зображення)

У розгалужених шляхах біосинтезу регуляція синтезу ферментів складніша. Прикладами можуть бути системи синтезу амінокислот («родина ароматичних амінокислот», «родина аспарагінової кислоти») (див. *рис. 5.3*). Ферменти, які містяться перед розгалуженням, піддані репресії всіма кінцевими продуктами, що діють одночасно (*мультивалентна репресія*). Синтез цих ферментів пригнічується тільки тоді, коли в середовищі є всі кінцеві продукти; якщо ж додавати їх окремо, ніякого ефекту не спостерігається.

Регуляція активності ферментів. Цей тип регуляції властивий, як правило, тільки ключовим ферментам клітинного метаболізму. Каталітична активність ферментів, які беруть участь у тому чи іншому біосинтетичному

шляху, може змінюватись: підвищуватись під дією *позитивного ефектора* або знижуватись під дією *негативного ефектора*. У разі інгібування кінцевим продуктом (ретроінгібування) останній пригнічує активність першого ферменту, який бере участь у даному ланцюгу реакцій. Такий тип регуляції називається також *інгібуванням за типом зворотного зв'язку* (рис. 5.13).

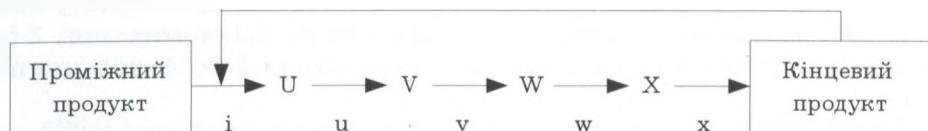


Рис. 5.13. Регуляція активності ферментів за типом зворотного зв'язку (схематичне зображення)

Регуляція активності ферментів на розгалужених шляхах біосинтезу. Особливі проблеми виникають у тих випадках, коли на перший етап біосинтезу діють два чи більше кінцевих продуктів. Якщо у якійсь гіпотетичній послідовності реакцій А перетворюється на Е, G і Н, то перший етап А → В буде пригнічуватись і у разі накопичення лише одного кінцевого продукту (наприклад Н). Проте це зумовить також зниження синтезу двох інших продуктів — G і Е.



Подібні проблеми, що виникають під час регуляції розгалужених шляхів біосинтезу, у різних організмів, очевидно, вирішуються по-різному. На сьогодні виявлено кілька різних типів регуляції для ферментів, що функціонують на розгалужених або паралельних шляхах метаболізму.

1. Перший етап каталізується кількома ізоферментами (ізозимами), кожен з яких регулюється певним кінцевим продуктом.

2. Перший етап каталізується одним ферментом, при цьому можливі різні варіанти: а) для інгібування загального першого етапу всі кінцеві продукти повинні бути присутні у надлишку; б) кожен із кінцевих продуктів діє незалежно від інших (*кумулятивне інгібування*), причому загальне пригнічення може перевищувати суму окремих ефектів (*кооперативне інгібування*).

Так, перший етап біосинтезу амінокислот метіоніну, лізину, треоніну та ізолейцину («аспартатна родина» амінокислот, або «родина аспарагінової кислоти») каталізують кілька ізозимів (рис. 5.14).

У *Escherichia coli* в реакції



беруть участь три паралельно функціонуючі ферменти *аспартаткінази* (I, II і III), активність яких регулюється різними кінцевими продуктами.

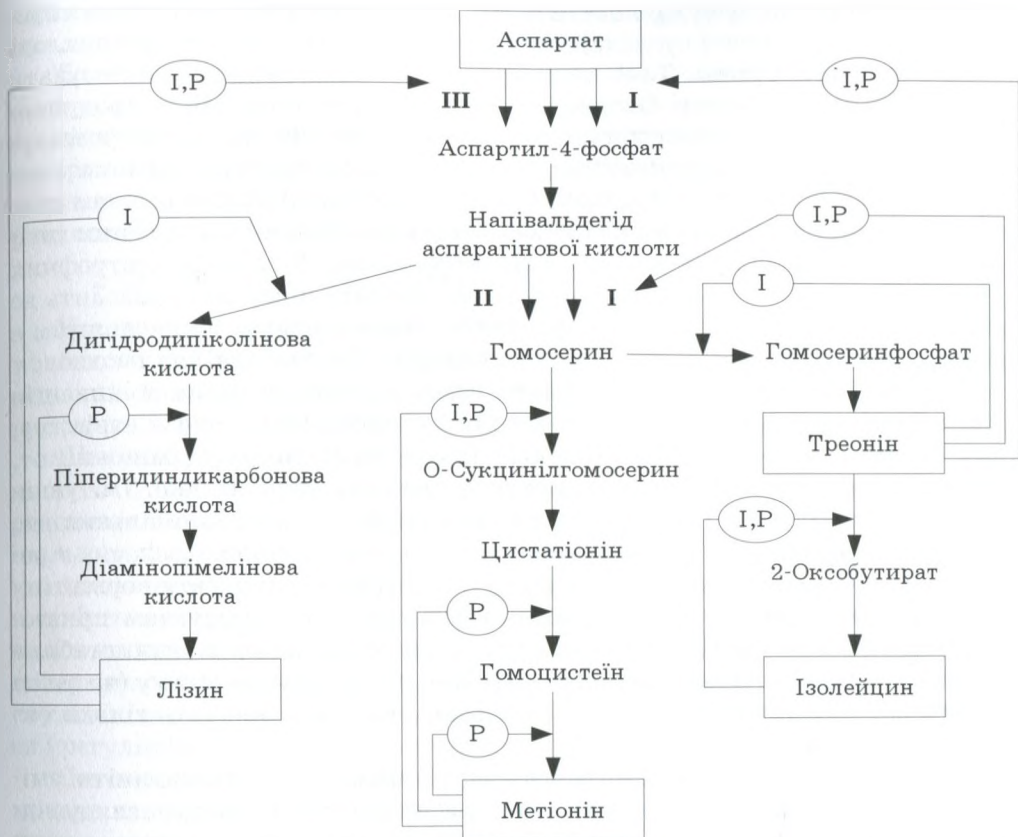


Рис. 5.14. Регуляція біосинтезу амінокислот аспаратної родини у *Escherichia coli*:

I — дії кінцевих продуктів, що інгібують ферментативну реакцію; P — дії кінцевих продуктів, що репресують синтез даного ферменту

Аспараткіназу I і гомосериндегідрогеназу I інгібуює треонін. Аспараткіназа III регулюється лізином. Аспараткіназа II не піддана алостеричній регуляції. У регуляції аспараткіназ беруть участь ще й додаткові механізми, причому у кожному разі перший фермент, специфічний для даного шляху біосинтезу, інгібуюється кінцевим продуктом цього шляху.

Подібна схема регуляції існує і для «родини ароматичних амінокислот» (див. рис. 5.4). Перший етап біосинтезу фенілаланіну, тирозину, триптофану і 4-амінобензойної кислоти полягає в реакції еритрозо-4-фосфату з ФЕП, в результаті якої утворюється 3-дезоксид-арабіногептулозо-7-фосфат (ДАГФ). У *E. coli* є три ДАГФ-синтази. Одна з них контролюється тирозином, друга — фенілаланіном, а третій, малоактивний фермент, не інгібуюється. Додаткова регуляція у цьому разі здійснюється за принципом ретроінгібування (негативного зворотного зв'язку).

5.3.3.3. Методи одержання штамів — продуцентів амінокислот. *Ауксотрофні мутанти* відбирають на селективних середовищах після обробки клітинної суспензії фізичними (УФ-опромінення, наприклад) і хімічними факторами. Такі ауксотрофні мутанти нездатні синтезувати якусь певну амінокислоту. Одержання ауксотрофних мутантів — продуцентів амінокислот — можливе тільки для мікроорганізмів, які мають розгалужений шлях біосинтезу, щонайменше двох амінокислот, утворюваних з одного попередника (наприклад, пролін, лізин, див. *рис. 5.3*). Їх біосинтез контролюється на рівні першого ферменту загальної ділянки узгодженим інгібуванням кінцевими продуктами (ретроінгібування). У таких ауксотрофних мутантів надлишок однієї амінокислоти за дефіциту іншої не призводить до пригнічення активності першого ферменту. Амінокислота, за якою штам є ауксотрофним, повинна добавлятися у середовище в обмеженій кількості.

Регуляторні мутанти відбирають серед культур, стійких до аналогів цільової амінокислоти (антиметаболітів). Антиметаболіти, які є структурними аналогами нормальних кінцевих продуктів біосинтезу (амінокислот, пуринів, піримідинів тощо) спричиняють бактеріостатичну дію. Імітуючи кінцевий продукт, вони, з одного боку, порушують синтез нормальних метаболітів, з другого — включаються в білки або нуклеїнові кислоти, в результаті чого утворюються макромолекули, нездатні виконувати нормальну функцію. Інгібування таким «несправжнім» кінцевим продуктом призводить до зупинення росту. Якщо на агаризоване середовище з антиметаболітом висіяти газонем популяцію (10^8 — 10^9 клітин) вихідного штаму (часто це ауксотроф), то здатність до росту і утворення колоній виявлять тільки окремі стійкі мутанти.

В основі такої стійкості до антиметаболітів можуть бути різноманітні зміни фізіологічних властивостей клітини, зумовлені мутаціями. З погляду відбору мутантів з порушеною регуляцією інтерес викликають такі два типи мутацій:

1. Мутації, що приводять до «алостеричної нечутливості». У цьому разі ні метаболіт, ні антиметаболіт не можуть пригнітити активність першого (алостеричного) ферменту даного шляху біосинтезу. В результаті утворення відповідного кінцевого продукту не регулюється.

2. Мутації, що приводять до конститутивної дерепресії. Наслідком такої мутації є неконтрольоване утворення ферментів, що беруть участь у синтезі кінцевого продукту.

Дерепресія синтезу анаболічних ферментів і втрата здатності підпорядковуватися алостеричному інгібуванню часто приводить до «перевиробництва» і виділення у середовище кінцевого продукту даного біосинтетичного шляху (метаболіта, у даному разі — амінокислоти).

Останнім часом для одержання надсинтетиків амінокислот використовують методи *генної інженерії*. Проте нині тільки створюються вектори і методи трансформації для грампозитивних бактерій типу *Corynebacterium* і *Brevibacterium*. Більшість плазмідних векторів з широким колом хазяїв реплікуються тільки у клітинах грамотригативних бактерій.

5.3.3.4. Біосинтез *L*-глутамінової кислоти. У 1957 р. японець Кіносіта виділив *Corynebacterium glutamicum* і цим самим відкрив нову

епоху в промисловому використанні процесів неповного окиснення. Ця бактерія є продуцентом *L*-глутамінової кислоти, яка була першою амінокислотою, одержаною шляхом мікробного синтезу.

Безпосереднім метаболічним попередником біосинтезу глутамінової кислоти є 2-оксоглутарат. У корінебактерій катаболізм глюкози здійснюється за гліколітичним шляхом, далі у циклі трикарбонових кислот через цитрат утворюється 2-оксоглутарат. Синтез глутамінової кислоти відбувається в результаті ферментативного відновлювального амінування 2-оксоглутарату за рахунок НАД⁺ або НАДФ⁺-залежної *глутаматдегідрогенази*:



Утворення глутамату залежить від накопичення 2-оксоглутарату, зумовленого відсутністю у бактерій 2-оксоглутаратдегідрогенази. Якщо в середовищі немає іонів амонію, виділяється 2-оксоглутарат. Анаплеротичною реакцією, яка постачає ЦТК оксалоацетатом, є карбоксилування пірувату.

Штами *Corynebacterium glutamicum* та *Brevibacterium divaricatum* виділяють *L*-глутамінову кислоту за певних фізіологічних умов — ліміті в середовищі біотину. Концентрація біотину (1—5 мкг/л) в середовищі є вирішальним фактором для синтезу глутамату. За такої концентрації біотину в клітинній мембрані відбуваються структурні та функціональні зміни, проникність мембрани для глутамінової кислоти збільшується, амінокислота виділяється з клітин. Аналогічна дія характерна для деяких антибіотиків і поверхнево-активних речовин. У результаті інтенсивного виділення з клітин глутамінової кислоти її внутрішньоклітинна концентрація різко знижується і регуляція синтезу кінцевим продуктом значно послаблюється.

Основна селекційна робота з продуцентами цієї амінокислоти була спрямована на одержання ауксотрофних мутантів з низькою активністю 2-оксоглутаратдегідрогенази, регуляторних мутантів, які характеризуються слабкою чутливістю глутаматдегідрогенази до інгібування кінцевим продуктом, і мутантів, здатних синтезувати глутамінову кислоту за підвищеної концентрації біотину (до 30 мкг/л). Такі штами необхідні у зв'язку з використанням у виробництві м'ясних середовищ, що містять високі концентрації біотину. Один із таких мутантів здатен накопичувати у культуральній рідині понад 50 г/л глутамінової кислоти. При цьому м'яса — єдине джерело вуглецю і енергії і немає потреби у внесенні у середовище поверхнево-активних речовин чи інших сполук, що підвищують проникність мембрани.

Японські дослідники проблему одержання глутамінової кислоти на м'ясних середовищах вирішили по-іншому — одержання мутантів, у яких накопичення амінокислоти контролюється температурним режимом. Температурочутливі мутанти характеризуються порушеннями структури клітинної мембрани, що проявляються за підвищення температури до 40 °С, що в свою чергу супроводжується виділенням глутамінової кислоти з клітини.

5.3.3.5. Біосинтез *L*-проліну. Пролін належить до родини глутамінової кислоти і утворюється в результаті АТФ-залежного відновлення останньої з подальшою циклізацією напівальдегіду глутамінової кислоти і перетворення його на пролін шляхом відновлення.

Використання прототрофних мутантів *Corynebacterium glutamicum* дає змогу одержати понад 25 г/л проліну. Для вирощування таких мутантів використовують середовища з підвищеним вмістом біотину (не 5 мкг/л, як для утворення глутамінової кислоти, а 1000 мкг/л). У таких умовах глутамінова кислота не виділяється з клітин, а перетворюється на пролін.

Ауксотрофні мутанти (гістидинові, метіонінові, лейцинові, ізолейцинові) бактерій роду *Brevibacterium* синтезували до 20—25 г/л проліну. У таких мутантів інгібовані або репресовані активності ключових ферментів відповідних шляхів, що створює надлишок у клітині як вуглецевих попередників, так і АТФ, яка підвищує активність *глутаматкінази* — першого фермента біосинтезу проліну. Підвищення виходу проліну у таких ауксотрофів можливе шляхом відбору регуляторних мутантів, резистентних до сульфогуанідину і 3,4-дегідропроліну. Такі мутанти здатні синтезувати понад 40 г/л проліну. Слід зазначити, що всі ауксотрофні мутанти потребують високого вмісту у середовищі біотину і підвищеної концентрації іонів амонію.

Генно-інженерні штами *E.coli* здатні синтезувати до 30 г/л проліну. Ці штами були одержані так. Спочатку одержували мутантні штами, стійкі до аналогів проліну, які використовували як донор ДНК. Далі проліновий оперон, що містить три гени, клонували на плазміді і гібридну плазмідну трансформували у реципієнтний штам.

5.3.3.6. Біосинтез L-лізину. У бактерій лізин синтезується через діамінопімелінову кислоту; цей шлях починається з аспарагінової кислоти (рис. 5.15). Крім лізину, за розгалуженою схемою біосинтезу з аспартату синтезуються також метіонін, треонін та ізолейцин.

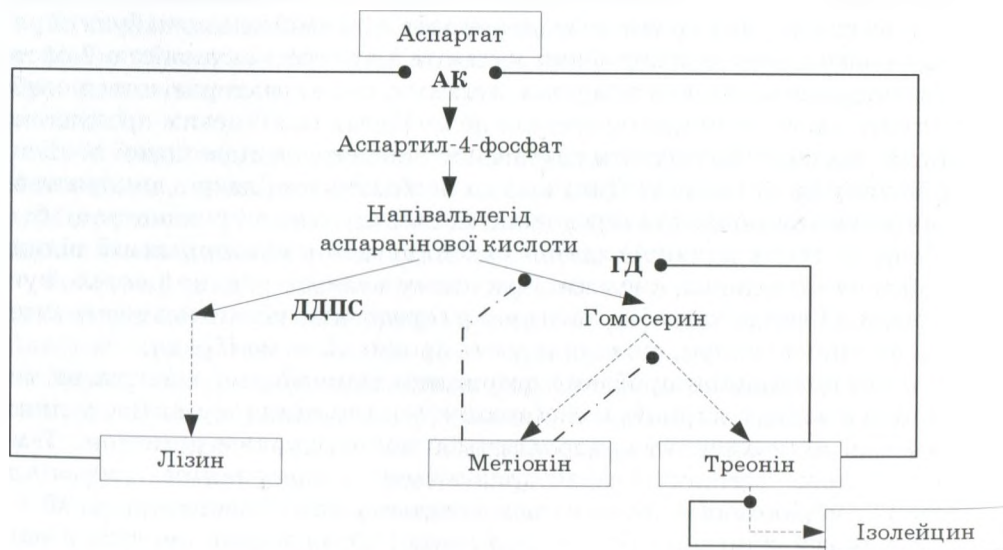


Рис. 5.15. Регуляція біосинтезу амінокислот аспартатної родини у бактерій родів *Corynebacterium* і *Brevibacterium*:

ферменти: АК — аспартаткіназа; ГД — гомосериндегідрогеназа; ГК — гомосеринкіназа; ДДПС — дигідропіколінатсинтеза; — — — — — інгібування активності ферментів; — • — — — репресія синтезу ферментів

Контроль біосинтезу амінокислот аспартатної родини здійснюється на рівні першого ферменту — *аспартаткінази* (АК). Продуценти лізину — *Corynebacterium glutamicum* і *Brevibacterium flavum* — мають одну аспартаткіназу, активність якої регулюється шляхом узгодженого інгібування за типом зворотного зв'язку треоніном і лізином (див. рис. 5.15). Синтез треоніну в свою чергу залежить від активності *гомосериндегідрогенази* (ГД), яка каталізує перетворення проміжного продукту гомосерину на треонін. Синтез лізину каталізується *дигідродипіколінатсинтетазою* (ДДПС). Загальний попередник синтезу лізину та треоніну — напівальдегід аспарагінової кислоти — у диких штамів корінебактерій використовується переважно на синтез треоніну, оскільки активність ГД у 15 разів вища за ДДПС-активність, тобто фактично біосинтез лізину починається після насичення клітини треоніном, метіоніном та ізолейцином. Отже, для надсинтезу лізину необхідно заблокувати біосинтез цих метаболітів, що можливо шляхом пригнічення активності ГД або *гомосеринкінази* (ГК).

У промисловості для одержання лізину використовуються ауксотрофні за гомосерином і треоніном мутанти. Ауксотрофи за треоніном менш продуктивні, тому що частина загального попередника йде на синтез гомосерину, оскільки у них зберігається активність ГД. Гомосерин і треонін під час вирощування таких мутантів повинні бути внесені в середовище екзогенно.

У метіонін- і треонінчутливих мутантів активність ГД знижена у 20—50 разів. ГД (хоч і з невисокою активністю) забезпечує потребу клітини у гомосерині, тому його не потрібно вносити в середовище.

Аналогорезистентні прототрофні мутанти одержують, використовуючи як селективний агент аналог лізину — аміноетилцистеїн (АЕЦ), який разом з треоніном інгібує ріст корінебактерій. Стійкі до АЕЦ і треоніну мутанти мають генетично змінену АК, нечутливу до узгодженого інгібування лізином і треоніном.

Відомі мутанти, які суміщають аналогорезистентність і ауксотрофність, здатні синтезувати на м'ясних середовищах до 100—150 г/л лізину.

5.3.3.7. Біосинтез L-треоніну. Треонін синтезується за тією самою схемою, що й лізин. Продуцентами цієї амінокислоти є представники коріне- і ентеробактерій. Системи контролю біосинтезу амінокислот у цих бактерій принципово різні. У корінебактерій (див. рис. 5.15) регуляція здійснюється за принципом узгодженого інгібування, а це значить, що ауксотрофність за ізолейцином, метіоніном або лізином не може спричинити надсинтез треоніну, оскільки він пригнічує ГД, унеможливаючи цим власний надсинтез.

Єдиний шлях одержання продуцентів треоніну з представників корінебактерій — селекція регуляторних мутантів, у яких ГД стала б нечутливою до треоніну. Як селективні агенти використовують аналоги треоніну, найчастіше β -оксинорвалін, 2-аміно-3-оксивалеріанову кислоту (АОВ). Мутанти *Brevibacterium flavum*, стійкі до АОВ, як правило, мають дві регуляторні мутації, що порушують ретроінгібування як ГД, так і АК. У таких штамів у середовище одночасно виділяється і треонін, і лізин. З дуже низькою частотою вдається виділити мутанти, у яких десенсибілізована тільки ГД і які накопичують 10—12 г/л тільки треоніну (без лізину).

Система регуляції біосинтезу амінокислот у ентеробактерій базується на принципі диференційованої регуляції ізоферментами (рис. 5.16). У *E.coli* виявлено три аспартаткінази і дві гомосериндегідрогенази. AK_1 інгібується і репресується треоніном, AK_2 репресується метіоніном, AK_3 інгібується і репресується лізином. Аналогічно AK_1 і AK_2 регулюється активність у $ГД_1$ і $ГД_2$. За такої системи регуляції одержання мутантів-продуцентів треоніну можливе лише за введення мутацій ауксотрофності за амінокислотами, які є кінцевими продуктами біосинтезу, тобто необхідно одержувати потрібні ауксотрофи. Такий мутант *E.coli* (ДАП-, метіонін-, ізолейцинзалежний) синтезував 15–20 г/л треоніну за наявності у середовищі попередника синтезу лізину ДАП, метіоніну та ізолейцину у кількостях, що забезпечують мінімальний ріст. Це ускладнює підбір виробничих середовищ для таких мутантів.

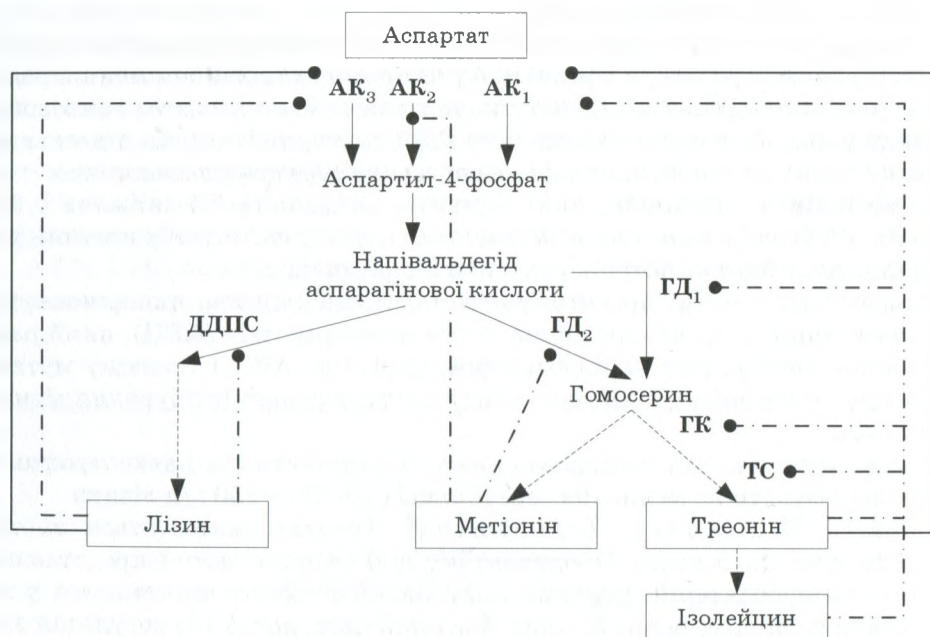


Рис. 5.16. Схематичне зображення системи регуляції амінокислот аспартатної родини у *Escherichia coli*:

ферменти: AK --- аспартаткіназа; $ГД$ --- гомосериндегідрогеназа; $ГК$ --- гомосеринкіназа; **ДДПС** --- дигідродипіколінатсинтетаза; **ТС** --- треонінсинтаза; --- інгібування активності ферментів; - - - - - репресія синтезу ферментів

Для *E. coli* встановлено, що гени, які кодуєть синтез AK_1 , $ГК$ і **треонінсинтази** (**ТС**), складають треоніновий оперон, який полівалентно репресується треоніном та ізолейцином. Оперонна організація структурних генів дає змогу використовувати *E. coli* для одержання надпродуцентів треоніну методами генної інженерії.

На основі мутантів, одержаних із вихідного штаму *E. coli* K-12, отримано надпродуцент треоніну, який не потребує внесення будь-яких амінокислот у середовище. Етапи конструювання цього надсинтетика такі:

1) селекція з аналогами й одержання мутацій, які знімають пригнічення синтезу надлишком треоніну і запобігають деградації цієї амінокислоти у клітині (АОВ-резистентні мутанти);

2) введення мутації, що забезпечує загальноклітинну позитивну регуляцію надсинтезу амінокислот (одноступінчатий відбір із використанням ніт-розогуанідину як мутагену);

3) ампліфікація генів треонінового оперону на багатокопійній плазміді і трансформація гібридної плазмід у реципієнтний штам.

Це дало змогу значно підвищити синтез ферментів, що кодуються треоїновим опероном. Концентрація треоїну у культуральній рідині досягала понад 50 г/л.

5.3.3.8. Біосинтез ароматичних амінокислот. Узагальнена спрощена схема біосинтезу ароматичних амінокислот у мікроорганізмів була наведена раніше (див. *рис. 5.4*). Еритрозо-4-фосфат і фосфоенолпіруват конденсуються з утворенням C_7 -сполуки, яка піддається циклізації. Загальним проміжним продуктом синтезу ароматичних амінокислот є *хоризмат*. У цій точці біосинтетичний шлях розгалужується на два: 1) утворення триптофану через антранілат; 2) утворення тирозину та фенілаланіну через префенат (*рис. 5.17*). Продуценти ароматичних амінокислот одержуються серед представників трьох родин: корінебактерій (*Brevibacterium flavum*, *Corynebacterium glutamicum*), бацил (*Bacillus subtilis*) і ентеробактерій (*E. coli*). Для цих мікроорганізмів регуляція загальної ділянки шляху зосереджена на першому ферменті — 3-дезоксид-арабіногептулозо-7-фосфатсинтази (ДАГФ-синтаза), проте механізми регуляції активності цього ферменту різняться.

У корінебактерій активність ДАГФ-синтази піддана узгодженому інгибуванню фенілаланіном і тирозином (*рис. 5.18*). Як побічний продукт утворюється індол, який перетворюється на триптофан під дією *триптофансинтази*.

Такий тип регуляції передбачає, що у процесі селекції продуцентів ароматичних амінокислот на першому етапі повинні бути виділені штамми-ауксотрофи, у яких загальний попередник — хоризмова кислота — витрачалася б в основному на синтез цільового продукту. У роботі з селекції продуцентів триптофану використовують ауксотрофні за фенілаланіном і тирозином мутанти; під час одержання продуцентів фенілаланіну проводять роботу з ауксотрофами за тирозином. Подальше підвищення продуктивності таких мутантів досягається одержанням на їх основі регуляторних мутантів, у яких були б десенсибілізовані перші ферменти власної ділянки біосинтезу. Для продуцентів триптофану це можливо виділенням мутантів, резистентних до його аналогів (5-метилтриптофан, 6-фтортриптофан), у яких десенсибілізується *антранілатсинтетаза* (АС). Такі мутанти можуть здійснювати пряме перетворення глюкози на триптофан з виходом 10—12 г/л. Продуценти фенілаланіну, одержані шляхом багатоступінчатого відбору, стійкі до аналогів (*p*-фторфенілаланін, *p*-амінофенілаланін) синтезують на вуглеводнісних середовищах понад 20 г/л амінокислоти.

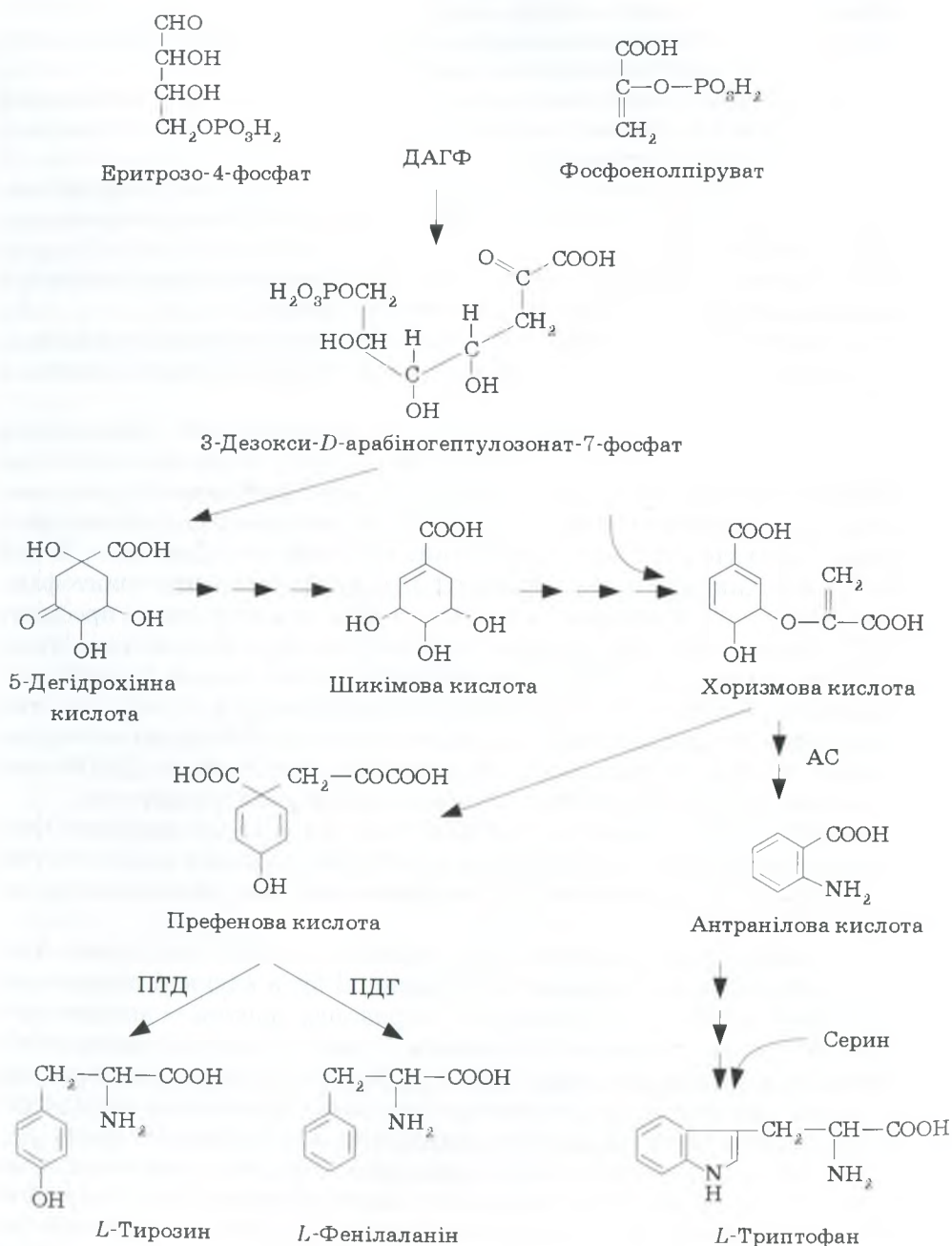


Рис. 5.17. Шляхи біосинтезу тирозину, фенілаланіну і триптофану:

ферменти: ДАГФ — 3-дезоксидарабіногептулозо-7-фосфатсинтаза; АС — антранілатсинтетаза; ПДГ — префенатдегідратаза; ПТД — претирозиндегідрогеназа

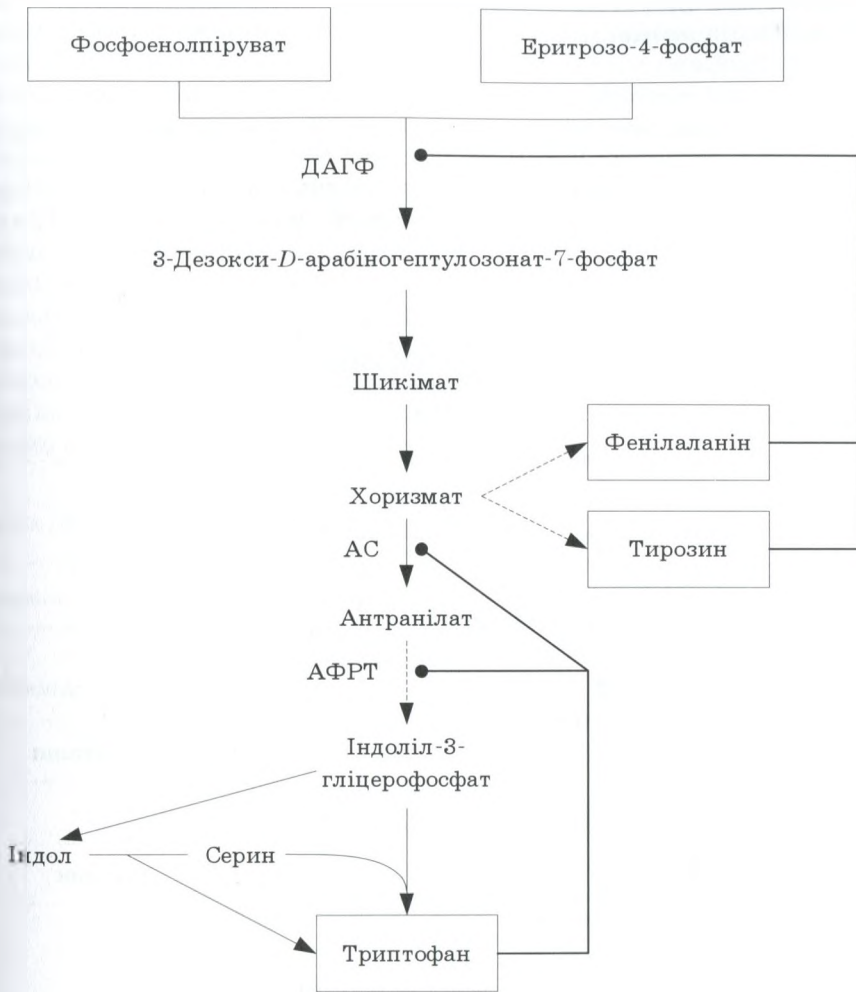


Рис. 5.18. Регуляція біосинтезу ароматичних амінокислот у *Corynebacterium glutamicum*:

Ферменти: ДАГФ — 3-деоксиарабіногептулозо-7-фосфатсинтаза; АС — антранілатсинтетаза; АФРТ — антранілатфосфорибозилтрансфераза; — — — інгібування активності ферментів.

Одержано позитивні результати щодо підвищення виходу триптофану у *C. glutamicum*. Для цього у клітини дикого типу була введена друга копія гена, що кодує антранілатсинтетазу — ферменту, що лімітує синтез триптофану. Підвищення синтезу триптофану досягалось також введенням у клітини *C. glutamicum* модифікованих генів трьох ферментів — 3-деоксиарабіногептулозо-7-фосфатсинтази, антранілатсинтетази і антранілатфосфорибозилтрансферази. Гени, що кодують ці ферменти, були піддані мутаціям так, що стали нечутливими до інгібування кінцевим продуктом (інгібування за типом зворотного зв'язку).

B. subtilis має одну ДАГФ-синтазу, синтез якої репресується тирозином і фенілаланіном, а активність пригнічується хоризмовою і префеновою кислотами (рис. 5.19).

Така складна система регуляції передбачає у процесі одержання продуцента триптофану введення багатьох мутацій, які приводять до дерепресії ДАГФ-синтази, десенсибілізації АС до інгібування триптофаном, дерепресії ферментів триптофанового оперону, десенсибілізації префенатдегідратази (ПДГ) фенілаланіном. Одержано мутант, який синтезує з глюкози 10—12 г/л триптофану.

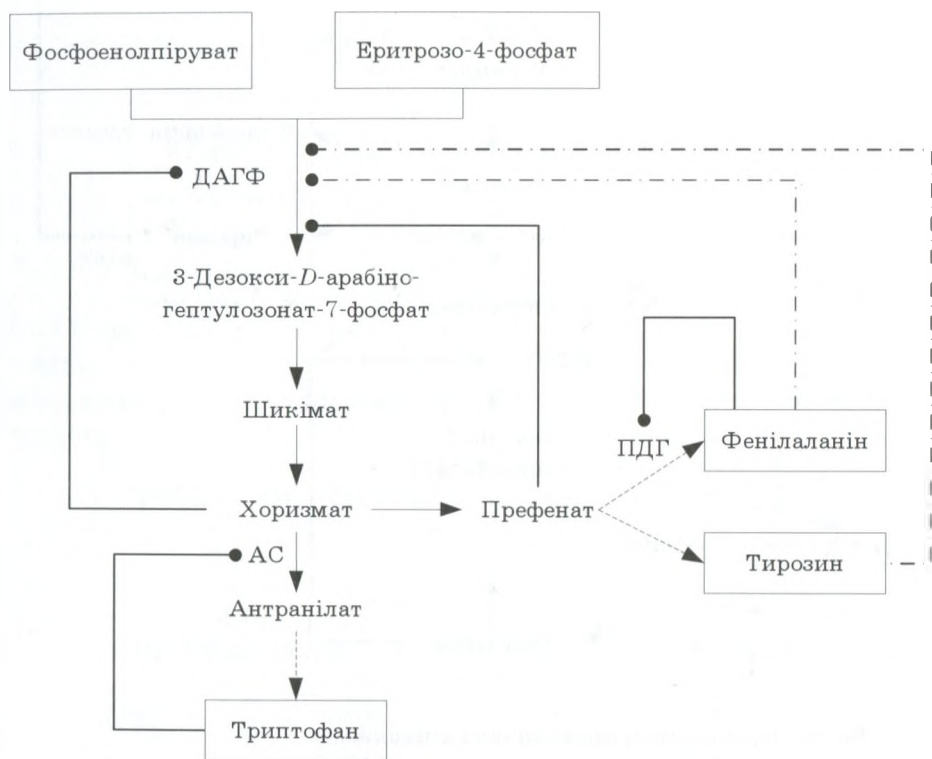


Рис. 5.19. Регуляція біосинтезу ароматичних амінокислот у *Bacillus subtilis*:

ферменти: ДАГФ — 3-дезоксидарабіногептулозо-7-фосфатсинтаза; АС — антранілатсинтаза; ПДГ — префенатдегідратаза; — — — — — інгібування активності ферментів; — • — — — — репресія синтезу ферментів

У *E. coli* ДАГФ-синтаза представлена системою з трьох ізозимів, які інгібуються своїми кінцевими продуктами — фенілаланіном, триптофаном, тирозином. Основний шлях одержання продуцентів цих амінокислот — виділення регуляторних мутантів, резистентних до аналогів відповідної амінокислоти. Проте високих концентрацій цільових продуктів такі мутанти

не утворюють. Регуляторні мутанти були використані як об'єкти для подальшої роботи з застосуванням методів генної інженерії. У результаті було одержано штам *E. coli*, здатний синтезувати 50 г/л фенолаланіну.

5.3.4. Біосинтез вітамінів

Вітаміни — група низькомолекулярних органічних речовин, які в дуже низьких концентраціях спричиняють сильну і різноманітну біологічну дію. У природі джерелом вітамінів є головним чином рослини та мікроорганізми. Менахінони та кобаламіни синтезуються виключно мікроорганізмами.

Мікробіологічним шляхом одержують ергостерин, вітамін B_{12} , вітамін B_2 , а також β -каротин — попередник вітаміну А (табл. 5.9). Крім того, мікроорганізми використовуються для виробництва каротиноїдів, а також як селективні окисники сорбіту в сорбозу у процесі виробництва вітаміну С (аскорбінової кислоти).

Таблиця 5.9. Вітаміни мікробного походження

Вітаміни	Хімічна природа	Продукенти
B_{12} (ціанкобаламін)	α - (5,6-Диметилбензимидазол)- кобамідціанід	<i>Propionibacterium shermanii</i> <i>Eubacterium limosum</i> (<i>Butyribacterium rettgerii</i>) <i>Nocardia rugosa</i> <i>Micromonospora purpureae</i> <i>Methanosarcina barkeri</i> <i>Clostridium thermoaceticum</i> <i>Pseudomonas denitrificans</i> <i>Bacillus circulans</i> <i>Rhodobacter capsulatus</i> <i>Rhodospirillum rubrum</i>
B_2 (рибофлавін)	7,8-Диметил-10-(1'-D-рибітил- ізоалоксазин)	<i>Eremothecium ashbyii</i> <i>Ashbyii gossypii</i> <i>Candida flaveri</i> <i>Mycocandida riboflavina</i> <i>Mycobacterium smegmatis</i> <i>Clostridium acetobutyricum</i>
Ергостерин (вихідний продукт для одержання вітаміну D_2)	Ергоста-5,7,22-триєн-3 β -ол	<i>Saccharomyces carlsbergensis</i> <i>Saccharomyces ellipsoideus</i> <i>Rhodotorula glutinis</i> <i>Candida utilis</i> <i>Candida guilliermondii</i> <i>Candida tropicalis</i>
β -Каротин (попередник вітаміну А)	Полієнові похідні	<i>Blakeslea trispora</i> <i>Choanephora conjuncta</i> <i>Rhodospiridium diobovatum</i> <i>Mycobacterium rubrum</i>

5.3.4.1. Біогенез вітаміну B_{12} . *Структура вітаміну B_{12}* . У 1972 р. було здійснено повний хімічний синтез кориноїдної структури. Для хімічного синтезу кориноїду необхідні 37 послідовних етапів. У зв'язку зі складністю такого синтезу мікробіологічний метод досі залишається єдиним промисловим способом одержання вітаміну B_{12} . Продуценти цього вітаміну наведено у табл. 5.9. Промислове виробництво вітаміну B_{12} здійснюється за допомогою пропіоновокислих бактерій (*Propionibacterium shermanii*), мезофільних і термофільних метаногенних бактерій, актиноміцетів та споріднених організмів.

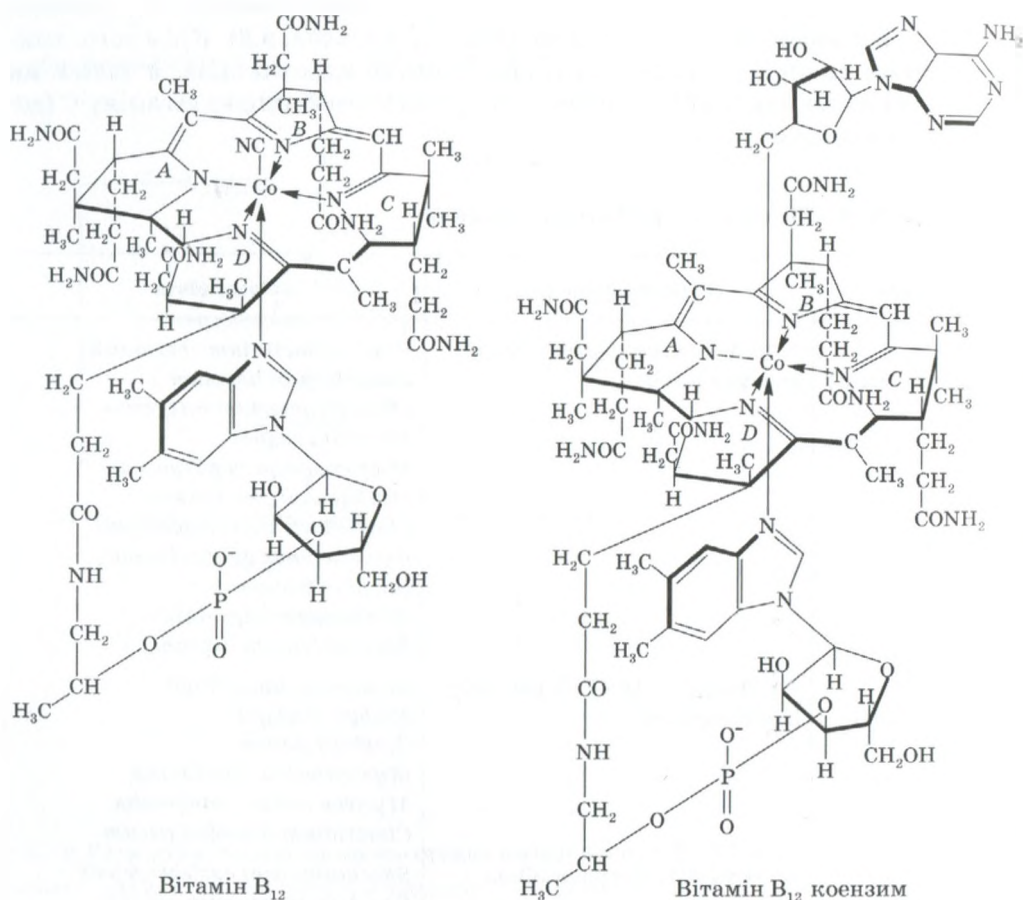


Рис. 5.20. Структурна формула вітаміну B_{12} і його коензимної форми

Молекула вітаміну B_{12} складається з двох частин: кобальтовмісної (порфіриноподібної) і нуклеотидної (рис. 5.20).

Порфіриноподібна структура є хромоформною, для неї характерна наявність атома кобальту і ціаногрупи, які утворюють координаційний комп-

лекс. Чотири з шести лігандних положень цього комплексу зайняті чотирма атомами азоту тетрапіролоподібної коринової кільцевої системи. Одна позиція з'єднана з азотом нуклеотидної основи, остання містить як замісник CN-групу. Коринова структура, як і всі порфірини, складається з чотирьох азотистих гетероциклів типу піролу, з'єднаних системою кон'югованих подвійних зв'язків. У цілому хромоформне ядро вітаміну за будовою подібне до уропорфірину III. Ця подібність особливо виявляється щодо природи і порядку розміщення бокових ланцюгів у пірольних кільцях. Проте, на відміну від порфіринів, молекула вітаміну B_{12} більш відновлена і містить шість додаткових метильних груп, які стабілізують відновлений стан усього макрокільця. β -Замісниками у молекулі вітаміну є аміді оцтової і пропіонової кислот, а не вільні кислоти. Кільця A і D з'єднані ковалентним зв'язком безпосередньо, а не через метиновий місток. Пропіонамід кільця містить ізопропаноламінний залишок, який є частиною нуклеотидного ліганда.

Нуклеотидне ядро складається з пуринової основи, рибози і залишка фосфорної кислоти. Нуклеотидне ядро з'єднується з кобальтом через азот основи і з кориновим кільцем — через амінопропаноловий місток, який зазвичай виділяють як самостійний структурний елемент молекули. Пуринова основа з'єднана з рибозою незвичним N - α -глікозидним зв'язком на відміну від N - β -глікозидного зв'язку, який, як правило, зустрічається в нуклеозидах природних пуринів і піримідинів. Основа нуклеотиду, 5,6-диметилбензімідазол, не виявлена в інших природних сполуках, крім вітаміну B_{12} .

На відміну від стабільного хімічного складу коринового кільця, склад нуклеотидного ядра варіює. Разом із вітаміном B_{12} , який називають ціанкобаламіном, можуть синтезуватись його аналоги: окси-, хлор-, сульфато-, нітритокобаламіни. Якщо в нуклеотидній частині молекули замість 5,6-диметилбензімідазолу міститься аденін, метиладенін, гіпоксантин або їх похідні, сполуці не притаманна біологічна активність для людини або тварин. Її називають *псевдовітаміном*. Перевага одержання вітаміну B_{12} за допомогою пропіоновокислих бактерій у порівнянні з актиноміцетами полягає в тому, що вони синтезують винятково істинний (справжній) вітамін B_{12} .

Вивчення похідних вітаміну B_{12} , синтезованих пропіоновокислими бактеріями, дало змогу встановити, що він перебуває в основному у так званій коензимній формі (див. *рис. 5.20*), яка становить від 75—80 % суми кобамідів. Ці форми характеризуються тим, що місце ціаногрупи займає молекула 5'-дезоксиаденозину, приєднана до атому кобальта Co — C -зв'язком.

Ціанкобаламіну не притаманна коензимна активність, і після введення в організм людини він повинен трансформуватися в свою коензимну форму. Проте за деяких патологічних змін організму таке перетворення не відбувається. Визнано, що використання коензимної форми B_{12} для медичних цілей є оправданішим, ніж ціанкобаламіну.

Шлях біосинтезу вітаміну B_{12} у мікроорганізмів описаний у 80-х роках XX ст. Причому початкові етапи синтезу були досліджені і охарактеризовані достатньо повно. Щодо кінцевих етапів біогенезу цього вітаміну, то на той час у дослідників залишилось багато питань, які потребували уточнень, і тому деякі кінцеві етапи біосинтезу були представлені як гіпотетичні. У наступні десятиліття ці питання були успішно вирішені, і на сьогодні шляхи

біосинтезу вітаміну B_{12} відомі і детально описані. Розглянемо біогенез цього вітаміну у міру появи відповідної наукової інформації.

Сукцинат-гліциновий шлях. Структурна подібність коринового кільця молекули вітаміну B_{12} і уропорфірину III дала змогу висунути гіпотезу про спільність початкових етапів біогенезу порфіринів і кориноїдів.

Синтез порфіринів тісно пов'язаний з інтермедіатами циклу Кребса. У початкових реакціях синтезу бере участь бурштинова кислота (сукцинат) у вигляді свого похідного сукциніл-КоА. Ця сполука дає початок реакціям, названим *сукцинат-гліциновим шляхом*. Вихідною реакцією останнього є конденсація сукциніл-КоА з гліцином, у результаті чого утворюється α -аміно- β -кетoadипінова кислота, яка після декарбоксілювання перетворюється на δ -амінолевулінову кислоту (δ -АЛК) (рис. 5.21). Ферментна система, що здійснює ці перетворення, піридоксальфосфатзалежна. Ферментна система δ -АЛК-синтетази репресується киснем. Фермент синтезується тільки клітинами з експоненційної фази росту.

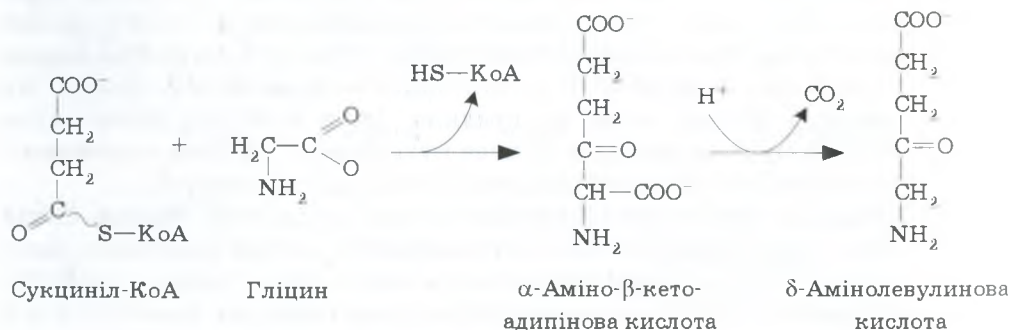


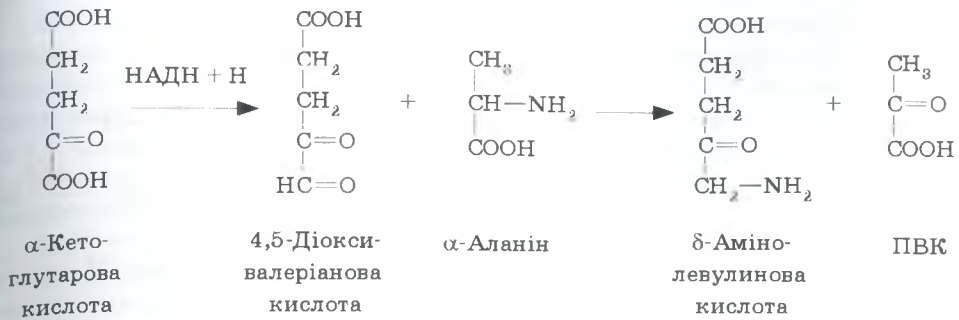
Рис. 5.21. Сукцинат-гліциновий шлях

Нарівні з сукцинат-гліциновим шляхом встановлено можливість синтезу δ -амінолевулінової кислоти з α -кетоглутарату (2-оксоглутарату).

У цьому разі відбувається НАДН-залежне відновлення 1-ї карбоксильної групи α -кетоглутарату з утворенням 4,5-діоксивалеріанової кислоти, а далі переамінування цього продукту з *L*-аланіном до δ -амінолевулінової кислоти (рис. 5.22).

Наступним етапом є утворення монопіролу — порфобіліногену з двох молекул δ -амінолевулінової кислоти (рис. 5.23). Фермент δ -АЛК-дегідратаза активується глутатіоном і цистеїном, а інгібується солями важких металів і меркаптидами, що вказує на важливу роль SH-груп у каталізі. δ -АЛК-дегідратаза є алостеричним ферментом, активність якого інгібується гемом, кінцевим продуктом біосинтетичного шляху; вітамін B_{12} не спричиняє інгібуючої дії.

Очевидно, у аеробних організмів основним джерелом сукциніл-КоА є окиснювальне декарбоксілювання α -кетоглутарату, тоді як у анаеробів можливе переважне його утворення з сукцинату через сукциніл-КоА-синтетазну реакцію або через метил-малоніл-КоА-ізомеразну реакцію. Джерелом сукцинату може бути також відновлення фумарової кислоти.

Рис. 5.22. Синтез δ -амінолевулінової кислоти через α -кетоглутарову кислоту:

ПВК — піровиноградна кислота

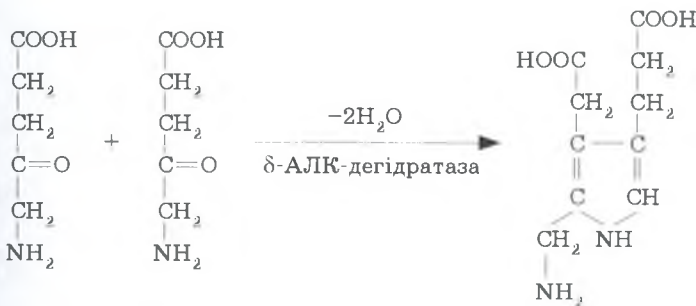


Рис. 5.23. Синтез монопіролу-порфобіліногену

Кінцеві етапи біосинтезу вітаміну B_{12} Суттєвий внесок у розшифрування кінцевих етапів біосинтезу вітаміну B_{12} зробив В.Я.Биховський, який виявив раніше невідомі тетрапірольні пігменти — корифірини. Це метильовані похідні уропорфірину III, які несуть метильні групи у β -положеннях пірольних кілець і при вуглецях α - чи γ -метинових місточків. У схемі біогенезу молекули вітаміну B_{12} корифірин і його КоА-похідне містяться між уропорфіриногеном III і кобіриновою кислотою (рис. 5.24). Отже, можна вважати, що у *Propionibacterium shermanii* працює система порфобіліноген $\rightarrow$ уропорфіриноген III $\rightarrow$ корифірин $\rightarrow$ КоА-корифірин $\rightarrow$ кобіринова кислота $\rightarrow$ вітамін B_{12} . Метилування уропорфіриногену III з можливим наступним декарбоксилюванням бокового ланцюга оцтової кислоти при С-12 кільця С приводить до розходження подальших шляхів біогенезу гема і корину. Включення кобальту у молекулу утвореного метильного похідного (корифірину), ймовірно, є необхідною умовою для його подальшого відновлення, яке супроводжується додатковим метилуванням з розривом метинового місточка і виникненням прямого С—С-зв'язку між кільцями А і D. Утворювана кобіринова кислота далі піддається амідуванню, включенню аміноізопропанольного залишка, нуклеотидної основи, що в результаті приводить до утворення вітаміну B_{12} і його аналогів.

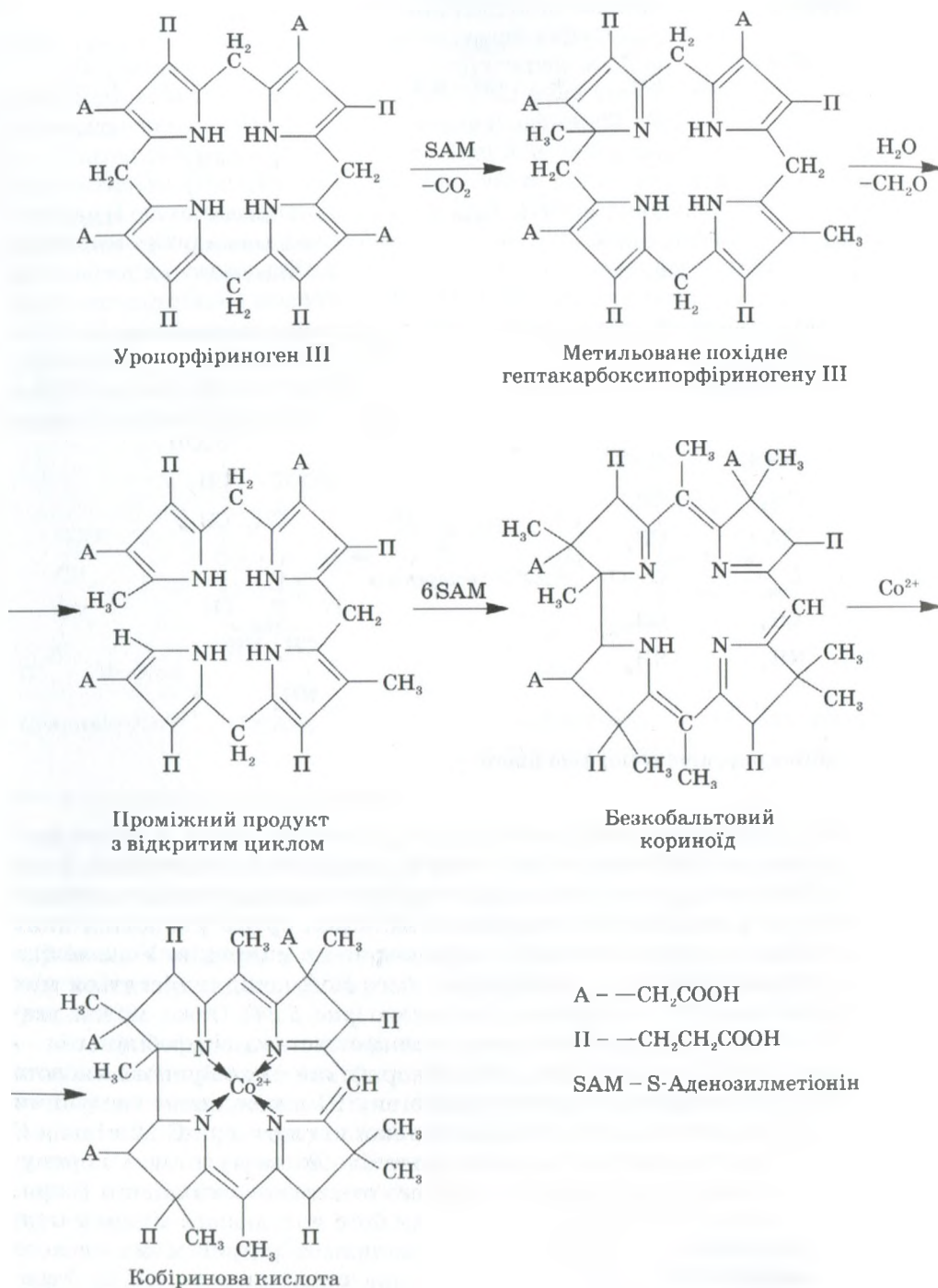


Рис. 5.24. Основні етапи гіпотетичної трансформації уропорфіриногену III у кобіринову кислоту

Метаболічним попередником нуклеотидної частини вітаміну (5,6-диметилбензимидазолу) є рибофлавін (рис. 5.25). Мічений рибофлавін і його попередник 6,7-диметил-8-рибітиллумазин включаються у кобаламін безклітинними екстрактами *Propionibacterium shermanii*. Розкладання рибофлавіну до 1,2-діаміно-4,5-диметилбензену відбувається в аеробних умовах, що й пояснює необхідність аерації у другій половині виробничої ферментації, якщо процес здійснюють без внесення попередника.

Рибітольна частина рибофлавіну не включається у рибозу. Є докази, що нуклеотидна частина кобаламіну утворюється з вільного 5,6-диметилбензимидазолу і рибозофосфату.

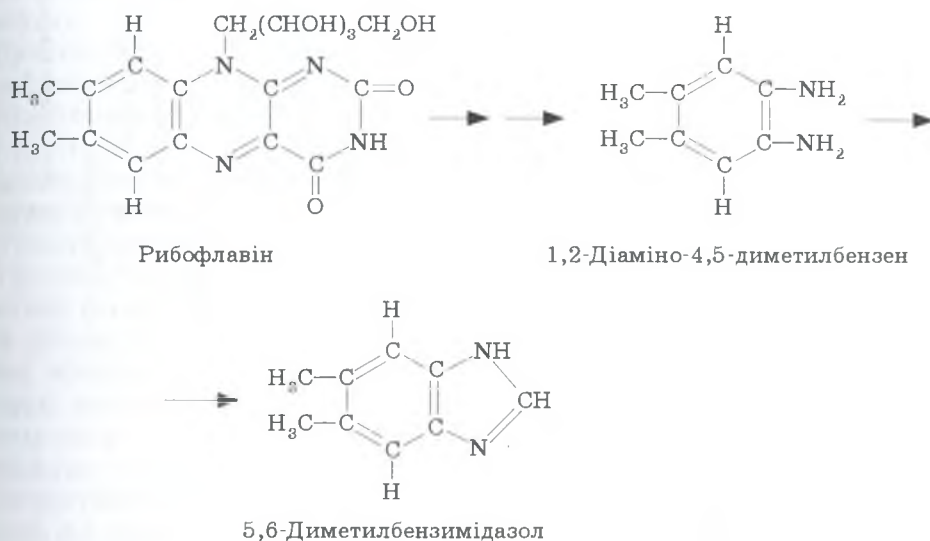


Рис. 5.25. Утворення 5,6-диметилбензимидазолу — метаболічного попередника нуклеотидної частини вітаміну B_{12}

Регуляція біосинтезу вітаміну B_{12} . Досить складним і маловивченим є питання, що стосується механізмів регуляції синтезу вітаміну B_{12} і сполук, що перебувають на спільних шляхах біосинтезу. Встановлено, що гем здійснює координовану репресію ферментів, які каталізують утворення δ -АЛК, порфобіліногену і уропорфіриногену III, пригнічуючи тим самим біосинтез як порфіринів, так і вітаміну B_{12} , для яких усі ці три стадії спільні (рис. 5.26). Вітамін B_{12} не впливає на ці ферменти, а його дія спрямована на ензиматичні системи, що беруть участь у метилюванні молекул уропорфіриногену III. Таку репресію спричиняє лише нуклеотидвмісна коензимна форма вітаміну, тому включення основи в молекулу вітаміну є одним із факторів регуляції.

Для синтезу вітаміну необхідні іони амонію. Замінити їх можуть тільки амінокислоти, які піддаються інтенсивному дезамінуванню. У реакції амідування молекули вітаміну, ймовірно, може брати безпосередню участь глютамін. Амідуванню піддаються залишки оцтової і пропіонової кислоти у процесі формування молекули вітаміну B_{12} .

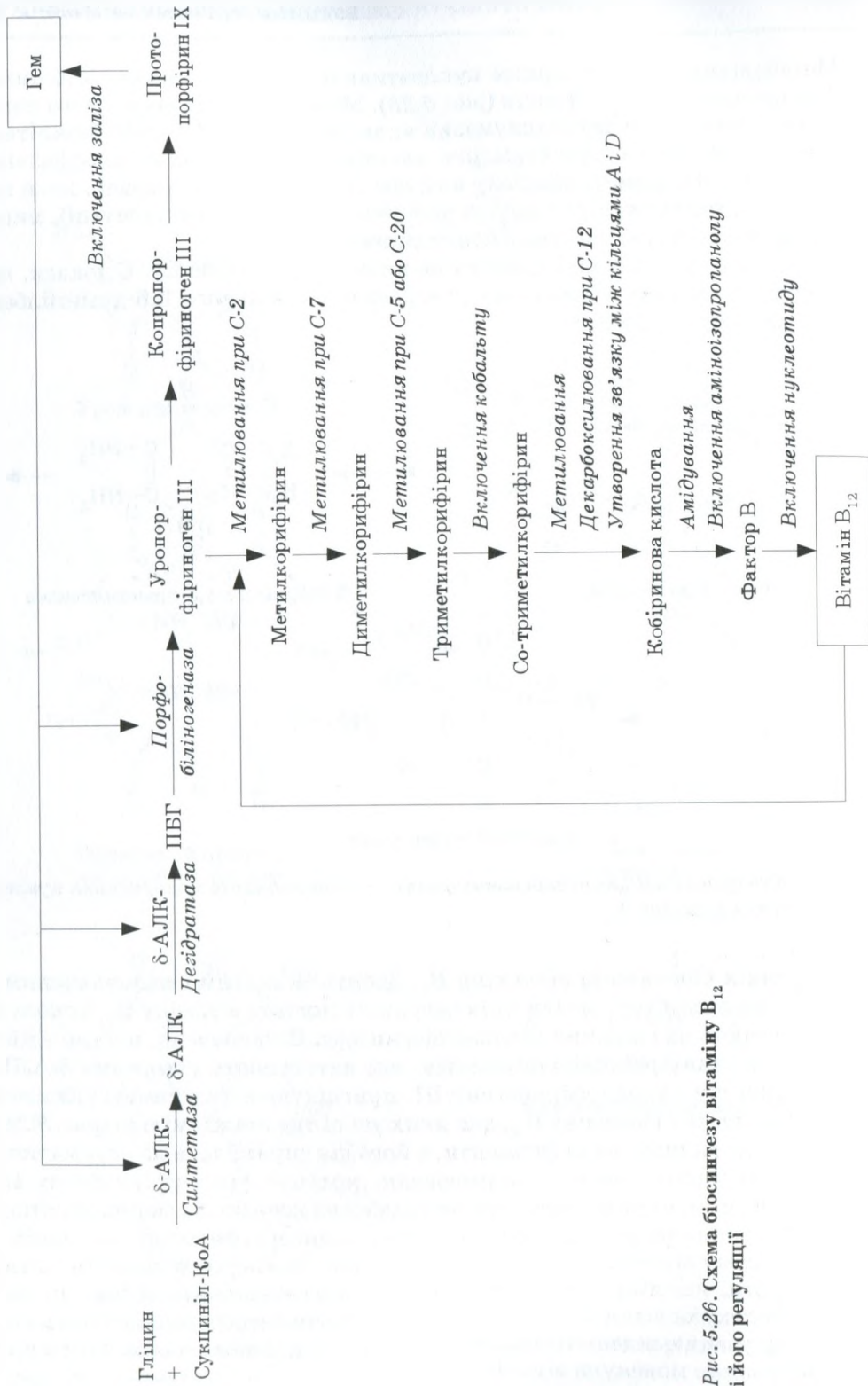


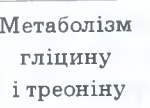
Рис. 5.26. Схема біосинтезу вітаміну В₁₂ і його регуляції

Утворення вітаміну B_{12} метаногенними бактеріями. Як продуценти вітаміну B_{12} можуть бути використані термофільні метаногенні бактерії. Так, процес накопичення цього вітаміну часто відбувається під час знешкодження стічних вод міських або підприємств, що переробляють зерно і м'ясо. Придатним для метаногенезу субстратом є барда ацетонобутилових і спиртових заводів. У біохімічному перетворенні беруть участь бактерії кількох фізіологічних груп, які здійснюють складний процес розщеплення органічних речовин до вуглекислоти і метану. До них належать класичні «бродильники», які здійснюють зброджування органічних речовин, амоніфікатори, сульфатредуктори і метаногени. Високий вміст вітаміну B_{12} у клітинах метаногенних бактерій зумовлений його функцією у процесі утворення метану.

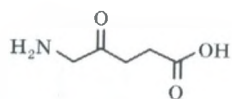
Сучасні дані про біосинтез вітаміну B_{12} . Наведені вище закономірності мікробного синтезу вітаміну B_{12} були встановлені у 80-х роках ХХ ст. На той час деякі етапи біосинтезу цього вітаміну не були чітко визначені і представлені як гіпотетичні. Це стосується насамперед шляхів трансформації уропорфіриногену III у кобіринову кислоту (див. *рис. 5.24*), а також включення кобальта у молекулу проміжного продукту синтезу (див. *рис. 5.26*).

У Кіотській енциклопедії генів і геномів (KEGG, www.genome.jp/kegg/) у 2007 р. представлена нова інформація про біосинтез вітаміну B_{12} у пропіоновокислих (*Propionibacterium acnes*), а також у багатьох метаногенних бактерій (у тому числі й *Methanosarcina barkeri*). Схему біосинтезу коензимної форми вітаміну B_{12} у *Propionibacterium acnes* показано на *рис. 5.27*. На сьогодні встановлено шлях утворення амінолевулінової кислоти: вона синтезується з гліцину і глутамат-1-напівальдегіду за участю фермента *глутамат-1-напівальдегідамінотрансферази* (*рис. 5.27*). Ці дані відрізняються від описаних раніше (див. *рис. 5.21* і *5.22*). Слід зазначити, що навіть нині не всі ферменти, які беруть участь у біогенезі цього вітаміну, ідентифіковані, хоча для багатьох з них визначено амінокислотну послідовність, а також і нуклеотидну послідовність відповідних генів. Це стосується ферментів, які здійснюють перетворення уропорфіриногену III на кобіринову кислоту і її подальшу трансформацію у кобальт(I)уринат діамід. Проте на відміну від даних 80-х років ХХ ст. (див. *рис. 5.24*) нині визначені всі проміжні продукти перетворення уропорфіриногену III на кобіринову кислоту. Ними є, як і передбачалось раніше, корифірини (на *рис. 5.27* представлені як прекоріни згідно з даними KEGG). Крім того, на сьогодні відомі всі інтермедіати трансформації 5-амінолевулінової кислоти у вітамін B_{12} . Структурні формули цих сполук наведено на *рис. 5.28*. За сучасними уявленнями про біосинтез вітаміну B_{12} кобальт включається у молекулу диметилкорифірину (прекоріну 2), а не триметилкорифірину, як припускали раніше (див. *рис. 5.26* і *5.27*).

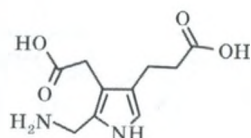
Біосинтез вітаміну B_{12} у *Methanosarcina barkeri* не відрізняється від такого у *Propionibacterium acnes* (див. *рис. 5.27*), хоча порівняно з пропіоновокислими у метаногенних бактерій детальніше досліджено більше ферментів, що беруть участь в утворенні цього вітаміну. Слід також зазначити, що у *Methanosarcina barkeri* не виявлені деякі з ферментів, що функціонують у *Propionibacterium acnes* (КФ 1.3.1.54, 2.7.1.156, 2.7.7.62, 2.4.2.21).



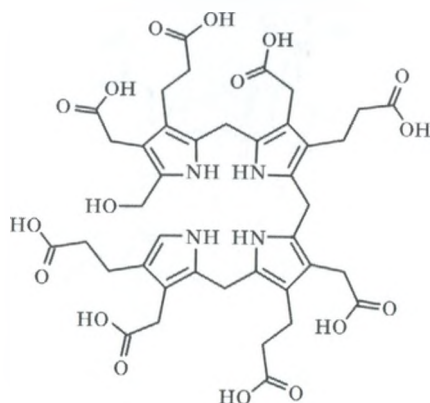
ферменти: 1 — глутамат-ТРНК-синтетаза (КФ 6.1.1.17); 2 — глутаміл-ТРНК-редуктаза (КФ 1.2.1.70); 3 — глутамат-1-напівальдегід-аміотрансфераза (КФ 5.4.3.8); 4 — порфобіліногенсинтаза (КФ 4.2.1.24); 5 — гідроксиметилбілансинтаза (КФ 2.5.1.61); 6 — уропорфіриноген-III-синтаза (КФ 4.2.1.75); 7 — уропорфіриноген-III-С-метилтрансфераза (КФ 2.1.1.107); 8 — прекорін-4-С11-метилтрансфераза (КФ 2.1.1.133); 9 — прекорін-6А-редуктаза (КФ 1.3.1.54); 10 — прекорін-8Х-метилмутаза (КФ 5.4.1.2); 11 — АТФ:кориніоїд-аденозилтрансфераза (КФ 2.5.1.17); 12 — аденозилкоринатсинтаза (КФ 6.3.5.10); 13 — аденозилкобінамід-фосфатсинтаза (КФ 6.3.1.10); 14 — аденозилкобінамідкіназа (КФ 2.7.1.156); 15 — аденозилкобінамід-фосфатгуаніллілтрансфераза (КФ 2.7.7.62); 16 — нікотинат-нуклеотид-диметилбензимидазол-фосфорибозилтрансфераза (КФ 2.4.2.21); 17 — кобаламінсинтаза (КФ 2.7.8.26)



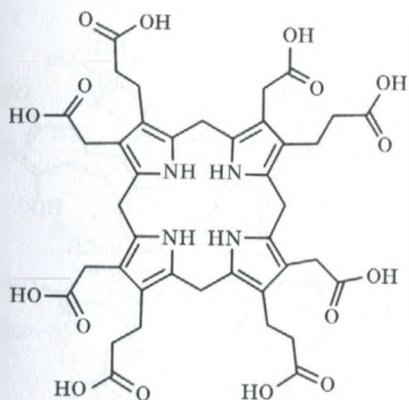
5-Амінолевулінат



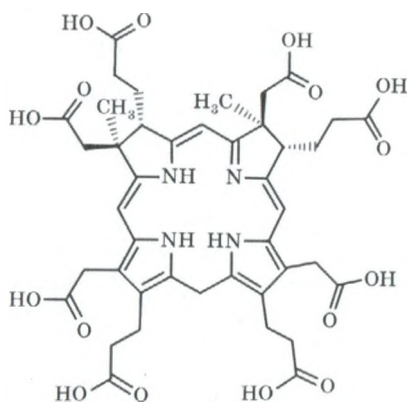
Порфобіліноген



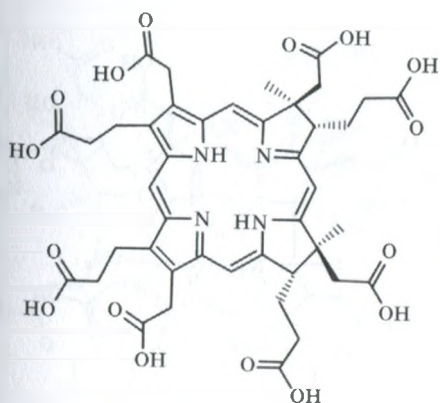
Гідроксиметилбілан



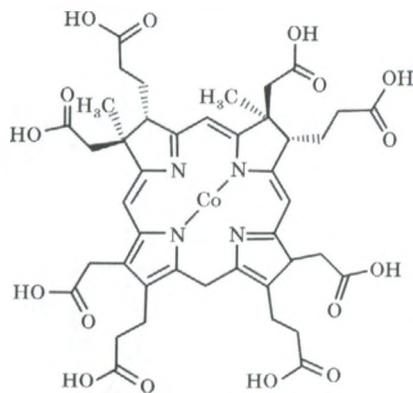
Уропорфіриноген III



Прекорін 2

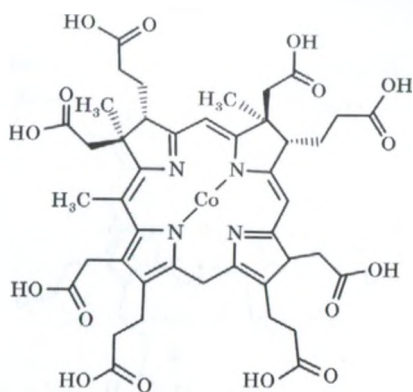


Сирогідрохлорин

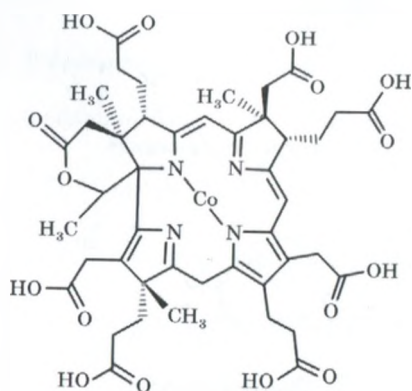


Кобальт-прекорін 2

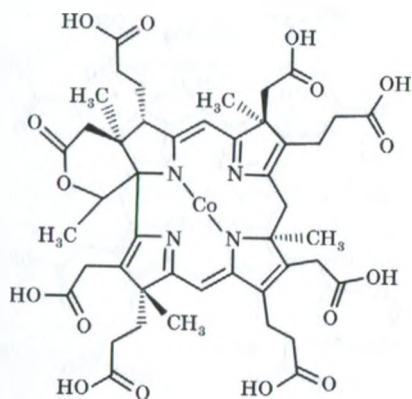
Рис. 5.28. Структурні формули проміжних сполук біогенезу коензимної форми вітаміну B₁₂



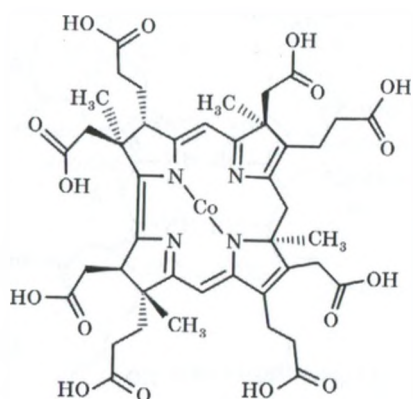
Кобальт-пекорін 3



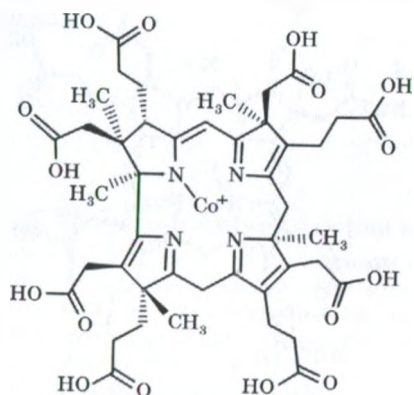
Кобальт-пекорін 4



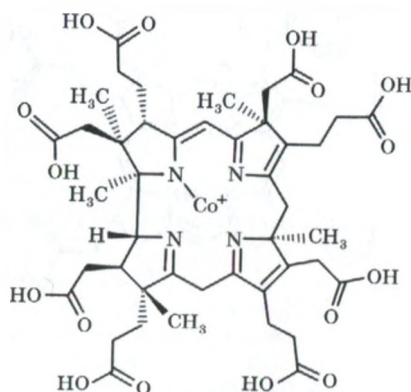
Кобальт-пекорін 5А



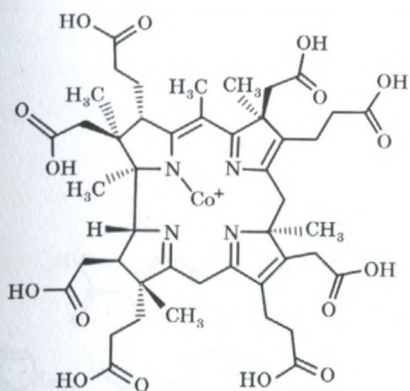
Кобальт-пекорін 5В



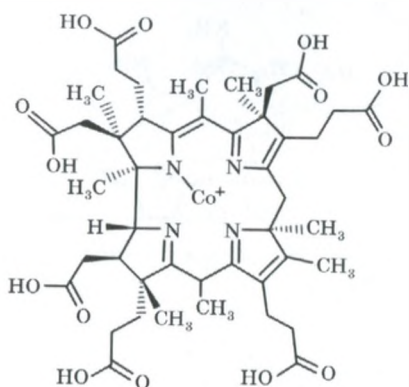
Кобальт-пекорін 6А



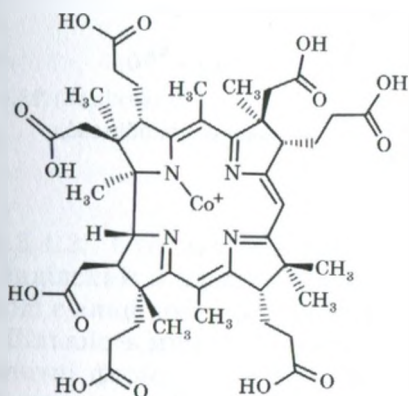
Кобальт-пекорін 6В



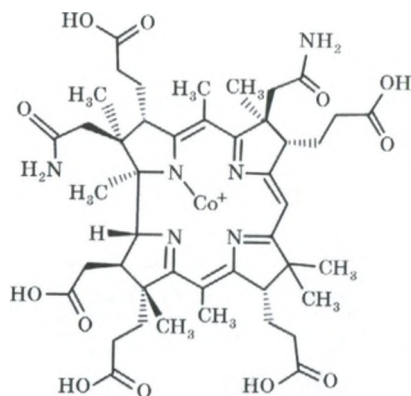
Кобальт-прекорін 7



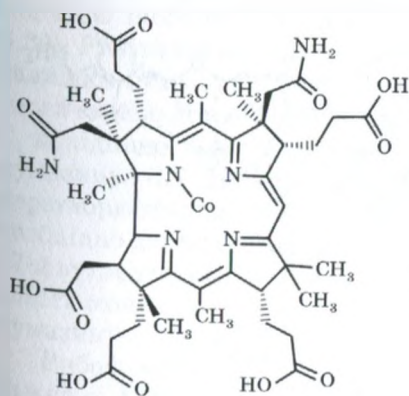
Кобальт-прекорін 8X



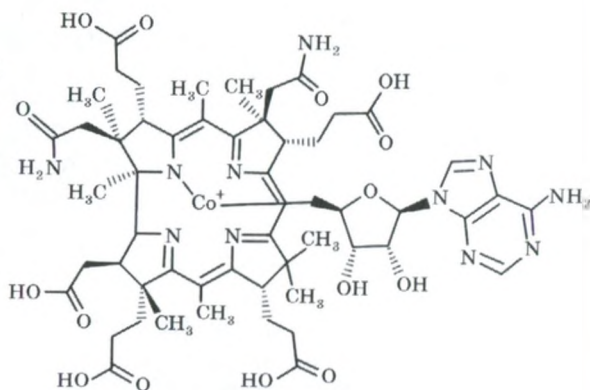
Кобіринова кислота



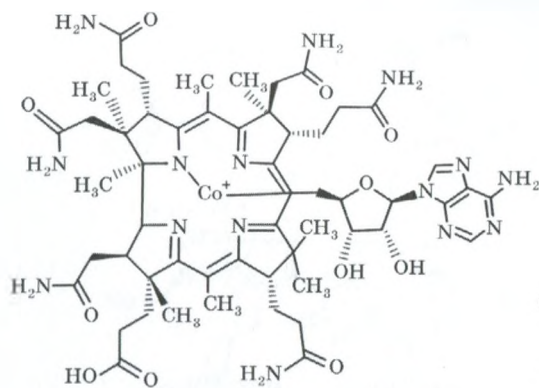
Кобальт(II)уринат діамід



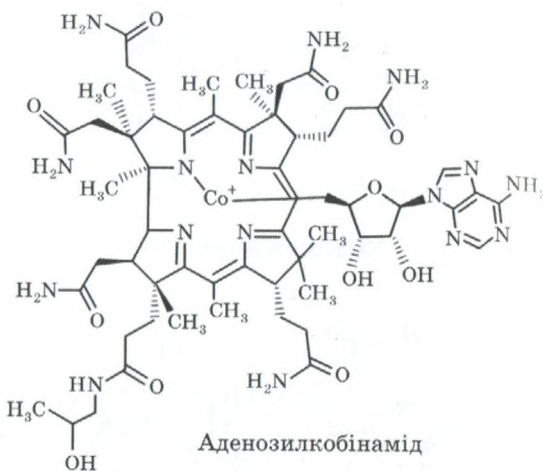
Кобальт(I)уринат діамід



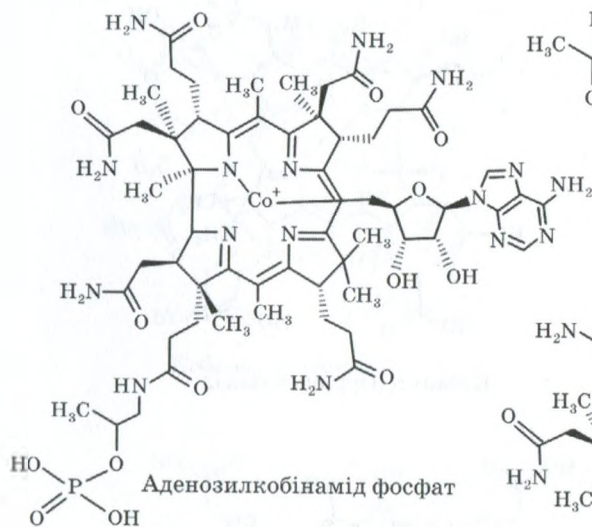
Аденозилкобірінат діамід



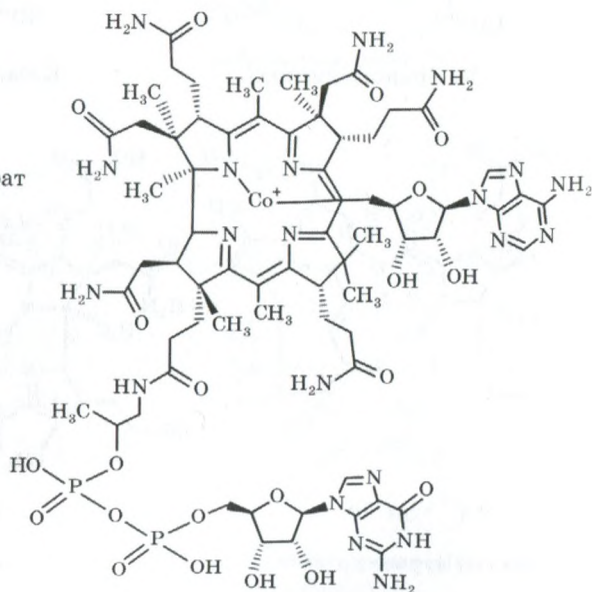
Аденозилкобірат гексамід



Аденозилкобінамід



Аденозилкобінамід фосфат



Аденозин-ГДФ-кобінамід

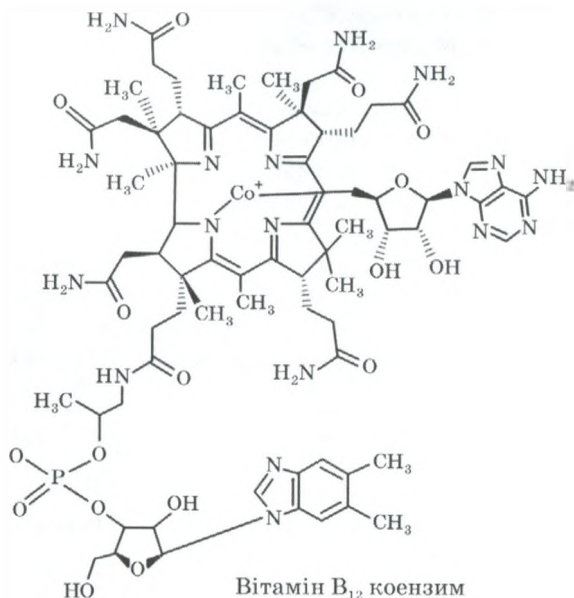


Рис. 5.28. (Закінчення)

5.3.4.2. Біосинтез рибофлавіну (вітаміну B₂). Рибофлавін був виділений у кристалічному вигляді у 1933 р. Його продуцентами в природі є вищі рослини, дріжджі, міцеліальні гриби та бактерії (див. табл. 5.9). Більшість мікроорганізмів утворює вільний рибофлавін та дві його коферментні форми — ФМН і ФАД. Найактивнішими продуцентами рибофлавіну є представники аскоміцетних дріжджів *Eremothecium ashbyii* та *Ashbyii gossypii*.

Метаболічним попередником рибофлавіну є гуанозинтрифосфат, який під дією *циклогідролази II* перетворюється на похідне піримідину I (рис. 5.29). Рибітильний боковий ланцюг рибофлавіну походить від рибозильного залишку гуанозинтрифосфату. Далі проміжний продукт I перетворюється через стадію II на 4-рибітиламіно-5-аміноурацил. Останній конденсується з C₄-похідним, ймовірно, діацетилом, з утворенням 6,7-диметил-8-рибітиллумази. 6,7-Диметил-8-рибітиллумазин під дією *рибофлавінсинтетази* перетворюється на рибофлавін. Для утворення однієї молекули рибофлавіну необхідно дві молекули 6,7-диметил-8-рибітиллумази. У даній реакції 6-й і 7-й вуглецеві атоми разом з обома приєднаними до них метильними групами однієї молекули переносяться на другу молекулу 6,7-диметил-8-рибітиллумази з утворенням 4-рибітиламіно-5-аміноурацилу і рибофлавіну.

Рибофлавін може взаємодіяти з високоенергетичними фосфатами, переважно з АТФ, з утворенням рибофлавін-5'-фосфату (ФМН). При взаємодії ФМН з АТФ утворюється флавінаденіндинуклеотид (ФАД). Регуляція синтезу рибофлавіну здійснюється за принципом негативного зворотного зв'язку, а також за рахунок зміни концентрації солей заліза у середовищі.



Наведені дані про біогенез вітаміну B_2 (див. *рис. 5.29*) одержані у 80-х роках ХХ ст. На той час залишався невідомим ряд проміжних сполук, утворюваних у процесі біосинтезу рибофлавіну, а також ферменти, що каталізують цей процес.

У 2007 р. у Кіотській енциклопедії генів і геномів наведено інформацію про шляхи біосинтезу рибофлавіну у багатьох мікроорганізмів, у тому числі й для активних продуцентів цього вітаміну – *Ashbyii gossypii* (*Eremothecium gossypii*) і *Bacillus subtilis*. Схему біогенезу у *Ashbyii gossypii* (*Eremothecium gossypii*) показано на *рис. 5.30*. Як видно з наведених даних, на сьогодні ідентифіковано вісім ферментів, що беруть участь у синтезі вітаміну B_2 . Слід також зазначити, що для двох ферментів (3,4-дигідрокси-2-бутанон-4-фосфатсинтази і рибофлавінсинтази бета-ланцюга) не визначено класифікаційний номер. Порівняно з інформацією 80-х років минулого сторіччя нині відомі всі інтермедіати синтезу вітаміну B_2 .

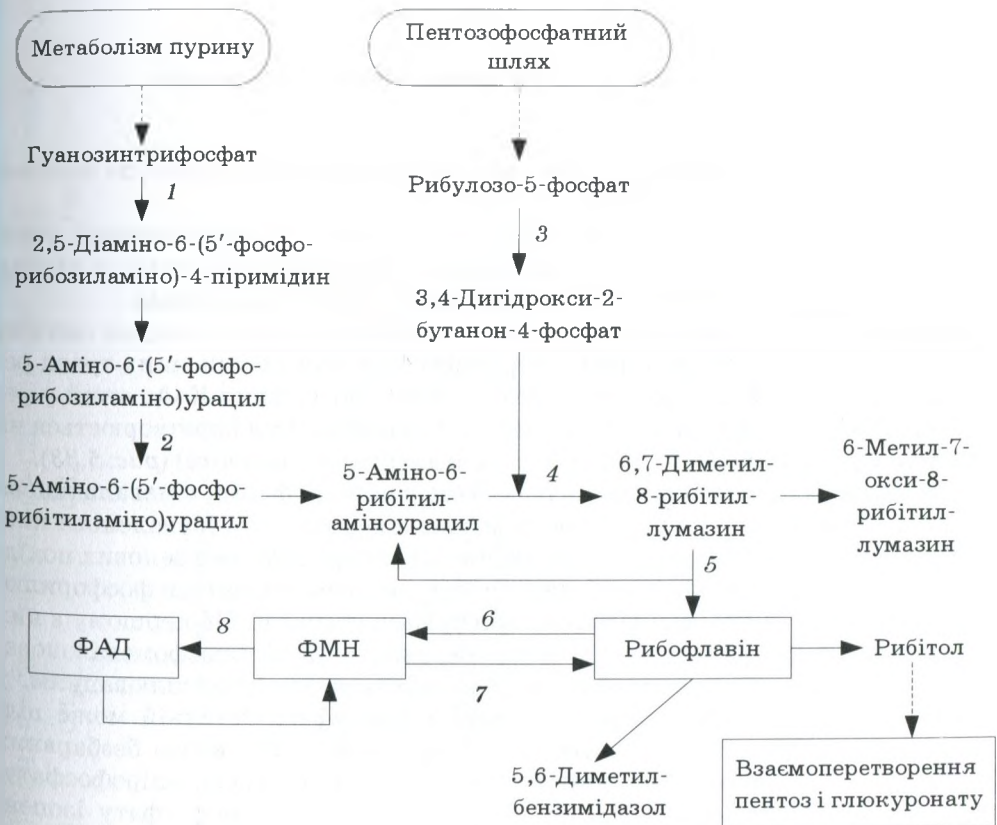


Рис. 5.30. Біосинтез рибофлавіну у Ashbyii gossypii (Eremothecium gossypii):

ферменти: 1 — ГТФ циклогідролаза II (КФ 3.5.4.25); 2 — 5-аміно-6-(5-фосфорибозиламіно)урацил редуктаза (КФ 1.1.1.193); 3 — 3,4-дигідрокси-2-бутанон-4-фосфатсинтаза; 4 — рибофлавінсинтаза бета-ланцюга; 5 — рибофлавінсинтаза (КФ 2.5.1.9); 6 — рибофлавінкіназа (КФ 2.7.1.26); 7 — фосфомоноестераза (КФ 3.1.3.2); 8 — ФАД-синтетаза (КФ 2.7.7.2)

5.3.4.3. Біосинтез β -каротину — попередника вітаміну А. За класичним визначенням, каротиноїди — це жовті або червоні пігменти аліфатичної або ациклічної будови, що складаються з ізопренових залишків (зазвичай з восьми). Останні з'єднані таким чином, що дві найближчі до центру молекули метильні групи перебувають у положенні 1:6, тоді як всі інші бокові метильні групи розміщені у положенні 1:5. Ряд спряжених подвійних зв'язків утворюють хромоформну систему каротиноїдів (рис. 5.31).

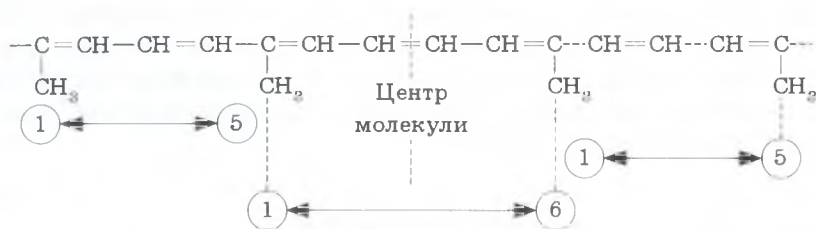


Рис. 5.31. Розміщення метильних груп біля центра молекули каротиноїда

Найбільше практичне значення має β -каротин. Його молекула містить два β -іононових угруповання (рис. 5.32).

Етапи біосинтезу каротиноїдів: синтез первинного C_5 -попередника; утворення безбарвних C_{40} -сполук з C_5 -попередника; формування молекул різних каротиноїдів дегідруванням безбарвного попередника; циклізація.

Перший етап біосинтезу можна розглядати як окремий випадок синтезу через ацетил-КоА, оскільки цей інтермедіат бере участь у перших трьох реакціях. Продуктом цих реакцій є 3-окси-3-метилглутарил-КоА, який у результаті НАД(Ф)⁺-залежного ензиматичного відновлення перетворюється на **мевалонову кислоту** (3,5-діокси-3-метилвалеріанова кислота) (рис. 5.33).

Проміжним продуктом, що не перебуває у вільній формі, є мевальдінова кислота. Відновлення є практично незворотною реакцією. Мевалонтова кислота розглядається як прямий і специфічний попередник ізопренових похідних. Далі у ланцюгові біогенезу мевалонтова кислота піддається фосфорилюванню за участю АТФ, яке відбувається трьома етапами. На першому з них утворюється 5-фосфомевалонтова кислота, далі — 5-пірофосфомевалонтова. Третя реакція фосфорилювання супроводжується декарбоксилюванням, у результаті якого утворюється ізопентенілпірофосфат. Останній може піддаватись ізомеризації в 3,3-диметилалілпірофосфат. Біосинтез безбарвних C_{40} -сполук з C_5 -попередника починається з утворення геранілпірофосфату, що відбувається за нуклеофільної атаки диметилалілпірофосфату ізопентенілпірофосфатом.

Подальші трансферазні (синтетазні) реакції приводять до утворення фарнезилпірофосфату — сполуки, що містить 15 вуглецевих атомів, і геранілгеранілпірофосфату з 20 атомами (рис. 5.33). Димеризація геранілгеранілпірофосфату супроводжується утворенням першого безбарвного C_{40} -попередника β -каротину — фітоїну. У результаті послідовних реакцій дегідрування фітоїну

утворюються фітофлуїн, ζ -каротин, нейроспорин, лікопін. У ході реакцій фітоїн поступово втрачає вісім атомів водню (рис. 5.34).

Згідно зі схемою лікопін виступає як кінцевий продукт, проте у деяких організмів, вірогідно, можуть функціонувати ферментні системи, що здійснюють його перетворення на β -каротин.

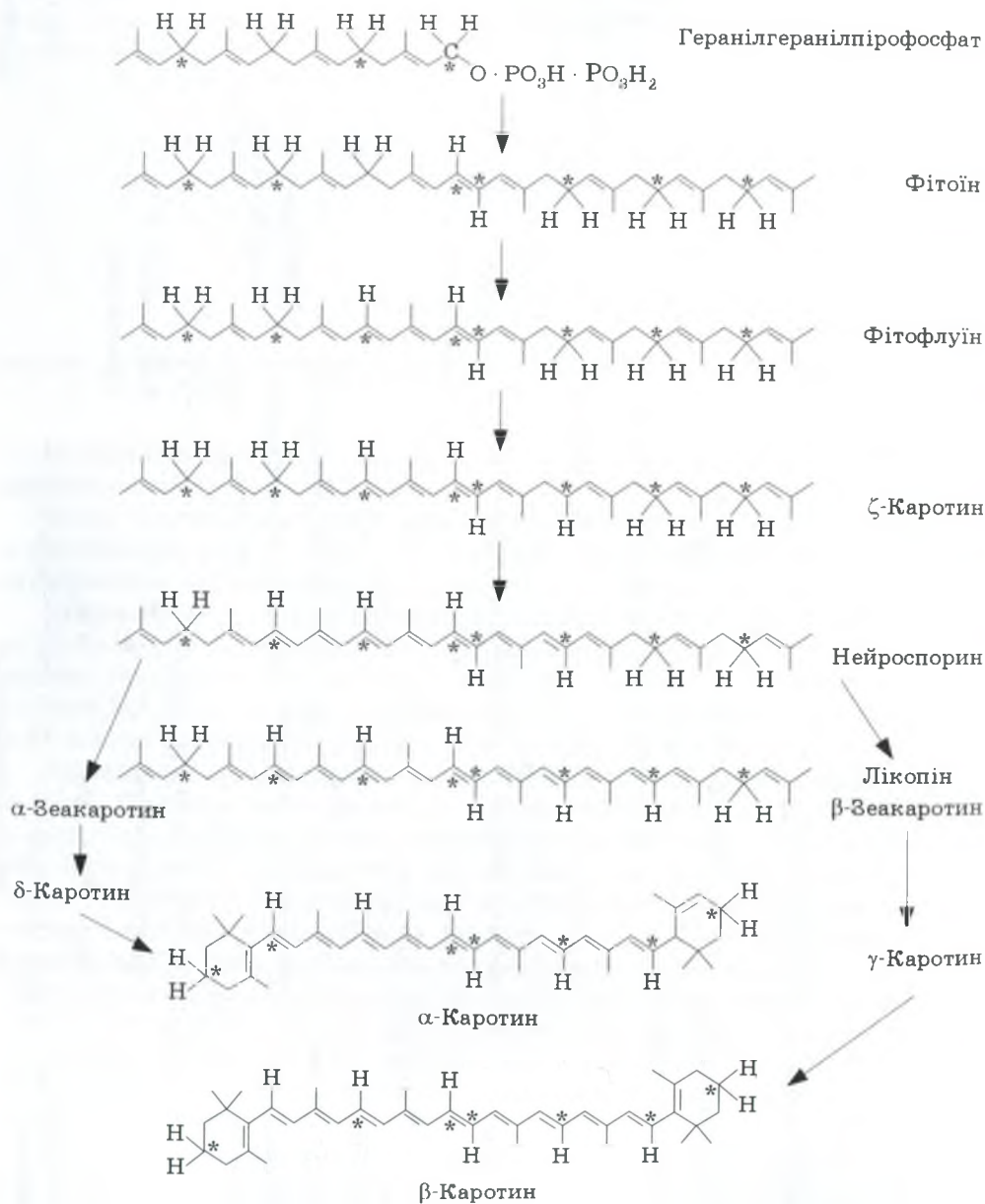


Рис. 5.34. Схема утворення β -каротину з геранілгеранілпірофосфату

Кінцевим етапом біосинтезу каротинів є циклізація з утворенням α - і β -іононових кілець (рис. 5.35). Процес циклізації починається з приєднання протона до третього вуглецевого атома, відновлення подвійного зв'язку між другим і третім вуглецевими атомами з одночасним утворенням зв'язку між другим і шостим атомами. Остання реакція веде до відновлення подвійного зв'язку між шостим і сьомим вуглецем. Далі, у разі утворення β -іононового кільця відбувається відщеплення водню від сьомого атома вуглецю. Під час формування β -іононової структури атом водню відщеплюється від п'ятого вуглецевого атома. Відповідно між шостим і сьомим, п'ятим і шостим атомами водню виникають подвійні зв'язки.



Рис. 5.35. Формування циклічних структур α - і β -іонону каротиноїдів

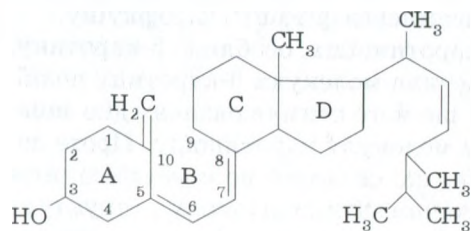
Регуляція синтезу β -каротину. Суттєвий внесок у встановлення проміжних продуктів біогенезу каротиноїдів було зроблено дослідями з вивчення дії інгібіторів і стимуляторів. Найвідомішою сполукою, додавання якої супроводжується пригніченням синтезу каротиноїдів, є дифеніламін. Передбачається, що сполука перешкоджає процесу дегідратування, спричиняючи накопичення більш насичених продуктів, насамперед фітоїну і фітофлуїну.

Стимулювальний ефект на біосинтез каротиноїдів, особливо β -каротину, спричиняє β -іонон. Оскільки циклічна частина молекули β -каротину подібна за будовою до β -іонону, передбачалось, що його стимулювальну дію можна пояснити безпосереднім включенням у молекулу каротиноїду. Проте досліди, проведені з ^{14}C - β -іононом, показали, що останній не є метаболічним попередником β -каротину, оскільки включення мітки від іонону у структуру β -каротину не перевищує 1—3 %. Подальші дослідження дали змогу встановити, що у *Phycomyces blakesleeanus* β -іонон виконує функцію неспецифічного регулятора ензиматичної реакції, зокрема знімає інгібування кінцевим продуктом на рівні реакції 5-фосфомевалонова кислота — диметилалілпірофосфат.

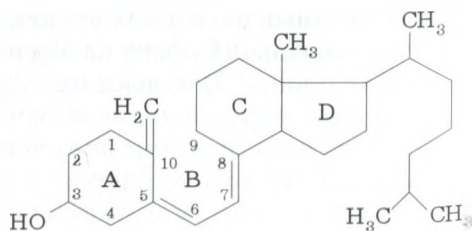
Досліди з *Blacheslea trispora* показали, що за присутності β -іону підвищується синтез каротину, але тільки за умови внесення цієї сполуки у культуру, яка перебуває у фізіологічно активному стані. Встановлено, що стимуляція процесу здійснюється на рівні трансляції. Слід зазначити, що стимулювальна дія β -іону виявляється тільки за присутності олій, причому склад ліпідів суттєво впливає на утворення β -каротину. До речовин, здатних стимулювати синтез β -каротину, належать триспорові кислоти, зокрема триспорові кислоти А, В, С, що входять до складу фактора β . За хімічною природою ці кислоти є окисненими ненасиченими похідними 1,1',3-триметил-2(3-метилоктил)-циклогексану. Триспорові кислоти є статевим гормоном або сексуальним фактором гетероталічних грибів, які мають (+) і (-) штами. Наявність у клітинах фактора β приводить до утворення зиготи. Слід зазначити, що фактор β утворюється тільки за умови спільного вирощування (+) і (-) штамів. Якщо (+) і (-) штами вирощувати окремо, утворення фактора β не спостерігається. Цей фактор є не тільки статевим гормоном, що регулює одну зі стадій репродукції, а й ініціатором утворення каротину у (+) і (-) штамів, які культивуються окремо. У молекулу каротину фактор β не включається. Передбачають, що триспорові кислоти стимулюють синтез ферментів, що функціонують на етапі від ацетил-КоА до β -каротину. Механізм їх дії полягає у тому, що вони є дерепресором гена, який регулює синтез специфічних ферментів, що беруть участь у синтезі β -каротину.

Найпомітніший ефект триспорові кислоти спричиняють за внесення у культуру (-) штаму *Blacheslea trispora* (збільшення синтезу каротину у 25—30 разів). Під час культивування (+) штаму або за спільного вирощування (+) і (-) штамів внесення триспорових кислот супроводжується збільшенням синтезу каротину всього у 1,5—2 рази. Позитивний ефект найбільший за умови внесення у середовище культивування продуцента каротину триспорової кислоти В.

5.3.4.4. Біосинтез ергостерину — попередника вітаміну D. Вивчення цього вітаміну розпочато у 1916 р., а у 1931 р. він був одержаний хімічним синтезом. Вітамін D існує у вигляді кількох вітамерів. Найпоширеніші вітаміни D₂ і D₃, їх можна розглядати як похідні стеринів (рис. 5.36). Провітамінами D₂ і D₃ є відповідно ергостерин і холестерин.



Вітамін D₂ (ергокальциферол)



Вітамін D₃ (холекальциферол)

Ергостерин належить до стеринів — поліциклічних спиртів. В основі молекули стеринів лежить циклічне угруповання атомів, що складається з відновленого фенантрено (повністю відновлений фенантрен називають пергідрофенантреном) і циклопентану. Це циклічне угруповання називається *циклопентанолпергідрофенантреном*, або *стераном*. Стеран, що характеризується наявністю бокового ланцюга вуглецевих атомів і двох CH_3 -груп (при 10-му і 13-му вуглецевих атомах циклу), називають *холестаном* (рис. 5.37).

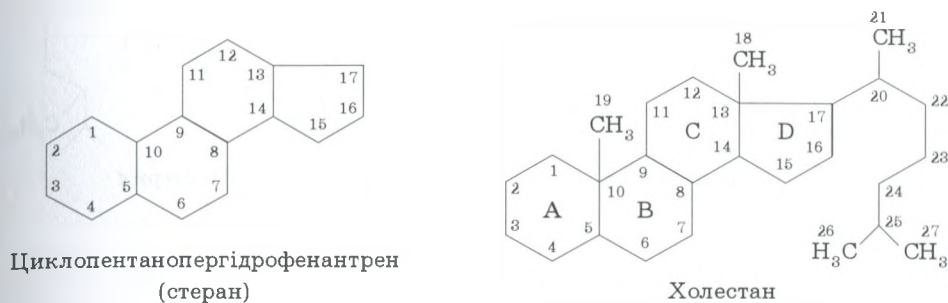


Рис. 5.37. Структурні формули стерану і холестерану

Вуглецеві атоми у цих вуглеводнях позначають згідно з нумерацією, прийнятою для фенантрено (1—14 атоми вуглецю); далі нумерують четвертий цикл і тільки після цього переходять до нумерації атомів вуглецю у бокових ланцюгах. Цикли прийнято позначати великими літерами латинського алфавіту.

Після окиснення у положенні 3 (кільце А) холестеран перетворюється на поліциклічний спирт — *холестанол*, який дає початок класу стеринів (рис. 5.38).



Рис. 5.38. Структурна формула поліциклічного спирту холестеранолу

Характерне ядро холестеранолу повторюється у всіх стеринів з невеликими варіаціями. Вони полягають у виникненні між п'ятим-шостим і сьомим-восьмим атомами вуглецю кільця В чи 22—23-м атомами вуглецю бокового ланцюга подвійних зв'язків, або до появи у положенні 24 бокового ланцюга радикала, який може мати будову $-\text{CH}_3$, $-\text{C}_2\text{H}_5$; $-\text{CH}=\text{CH}_2$ тощо. На рис. 5.39 наведено формули найважливіших природних стеринів.

Холестерин є основним стеринном тварин і людини, ергостерин характерний для грибів, ситостерин і стигмастерин (фікостерини) типові для рослин. Фукостерин виявлено у бурих водоростях. Продуцентами ергостерину є дріжджі *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces ellipsoideus*, *Rhodotula glutinis*, *Candida utilis*, *Candida guilliermondii*, *Candida tropicalis*.

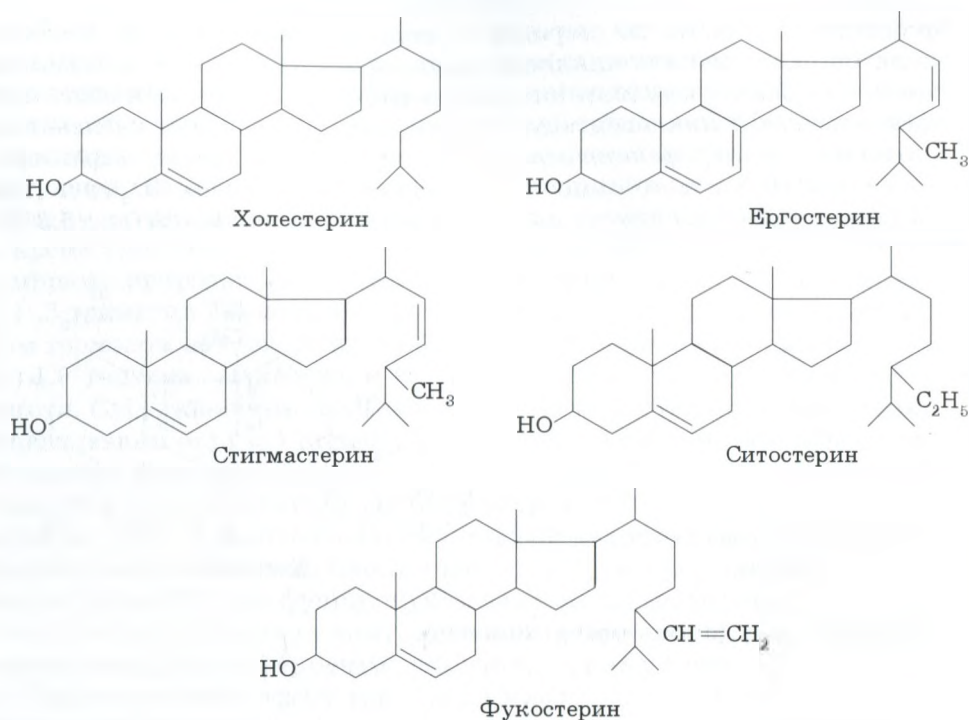


Рис. 5.39. Структурні формули найважливіших природних стеринів

Біогенез стеринів. Механізм біосинтезу стеринів довго залишався загадковим, хоча давно було відомо, що стерини синтезуються більшістю організмів. Тільки використання методу мічених атомів дало змогу розшифрувати основні етапи цього процесу, які, очевидно, збігаються у найрізноманітніших організмів.

Синтез стеринів здійснюється з ацетил-КоА як вихідної сполуки. Перші реакції біосинтезу збігаються з реакціями біогенезу каротиноїдів (див. рис. 5.33). У результаті двох послідовних реакцій з трьох молекул ацетил-КоА утворюється 3-окси-3-метилглутарил-КоА, який ензиматично відновлюється до мевалонової кислоти. Мевалонова кислота двічі фосфорилюється за участю АТФ і перетворюється на 5-пірофосфомеваленову кислоту. Пірофосфомеваленова кислота декарбоксилується. Одночасно відбувається реакція дегідратування і утворюється ізопентенілпірофосфат, який під дією фермента *ізопентенілпірофосфатізомераз* перетворюється на диметилалілпірофосфат.

Із двох сполук — ізопентенілпірофосфату і диметилалілпірофосфату — синтезується геранілпірофосфат (фермент *диметилалілтрансфераза*). Цей же фермент каталізує реакцію утворення з геранілпірофосфату наступної проміжної сполуки — фарнезилпірофосфату. Далі у синтезі стеринів спостерігаються відмінності від біосинтезу каротиноїдів.

Дві молекули фарнезилпірофосфату з'єднуються за місцем приєднання пірофосфатних груп з відщепленням останніх (рис. 5.40).

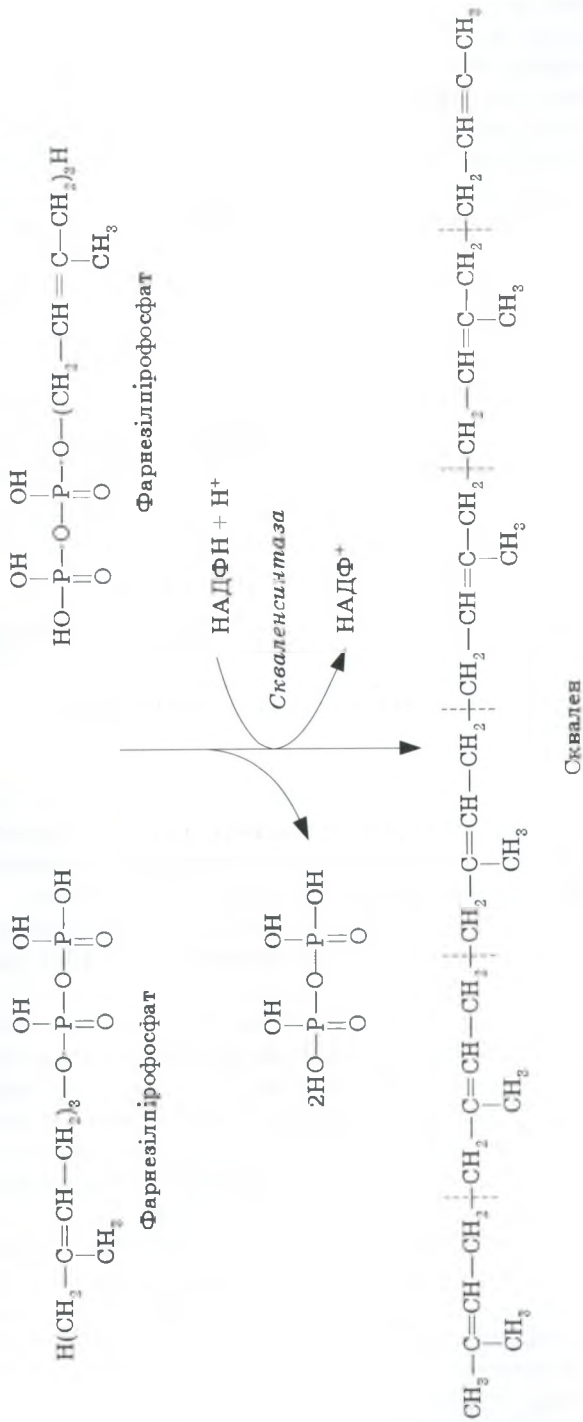


Рис. 5.40. Синтез сквалєну з фареізіпірофсфату

Джерелом атомів водню у процесі утворення молекул пірофосфату є НАДФН. У результаті реакції синтезується ненасичений вуглеводень — **сквален**, який складається з шести ізопреноїдних угруповань. Процес утворення сквалену каталізується ферментом *скваленсинтазою*.

Молекула сквалену легко набуває просторову конфігурацію, подібну до просторової конфігурації стеринів, і легко окиснюється за кінцевим подвійним зв'язком з утворенням **сквален-2,3-оксиду** за участю ферменту *сквален епоксидози*, який належить до підкласу монооксигеназ (рис. 5.41).

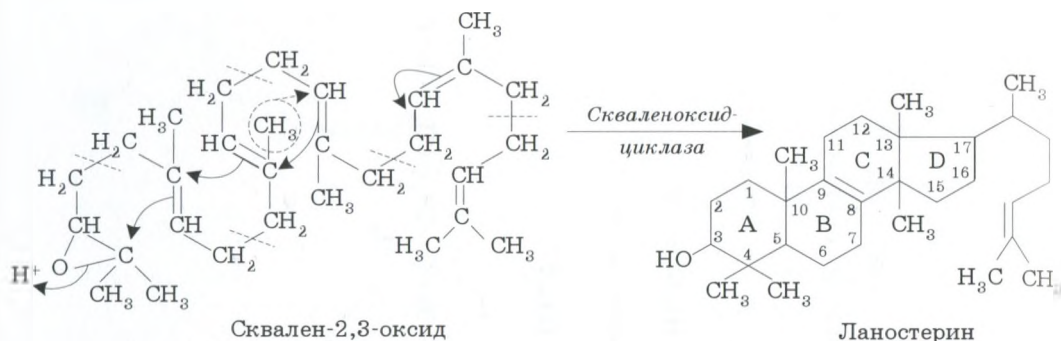


Рис. 5.41. Структурні формули сквален-2,3-оксиду і ланостерину — попередників стеринів

Протонування епоксидної групи приводить до зсувів електронної щільності у системі подвійних зв'язків сквалену і замиканню (показано стрілками) шести- і п'ятичленних циклів, характерних для стеринів.

Шляхом перетворень ланостерину (цей продукт утворюється у клітинах печінки) або інших первинних продуктів циклізації виникають різноманітні природні стерини.

5.3.4.5. Участь мікроорганізмів у синтезі вітаміну С. На сьогодні для промислового виробництва аскорбінової кислоти (вітаміну С) використовують досить складний процес, що має одну мікробіологічну стадію і кілька хімічних. Вихідним субстратом є *D*-глюкоза (рис. 5.42).

Одержання *L*-сорбози. Мікробіологічна стадія полягає в окисненні *D*-сорбіту до *L*-сорбози і здійснюється оцтовокислими бактеріями (*Glucobacter suboxydans*, *Acetobacter suboxydans*). Для цього перетворення використовується глибинне культивування оцтовокислих бактерій. Інокулянт вирощується на середовищі, що містить сорбіт, глюкозу, дріжджовий екстракт і CaCO_3 . У 15—20 % розчини сорбіту, які містять штам-трансформатор і необхідні для його росту вітаміни, пропускають повітря через розпилювальні системи. Через добу при температурі 30 °C одержують сорбозу з виходом 93 %.

Процес мікробного окиснення *D*-сорбіту до *L*-сорбози належить до неповних окиснень, а саме до трансформації речовин мікроорганізмами.

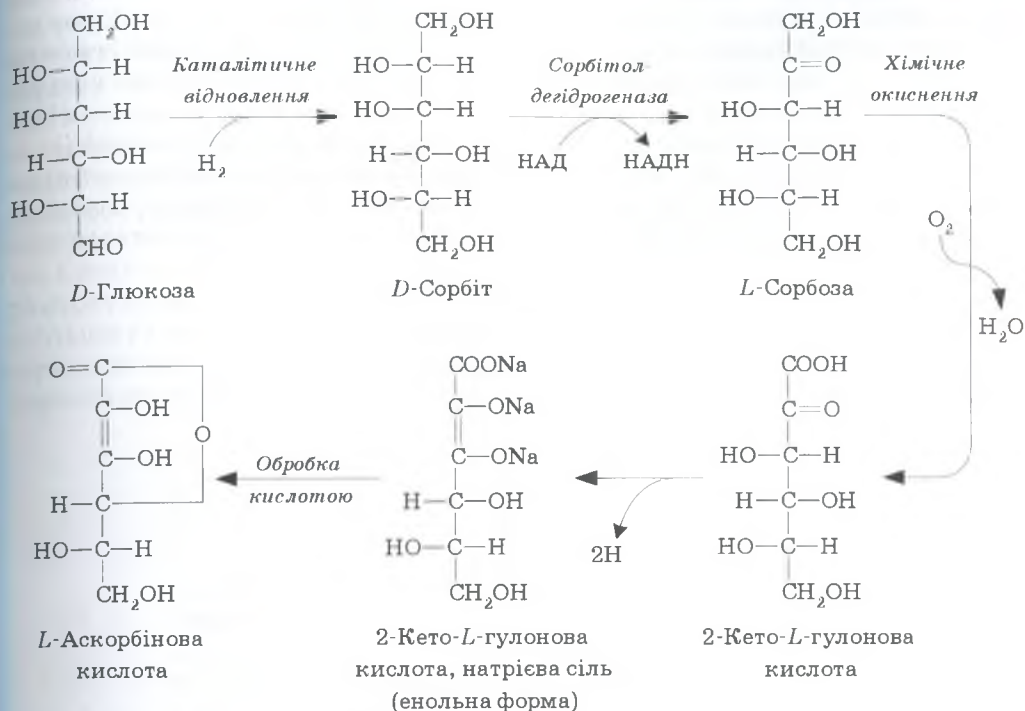


Рис. 5.42. Промисловий синтез L-аскорбінової кислоти:

одна зі стадій, а саме перетворення D-сорбіту на L-сорбозу, здійснюється оцтовокислими бактеріями. Решта стадій — хімічні реакції

Окиснення поліолів уперше описано в класичних роботах Т.Бертрана (1896 р.): так було проведено окиснення маніту до фруктози і сорбіту до сорбози за допомогою бактерій *Acetobacter aceti* і *Acetobacter xylinum*. Пізніше були виявлені культури, які здійснюють цей процес інтенсивніше (*Acetobacter suboxydans*).

Одержання 2-кето-L-гулонової кислоти. На останньому етапі процесу виробництва аскорбінової кислоти (див. рис. 5.42) 2-кето-L-гулонова кислота (2-КЛГ) перетворюється у кислому середовищі на L-аскорбінову кислоту.

Біохімічні дослідження метаболізму різних мікроорганізмів показали, що 2-КЛГ можна одержати іншим шляхом. Так, одні бактерії (*Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Erwinia*) можуть перетворювати глюкозу на 2,5-дикето-D-глюконову кислоту (2,5-ДКГ), а інші — (*Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Arthrobacter*), які синтезують фермент 2,5-ДКГ-редуктазу, — здатні перетворювати 2,5-ДКГ на 2-КЛГ.

Спосіб одержання аскорбінової кислоти можна вдосконалити сумісним культивуванням бактерій, здатних до утворення 2-КЛГ з глюкози. На жаль, таке культивування має ряд недоліків. Так, мікроорганізми можуть мати

різні оптимуми рН і температури, склад середовища, швидкість росту. Отже, умови культивування, оптимальні для одного організму, можуть бути непридатними для іншого, що супроводжуватиметься вимиванням одного з партнерів. У подібних випадках можна здійснювати послідовне культивування мікроорганізмів (рис. 5.43), проте такий процес важко зробити безперервним, якщо для вирощування мікроорганізмів необхідні принципово різні поживні середовища. Найкращим виходом із такої ситуації було б створення одного мікроорганізму, здатного синтезувати всі ферменти, необхідні для перетворення глюкози на 2-КЛГ.

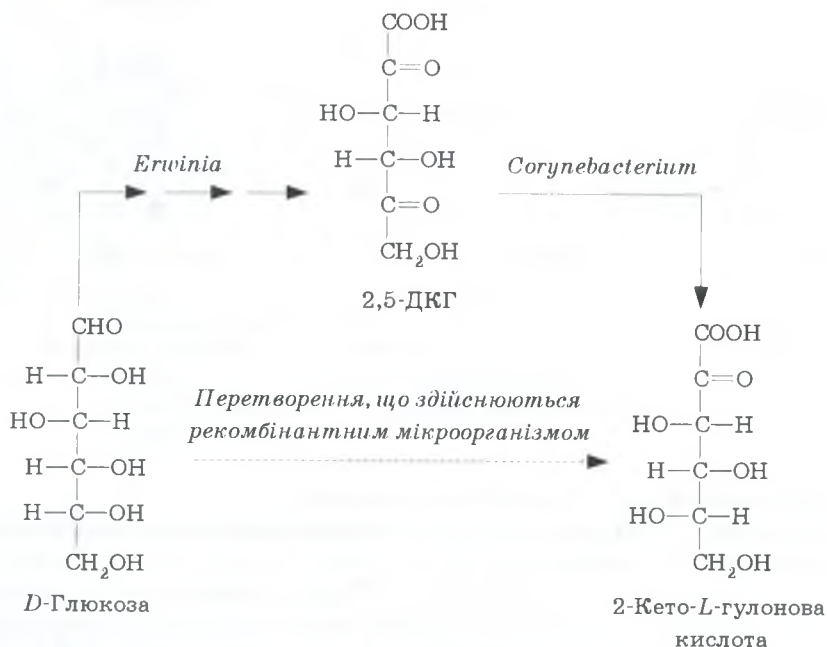


Рис. 5.43. Мікробіологічний синтез 2-кетоглулонової кислоти:

Erwinia здійснює перетворення *D*-глюкози на 2,5-дикето-*D*-глюконову кислоту (2,5-ДКГ), а *Corynebacterium* — перетворення 2,5-ДКГ на 2-кетоглулонову кислоту (2-КЛГ). 2-КЛГ можна одержати з глюкози спільним культивуванням цих бактерій. Альтернативний підхід полягає у створенні рекомбінантної бактерії *Erwinia*, яка експресує ген відповідного ферменту *Corynebacterium*.

Erwinia herbicola здійснює перетворення глюкози на 2,5-ДКГ упродовж кількох стадій, що каталізуються різними ферментами, тоді як *Corynebacterium* sp. для перетворення 2,5-ДКГ на 2-КЛГ необхідний лише один етап. Отже, найпростіший спосіб створення одного мікроорганізму, здатного перетворювати *D*-глюкозу на 2-КЛГ, полягає у виділенні гена 2,5-ДКГ-редуктази *Corynebacterium* sp. і введенні його у *Erwinia herbicola*. Така робота була проведена на початку — в середині 80-х років ХХ ст. вченим С.Андерсоном. Це була одна з перших робіт в області метаболічної інженерії. За допомогою

генетичних маніпуляцій метаболічні реакції, що проходять у різних мікроорганізмів, вдалося здійснити в одному з них. Таку бактерію можна використовувати як фабрику для виробництва 2-КЛГ, що замінює перші три стадії у традиційному процесі виробництва аскорбінової кислоти (див. рис. 5.42).

Слід зазначити, що комерційну цінність 2,5-ДКГ-редуктази можна підвищити, здійснивши амінокислотні заміни, що підвищують каталітичну активність фермента і його термостабільність. За допомогою олігонуклеотид-спрямованого мутагенезу було одержано мутантну форму 2,5-ДКГ-редуктази, в якій залишок глутаміну у положенні 192 замінено на аргінін, що супроводжувалось підвищенням активності ферменту майже у два рази. Заміна гліцинових залишків у положеннях 55 і 57 на аланінові дала змогу одержати термостабільніший фермент. Подальші зусилля вчених, очевидно, будуть спрямовані на одержання ферменту, що поєднує ці обидві властивості.

КОНТРОЛЬНІ ЗАПИТАННЯ ДО ПІДРОЗДІЛУ 5.3

1. На основі яких ознак метаболіти поділяють на первинні і вторинні?
2. Чому органічні кислоти є первинними метаболітами?
3. Дайте характеристику оцтовокислих бактерій.
4. Як відбувається утворення оцтової кислоти з етанолу у оцтовокислих бактерій?
5. Які особливості функціонування циклу трикарбонових кислот притаманні оцтовокислим бактеріям?
6. Які органічні кислоти синтезуються грибами?
7. Який механізм синтезу органічних кислот у грибів?
8. Як впливає концентрація заліза у середовищі культивування грибів на синтез лимонної кислоти?
9. Які способи використовуються для одержання амінокислот у промисловому масштабі?
10. Назвіть шляхи використання амінокислот у різних галузях промисловості і медицині.
11. Які особливості притаманні синтезу амінокислот у мікроорганізмів?
12. Чому для одержання амінокислот використовують ауксотрофні і регуляторні мутанти?
13. На яких рівнях може здійснюватися регуляція синтезу амінокислот у мікроорганізмів?
14. Як здійснюється регуляція активності ферментів на розгалужених шляхах біосинтезу?
15. Як відбувається регуляція біосинтезу амінокислот аспартатної родини у *E. coli*?
16. Як відбувається регуляція біосинтезу ароматичних амінокислот у *E. coli*?

17. Які способи одержання ауксотрофних мутантів — продуцентів амінокислот Ви знаєте?
18. Що таке антиметаболіти? Чому ці сполуки використовуються для одержання регуляторних мутантів — продуцентів амінокислот?
19. Які механізми стійкості до антиметаболітів Ви знаєте?
20. Як утворюється глютамінова кислота у клітинах корінебактерій?
21. Чому концентрація біотину є вирішальним фактором для синтезу глютамінової кислоти?
22. Як утворюється пролін у корінебактерій? Які мутанти використовуються для одержання цієї амінокислоти?
23. Охарактеризуйте шлях біосинтезу лізину у бактерій.
24. Як здійснюється контроль біосинтезу амінокислот аспартатної родини у бактерій?
25. Які мутанти використовують для одержання лізину і чому?
26. Які особливості регуляції біосинтезу треоніну притаманні коріне- і ентеробактеріям?
27. Охарактеризуйте етапи одержання генно-інженерного штаму *E. coli* — надсинтетика треоніну.
28. Як здійснюється біосинтез ароматичних амінокислот у мікроорганізмів?
29. Які механізми регуляції активності 3-дезоксисарабіногептулозо-7-фосфатсинтази (ДАГФ-синтази) притаманні корінебактеріям?
30. Як здійснюється регуляція ДАГФ-синтази у бацил?
31. Як здійснюється регуляція ДАГФ-синтази у *E. coli*?
32. Які вітаміни одержують мікробіологічним синтезом?
33. Охарактеризуйте структуру кобаламіну.
34. Які інтермедіати циклу Кребса є вихідними для синтезу вітаміну B_{12} ?
35. Які шляхи біосинтезу δ -амінолевулінової кислоти у клітинах мікроорганізмів Ви знаєте?
36. Як відбувається перетворення δ -амінолевулінової кислоти у уропорфіриноген III під час біосинтезу ціанкобаламіну?
37. Як відбувається утворення кобіринової кислоти у процесі синтезу ціанкобаламіну?
38. Яка сполука є метаболічним попередником нуклеотидної частини ціанкобаламіну?
39. Які механізми регуляції біосинтезу вітаміну B_{12} Ви знаєте?
40. Яка сполука є метаболічним попередником рибофлавіну? Які шляхи синтезу цього попередника з глюкози?
41. Які основні етапи біосинтезу рибофлавіну?
42. Дайте характеристику каротиноїдів.
43. Які етапи біосинтезу каротиноїдів?
44. Як здійснюється синтез мевалонової кислоти під час утворення каротиноїдів?

45. Як відбувається біогенез метаболічних попередників каротину з мевалонової кислоти?
46. Які основні етапи утворення каротину з геранілгеранілпірофосфату?
47. Які шляхи регуляції біосинтезу каротину Ви знаєте?
48. Охарактеризуйте вітамін D і ергостерин.
49. Які природні стерини Ви знаєте?
50. Яка сполука є попередником синтезу стеринів?
51. Які шляхи біосинтезу спільні для каротиноїдів і стеринів?
52. Як відбувається утворення сквалену під час синтезу стеринів?
53. Як здійснюється утворення стеринів із сквалену?
54. Охарактеризуйте основні стадії промислового синтезу аскорбінової кислоти. Які з них здійснюються мікроорганізмами?
55. Як здійснюється одержання сорбози за допомогою оцтовокислих бактерій?
56. Яка роль мікроорганізмів у одержанні 2-кето-*L*-гулонової кислоти?
57. Охарактеризуйте основні етапи одержання рекомбінантного штаму *Erwinia*, здатного здійснювати перетворення глюкози на 2-кето-*L*-гулонову кислоту.

5.4. БІОСИНТЕЗ ВТОРИННИХ МЕТАБОЛІТІВ

5.4.1. Шляхи синтезу мікробних екзополісахаридів

Класифікація мікробних екзополісахаридів. Упродовж останніх 20—30 років мікробні екзополісахариди (ЕПС) — високомолекулярні екзогенні продукти метаболізму мікроорганізмів — є об'єктом інтенсивних теоретичних і прикладних досліджень. Здатність розчинів мікробних ЕПС до гелеутворення, емульгування, суспендування, зміни реологічних характеристик водних систем зумовили широке використання цих біополімерів у нафто- і гірничовидобувній, текстильній, харчовій, фармацевтичній, хімічній промисловостях, сільському господарстві і медицині. Мікробні ЕПС мають ряд переваг перед полісахаридами рослинного походження. Так, ці біополімери можна отримувати в потрібних обсягах незалежно від пори року і кліматичних умов.

Економічна доцільність використання мікробних ЕПС зумовлена їх по-заклітинною природою і високою продуктивністю синтезу на дешевих субстратах. На відміну від хімічних полімерів (поліакриламід) мікробні ЕПС стійкі до температурної, окисної, механічної деструкції, але піддаються біологічній деградації і є нетоксичними, що робить екологічно безпечним їх застосування, наприклад, у нафтодобуванні.

Класифікацію мікробних ЕПС наведено у *табл. 5.10*.

Таблиця 5.10. Класифікація промислових мікробних екзополісахаридів

Група ЕПС	Назва ЕПС і продуцента	Характеристика ЕПС	Сфера використання
№ 1 — гомополісахариди, синтез яких здійснюється на середовищах, що містять специфічний вуглеводний субстрат	Декстран — <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Streptococcus bovis</i> , <i>Streptococcus viridans</i>	α -D-глюкан	Замінник плазми крові, а також для аналітичних досліджень у хімії та біології
№ 2 — для синтезу необхідна наявність специфічного вуглецевого субстрату, проте ЕПС є гетерополісахаридами	Продуцент — жовтозобарвлена бактерія роду <i>Pseudomonas</i>	—	—
№ 3 — гомополісахариди, які синтезуються на різних вуглецевих субстратах	Пулулан — <i>Aureobasidium pullulans</i>	Лінійний полімер D-глюкози, який складається з α -(1→6)-мальтотріозних і невеликої кількості мальтотетразних одиниць	У харчовій промисловості — виготовлення плівки для пакування харчових продуктів, для приготування низькокалорійних продуктів замість крохмалю
	Курдлан — <i>Alcaligenes faecalis</i> і <i>Agrobacterium radiobacter</i>	β (1→3)-глюкан, при нагріванні до 54 °C утворює гель, який, на відміну від агарових, зберігає свою структуру в широкому діапазоні температур (від 18 до 80 °C)	У харчовій промисловості, а також для приготування мікробіологічних середовищ
	Склероглюкан — <i>Sclerotium rolfii</i> , <i>Sclerotium glaucum</i> , <i>Sclerotium</i> sp.	Нейтральний гомополісахарид, в якому залишки глюкопіранози з'єднані β -(1,3)-зв'язками. До кожного третього залишку глюкози основного ланцюга в положенні C ₆ приєднується ще один залишок глюкози	У нафтовидобуванні для інтенсифікації нафтовидобутку

Закінчення табл. 5.10

Група ЕПС	Назва ЕПС і продуцента	Характеристика ЕПС	Сфера використання
№ 4 — гетерополісахариди, які складаються із структур з повторюваними блоками	Ксантан — <i>Xanthomonas campestris</i>	Залишки <i>D</i> -глюкози, <i>D</i> -манози, <i>D</i> -глюкуронової кислоти у співвідношенні 2,8:2:2; 4,7 % <i>O</i> -ацетильних груп і близько 3 % піровиноградної кислоти	У нафтовидобуванні, а також у виготовленні харчових продуктів
	Гелан — <i>Pseudomonas elodea</i>	Залишки глюкози, рамнози, глюкуронової кислоти і <i>O</i> -ацетильні групи	У харчовій промисловості і для приготування мікробіологічних середовищ
	Етаполан — <i>Acinetobacter</i> sp.	Залишки <i>D</i> -глюкози, <i>D</i> -манози, <i>D</i> -галактози, <i>L</i> -рамнози, <i>D</i> -глюкуронової і піровиноградної кислот (3:2:1:1:1:1) та жирні кислоти (C_{12} — C_{18})	У нафтовидобувній, харчовій, хімічній промисловості як загущувальний, стабілізувальний, емульгувальний та суспендувальний агент
№ 5 — гетерополісахариди, у складі яких немає повторюваних одиниць	Емульсан — <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	<i>N</i> - і <i>O</i> -ацильовані залишки <i>D</i> -галактозаміну, <i>D</i> -глюкози і аміноуронової кислоти. <i>O</i> -ацильна частина містить 5—19 % жирних кислот	У нафтовій промисловості для підвищення нафтовидобутку
	Альгінат — <i>Pseudomonas aeruginosa</i> і <i>Azotobacter vinelandii</i>	Залишки <i>D</i> -мануронової і <i>L</i> -гулууронової кислот, <i>O</i> -ацетильні групи	У харчовій промисловості як замітники водоростевих альгінатів

Примітка. «—» — даних немає.

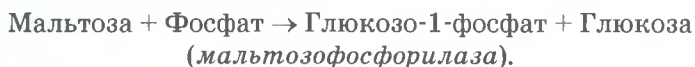
5.4.1.1. Особливості біосинтезу полісахаридів на вуглеводних субстратах. Процес біосинтезу ЕПС можна поділити на три етапи: синтез фосфорильованих вуглеводів; синтез попередників ЕПС — нуклеозиддифосфатпохідних вуглеводів; реакції полімеризації.

Утворення фосфорильованих вуглеводів. Фосфорильовані похідні сахаридів під час росту мікроорганізмів на вуглеводах можуть утворюватися трьома шляхами.

1. У процесі поглинання гексоз за допомогою фосфотрансферазної системи (ФТС). У цьому разі процес транспортування супроводжується фосфорилуванням субстрату за рахунок фосфоенолпірувату (ФЕП). Показано, що дисахарид трегалоза надходить у клітини *Escherichia coli* за участю ФТС. Продукт транспортування — трегалозо-6-фосфат — розщеплюється далі до глюкози і глюкозо-6-фосфату під дією специфічної *гідролази*.

2. Деякі дисахариди і моносахариди активно транспортуються у клітину без хімічної модифікації. У цьому разі гексози фосфорилуються під дією *гексокінази* за рахунок фосфатної групи АТФ.

3. Внутрішньоклітинний розпад дисахаридів часто починається з *пірофосфоролітичного розщеплення* за участю ферментів *фосфорилаз*:



Синтез попередників ЕПС. Безпосередніми попередниками глікозильних залишків, що входять до складу ЕПС, є, за деяким винятком, нуклеозиддифосфатсахариди. Як правило, нуклеозидна частина у їх складі представлена уридином. Нуклеозиддифосфатсахариди є також попередниками інших, відмінних від глюкози, моносахаридів. Синтез цих сполук відбувається за реакціями:



Із найбільш вивчених на сьогодні нуклеотидглікозильних донорів як приклади можна назвати такі:

УДФ-глюкоза, яка бере участь у синтезі глікогену, крохмалю, целюлози, сахарози, трегалози, ксантану;

АДФ-глюкоза — у синтезі α -1,4-глюкану;

ГДФ-глюкоза — у синтезі целюлози (разом з УДФ-глюкозою);

УДФ-2-ацетамідо-2-дезоксиглюкоза — у синтезі хітину;

ГДФ-маноза — у синтезі глюкоманану;

УДФ-ксилоза — у синтезі ксиланів;

УДФ-галактоза — у синтезі галактози.

Реакції полімеризації ЕПС. Синтез повторюваних олігосахаридних блоків, з яких переважно складаються ЕПС, здійснюється у клітинах мікроорганізмів за участю сполук ліпідної природи, зокрема ундекапренілфосфату (ліпід-Ф), який локалізований у цитоплазматичній мембрані:



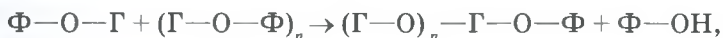
і так далі.

Порядок приєднання моносахаридів визначається субстратною специфічністю відповідних ферментів. Готові олігосахаридні блоки приєднуються до полісахаридного ланцюга з вивільненням ундекапренілфосфату. За участю ундекапренілфосфату відбувається синтез полісахаридів у ентеробактерій.

У продуцента ксантану процес синтезу ЕПС здійснюється за участю як ліпідного переносника ізопреноїдетилфосфату.

Особливості синтезу декстрану. Декстран — це полісахарид, що містить залишки глюкози, з'єднані на лінійних ділянках молекули α (1→6)-зв'язками. Декстран є позаклітинним полісахаридом, що синтезується багатьма молочнокислими бактеріями. Відомо кілька типів декстранів, які різняться тим, що крім α (1→6)-зв'язків у їхніх молекулах присутні α (1→3)- і α (1→2)-зв'язки, хоча порівняно із α (1→6)-зв'язками їх значно менше. Синтез декстрану здійснюється ферментом *декстрансахаразою*. Вихідною сполукою для синтезу декстрану є сахароза. Фермент відщеплює від сахарози молекулу глюкози і передає її на акцепторну молекулу без утворення будь-яких проміжних сполук, зокрема фосфоровмісних. Найактивнішим акцептором є низькомолекулярні декстрини, які несуть на одному з кінців фруктофуранозний залишок.

Сумарна реакція має вигляд:



де $\Phi-O-G$ — сахароза; Φ — фруктоза; G — глюкоза.

Витрати енергії на синтез полісахаридів. Процес полімеризації ЕПС — енергозатратний. Приєднання повторюваного блока до полісахаридного ланцюга відбувається за участю АТФ. Цікаво зазначити, що за наявності у складі ЕПС окиснених замісників (піровиноградної, уронових, жирних кислот, ацетату, сукцинату тощо) процес синтезу полісахаридів супроводжується вивільненням енергії. Причому чим більше ЕПС містить таких окиснених замісників, тим більше енергії генерується під час їх синтезу. У процесі синтезу нейтральних полісахаридів (наприклад курдлану) генерація енергії не відбувається.

На *рис. 5.44* показано узагальнену схему синтезу повторюваної ланки мікробного полісахариду етаполану з глюкози.

Для визначення енергетичних потреб синтезу ЕПС необхідно знати шляхи метаболізму ростового субстрату, структуру повторюваної ланки вуглеводного ланцюга ЕПС, а також співвідношення Р/О. Етаполан складається з нейтрального і двох кислих ЕПС, один з яких ацильований. Ацильований (АП) і неацильований (НАП) полісахариди ідентичні за молярним співвідношенням *D*-глюкози, *D*-манози, *D*-галактози, *L*-рамнози, *D*-глюкуронової і піровиноградної кислот (3:2:1:1:1:1) та структурою повторюваної ланки вуглеводного ланцюга (див. *табл. 5.10*, *рис. 5.44*). Різниця між цими ЕПС полягає в тому, що ацильований полісахарид містить жирні кислоти (C_{12} — C_{18}).

Для проведення розрахунків енерговитрат на синтез етаполану було взято такі припущення:

— 50 % глюкози катаболізується шляхом Ембдена—Мейергофа—Парнаса і 50 % — шляхом Ентнера—Дудорова;

— співвідношення Р/О становить 2;

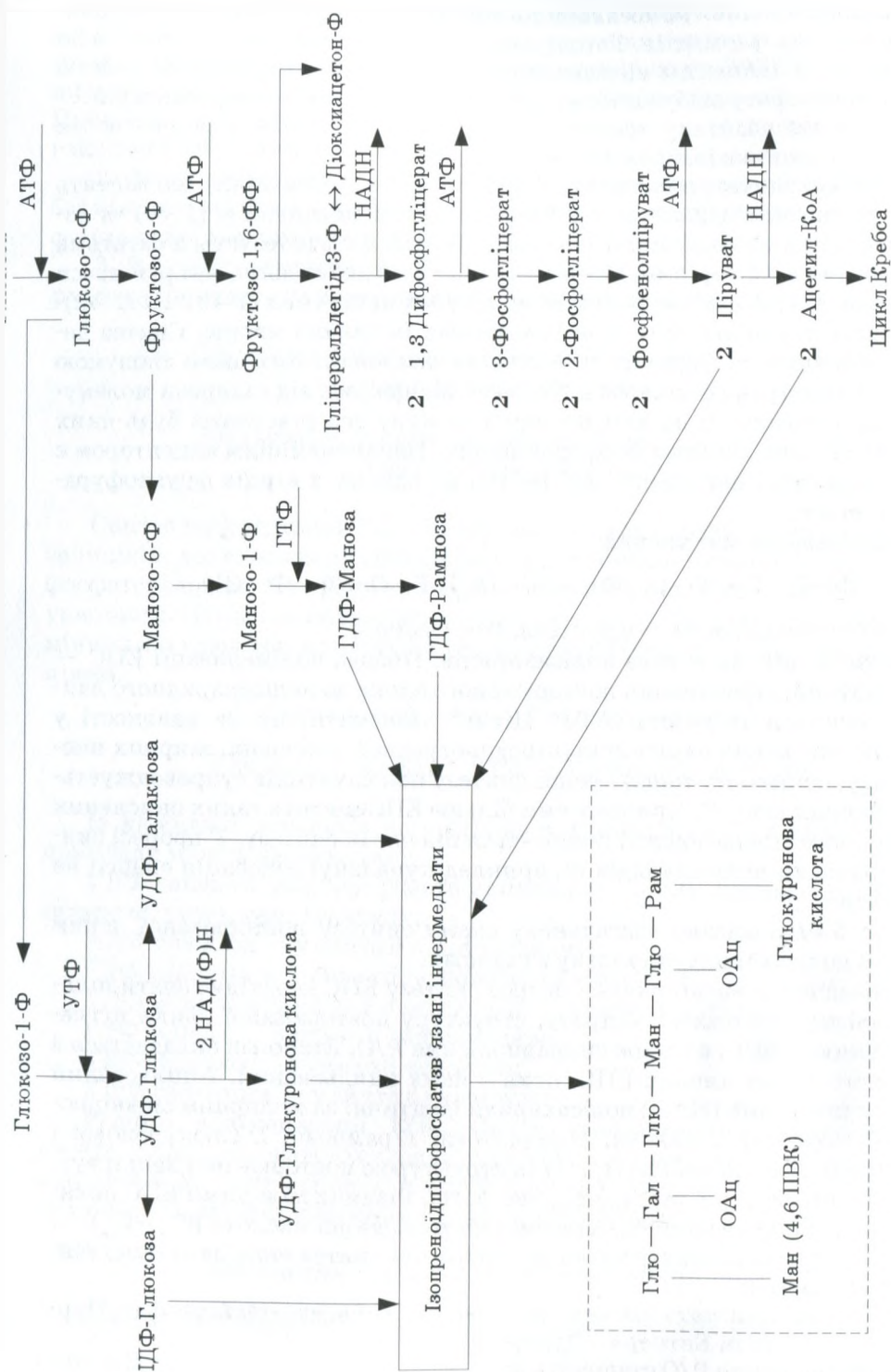


Рис. 5.44. Узагальнена схема синтезу повторюваної ланки мікробного полісахариду етанолану з глюкози:

Глю — глюкоза; Гал — галактоза; Ман — маноза; Рам — рамноза; ОАц — О-ацильні групи; ПВК — піровиноградна кислота

— ЕПС містить 50 % АП та 50 % НАП (оскільки залежно від умов культивування вміст АП у етаполані може варіювати від 0 до 90 %);

— у складі ланцюга АП міститься залишок лауринової ($C_{12}H_{24}O_2$) і пальмітинової ($C_{16}H_{32}O_2$) кислот;

— НАДФН, утворений у результаті катаболізму етанолу та глюкози, є джерелом відновлювальних еквівалентів, що окиснюються до води через дихальний ланцюг.

Потреба в АТФ для синтезу етаполану з глюкози. На рис. 5.44 показано узагальнену схему синтезу повторюваної ланки ацильованого полісахариду у разі гліколітичного шляху катаболізму глюкози. АТФ витрачається на синтез моносахаридів і жирних кислот, що входять до складу ланки АП.

Витрати енергії на синтез моносахаридів. З наведеної схеми (див. рис. 5.44) виходить, що один моль АТФ (або її еквіваленту) використовується у процесі утворення глюкозо-6-фосфату і один — нуклеозиддифосфатсахаридів (наприклад, глюкозо-1-фосфат $\rightarrow$ УДФ-глюкоза чи манозо-1-фосфат $\rightarrow$ ГДФ-маноза і т.ін.). Крім того, один макроергічний зв'язок витрачається для приєднання повторюваної ланки до молекули ЕПС (тобто під час полімеризації ЕПС). До складу ланки АП входять залишки семи нейтральних моносахаридів і залишок глюкуронової кислоти. Для їх синтезу необхідно 8 моль глюкози. Енерговитрати на синтез із глюкози одного моносахариду, що входить до складу ланки АП, становлять 2 моль АТФ. Загальна витрата АТФ на синтез моносахаридів, які входять до складу повторюваної ланки АП, і приєднання цієї ланки до молекули ЕПС становить $8 \cdot 2 + 1 = 17$ моль АТФ (як у разі гліколітичного, так і КДФГ-шляху катаболізму глюкози).

Витрати енергії на синтез жирних кислот із ацетил-КоА. Синтез жирних кислот здійснюється так: з ацетил-КоА та CO_2 за допомогою АТФ-залежної реакції утворюється малоніл-КоА і далі в результаті трьох наступних реакцій — бутирил-КоА. Цей бутирил-КоА взаємодіє з наступною молекулою малоніл-КоА, і процес повторюється до утворення $CH_3-(CH_2)_4-CO-SKoA$. У наступному циклі як кінцевий продукт утворюється $CH_3-(CH_2)_6-CO-SKoA$. Отже, послідовним нарощуванням ацил-КоА на двовуглецевий фрагмент (за допомогою взаємодії з малоніл-КоА і наступній втраті CO_2) синтезуються вищі жирні кислоти у вигляді відповідних ацил-КоА. Отже, для синтезу лауринової кислоти (C_{12}) необхідно п'ять, для утворення пальмітинової (C_{16}) — сім циклів. В одному циклі витрачається 1 моль АТФ. Отже, енерговитрати на синтез жирних кислот, що входять до складу повторюваної ланки АП, становлять $5 + 7 = 12$ моль АТФ (як у разі гліколітичного, так і КДФГ-шляху катаболізму глюкози).

Генерація енергії під час утворення етаполану з глюкози. З літературних даних про енерговитрати на синтез ЕПС відомо, що енергія генерується під час синтезу ПВК, глюкуронової кислоти та ацетил-КоА (попередника жирних кислот).

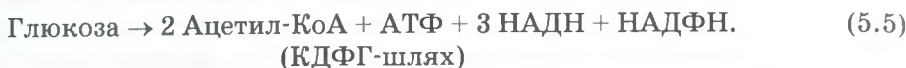
Синтез ПВК. Сумарну реакцію утворення ПВК з глюкози можна показати у вигляді таких рівнянь:



Утворення глюкуронової кислоти. У процесі окиснення глюкози до глюкуронової кислоти (у повторюваній ланці ЕПС міститься 1 моль глюкуронової кислоти) утворюється 2 НАД(Ф)Н:



Синтез ацетил-КоА. Сумарну реакцію утворення ацетил-КоА з глюкози можна показати у вигляді таких рівнянь:



Для синтезу моля лауринової кислоти необхідно 6, а для утворення моля пальмітинової кислоти — 8 моль ацетил-КоА. Всього необхідно 14 моль ацетил-КоА, для утворення яких витрачається 7 моль глюкози. Генерація енергії при цьому становитиме:



Дані щодо витрат АТФ на синтез ланки АП і НАП, а також дані про генерацію енергії (рівняння (5.1)–(5.7)) можна навести у вигляді *табл. 5.11*.

На утворення повторюваної ланки АП витрачається 15,5 моль глюкози (8 моль — на синтез моносахаридів і глюкуронової кислоти, 0,5 — на утворення ПВК і 7 моль на утворення жирних кислот), на синтез ланки НАП витрачається 8,5 моль глюкози (8 моль на синтез моносахаридів і глюкуронової кислоти, 0,5 моль — на утворення ПВК). Енергетичні потреби мікробного синтезу АП і НАП у перерахунку на моль використаної глюкози наведено в *табл. 5.12*.

Таблиця 5.11. Витрати і генерація енергії при утворенні повторюваної ланки ацильованого та неацильованого етаполану з глюкози

Шлях катаболізму глюкози	ЕПС	Витрати енергії на утворення ланки ЕПС, моль АТФ		Генерація енергії під час утворення ланки ЕПС, моль АТФ		
		Синтез моносахаридів	Синтез жирних кислот з ацетил-КоА	Синтез ПВК	Синтез глюкуронової кислоти	Синтез ацетил-КоА
Гліколіз	АП	17	12	3	4	70
	НАП	17	0	3	4	0
КДФГ-шлях	АП	17	12	2,5	4	63
	НАП	17	0	2,5	4	0

Таблиця 5.12. Енергетичні потреби синтезу ацильованого та неацильованого етаполану з глюкози

Шлях катаболізму глюкози	ЕПС	Витрата глюкози на синтез ланки ЕПС, моль	Витрати енергії, моль АТФ		Генерація енергії, моль АТФ	
			на синтез ланки ЕПС	на моль використаної глюкози	на синтез ланки ЕПС	на моль використаної глюкози
Гліколіз	АП	15,5	29	1,87	77	4,97
	НАП	8,5	17	2	7	0,12
	АП+НАП	24	46	1,92	84	3,50
КДФГ-шлях	АП	15,5	29	1,87	69,5	4,48
	НАП	8,5	17	2,0	6,5	0,76
	АП+НАП	24	46	1,92	76	3,17

Отже, генерація енергії під час синтезу повторюваної ланки АП і ланки НАП (АП + НАП) становить:

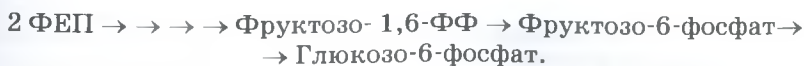
$3,5 - 1,92 = 1,58$ моль АТФ/моль використаної глюкози (гліколіз);

$3,17 - 1,92 = 1,25$ моль АТФ/моль використаної глюкози (КДФГ-шлях).

Згідно з припущенням, 50 % глюкози катаболізується за гліколітичним, а 50 % — за КДФГ-шляхом. Отже, генерація енергії під час синтезу етаполану з глюкози становить 1,42 моль АТФ/моль використаної глюкози.

5.4.1.2. Синтез полісахаридів на неуглеводних субстратах. На сьогодні немає підстав вважати, що механізм синтезу ЕПС на неуглеводних субстратах (наприклад C_1-C_2 -сполуки) принципово відрізняється від механізму синтезу на вуглеводах. Проте під час росту на неуглеводних сполуках необхідне функціонування реакцій глюконеогенезу. Тому інтенсивність цих реакцій і особливості їх регуляції можуть суттєво впливати на здатність синтезувати ЕПС. У цьому плані цікаві дослідження, проведені з *Xanthomonas campestris*. У процесі вирощування на глюкозі ці бактерії досить добре ростуть і синтезують велику кількість ЕПС ксантану. Водночас використання пірувату як єдиного джерела вуглецю забезпечує слабкий ріст за повної відсутності синтезу ЕПС. Це, проте, не означає, що бактерії не здатні поглинати і асимілювати екзогенний піруват, оскільки за присутності глюкози він залучається до метаболізму. Слабкий ріст на піруваті *Xanthomonas campestris* і нездатність до синтезу ксантану найвірогідніше зумовлені відсутністю або низькою активністю глюконеогенетичної гілки обміну речовин.

Здатність бактерій синтезувати ЕПС під час росту на C_1-C_2 -субстратах свідчить, очевидно, про високу активність процесу глюконеогенезу. Суть глюконеогенезу полягає в тому, що з двох молекул C_3 -сполуки синтезується одна молекула фосфорильованої гексози — глюкозо-6-фосфату або фруктозо-6-фосфату:



Тому очевидно, що ефективність росту і синтезу ЕПС буде значною мірою залежати від особливостей процесу перебудови C_1 - або C_2 -субстрату, який забезпечує біосинтез ключового C_3 -інтермедіату конструктивного метаболізму.

Біосинтез етаполану на етанолі. Етанол у гетеротрофних бактерій утилізується шляхом його окиснення до ацетату через ацетальдегід (рис. 5.45). Ацетат, що утворюється під час окиснення етанолу, залучається до метаболізму через ацетил-КоА. Бактерії, які використовують етанол як ростовий субстрат, витрачають ацетил-КоА, головним чином, на синтез жирних кислот, 2-оксоглутарату, C_4 -дикарбонових кислот, з яких потім утворюються C_3 -інтермедіати, вуглеводи, амінокислоти, нуклеотиди. C_4 -дикарбонові кислоти у мікроорганізмів, які ростуть на етанолі, ацетаті, жирних кислотах чи вуглеводнях, синтезуються у гліоксилатному циклі.

Дослідження показали, що метаболізм *Acinetobacter* sp. лімітований ацетил-КоА. Отже, внесення C_4 -дикарбонових кислот у середовище з етанолом повинно привести до посилення глюконеогенезу і підвищення синтезу етаполану. Ця гіпотеза була підтверджена експериментально. Встановлено, що

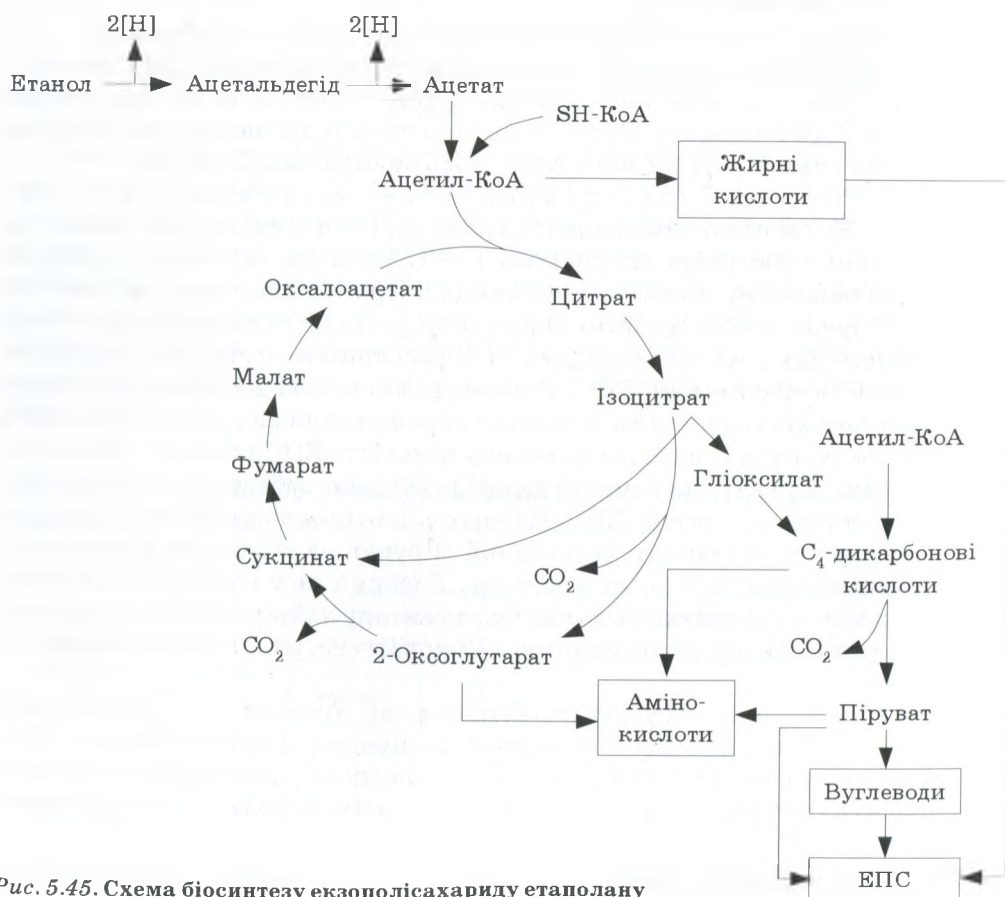


Рис. 5.45. Схема біосинтезу екзополісахариду етаполану у процесі вирощування *Acinetobacter* sp. на етанолі

екзогенні C_4 -дикарбонові кислоти (зокрема фумарат калію) витрачаються в основному на утворення ЕПС, і таким чином за їх допомогою можна регулювати спрямованість процесів біосинтезу у *Acinetobacter* sp.

Показано, що у разі дробного внесення фумарату калію (порціями по 0,2 %) в середовище з етанолом у стаціонарній фазі росту бактерій відбувається стехіометричне перетворення його на ЕПС. Реалізація цього підходу дала змогу підвищити кількість синтезованого етанолану у 4—5 разів.

Біосинтез полісахаридів на метані. Схему біосинтезу ЕПС у процесі вирощування бактерій *Methylococcus thermophilus* на метані показано на рис. 5.46. Ці бактерії реалізують гексулозофосфатний шлях асиміляції формальдегіду, цикл трикарбонових кислот у них виконує переважно біосинтетичну роль, а синтез оксалоацетату відбувається у ФЕП-карбоксилазній реакції. Слід зазначити, що активність ФЕП-карбоксилази у *Methylococcus thermophilus* невисока порівняно з іншими ключовими ферментами конструктивного метаболізму. Крім того, реакція карбоксилування ФЕП супроводжується гідролізом макроергічного фосфатного зв'язку, тому витрати енергії на синтез оксалоацетату досить значні, особливо якщо врахувати, що ця сполука витрачається на синтез 10 амінокислот і піримідинів (див. рис. 5.46). Показано, що внесення у середовище культивування *Methylococcus thermophilus* екзогенного аспартату — продукту амінування оксалоацетату — дало змогу суттєво підвищити синтез ЕПС.

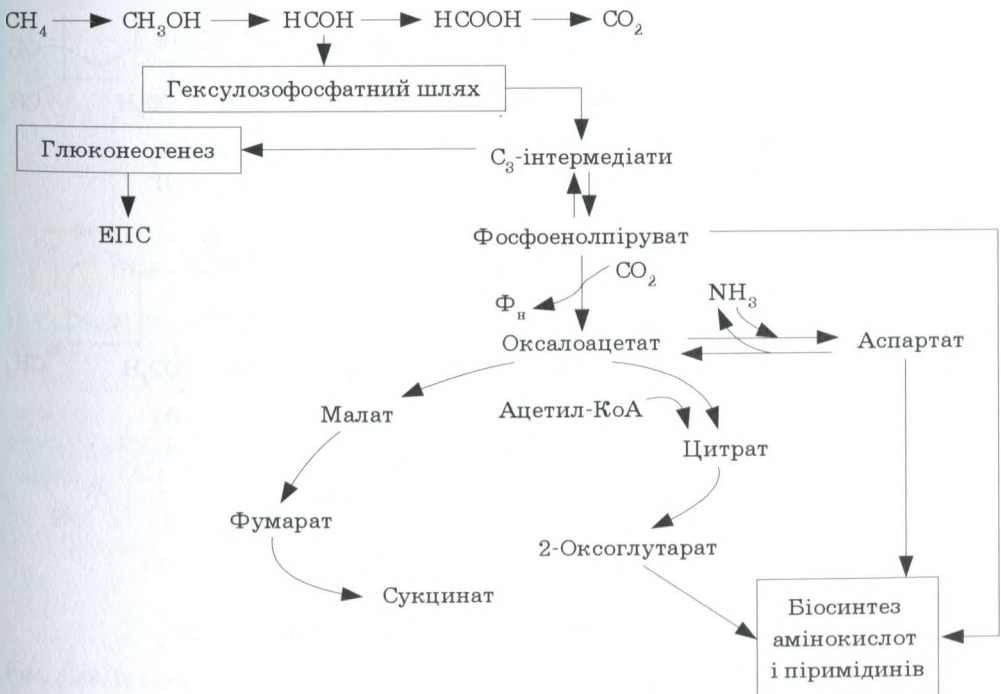


Рис. 5.46. Реакції, спряжені з метаболізмом оксалоацетату, у *Methylococcus thermophilus*

5.4.2. Біосинтез гіберелінів

Загальна характеристика гіберелінів. Гібереліни — це група фізіологічно активних сполук, регуляторів росту рослин гормональної природи. На сьогодні описано близько сорока сполук, об'єднаних спільною назвою «гібереліни». Продуцентами гіберелінів є мікроміцети роду *Fusarium* (*Fusarium moniliforme*). За хімічною природою гібереліни є тетрациклічними карбоновими кислотами, що належать до терпеноїдів (рис. 5.47).

Гібереліни позначають символом А з цифрою праворуч унизу, яка є порядковим номером, що надається кожному новому гібереліну у міру виділення та ідентифікації. Залежно від кількості вуглецевих атомів гібереліни поділяють на дві групи. До першої належать сполуки, що містять

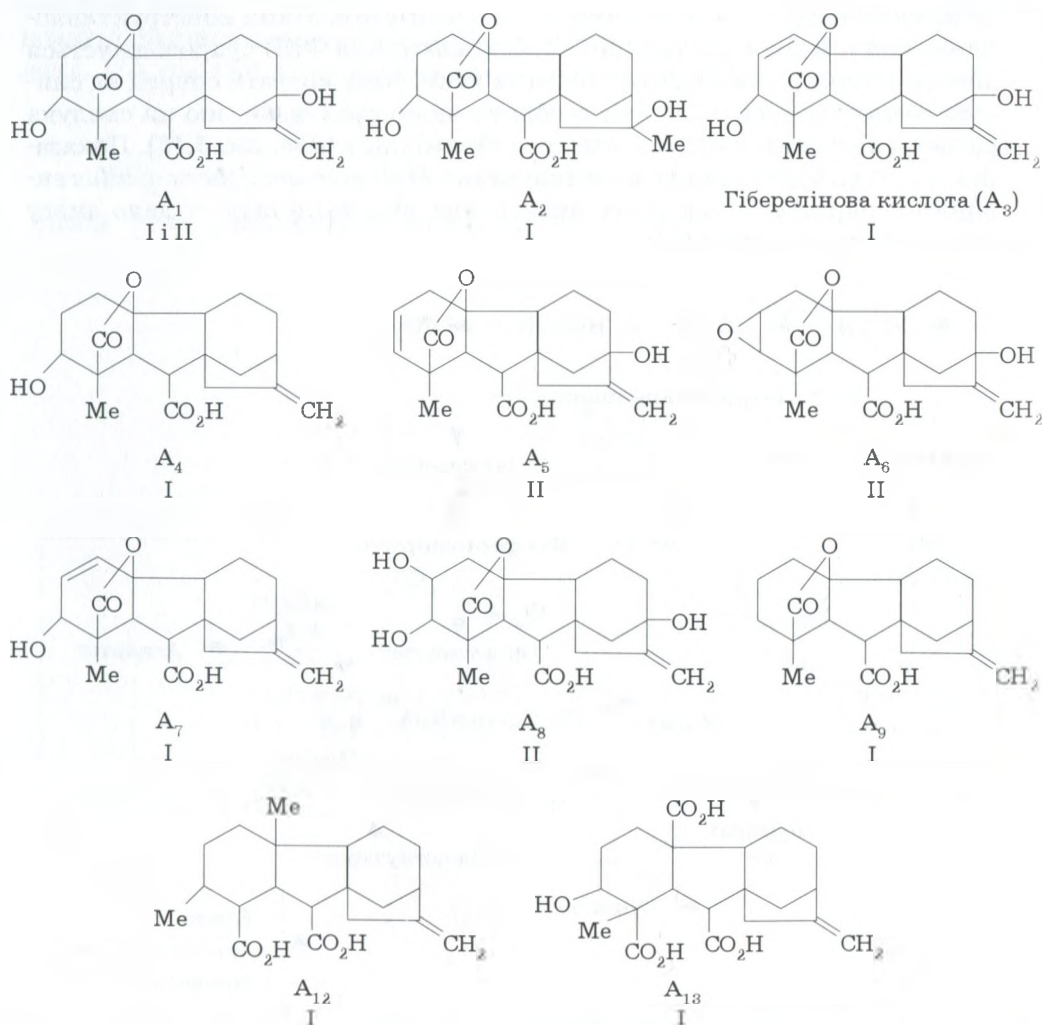


Рис. 5.47. Структура гіберелінів грибного (I) і рослинного (II) походження

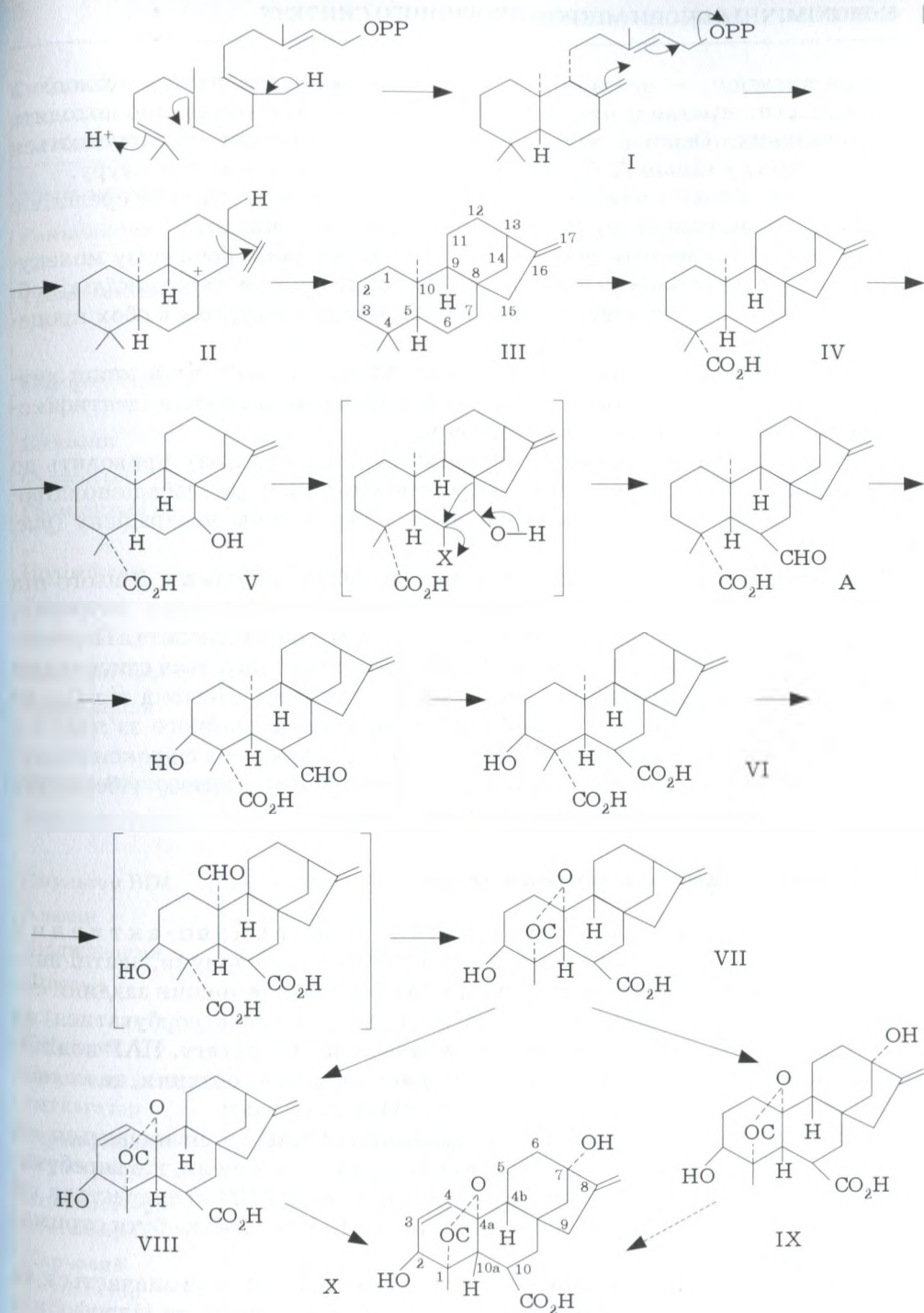


Рис. 5.48. Біосинтез гіберелінів:

I — лабадієнолпірофосфат; **II** — пімарадієн; **III** — (–)-каурен; **IV** — кауренова кислота; **V** — 7-оксикауренова кислота; **VI** — гіберелін A_{14} ; **VII** — гіберелін A_4 ; **VIII** — гіберелін A_7 ; **IX** — гіберелін A_1 ; **X** — гіберелінова кислота (гіберелін A_3)

20 атомів вуглецю, — це справжні дитерпени, кількість атомів вуглецю в молекулах яких кратна п'яти, до другої — C_{19} -вмісні сполуки, що походять від C_{20} -похідних. Основні відмінності між гіберелінами спостерігаються щодо замісників у кільці А. C_{19} -Гібереліни містять лактонну структуру.

Найпоширенішим і найбільш фізіологічно активним серед гіберелінів є сполука A_3 , що дістала назву гіберелова (гіберелінова) кислота.

Особливості біосинтезу гіберелінів. Початкові етапи біосинтезу молекули гіберелінів здійснюються шляхом, подібним до синтезу каротиноїдів, тобто через мевалонову кислоту. Загальним кінцевим продуктом в обох процесах синтезу є геранілгеранілпірофосфат.

Етапи синтезу від геранілгеранілпірофосфату до гіберелінів менш вивчені, ніж попередні. Ймовірно, наразі не всі проміжні продукти ідентифіковані. Проте загальний хід процесу відомий.

Протонініційована циклізація геранілгеранілпірофосфату приводить до утворення біциклічної структури, депротейнізація якої дає лабадієнолпірофосфат (лабадієн), який далі циклізується з утворенням пімарадієну (рис. 5.48).

Пімарадієн є вихідним продуктом для синтезу (-)-каурену. З нього під дією оксигеназ із змішаною функцією утворюються спочатку кауренол, далі — кауреналь, кауренова кислота, 7-оксикауренова кислота. Перетворення 7-оксикауренової кислоти на гібереліни супроводжується стисненням одного кільця, від якого відщеплюється атом вуглецю. Перехід від C_{20} - до C_{19} -структури відбувається з утворенням γ -лактону, подвійного зв'язку і у деяких гіберелінів (у тому числі й гіберелінової кислоти) — з гідроксилуванням молекули. Ензиматичні характеристики процесу синтезу гіберелінів дотепер залишаються недостатньо дослідженими.

5.4.3. Біосинтез поверхнево-активних речовин

5.4.3.1. Загальна характеристика поверхнево-активних речовин. Поверхнево-активні речовини (ПАР) — це сполуки, здатні знижувати поверхневий натяг на межі розподілу фаз. Такі речовини завдяки силам міжмолекулярної взаємодії можуть концентруватися (адсорбуватися) на межі розподілу фаз, знижуючи величину поверхневого натягу. ПАР поділяються на *молекулярно-розчинні*, що утворюють справжні розчини, та *колоїдні (міцелярно-розчинні)*. Основні характеристики ПАР такі:

— критична концентрація міцелоутворення (ККМ) — визначається як концентрація ПАР, за якої в його розчині утворюються міцели, що перебувають у рівновазі з молекулами чи іонами. На практиці ККМ визначається як максимальна концентрація істинно розчинного ПАР, яка може бути отримана в даних умовах;

— величина гідрофільно-ліпофільного балансу (ГЛБ) — визначається за 20-бальною шкалою і показує співвідношення гідрофільної та гідрофобної частин у молекулі ПАР. Чим вище значення ГЛБ, тим гідрофільнішою є сполука.

За класифікацією ізраїльського вченого Е. Розенберга (1999 р.), біосурфактанти поділяються на низько- та високомолекулярні (табл. 5.13).

Таблиця 5.13. Сурфактанти мікробного походження

Сурфактант	Продукент	Характеристика біо-ПАР
Низькомолекулярні		
Рамноліпіди	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas</i> spp.	ККМ = 10—30 мг/л
Трегалозоліпіди	<i>Rhodococcus erythropolis</i> <i>Arthrobacter</i> sp. <i>Mycobacterium</i> sp.	ККМ = 2 мг/л
Софороліпіди	<i>Torulopsis bombicola</i> <i>Candida borgoriensis</i>	Гліколіпід
Віскозин	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	$\sigma = 27$ мН/м, ліпопептид
Сурфактин	<i>Bacillus subtilis</i>	Ліпопептид, антибіотик
Грамїцидин S	<i>Bacillus brevis</i>	ККМ = 25 мг/л, $\sigma = 27$ мН/м, ліпопептид, антибіотик
Поліміксин	<i>Bacillus polymyxa</i>	Ліпопептид, антибіотик
Сераветин	<i>Serratia marcescens</i>	—
Ліпопептид	<i>Bacillus licheniformis</i>	—
Міколові кислоти	<i>Nocardia erythropolis</i>	—
Фосфоліпіди	<i>Acinetobacter</i> spp. <i>Thiobacillus thiooxidans</i>	ККМ = 30 мг/л
Високомолекулярні (емульгатори)		
Емульсан RAG-1	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> RAG-1	Комплекс полісахариду та білка
Емульсан BD4	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> BD413	Те саме
Алазан	<i>Acinetobacter radioresistens</i> KA53	» »
Біодисперсан	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> A2	» »
Ліпозан	<i>Candida lipolytica</i>	Комплекс (83 % вуглеводів і 17 % білка)
Емульсан 378	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	—
Інсектицидний емульгатор	<i>Pseudomonas tralucida</i>	Ацетильований полісахарид
Термофільний емульгатор	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	Протеїн-полісахарид- ліпідний комплекс
Ацетилгетеро- полісахарид	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	—
Харчовий емульгатор	<i>Candida utilis</i>	—
Сульфітований полісахарид	<i>Halomonas eurihalinia</i>	—

Примітка. «—» — даних немає.

До низькомолекулярних належать гліколіпіди (трегалозоліпіди, софорозоліпіди, рамноліпіди) та ліпопептиди (сурфактин, поліміксин, граміцидин S). Високомолекулярні біосурфактанти — це полісахариди, білки, ліпополісахариди, ліпопротеїни або комплекси цих сполук. Низькомолекулярні ПАР здатні знижувати поверхневий натяг на межі розподілу фаз, а високомолекулярні є ефективними стабілізаторами емульсій типу «олія у воді», тобто вони є емульгаторами.

Біо-ПАР є міцелярно-розчинними сполуками, тобто складаються з гідрофобної та гідрофільної частин. ПАР на основі значення ККМ можна поділити на три групи:

1) ПАР, для яких ККМ перевищує 7 г/л. Таким ПАР не притаманні мийні властивості;

2) типові мийні засоби, емульгатори. Значення ККМ становить 0,2—7,0 г/л;

3) ПАР, слабкорозчинні у воді і добре розчинні у вуглеводневих середовищах. ККМ не перевищує 0,2 г/л.

Слід зазначити, що дистильована вода має поверхневий натяг 73 мН/м. Ефективні біо-ПАР знижують це значення до 29—32 мН/м, маючи при цьому низькі значення ККМ.

За хімічною природою біо-ПАР поділяються на п'ять груп (класифікація німецького вченого Ф. Вагнера, який є провідним спеціалістом у галузі біотехнології мікробних ПАР): гліколіпіди; ліпопептиди (ліпопротеїни); ліпополісахариди; жирні кислоти та їх похідні; фосфоліпіди.

Структурні формули низькомолекулярних гліколіпідів мікробного походження (рамно-, трегалозо- і софорозоліпіди) показано на рис. 5.49—5.51, мікробних фосфоліпідів і ліпопептидів — на рис. 5.52 і 5.53, високомолекулярного біосурфактанту — ліпополісахариду емульсану — на рис. 5.54.

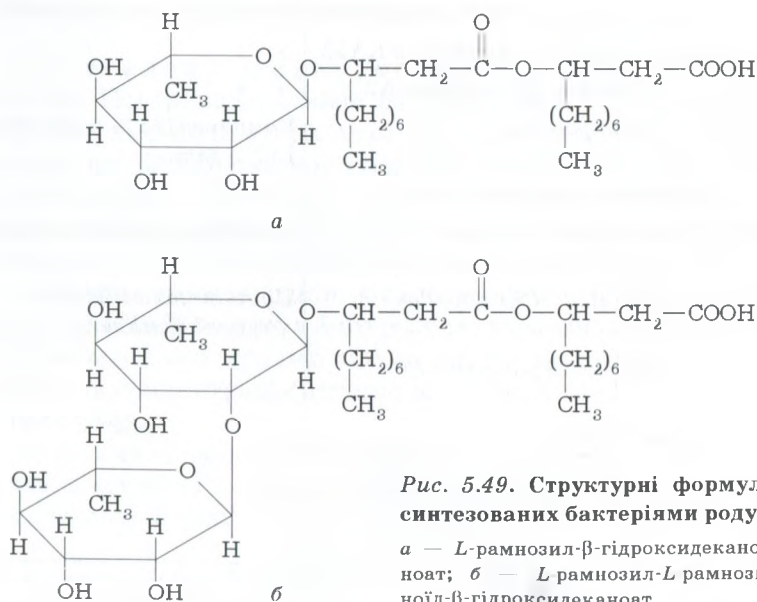


Рис. 5.49. Структурні формули рамноліпідів, синтезованих бактеріями роду *Pseudomonas*:

a — *L*-рамнозил- β -гидроксидеканоїл β -гидроксидеканоат; *б* — *L*-рамнозил-*L*-рамнозил- β -гидроксидеканоїл- β -гидроксидеканоат

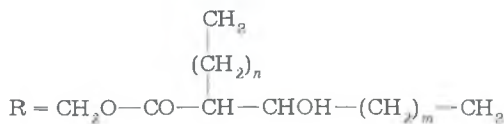
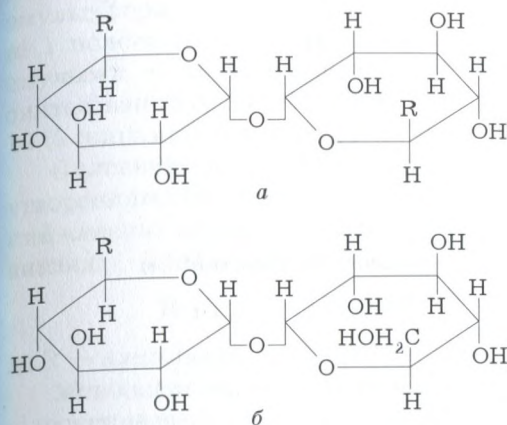


Рис. 5.50. Структурні формули міколатів, синтезованих *Rhodococcus erythropolis* DSM 43215:

a — трегалозо-6,6-диміколат; *б* — трегалозо-6,6-мономіколат

Рис. 5.51. Структурна формула софорозоліпиду, синтезованого *Torulopsis bombicola*

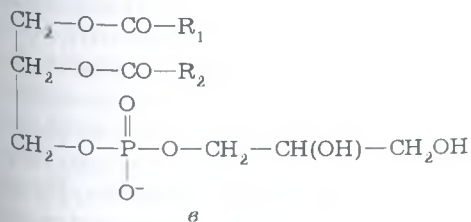
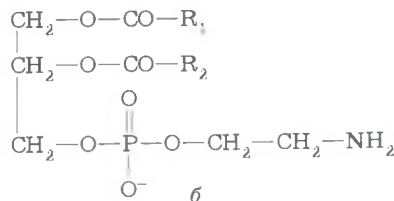
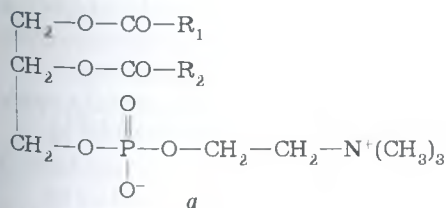
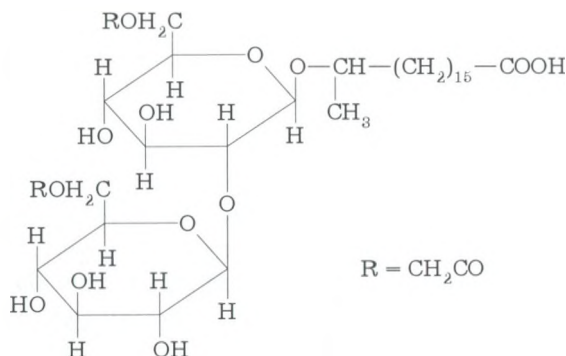


Рис. 5.52. Структурні формули фосфоліпідів:

a — фосфатидилхолін; *б* — фосфатидилетаноламін; *в* — фосфатидилгліцерин

емульгатори або поверхнево-активні речовини, здатні емульгувати вуглеводні і полегшувати їх транспортування у клітину. Прикладом може бути емульсан — позаклітинний і асоційований з клітинами ліпополісахарид, синтезований *Acinetobacter calcoaceticus* (див. рис. 5.51). Емульсан містить до 19 % жирних кислот, завдяки чому є прекрасним емульгатором.

Окиснення вуглеводнів каталізується, як правило, монооксигеназами з утворенням відповідних спиртів. У реакції беруть участь також молекулярний кисень і відновник. Загальне рівняння для реакцій цього типу має такий вигляд:



де R — алкільний радикал.

Монооксигенази є поліферментними системами, до складу яких входять гідроксилазний компонент (який і каталізує окиснення вуглеводнів), а також переносники електронів від НАДН і НАДФН (можливі й інші відновники) до гідроксилазного компонента.

Продукти монооксигенування вуглеводів (спирти) окиснюються спочатку до альдегідів, а потім до відповідних жирних кислот за участю дегідрогеназ.

Вищі жирні кислоти розкладаються шляхом β -окиснення. Спочатку жирна кислота перетворюється за допомогою фермента *ацил-КоА-синтетази* на відповідний складний ефір кофермента А. Далі КоА-ефір окиснюється за β -положенням (фермент *ацил-КоА-дегідрогеназа*) і розщеплюється з утворенням ацетил-КоА та КоА-ефіру жирної кислоти, скороченої на два вуглецеві атоми. При цьому відновлюється одна молекула НАД і молекула ФАД. Потім цикл β -окиснення повторюється до повного розпаду жирної кислоти.

У результаті розпаду жирних кислот з парною кількістю атомів вуглецю утворюється тільки ацетил-КоА. Тому мікроорганізмам, які ростуть на таких субстратах, потрібен гліюксилатний цикл як анаплеротична послідовність і глюконеогенез для синтезу вуглеводів для конструктивного метаболізму.

Біосинтез трегалозоліпідів з тетрадекану. Процес біосинтезу трегалозоліпідів (моно- і диміколатів) у процесі росту бактерій роду *Rhodococcus* на тетрадекані можна поділити на такі етапи (рис. 5.55):

1) утворення міколатів конденсацією двох жирних кислот, активованих у вигляді тіолових ефірів;

2) синтез вуглеводів (глюкозо-6-фосфату) у процесі глюконеогенезу з C_2 -сполук, утворюваних із *n*-алкану;

3) синтез трегалозо-6-фосфату за участю ферменту *трегалозо-6-фосфатсинтази*:



4) утворення трегалозоміколатів із трегалозо-6-фосфату і міколових кислот (див. рис. 5.55).

На сьогодні невідомо, які саме ферменти (ферментні системи) беруть участь у синтезі трегалозоміколатів.

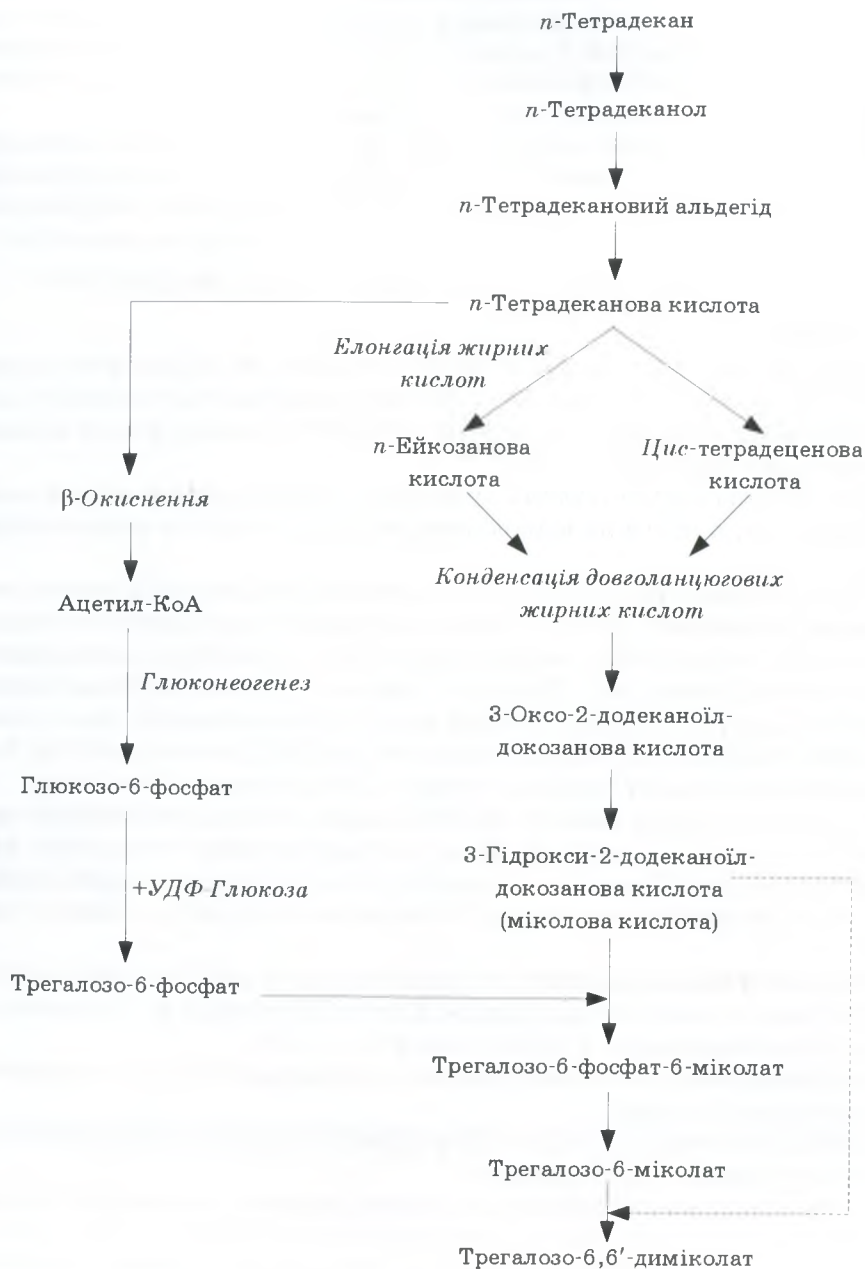


Рис. 5.55. Схема біосинтезу трегалозоліпідів (моно- і диміколатів) під час росту *Rhodococcus erythropolis* DSM 43215 на тетрадекані

КОНТРОЛЬНІ ЗАПИТАННЯ
ДО ПІДРОЗДІЛУ 5.4

1. На які групи поділяються мікробні полісахариди?
2. Охарактеризуйте найважливіші промислові полісахариди.
3. На які етапи можна поділити процес біосинтезу ЕПС?
4. Як можуть утворюватися під час росту на вуглеводних субстратах фосфорильовані похідні сахаридів?
5. Як здійснюється синтез попередників ЕПС?
6. Як відбувається синтез повторюваних олігосахаридних блоків?
7. Які особливості притаманні синтезу декстрану?
8. На прикладі полісахариду етаполану охарактеризуйте енергозатратність процесу синтезу цього ЕПС.
9. Під час синтезу яких складових ЕПС може генеруватися енергія?
10. Чим відрізняється синтез полісахаридів на вуглеводних і не-вуглеводних субстратах?
11. Чому під час росту на неуглеводних субстратах необхідне функціонування реакцій глюконеогенезу?
12. Як відбувається синтез етаполану під час росту на етанолі?
13. Які особливості притаманні біосинтезу ЕПС на метані?
14. Охарактеризуйте шляхи інтенсифікації біосинтезу ЕПС на етанолі й метані. У чому полягає їх сутність?
15. Що таке гібереліни? Яка їх хімічна природа?
16. Які реакції спільні у синтезі каротиноїдів і гіберелінів?
17. Як відбувається синтез гіберелінів із геранілгеранілпірофосфату?
18. Охарактеризуйте поверхнево-активні речовини мікробного походження.
19. На які групи поділяються мікробні ПАР залежно від їх хімічної природи?
20. Наведіть приклади низько- і високомолекулярних мікробних ПАР.
21. Як відбувається катаболізм *n*-алканів?
22. Які сполуки утворюються у результаті β -окиснення жирних кислот з парною і непарною кількістю атомів вуглецю?
23. Які етапи можна виділити у біосинтезі трегалозоліпідів під час росту бактерій на тетрадекані?

5.5. БІОСИНТЕЗ ВТОРИННИХ МЕТАБОЛІТІВ. АНТИБІОТИКИ

5.5.1. Загальна характеристика антибіотиків. Особливості мікробного синтезу антибіотиків

Ще у XIX ст. було відомо, що між різними мікроорганізмами можуть існувати як симбіотичні (взаємовигідні), так і антагоністичні відносини. Антагонізм — взаємодія двох організмів, за якої один пригнічує життєдіяльність іншого. Поштовхом до з'ясування матеріальної основи антибіозу було спостереження А. Флемінга, який у 1928 р. виявив, що колонія гриба *Penicillium notatum* пригнічувала ріст стафілококів. З тих пір було виявлено багато речовин з антибіотичною активністю. Антибіотики — це речовини біологічного походження, здатні навіть у низьких концентраціях пригнічувати ріст мікроорганізмів. Розрізняють речовини, що пригнічують ріст мікроорганізмів (бактеріостатичні, фунгістатичні), і такі, що їх знищують (бактерицидні, фунгіцидні).

Продуцентами антибіотиків є гриби з групи аспергілів, актиноміцети (стрептоміцети), а також деякі бактерії (бацили). Нині відомо понад 2000 антибіотиків, але тільки близько 50 з них використовуються як хіміотерапевтичні засоби.

Яке значення мають антибіотики для організмів-продуцентів? До утворення антибіотиків ведуть біохімічні шляхи, що належать до вторинного метаболізму. Ці шляхи та ферменти, що їх забезпечують, не є необхідними для росту та виживання клітин. Генетичний апарат, необхідний для синтезу антибіотиків, у разі їх непотрібності для організму, став би баластом, і організм звільнився б від нього в процесі еволюції. Проте, оскільки в природі зберігається лише те, що є доцільним, потрібно бачити в антибіотиках речовини, які забезпечують їх продуцентам селективні переваги і в природних умовах існування (наприклад, перевага у конкуренції за один і той самий ростовий субстрат).

З погляду біогенезу антибіотики розглядають як вторинні метаболіти. До вторинних метаболітів ці сполуки належать на основі таких ознак: синтезуються тільки деякими видами мікроорганізмів; не виконують яких-небудь явних функцій у процесі росту і переважно утворюються після припинення росту; здатність до синтезу часто втрачається в результаті мутацій; часто утворюються у вигляді комплексів подібних продуктів.

Класифікацію антибіотиків за механізмом біологічної дії наведено у табл. 5.14, а найважливіші антибіотики мікробного походження — у табл. 5.15.

Взаємозв'язок між первинним і вторинним метаболізмом. Дослідження біосинтезу антибіотиків полягає у визначенні послідовності ферментативних реакцій, у ході яких один чи кілька первинних метаболітів (або проміжних продуктів їх синтезу) перетворюються на антибіотик. Треба мати на увазі, що утворення вторинних метаболітів, особливо у великій кількості, супроводжується значними змінами у первинному метаболізмі клітини, оскільки у цьому разі клітина повинна синтезувати вихідний матеріал, постачати енергію, наприклад у формі АТФ, і відновлені коферменти. Тому не дивно,

Таблиця 5.14. Класифікація антибіотиків (за механізмом біологічної дії)

Номер групи	Біологічна дія антибіотиків	Представники
1	Пригнічення синтезу клітинної стінки	Пеніциліни, бацитрацин, ванкоміцин, цефалоспорини
2	Порушення функцій мембрани	Полієни, валіноміцин, граміцидини, трихоміцин
3	Пригнічення синтезу (обміну) РНК	Анзаміцини, гризеофульвін, канаміцин, неоміцин, новобіоцин, олівоміцини
4	Пригнічення синтезу (обміну) ДНК	Актиноміцин Д, мітоміцини, новобіоцин, саркоміцин, брунеоміцин
5	Пригнічення синтезу пуринів і піримідинів	Азасерин, декоїнін, саркоміцин
6	Пригнічення синтезу білка	Бацитрацин, аміноглікозиди, макроліди, тетрацикліни, хлорамфенікол
7	Інгібітори дихання	Олігоміцини, патулін, піоціанін
8	Інгібітори окиснювального фосфорилування	Валіноміцин, граміцидини, коліцини, олігоміцин
9	Антиметаболіти амінокислот, вітамінів, нуклеїнових кислот	Циклосерин
9	Конкурентна дія в процесі метаболізму	Пуроміцин, циклосерин, актитіазова кислота

Таблиця 5.15. Антибіотики мікробного походження

Мікро-організми	Продуцент	Антибіотики	Хімічна природа антибіотиків
Бактерії	<i>Bacillus brevis</i> <i>Bacillus polymyxa</i> , <i>Bacillus circulans</i> <i>Bacillus licheniformis</i> <i>Streptococcus lactis</i>	Граміцидини (А, В, С _D , С(S), D) Поліміксини (А ₁ , А ₂ , В ₁ , В ₂ , С, D ₁ , D ₂ , Е ₁ (колістин А), Е ₂ (колістин В), М, Р ₁ , Р ₂) Бацитрацини (А, А ₁ , В, С, D, Е, F ₁ , F ₂ , F ₃ , G) Нізін	Поліпептиди та низькомолекулярні білки
Бактерії (актиноміцети)	<i>Streptomyces griseus</i> <i>Streptomyces fradiae</i> , <i>Streptomyces albogriseolus</i> <i>Streptomyces kanamyceticus</i> <i>Micromonospora purpurea</i> (echinospora)	Стрептоміцин Неоміцини Канаміцини Гентаміцини	Аміноглікозиди

Мікро-організми	Продукент	Антибіотики	Хімічна природа антибіотиків
Бактерії (актино-міцети)	<i>Streptomyces aureofaciens</i> <i>Streptomyces rimosus</i> <i>Streptomyces aureofaciens</i>	Хлортетрациклін Окситетрациклін Тетрациклін	Тетрацикліни
	<i>Streptomyces antibioticus</i> , <i>Streptomyces chrysomallus</i> , <i>Streptomyces flavus</i>	Актиноміцини	Хромопептиди
	<i>Streptomyces erythreus</i> <i>Streptomyces antibioticus</i> <i>Streptomyces filipensis</i> <i>Streptomyces notalensis</i>	Еритроміцин Олеандоміцин Філіпін Пімаріцин	Макроліди
	<i>Nocardia mediterranea</i> представники роду <i>Micromonospora</i> <i>Streptomyces spectabilis</i> <i>Streptomyces tolypophorus</i>	Рифаміцини (рифозин, рифампіцин, рифамід) Стрептоваріцини Толіпоміцини	Анзаміцини
Міцелі-альні гриби	<i>Penicillium chrysogenum</i> , <i>Penicillium brevicompactum</i> , <i>Penicillium nigricans</i> , <i>Aspergillus nidulans</i> , <i>Aspergillus flavus</i> <i>Cephalosporium acremonium</i>	Пеніциліни Цефалоспорини	β-лактамні антибіотики
	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Фумагілін	Полієновий антибіотик
	<i>Penicillium griseofulvum</i> <i>Trichotecium roseum</i>	Гризеофульвін Трихотецин	Гетероциклічні антибіотики

що за порівняння штамів, здатних синтезувати антибіотики, виявляються значні відмінності у концентрації ферментів, які прямо не беруть участі у синтезі даного антибіотика.

Основні біосинтетичні шляхи. Механізми біосинтезу антибіотиків можна поділити на три основні категорії:

1) антибіотики, що походять від єдиного первинного попередника. Шлях їх біосинтезу має послідовність реакцій, що модифікують вихідний продукт так само, як і у процесі синтезу амінокислот або нуклеотидів;

2) антибіотики, що походять від двох чи трьох різних первинних метаболітів, які модифікуються і конденсуються з утворенням складної молекули. Аналогічні випадки спостерігаються у первинному метаболізмі під час синтезу деяких коферментів, наприклад фолієвої кислоти або коферменту А;

3) антибіотики, що беруть початок від продуктів полімеризації кількох подібних метаболітів з утворенням основної структури, яка у подальшому може модифікуватися у ході інших ферментативних реакцій.

У результаті полімеризації синтезуються антибіотики чотирьох типів:

- 1) поліпептидні антибіотики, що утворюються конденсацією амінокислот;
- 2) антибіотики, утворювані з ацетат-пропіонатних одиниць у реакціях полімеризації, подібних до реакцій біосинтезу жирних кислот;
- 3) терпеноїдні антибіотики, що походять з ацетатних одиниць у шляху синтезу ізопреноїдних сполук;
- 4) аміноглікозидні антибіотики, утворювані в реакціях конденсації, подібних до біосинтезу полісахаридів.

Синтез «родин» антибіотиків. Часто штами мікроорганізмів синтезують кілька подібних у хімічному чи біологічному відношенні антибіотиків, що утворюють «родину» (антибіотичний комплекс). Утворення «родин» характерне не тільки для біосинтезу антибіотиків, а є загальною властивістю вторинного метаболізму, пов'язаного з великою кількістю проміжних продуктів. Біосинтез комплексів споріднених сполук здійснюється у ході таких метаболічних шляхів:

1. Біосинтез ключового метаболіту.
2. Модифікація ключового метаболіту за допомогою поширених реакцій, наприклад окисненням метильної групи у спиртову і далі у карбоксильну, відновленням подвійних зв'язків, дегідруванням, метилюванням, етерифікацією тощо.
3. Один і той самий метаболіт може бути субстратом двох чи кількох таких реакцій, що приводять до утворення двох чи більше різних продуктів, які в свою чергу можуть піддаватися різним перетворенням за участю ферментів, даючи початок «метаболічному дереву».
4. Один і той самий метаболіт може утворюватися в двох (чи більше) різних шляхах, в яких змінюється тільки порядок ферментних реакцій, даючи початок «метаболічній мережі».

Досить своєрідні концепції «метаболічного дерева» і «метаболічної мережі» можна пояснити прикладами біогенезу родини рифаміцинів (дерево) і еритроміцинів (мережа).

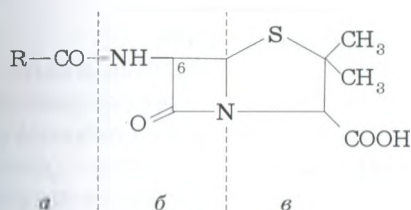
Першим метаболітом у біогенезі родини рифаміцинів є проторифаміцин I (рис. 5.56), який можна розглядати як ключовий метаболіт. У послідовності реакцій, порядок яких невідомий, проторифаміцин I перетворюється на рифаміцин W і рифаміцин S, завершуючи частину синтезу з використанням єдиного шляху (стовбур дерева). Рифаміцин S є вихідною точкою розгалуження кількох альтернативних шляхів: конденсація з двовуглецевим фрагментом дає початок рифаміцину O і рифаміцинам L і B. Останній у результаті окиснення перетворюється на рифаміцин Y. Відщеплення одновуглецевого фрагмента під час окиснення рифаміцину S приводить до утворення рифаміцину G, а в результаті невідомих реакцій рифаміцин S перетворюється на так званий рифаміциновий комплекс (рифаміцини A, C, D і E). Окиснення метильної групи при C-30 дає початок рифаміцину R.

Ключовим метаболітом родини еритроміцинів є еритронолід B (Ер. В), який перетворюється на еритроміцин A (складніший метаболіт) за допомогою чотирьох реакцій (рис. 5.57): 1) глікозилювання у положенні 3 конденсацією з мікарозою (Мік) (реакція I); 2) перетворення мікарози на кладинозу (Клад)

у результаті метилювання (реакція II); 3) перетворення еритроноліді В на еритронолід А (Ер А) у результаті гідроксилування у положенні 12 (реакція III); 4) конденсація з дезозаміном (Дез) у положенні 5 (реакція IV).

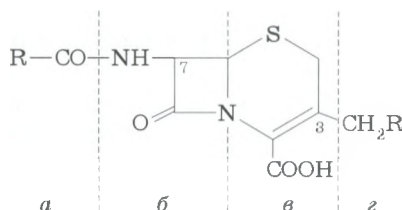
Оскільки порядок цих чотирьох реакцій може варіювати, можливі різні метаболічні шляхи, а разом вони утворюють метаболічну мережу, показану на рис. 5.57. Слід зазначити, що є також шляхи, які є комбінацією древа і мережі.

5.5.1.1. Будова деяких антибіотиків. β -Лактамні антибіотики. У хімічному відношенні антибіотики цього класу характеризуються наявністю у молекулі β -лактаму — циклічного аміді, що утворює чотиричленне кільце. Клас β -лактамів містить дві найважливіші родини антибіотиків: пеніциліни, у яких лактамне кільце з'єднане з тiazолідиновим (п'ятичленне кільце), і цефалоспори́ни, у яких є дигідротіазинове (шестичленне) кільце (рис. 5.58). Більша частина похідних β -лактамів, використовуваних у клініці, одержана модифікацією бокового ланцюга у положенні 6 пеніцилінів або у положенні 7 цефалоспори́нів. Активні похідні цефалоспори́нів одержані також модифікацією замісника у положенні 3.



Пеніциліни

a — боковий ланцюг;
b — β -лактамне кільце;
v — тiazолідинове кільце



Цефалоспори́ни

a — боковий ланцюг;
b — β -лактамне кільце;
v — дигідротіазинове кільце;
z — група у положенні 3

Рис. 5.58. β -Лактамні антибіотики

Тетрацикліни. В основі структури тетрациклінів лежить нафтацен (рис. 5.59). Найвідомішими серед цього класу антибіотиків є тетрациклін (див. рис. 5.59), хлортетрациклін (ауреоміцин), окситетрациклін (тераміцин).

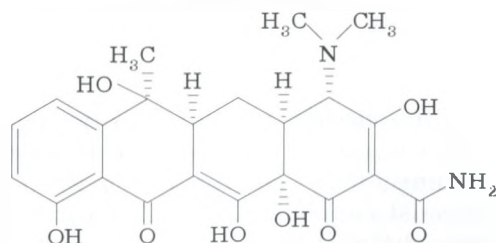


Рис. 5.59. Структурна формула тетрацикліну

Аміноглікозиди. За хімічною структурою антибіотики цього класу належать до аміноциклітолів (циклогексан з гідроксильними і аміно- чи гуанідинозамісниками) з глікозильними замісниками за однією чи кількома гідроксильними групами. Залежно від природи аміноциклітолу аміноглікозидні антибіотики поділяють на кілька груп.

Основні аміноциклітольмісні антибіотики

Аміноциклітол	Основні антибіотики
Стрептідин	Стрептоміцин
2-Дезоксистрептамін	Неоміцин
	Канаміцин
	Гентаміцин
	Сизоміцин
	Тобраміцин
	Селдоміцин
Актинамін	Спектиноміцин

Структурну формулу стрептоміцину показано на *рис. 5.60*.

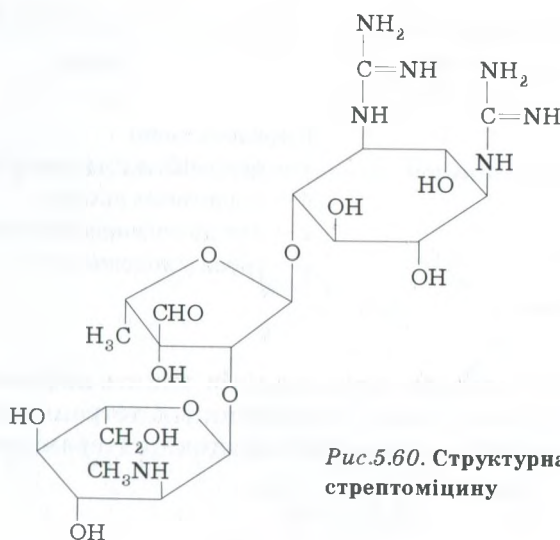


Рис. 5.60. Структурна формула антибіотика стрептоміцину

Макроліди. Антибіотики, молекули яких містять великі аліфатичні лактони, називаються *макролідами* (*макролідними*). Вони поділяються на два класи з різними біологічними властивостями і структурою: антибактеріальні макроліди і протигрибкові макроліди, відомі також під назвою *полієни*.

Антибактеріальні макроліди характеризуються меншим розміром лактонних кілець, які містять від 12 до 16 атомів. Лактонне кільце має метильні і гідроксильні замісники у різних положеннях. Обов'язково присутній один

вуглеводний залишок, зазвичай у положенні 5, часто є й другий — у положенні 3. Структура еритроміцину А (рис. 5.61) типова для макролідів: вона містить кільце з 14 атомів, без подвійних зв'язків, з метильними групами при парних атомах вуглецю і з карбонільною групою у положенні 9. У положенні 5 міститься замісник дезозамін, у положенні 3 — кладиноза.

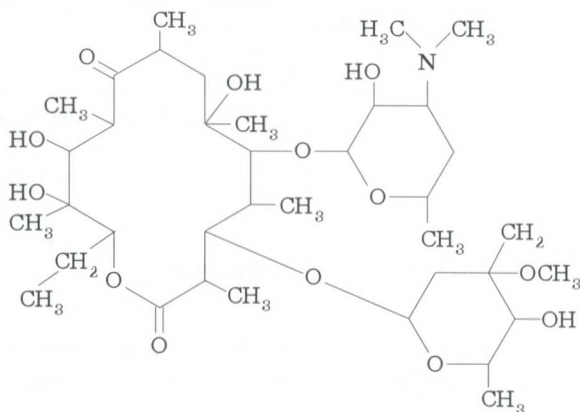


Рис. 5.61. Структурна формула еритроміцину А

Анзаміцини. Анзаміцини мають циклічну структуру, яка нагадує структуру макролідів. Циклічна частина їх молекули складається з ароматичного угруповання і аліфатичного ланцюга, причому кільце замикається амідною групою, в результаті чого ці сполуки є лактамами, а не лактонами. Залежно від природи ароматичної групи їх поділяють на два класи: з бензольним ядром і нафталіновим. Анзаміцини з нафталіновим ядром у свою чергу також поділяються на дві групи: стрептоваріцини (у яких аліфатичний ланцюг безпосередньо з'єднаний з ароматичним ядром зв'язком вуглець—вуглець) і рифаміцини, толіпоміцини і галоміцини (у яких аліфатичний ланцюг з'єднаний з ароматичною частиною ефірним зв'язком).

Найважливішою групою анзаміцинів є рифаміцини. На *рис. 5.62* показано структурну формулу рифаміцину SV і B, а на *рис. 5.63* — рифампіну (рифампіцину).

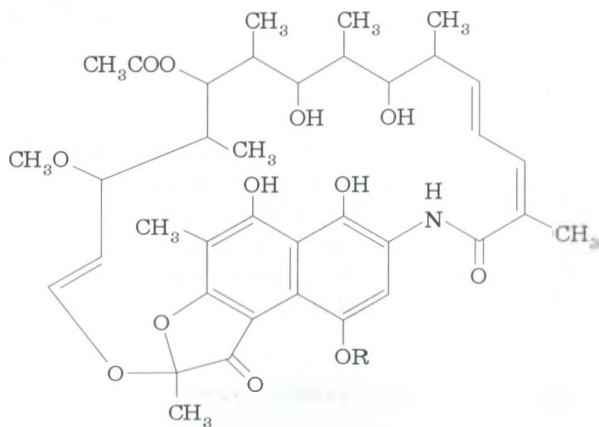


Рис. 5.62. Рифаміцин SV ($R=H$)
і В ($R=CH_2COOH$)

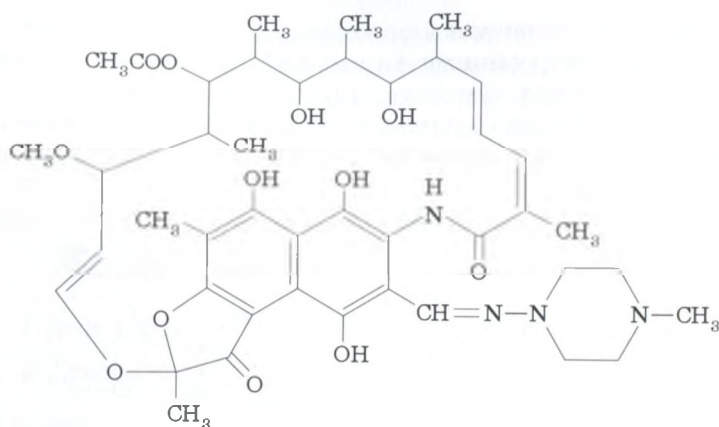


Рис. 5.63. Структурна формула рифампіну

Пептидні антибіотики. Вони складаються з амінокислотних залишків, з'єднаних пептидними зв'язками. У хімічному відношенні це досить гетерогенна група речовин, які відрізняються від білків за такими ознаками: мають меншу молекулярну масу (близько 10^3 дальтон); містять *D*-амінокислоти; містять деякі незвичайні амінокислоти (*N*-метиламінокислоти, β -амінокислоти); є циклічними сполуками; містять гетероциклічні кільця (часто тiazольні).

Структурну формулу поліміксину В показано на рис. 5.64.

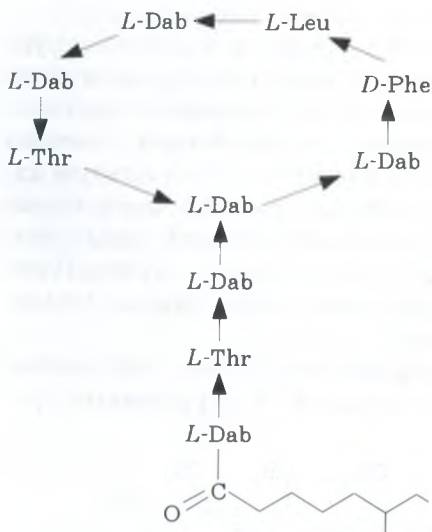


Рис. 5.64. Поліміксин В:

L-Dab — 2,4-діаміномасляна кислота; *L*-leu — лейцин; *D*-Phe — фенілаланін; *L*-Thr — треонін; аліфатичний боковий ланцюг — 6-метилоктанова кислота

Гризеофульвін. Протигрибковий антибіотик гризеофульвін описаний у 1939 р. і впродовж багатьох років вважався неактивним. Тільки з кінця 50-х років ХХ ст. став використовуватися у клінічній практиці. За хімічною природою є гетероциклічним антибіотиком (рис. 5.65).

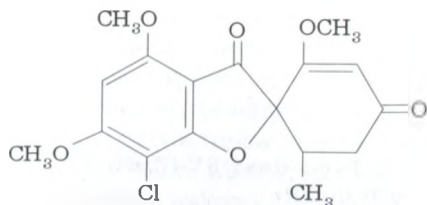


Рис. 5.65. Структурна формула гризеофульвіну

5.5.2. Шляхи біосинтезу антибіотиків

5.5.2.1. Біосинтез антибіотиків, що походять від єдиного первинного метаболіту (хлорамфенікол, нуклеозидні антибіотики). Структура багатьох антибіотиків свідчить про те, що вони походять від певних амінокислот або від проміжних продуктів їх синтезу. До таких антибіотиків належать хлорамфенікол і нуклеозидні антибіотики.

Біосинтез хлорамфеніколу. Вторинні метаболіти з ароматичною структурою можуть утворюватися у біосинтетичних шляхах двох типів: шляхом циклізації ланцюгів, побудованих з ацетатних одиниць (точніше, з малонату), про що йтиметься далі, або звичайним шляхом, характерним для утворення первинних ароматичних метаболітів, так званим шляхом шикімової кислоти (за назвою одного з характерних проміжних продуктів). Хлорамфенікол утворюється саме таким шляхом.

Перший ідентифікований продукт біосинтетичної послідовності — *n*-амінофенілаланін, який не є звичайним продуктом первинного метаболізму (рис. 5.66). Експерименти з міченими попередниками показали, що він утворюється за тим же шляхом, що й ароматичні амінокислоти. Останнім проміжним продуктом, загальним для обох шляхів (синтезу ароматичних амінокислот і хлорамфеніколу) є, очевидно, префенова кислота. Наступні проміжні продукти синтезу хлорамфеніколу були встановлені з використанням мічених попередників, а загальну схему біосинтезу показано на рис. 5.66.

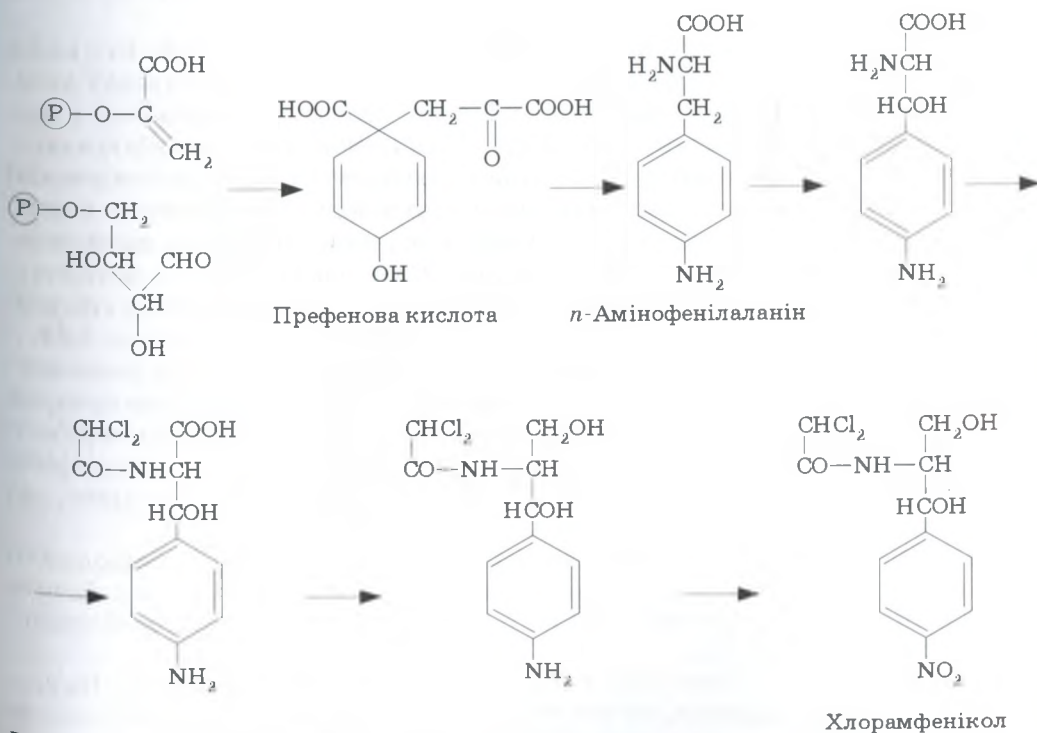


Рис. 5.66. Біосинтез хлорамфеніколу

Цікавою особливістю цієї схеми є утворення первинної спиртової групи у результаті відновлення карбоксильної групи, а також походження нітрогрупи, що підтверджує уявлення про те, що функціональні групи, які містять азот в окисненому стані (гідроксиамін, нітрозо- і нітрогрупи), одержуються шляхом окиснення амінів.

Біосинтез нуклеозидних антибіотиків. Є кілька антибіотиків із структурою, аналогічною природним нуклеозидам, проте жоден із них на сьогодні не має важливого практичного значення. Відмінність цих антибіотиків від природних нуклеозидів полягає у модифікації пуринової чи піримідинової основи або вуглеводного залишку (рибози) і дуже рідко зачіпає відразу обидва компоненти. Багато які з цих антибіотиків синтезуються із звичайних нуклеотидів. Одним із них є кордицепін (3'-дезоксиаденозин), який утворюється з аденозину (або з аденілової кислоти) у реакції, показаній на *рис. 5.67*. Ця реакція є простим відновленням гідроксильної групи без зміни основи молекули. Подібні реакції здійснюються у первинному метаболізмі під час синтезу 2'-дезоксинуклеотидів.

Складніші приклади модифікації пуринової основи характерні для антибіотиків туберцидину, сангіваміцину і тойокаміцину. Ці антибіотики утворюються з ГТФ у послідовності реакцій, які досі повністю не встановлені, проте які можна навести так, як на *рис. 5.67*. Кінцеві продукти все ще містять атоми вихідної сполуки, за винятком С-8 і азоту у положенні 9, які заміщені на атоми С-1 і С-2 залишку рибози.

Реакції цього типу нагадують шлях первинного метаболізму, який веде до синтезу птеридину.

5.5.2.2. Антибіотики, утворювані конденсацією кількох метаболітів (лінкоміцин, новобіоцин). Синтез багатьох антибіотиків включає конденсацію двох чи більше молекул, утворюваних у процесі первинного метаболізму, які можуть бути різною мірою модифіковані.

Біосинтез лінкоміцину. Лінкоміцин утворюється шляхом конденсації циклічної амінокислоти і модифікованого вуглеводу. Про біосинтез компонентів молекули лінкоміцину відомо порівняно мало. Показано, що метильні групи при атомі азоту, сірка і пропільний ланцюг походять із метіоніну. Піролідінове кільце утворюється з тирозину у шляху, паралельному утворенню меланіну. Неповну схему біосинтезу лінкоміцину показано на *рис. 5.68*.

Біосинтез новобіоцину. Цей антибіотик утворюється з трьох компонентів: вуглеводу, кумарину і похідного бензойної кислоти. Цікаво, що кумарин і похідне бензойної кислоти утворюються від одного первинного метаболіту — тирозину. На схемі (*рис. 5.69*) для спрощення показано, що модифікація вуглеводу відбувається до конденсації з кумарином, але ймовірно, що метилювання і карбамоїлювання відбуваються після конденсації.

Цікаво зазначити, що аліфатичний ланцюг у положенні 3 бензольного кільця не утворюється з мевалонової кислоти, хоча це можна передбачити виходячи з його структури, тобто його біосинтез не пов'язаний із біосинтезом ізопреноїдних сполук.

Детальнішу схему біосинтезу новобіоцину показано на *рис. 5.70*. На сьогодні більшість ферментів, що беруть участь у синтезі цього антибіотика, не ідентифіковано. Хоча слід зазначити, що нуклеотидна послідовність генів,

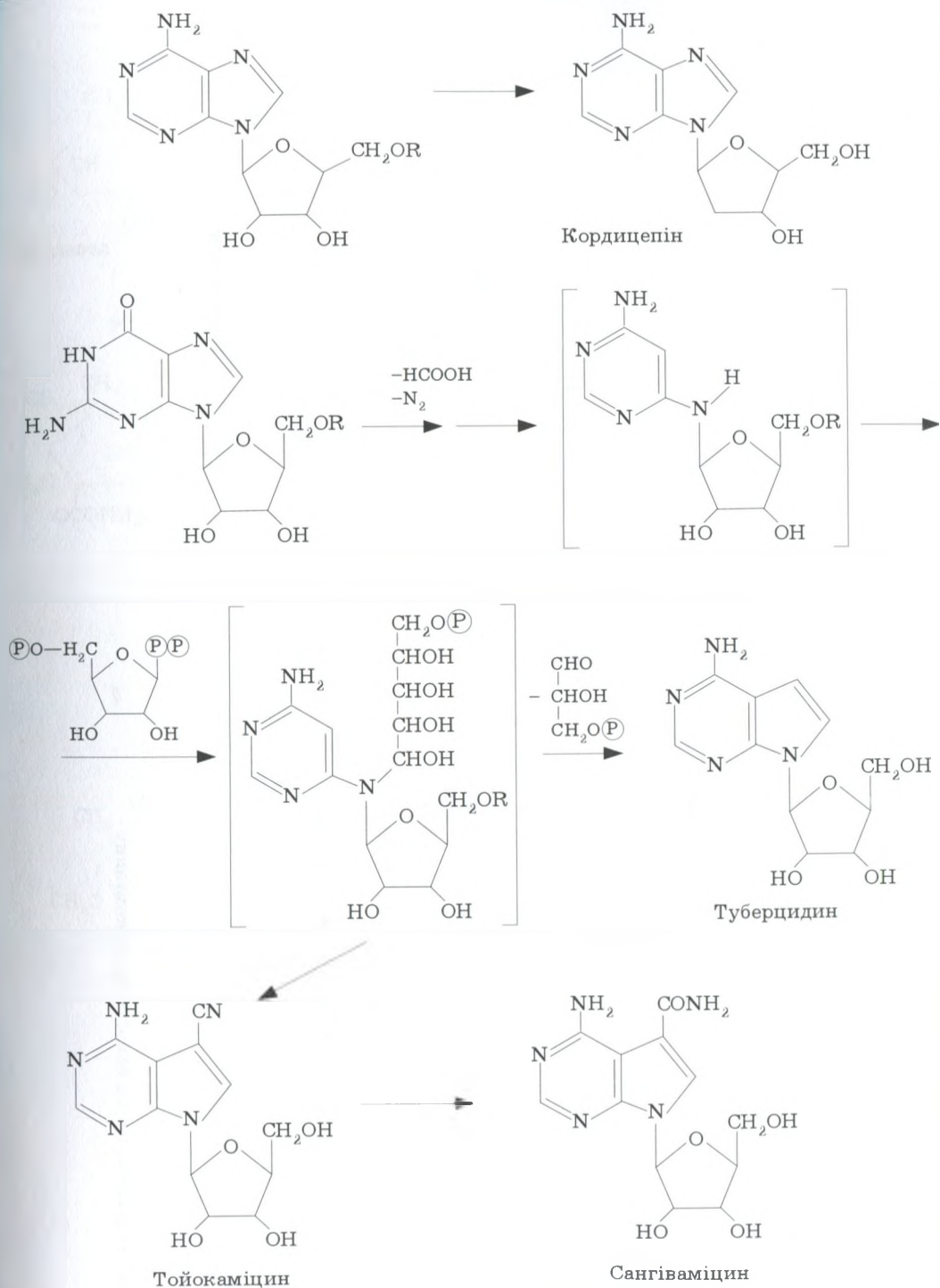


Рис. 5.67. Біосинтез деяких нуклеозидних антибіотиків

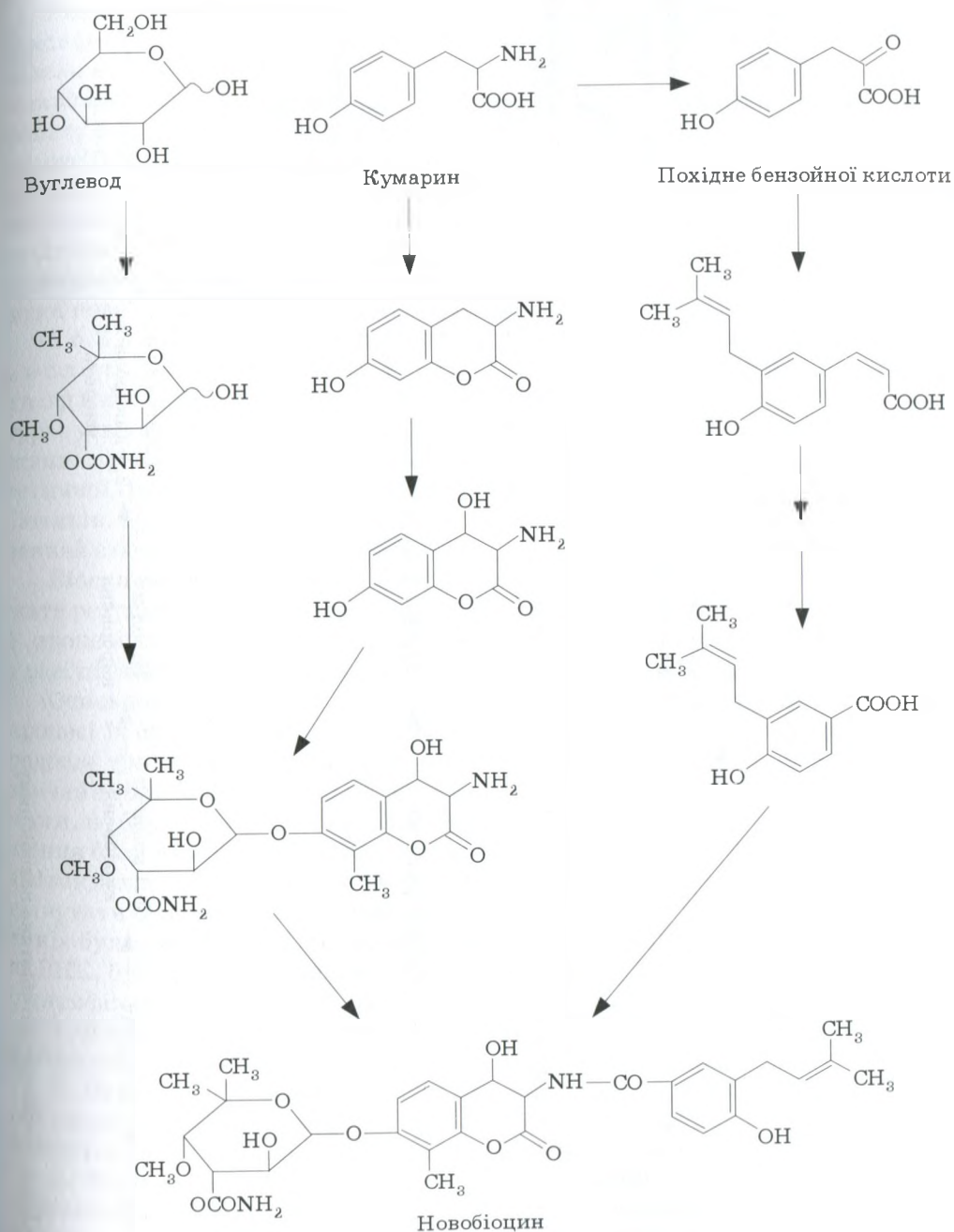


Рис. 5.69. Узагальнена схема біосинтезу новобіоцину



які кодуєть синтез практично всіх ферментів біосинтезу новобіоцину, встановлена і наведена у Genbank.

Відомі ферменти, що здійснюють взаємоперетворення тирозину і 4-гідроксифенілпірувату: *аспартаттрансаміназа* (КФ 2.6.1.1), *тирозинтрансаміназа* (КФ 2.6.1.5), *гістидинолфосфаттрансаміназа* (КФ 2.6.1.9) і *амінотрансфераза* ароматичних амінокислот (КФ 2.6.1.57). Перетворення префенату на 4-гідроксифенілпіруват може каталізуватися *префенатдегідрогеназою* (КФ 1.3.1.12) або *арогенатдегідрогеназою* (КФ 1.3.1.43).

Один із ключових проміжних продуктів синтезу новобіоцину — 3-диметилаліл-4-гідроксибензоат (похідне бензойної кислоти) може утворюватися двома шляхами: з *L*-тирозину або β -гідрокси-*L*-тирозину (див. рис. 5.70). Кумаринова кислота синтезується з *L*-проліну, утворення вуглеводної складової новобіоцину починається з дТДФ-рамнози (див. рис. 5.70).

5.5.2.3. Антибіотики, утворювані конденсацією амінокислот (нерибосомальні пептиди, пеніциліни і цефалоспорины). Процес біосинтезу антибіотиків, в основі яких лежить структура, утворювана конденсацією подібних мономерів, можна поділити на два етапи: процес олігомеризації, подібний для всіх антибіотиків однієї біосинтетичної групи; наступні модифікації, характерні для індивідуальних антибіотиків. Ця схема непридатна для аміноглікозидів, у яких конденсація зазвичай є останньою стадією біосинтезу.

Біосинтез поліпептидів. Відомо понад 300 антибіотиків, які можна вважати результатом конденсації амінокислот з утворенням пептидних зв'язків. У процесі конденсації деяких амінокислот утворюються кільця (наприклад у разі цистеїну — тіазольні кільця), і часто молекула являє собою макроцикл.

Основною особливістю біогенезу поліпептидних антибіотиків є те, що у процесі їх синтезу бере участь специфічний ферментний комплекс, хоча упродовж тривалого часу це положення піддавалось сумніву. Показано, що звичайна білоксинтезувальна система, що містить комплекс мРНК з рибосомами, не бере участі в їх синтезі. Першим аргументом на користь цього положення була наявність у складі пептидних антибіотиків незвичних для білків амінокислот, а також нездатність відомих інгібіторів білкового синтезу пригнічувати біосинтез цих антибіотиків. Пізніше, коли деякі з таких антибіотиків були синтезовані у безклітинних системах, що не містили ні рибосом, ні РНК, було одержано вагоміші докази. Системи синтезу *in vitro* дали змогу ідентифікувати основні стадії процесу полімеризації.

1. Амінокислоти активуються в реакції з АТФ з утворенням аміноацил-аденілатів.

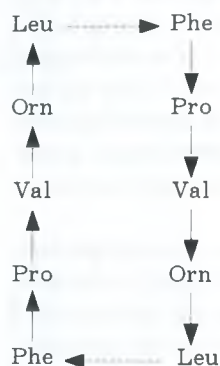
2. Високоенергетичний зв'язок між амінокислотою і фосфатом аденілової кислоти забезпечує перенесення амінокислоти на тільні групи у складній ферментній системі з утворенням аміноацилтіоефірів.

3. Ферментна система каталізує далі утворення пептидного зв'язку між карбоксильною групою першої амінокислоти і аміногрупою другої амінокислоти, використовуючи енергію розщеплення тіоефірного зв'язку. Ланцюг, утворюваний таким шляхом, весь час залишається зв'язаним складним ефірним зв'язком з тільною групою, і до нього може приєднуватись третя амінокислота, четверта і так до кінця ланцюга.

Детальніше цей процес описано далі під час розгляду синтезу граміцидину S. Описаний механізм синтезу пояснює, чому пептидні антибіотики ніколи не містять більше як 15 чи 20 амінокислотних залишків, оскільки малоймовірно, що ферментний комплекс може «впізнати» більшу кількість амінокислот; пептидні антибіотики часто утворюються «родами», компоненти яких відрізняються одним чи кількома амінокислотними залишками.

Дуже часто після чи під час утворення ланцюга відбуваються й інші реакції. Це може бути циклізація молекули чи її частини і модифікація окремих амінокислот. Наприклад, *D*-амінокислоти зазвичай утворюються з *L*-амінокислот після полімеризації. Одним із прикладів значної модифікації трипептидного ланцюга є біогенез пеніцилінів і цефалоспоринів.

Біосинтез граміцидину S. Граміцидин S — це декапептид, що складається з двох ідентичних пентапептидів, циклізованих «голова до хвоста» (рис. 5.71).



Біосинтез цього антибіотика каталізується двома розчинними ферментами, один з яких має молекулярну масу 100 000 (легкий фермент, або L), і другий — 280 000 (важкий фермент, або H). Легкий фермент каталізує активацію фенілаланіну і його перехід із лівоповоротної форми у правоповоротну, важкий — активацію чотирьох інших амінокислот. Активація відбувається у ході реакції, показаної на рис. 5.72.

Рис. 5.71. Структура граміцидину S:

суцільні стрілки — зв'язки —CO—NH; штрихові — зв'язки, що приводять до утворення циклічної структури з двох субодиниць

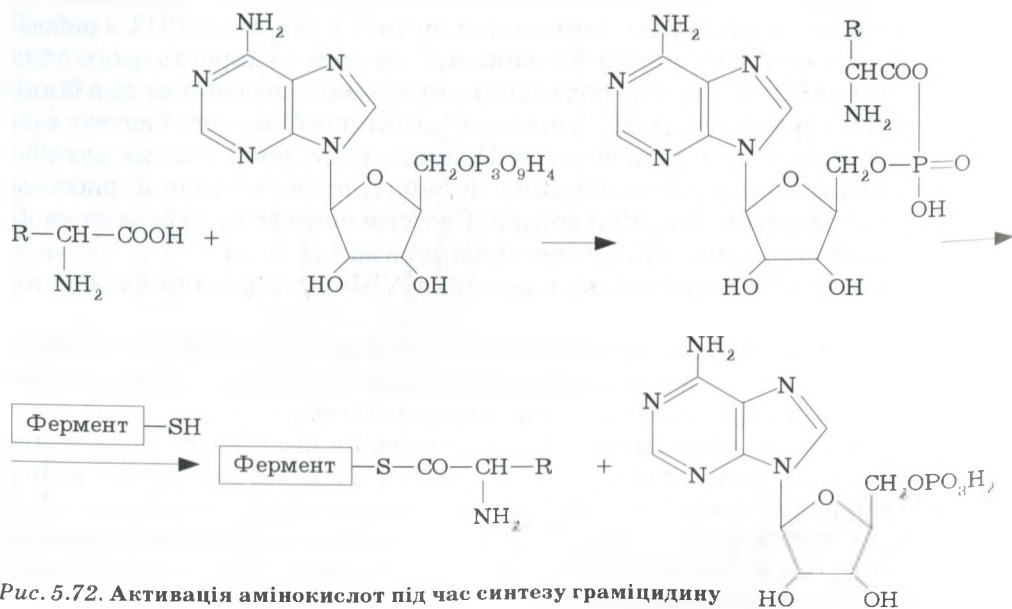


Рис. 5.72. Активація амінокислот під час синтезу граміцидину

Після активації п'ять амінокислот виявляються зв'язаними з ферментами у формі тіоефірів. Полімеризація здійснюється тільки у тому разі, якщо два ферменти, що несуть активовані амінокислоти, об'єднані, і проходить так, як показано на *рис. 5.73*. Як тільки пентапептиди синтезовані, дві молекули взаємодіють з утворенням циклічної сполуки, що замикається двома додатковими пептидними зв'язками лейцин—фенілаланін з розщепленням останніх тіоефірних зв'язків і вивільненням ферменту.

Детальніше утворення молекули грамїцидину S показано на *рис. 5.74*.

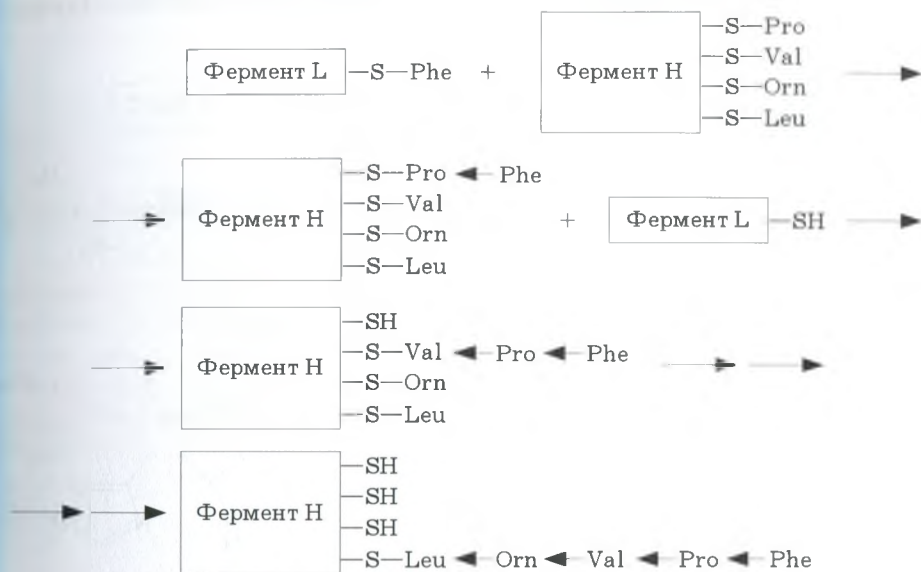


Рис. 5.73. Схема біосинтезу грамїцидину S

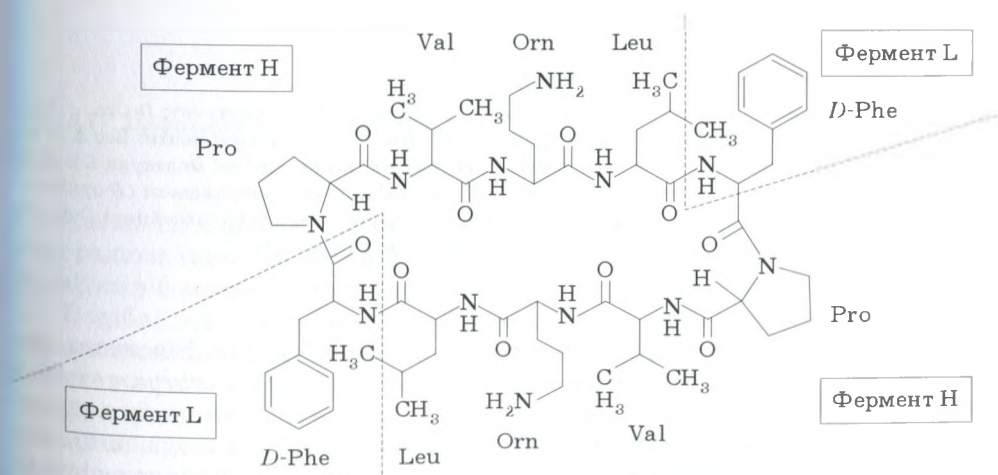


Рис. 5.74. Утворення молекули грамїцидину S:

амінокислоти: Pro — L пролін; Val — L валін; Orn — L орнітин; Leu — L-лейцин;
D-Phe — D-фенілаланін

Біосинтез бацитрацину. У біогенезі бацитрацину беруть участь три ферментні комплекси (рис. 5.75). *Бацитрацинсинтетаза I* (Bac A) відповідальна за активацію і включення у молекулу бацитрацину п'яти амінокислот (*L*-лейцин, *L*-цистеїн, дві молекули *L*-ізолейцину, *D*-глутамат). Цей ферментний комплекс також здійснює перетворення *L*-глутамату на *D*-глутамат. *Бацитрацинсинтетаза II* (Bac B) відповідальна за активацію і включення у молекулу бацитрацину двох амінокислот (*D*-орнітин і *L*-лізин). *Бацитрацинсинтетаза III* (Bac C) зв'язує п'ять амінокислот (*L*-ізолейцин, *D*-фенілаланін, *L*-гістидин, *D*-аспарат, *L*-аспарат) і формує тiazолідинове кільце.

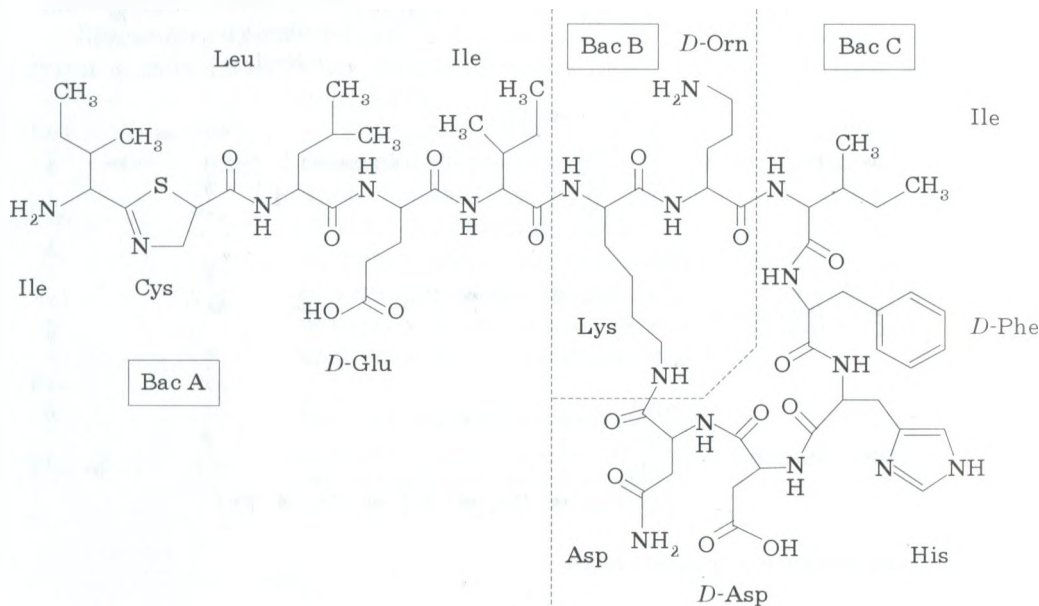


Рис. 5.75. Утворення молекули бацитрацину:

амінокислоти: Ile — ізолейцин; Cys — цистеїн; Leu — лейцин; *D*-Glu — глутамат; *D*-Orn — орнітин; Lys — лізин; Asp — аспарат; *D*-Phe — фенілаланін; His — гістидин; ферменти: Bac A — бацитрацинсинтетаза I, яка зв'язує п'ять амінокислот (*L*-лейцин, *L*-цистеїн, дві молекули *L*-ізолейцину, *D*-глутамат); Bac B — бацитрацинсинтетаза II, яка зв'язує дві амінокислоти (*D*-орнітин і *L*-лізин); Bac C — бацитрацинсинтетаза III, яка зв'язує п'ять амінокислот (*L*-ізолейцин; *D*-фенілаланін; *L*-гістидин; *D*-аспарат; *L*-аспарат) і формує тiazолідинове кільце

Поліпептиди. Біосинтез пеніцилінів і цефалоспоринів. Біосинтез цих антибіотиків досліджено головним чином у *Penicillium chrysogenum* і *Cephalosporium acremonium*. *P. chrysogenum* утворює різні пеніциліни залежно від умов культивування. Найважливіші з погляду біосинтезу пеніциліни показано на рис. 5.76. *C. acremonium* утворює пеніцилін N і цефалоспорин C, структурні формули яких показано на рис. 5.77.

Утворення бокового ланцюга пеніциліну G з фенілоцтової кислоти доведено такими дослідями: з внесенням фенілоцтової кислоти у культуру

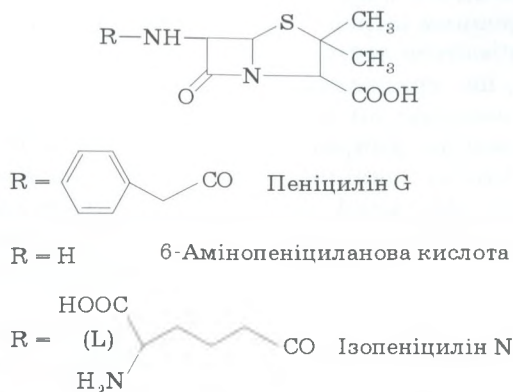


Рис. 5.76. Пеніцилін та його похідні

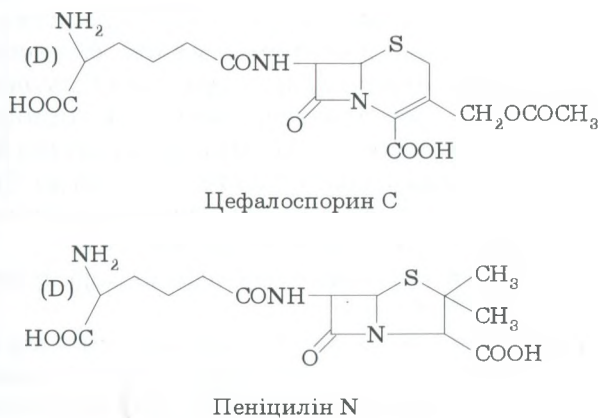


Рис. 5.77. Цефалоспорин С і пеніцилін N

P. notatum спостерігається інтенсифікація синтезу пеніциліну G; з додаванням радіоактивної фенолоцтової кислоти відбувається специфічне включення мітки у боковий ланцюг пеніциліну.

Подібні дослід з використанням мічених попередників показали, що ядро пеніцилінів походить із цистеїну і валіну. Обидві ці амінокислоти включаються в інтактній формі. Цистеїн залишається у лівоповоротній конфігурації, а валін переходить із ліво- у правоповоротну форму з асиметричним центром, проте, як показано незалежним міченням двох метильних груп, конфігурація при третьому вуглецевому атомі не змінюється.

Показано, що ядро пеніциліну (6-амінопеніциланова кислота, 6-АПК) не синтезується безпосередньо в клітинах продуцента з подальшою його конденсацією з фенолоцтовою кислотою. Встановлено, що утворюється проміж-

ний продукт, трипептид $\delta(L\text{-}2\text{-аміноадипіл})\text{-}L\text{-цистеїніл-}D\text{-валін}$, який потім циклізується з утворенням ізопеніциліну N. З нього в результаті обміну бокового ланцюга утворюється пеніцилін G.

Слід зазначити, що трипептид $\delta(L\text{-}2\text{-аміноадипіл})\text{-}L\text{-цистеїніл-}D\text{-валін}$ був виділений з культуральної рідини пеніцилів, а пригнічення синтезу 2-аміноадипінової кислоти (наприклад добавленням лізину) супроводжувалося пригніченням синтезу пеніциліну G. З культури *Penicillium* виділено фермент *ацилтрансферазу*, який каталізував *in vitro* реакцію перетворення ізопеніциліну N на пеніцилін G. Ці експериментальні дані підтверджують, що попередником синтезу пеніцилінів є трипептид $\delta(L\text{-}2\text{-аміноадипіл})\text{-}L\text{-цистеїніл-}D\text{-валін}$.

Аналогічні досліді з використанням мічених попередників, проведені з культурою *Cephalosporium*, показали, що ядро цефалоспорину і пеніциліну N утворюється з лівоповоротних цистеїну і валіну. У пеніциліну N, як і у всіх пеніцилінів, спостерігається інверсія конфігурації валіну з асиметричним центром. У цефалоспоринів одна з двох метильних груп валіну включається в дегідротіазинове кільце, а друга спочатку гідроксильється, а потім ацетильється. Походження цефалоспорину C і пеніциліну N з трипептиду $\delta(L\text{-}2\text{-аміноадипіл})\text{-}L\text{-цистеїніл-}D\text{-валін}$ підтверджується структурою цих антибіотиків. Більше того, цей трипептид був виділений з культури *Cephalosporium*. Проте слід зазначити, що в трипептиді аміноадипінова кислота має ліву конфігурацію, а в цефалоспорині C і пеніциліні N — праву. Очевидно, у *Cephalosporium* є фермент, здатний каталізувати інверсію конфігурації. Після такої модифікації молекула стає стійкою до дії ацилтрансфераз, і, отже, боковий ланцюг, на відміну від *Penicillium*, не може ферментативним шляхом обмінюватися на інші ацильні ланцюги.

Спрощену схему біосинтезу пеніциліну і цефалоспорину показано на рис. 5.78, детальнішу — на рис. 5.79.

Із $L\text{-}2\text{-аміноадипінової}$ кислоти, $L\text{-цистеїну}$ і $L\text{-валіну}$ під дією ферменту $N\text{-}(5\text{-аміно-}5\text{-карбоксипентанойл})\text{-}L\text{-цистеїніл-}D\text{-валін синтази}$ (КФ 6.3.2.26) утворюється $\delta(L\text{-}2\text{-аміноадипіл})\text{-}L\text{-цистеїніл-}D\text{-валін}$, який за участю *ізопеніцилін-N-синтази* (КФ 1.21.3.1) трансформується у ізопеніцилін N. Перетворення ізопеніциліну N на пеніцилін G каталізує фермент *ізопеніцилін N-N-ацилтрансфераза* (КФ 2.3.1.164). Під дією *пеніцилінази* (β -лактамаза, КФ 3.5.2.6) пеніцилін G перетворюється на пеніцилову кислоту, а за участю *пеніцилінамідази* (КФ 3.5.1.11) — на 6-амінопеніциланову кислоту — вихідну сполуку для одержання напівсинтетичних пеніцилінів.

Ізопеніцилін N під дією *ізопеніцилін-N-епімерази* (КФ 5.1.1.17) трансформується у пеніцилін N, який двома шляхами (за участю одного неідентифікованого на сьогодні фермента, або двох ферментів — *дезацетоксицефалоспорин-C-синтази* — КФ 1.14.20.1 і *дезацетоксицефалоспорин-C-гідроксилази* — КФ 1.14.11.26) перетворюється на дезацетилцефалоспорин C. Перетворення дезацетилцефалоспорину C на цефалоспорин C каталізує неідентифікований фермент.

Дезацетилцефалоспорин C під дією *трансферази* і *цефамінсинтетази* далі може трансформуватися у цефаміксин C — один із антибіотиків цефалоспоринового ряду.

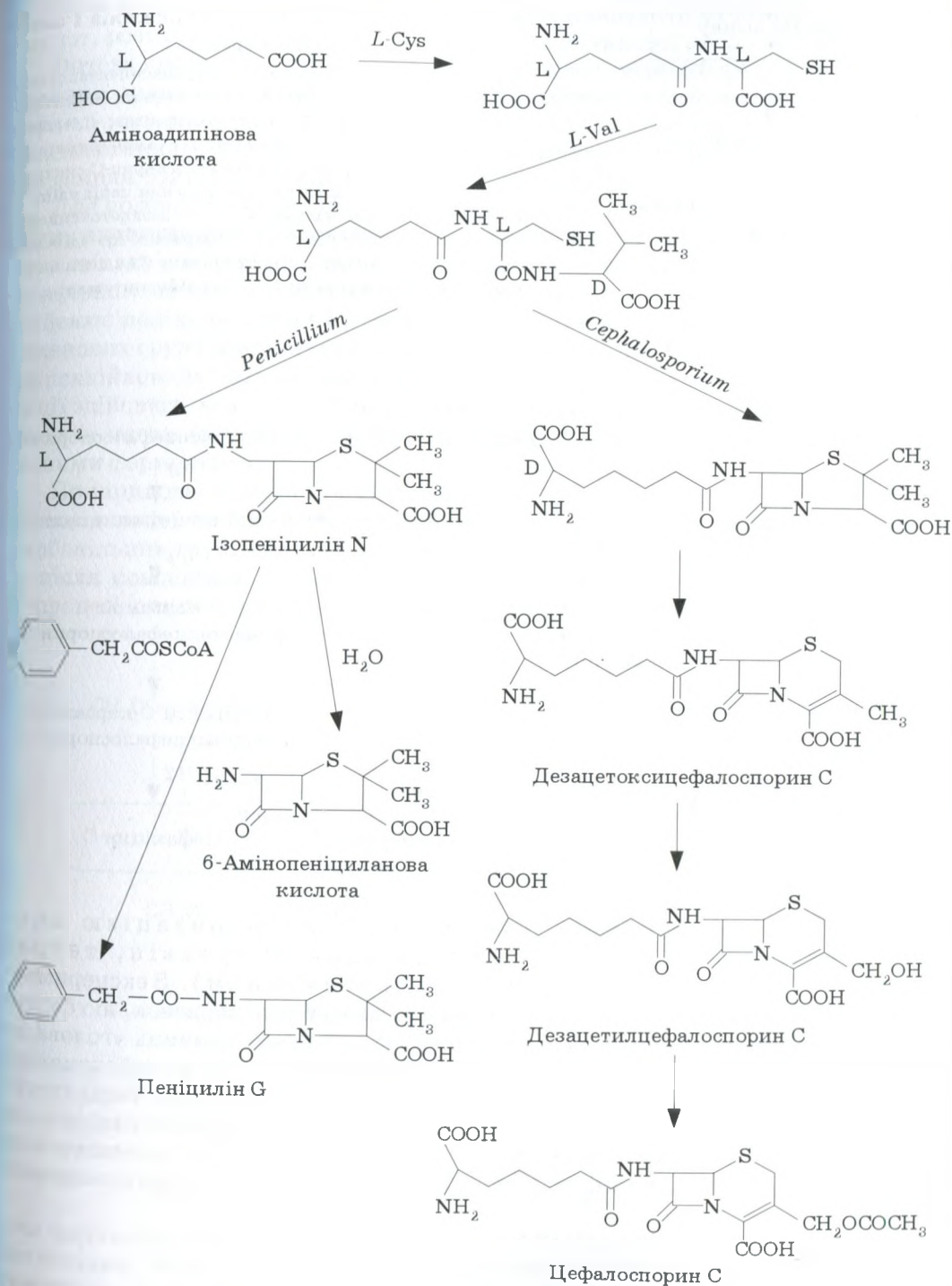


Рис. 5.78. Біосинтез пеніциліну і цефалоспорину

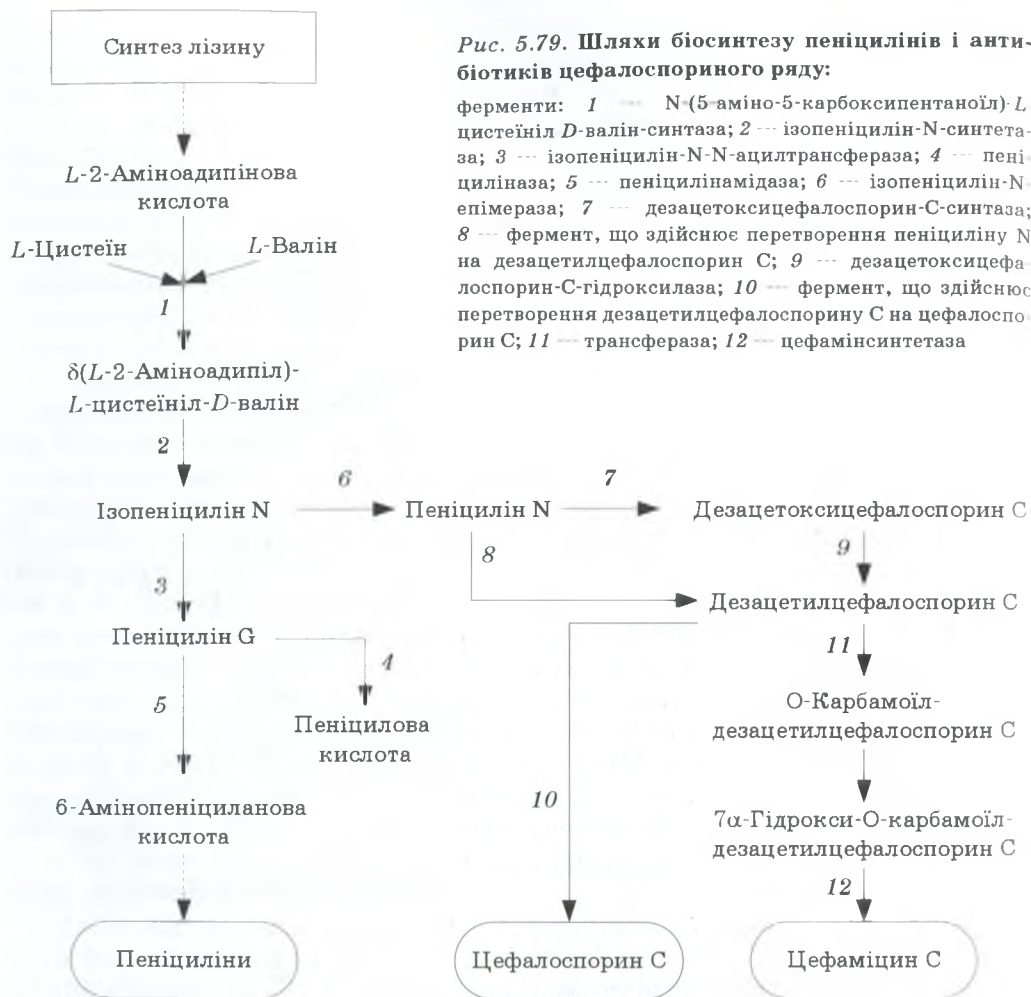


Рис. 5.79. Шляхи біосинтезу пеніцилінів і антибіотиків цефалоспориного ряду:

ферменти: **1** — N-(5-аміно-5-карбоксипентаноїл)-L-цистеїніл D-валін-синтаза; **2** — ізопеніцилін-N-синтаза; **3** — ізопеніцилін-N-N-ацилтрансфераза; **4** — пеніциліназа; **5** — пеніцилінамідаза; **6** — ізопеніцилін-N-епімераза; **7** — дезацетоксицефалоспорин-C-синтаза; **8** — фермент, що здійснює перетворення пеніциліну N на дезацетилцефалоспорин C; **9** — дезацетоксицефалоспорин-C-гідроксилаза; **10** — фермент, що здійснює перетворення дезацетилцефалоспорино C на цефалоспорин C; **11** — трансфераза; **12** — цефамінсинтетаза

5.5.2.4. Антибіотики, утворювані полімеризацією ацетатних і пропіонатних одиниць (гризеофульвін, тетрациклін, полікетиди I і II типу, анзаміцини). З експериментів із уведенням міченої оцтової кислоти було зроблено висновок, що багато які антибіотики синтезуються конденсацією ацетатних одиниць «голова до хвоста», тобто з утворенням зв'язку між вуглецевим атомом карбоксильної групи і вуглецевим атомом метильної групи наступної одиниці. Іноді структурною одиницею замість ацетату є пропіонат, причому у цьому разі зв'язок утворюється між вуглецевим атомом карбоксильної групи і метиленовою групою наступної одиниці, в результаті чого синтезується метилзамісний ланцюг.

У цій біогенетичній групі можна виявити абсолютно різні структури: ізолювані або конденсовані ароматичні кільцеві структури, хінони, макроліди. Таке різноманіття є результатом відносно невеликих варіацій біосинтетичного процесу, який багато в чому подібний до біосинтезу жирних кислот.

Щоб уявити собі процес полімеризації, що приводить до синтезу жирних кислот, розглянемо як приклад біосинтез пальмітинової кислоти (рис. 5.80).

Оцтова кислота (у вигляді ацетил-КоА) безпосередньо бере участь лише в ініціації ланцюга, а основною мономерною одиницею є малонові кислота (у вигляді малоніл-КоА). Проте малонові кислота утворюється з оцтової її карбоксилуванням, тому досліді з уведенням мічених попередників вказують, що ланцюг будується виключно з ацетатних одиниць.

Для подовження ланцюга як оцтова кислота, так і малонові повинні спочатку активуватися. Активація відбувається за рахунок утворення тіоефірного зв'язку з коферментом А (КоАШ). Ацетат і малонат завдяки наявності тіоефірного зв'язку з коферментом переносяться на ферментну систему, що здійснює полімеризацію і відновлення карбонільних груп з утворенням метиленових груп [шляхом відновлення в оксигрупу, дегідрування і відновлення подвійного зв'язку (на рис. 5.80 не показано)]. У клітинах еукаріот ці реакції здійснюються мультиферментним комплексом з дуже високою молекулярною масою (понад 2 000 000), а у бактерій різні реакції каталізуються різними ферментами.

Принципова відмінність системи синтезу жирних кислот від системи, відповідальної за біосинтез вторинних метаболітів, полягає у відновленні карбонільних груп, яке під час синтезу жирних кислот відбувається відразу ж після конденсації чергової одиниці і до початку конденсації наступної. У процесі синтезу вторинних метаболітів такого відновлення або не від-

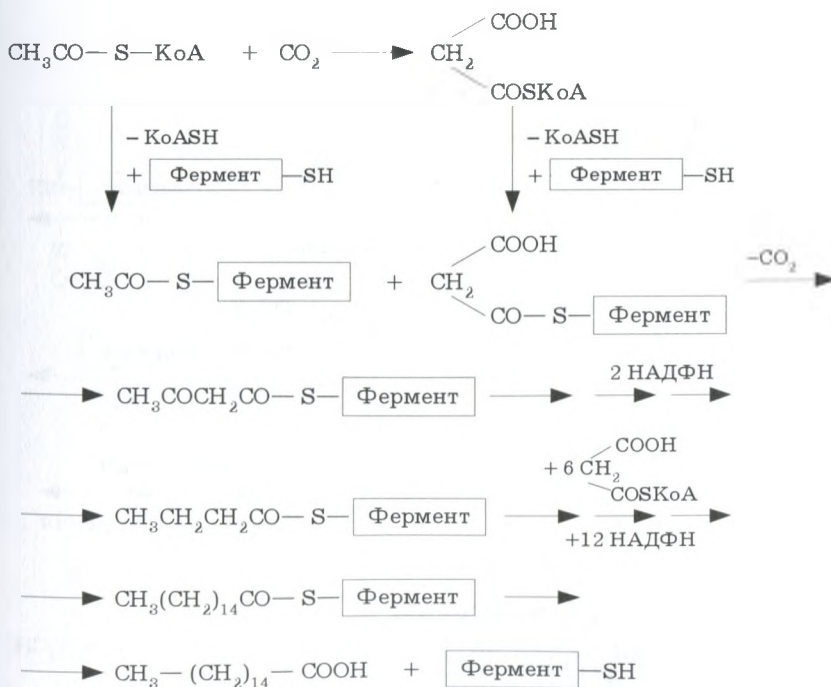


Рис. 5.80. Біосинтез пальмітинової кислоти

бувається (і тоді утворюються ароматичні структури), або воно відбувається тільки частково, до стадії утворення гідроксильної групи чи подвійних зв'язків, даючи початок макролідним структурам.

Другою важливою відмінністю є здатність систем, що синтезують деякі антибіотики, використовувати для елонгації метилмалонат (який може утворюватися карбоксилюванням пірувату) з утворенням метильованих ланцюгів. У деяких випадках використовується етилмалонат, що приводить до утворення етилзамісних ланцюгів.

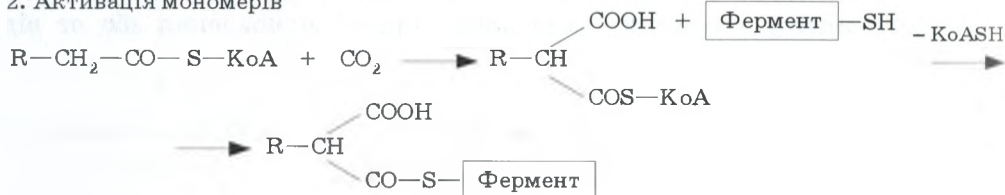
Ініціатором ланцюга під час синтезу жирних кислот зазвичай є активована оцтова кислота, проте у процесі синтезу жирних кислот у бактерій це можуть бути інші сполуки, наприклад пропіонат і ізовалеріанова кислота.

Під час біосинтезу антибіотиків, крім оцтової і пропіонової кислот, як ініціатор може використовуватись малонамід і інші складніші сполуки. На рис. 5.81 показано схему утворення ланцюга під час синтезу антибіотиків, що походять з ацетату і пропіонату.

1. Активация ініціатора



2. Активация мономерів



3. Полімеризация

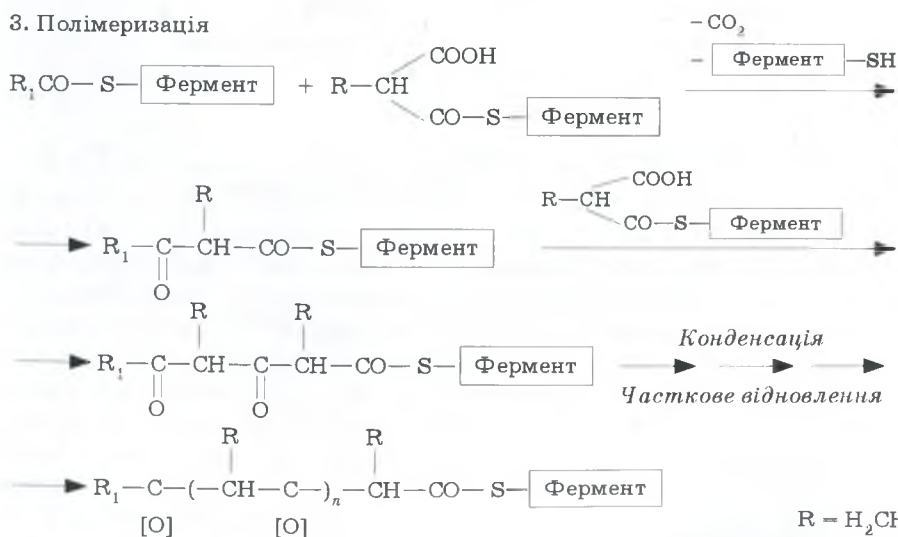


Рис. 5.81. Біогенез ланцюга, з якого походять антибіотики, утворювані з ацетату-пропіонату

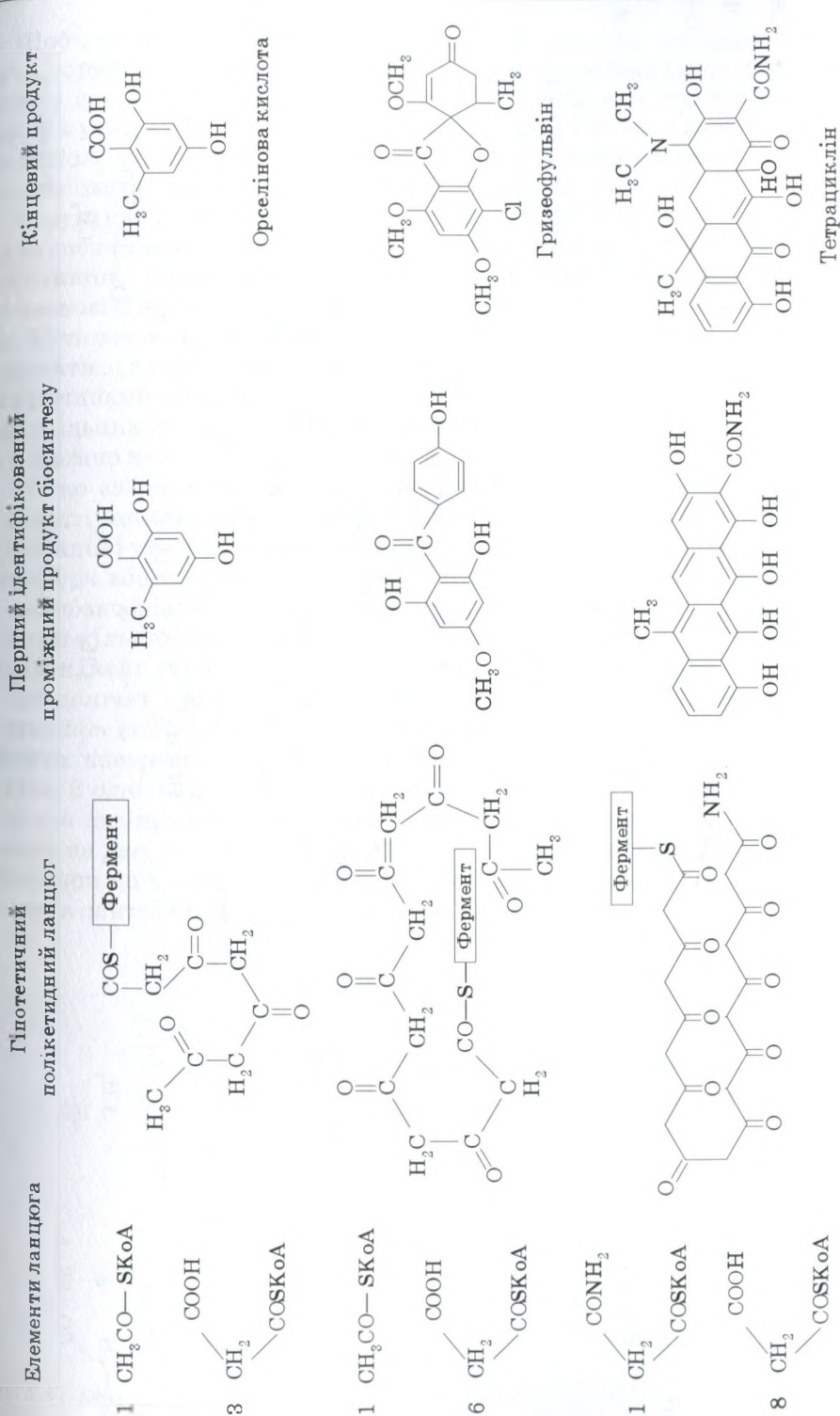


Рис. 5.82. Утворення ароматичних кілець з полікетидних ланцюгів



Щоб зв'язати первинний і вторинний метаболізм, згадаємо, що ацетил-КоА є нормальним продуктом метаболізму всіх ростових субстратів (від полімерних до одновуглецевих); малоніл-КоА також є нормальним продуктом обміну і утворюється карбоксилюванням ацетил-КоА. Аналогічно метилмалоніл-КоА може утворюватися карбоксилюванням пропіоніл-КоА, проте частіше синтезується ізомеризацією сукциніл-КоА.

Структура антибіотика визначається головним чином довжиною ланцюга і ступенем його відновлення. У ланцюгах, утворених виключно з ацетатних одиниць, у тому разі, коли карбонільні групи не відновлені, чергуються метиленові й карбонільні групи (полікетометиленові або полікетидні ланцюги). Метиленові групи у цих структурах високоактивні і намагаються конденсуватися з карбонільними групами з утворенням кілець, які за стеричними причинами містять переважно шість атомів. Енолізація непрореагованих карбонільних груп приводить до ароматизації структури. Деякі такі приклади показано на рис. 5.82.

Якщо завдяки частковому відновленню у процесі полімеризації або за наявності метильних замісників ланцюг не є істинно полікетометиленовим, циклізація і утворення ароматичних кілець утруднені, синтезуються лінійні структури або частіше макроцикли. Класичним прикладом є макроліди — як антибактеріальні з кільцями середніх розмірів, так і протигрибкові з великими кільцями (рис. 5.83). Анзаміцини можна розглядати як проміжний випадок, коли утворюється і ароматичне кільце, і макроцикл (див. рис. 5.83).

Біосинтез гризеофульвіну. Біосинтез цього антибіотика в культурах *Penicillium griseofulvum* і *Penicillium patulum* досліджували як із введенням мічених попередників, так і з виділенням передбачуваних проміжних продуктів. З однієї ацетатної і шести малонатних одиниць (див. рис. 5.82) утворюється заміщений бензофенон. Схему можливої послідовності реакцій показано на рис. 5.84, з якого видно, що синтез йде від повністю ароматичної структури до частково насиченої. Саме таким шляхом, як правило, здійснюється синтез вторинних метаболітів з ацетату.

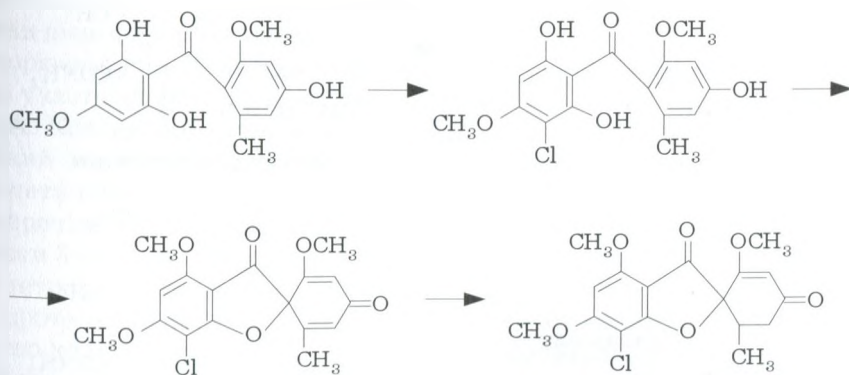


Рис. 5.84. Кінцеві стадії біосинтезу гризеофульвіну

Біосинтез тетрациклінів. Загальним попередником тетрацикліну, хлортетрацикліну і окситетрацикліну є метилпрететрамід (рис. 5.85, А). Ця сполука синтезується шляхом конденсації однієї малонамідної і восьми малонатних одиниць (див. рис. 5.82). Метильні групи походять від звичайного фонду одноуглецевих сполук (фонд донорів метильних груп).

Реакції перетворення метилпрететраміду на тетрациклін, хлортетрациклін і окситетрациклін показано на рис. 5.86 і 5.87. У процесі синтезу хлортетрацикліну у положення 7 продукту В (4-дедиметиламіно-4-оксоангідротетрацикліну) включається атом хлору, і наступні реакції здійснюються з хлорованим продуктом так само, як і з нехлорованим. Гідроксильна група у положення 5 окситетрацикліну вводиться на пізнішій стадії перетворення ангідротетрацикліну.

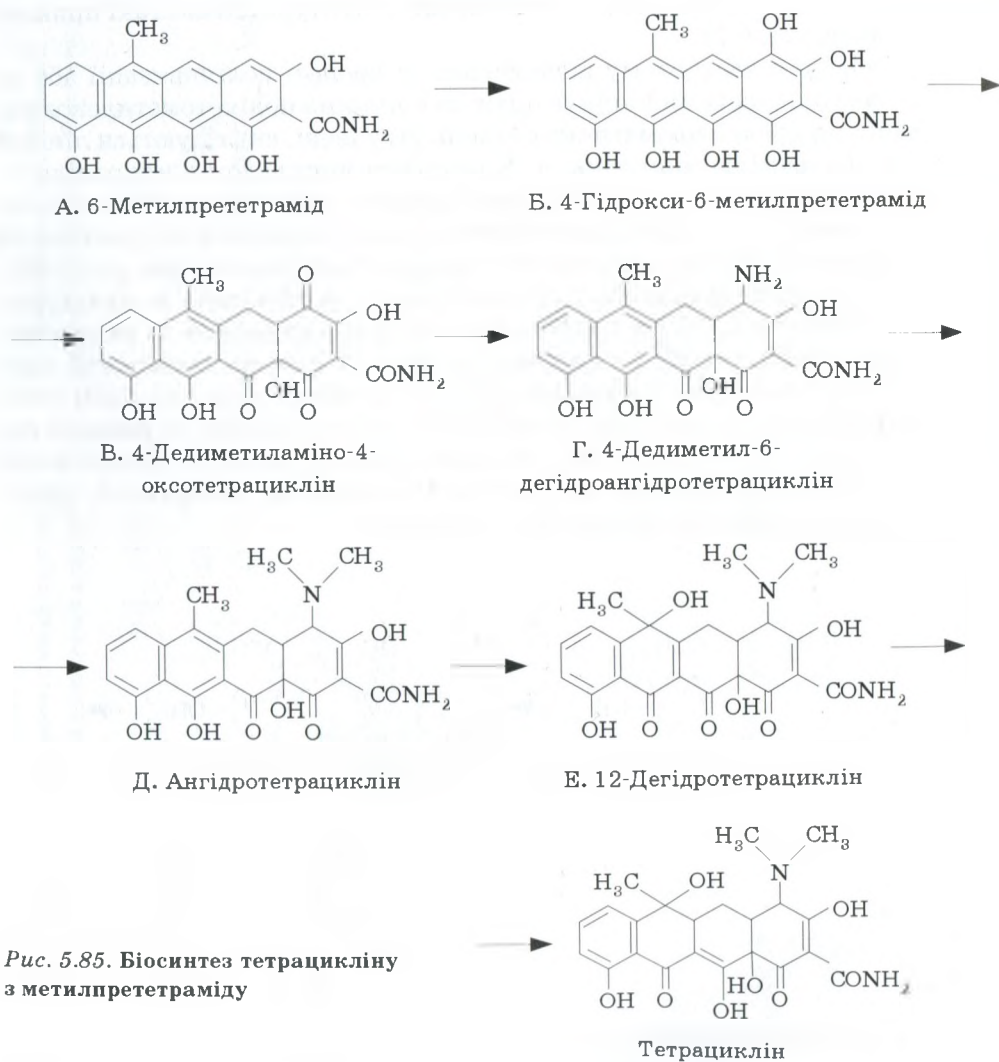


Рис. 5.85. Біосинтез тетрацикліну з метилпрететраміду

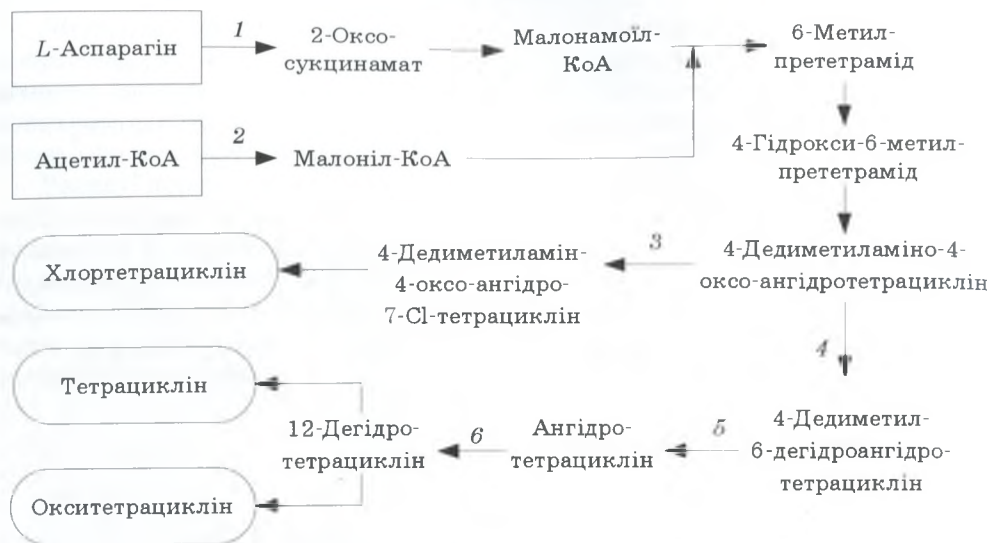


Рис. 5.88. Шлях біосинтезу тетрацикліну, хлортетрацикліну і окситетрацикліну:

ферменти: 1 — аспарагін-оксокислота-трансаміназа; 2 — ацетил-КоА-карбоксиллаза; 3–5 — ферменти, відповідальні за хлорування, метилювання і гідроксильовання тетрацикліну; 6 — ангідротетрациклінмонооксигеназа

Біосинтез 12-, 14- і 16-членних макролідів (полікетиди I типу — еритроміцин, авермектини). У процесі біосинтезу макролідних антибіотиків є три аспекти, що потребують розгляду: походження лактонного циклу; походження вуглеводів; послідовність реакцій, що супроводжуються конденсацією цих компонентів з наступною модифікацією.

Основа структури лактонного макроциклу 12-, 14- і 16-членних макролідних антибіотиків утворюється в результаті полімеризації пропіонатних і метилмалонатних (малонатних) одиниць.

Біосинтез еритроміцину. Як зазначалося раніше, у складі різних еритроміцинів присутні залишки вуглеводів дезозаміну, мікарози і кладинози (див. рис. 5.57 і 5.61). Проте дані останніх років (2004—2005), наведені у Кіотській енциклопедії генів і геномів (www.genome.jp/kegg/), свідчать про наявність у складі еритроміцинів лише дезозаміну і мікарози.

Шлях біосинтезу еритроміцинів показано на *рис. 5.89*.

У результаті полімеризації пропіоніл-КоА і метилмалоніл-КоА утворюється 6-дезоксиритронолід В (фермент *еритронолідсинтаза*, КФ 2.3.1.94), який шляхом гідроксилування за участю *6-дезоксиритронолід-В-гідроксилази* перетворюється на еритронолід В.

Вуглеводні складові еритроміцинів (мікароза і дезозамін) синтезуються з глюкозо-1-фосфату. Глюкозо-1-фосфат під дією *дТДФ-глюкозосинтази* (КФ 2.7.7.24) трансформується у дТДФ-глюкозу, яка за участю *дТДФ-глюкозо-4,6 дегідратази* (КФ 4.2.1.46) перетворюється на дТДФ-4-оксо-6-дезоксид-глюкозу. Ця сполука далі трансформується у дТДФ-4-оксо-6-дезоксид-*L*-манозу (фермент *дТДФ-4 дегідрорамнозо-3,5-епімераза*, КФ 5.1.3.13), яка під дією двох неідентифікованих на сьогодні ферментів перетворюється на

дТДФ-3-метил-4-оксо-2,6-дидезокси-*L*-глюкозу. Під дією *дезоксигексозоредуктази* утворюється дТДФ-*L*-мікароза, яка конденсується з еритронолідом В (фермент *глікозилтрансфераза*) з утворенням 3- α -О-мікарозил-еритроноліду В. Друга вуглеводна складова антибіотики — дТДФ-*D* дезозамін утворюється в результаті чотирьох послідовних реакцій з дТДФ-4-оксо-6-дезоксид-*D* глюкози. Відомі лише два ферменти, які беруть участь у цих перетвореннях — *дТДФ 4 кето-6 дезоксигексозо-3,4 ізомераза* і *ТДФ-N-диметил дезозамін-N-метилтрансфераза*. У процесі конденсації дТДФ-*D*-дезозаміну з 3- α -О-мікарозил-еритронолідом В утворюється еритроміцин D, з якого далі синтезуються еритроміцин В, С і А. В утворенні еритроміцину А і С бере участь фермент *еритроміцин-B/D C-12-гідроксилаза* (здійснює гідроксилювання у положенні 12). Еритроміцин Е утворюється з еритроміцину А.

Така схема біосинтезу еритроміцинів встановлена на основі досліджень, проведених до 2005 року.

Біосинтез авермектинів. Авермектини — це комплекс восьми споріднених сполук: чотирьох основних (A_{1a} , A_{2a} , B_{1a} , B_{2a}) і чотирьох міnorних (A_{1b} , A_{2b} , B_{1b} , B_{2b}). За хімічною природою це 16-членний поліциклічний лактон, що містить діолеандрозу як вуглеводний компонент (рис. 5.90).

До групи А належать авермектини, що містять метильну групу у положенні С-23, авермектини групи В містять у тому ж положенні атом водню. Вісім авермектинів різняться радикалами у положеннях С-23, С-25 і С-5 (табл. 5.16).

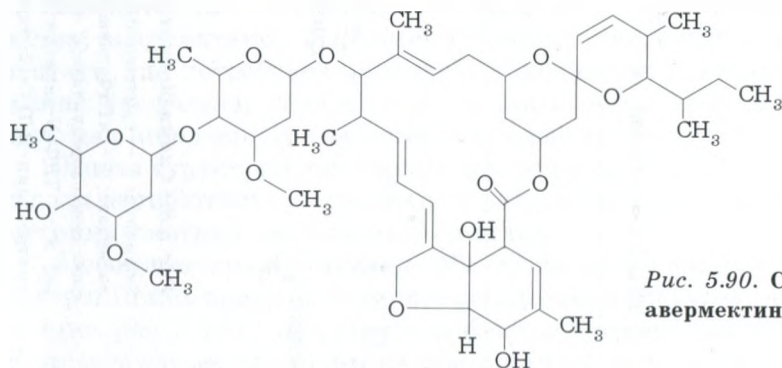


Рис. 5.90. Структурна формула авермектину B_{1a}

Таблиця 5.16. Радикали авермектинів груп А і В

Авермектини	Радикал у положенні		
	С-23	С-25	С-5
A_{1a}	CH ₃	CH ₂ —CH ₃	CH=CH
A_{1b}	CH ₃	CH ₂ —CH ₃	CH=CH
A_{2a}	CH ₃	CH ₂ —CH ₃	CH=CH (OH)
A_{2b}	CH ₃	CH ₂ —CH ₃	CH=CH (OH)
B_{1a}	H	CH ₃	CH=CH
B_{1b}	H	CH ₃	CH=CH
B_{2a}	H	CH ₃	CH=CH (OH)
B_{2b}	H	CH ₃	CH=CH (OH)

Препарати на основі авермектинів використовуються для боротьби з різними шкідниками у сільському господарстві, а також у ветеринарії.

Схему біосинтезу авермектинів показано на *рис. 5.91* (дані на 2005 р.).

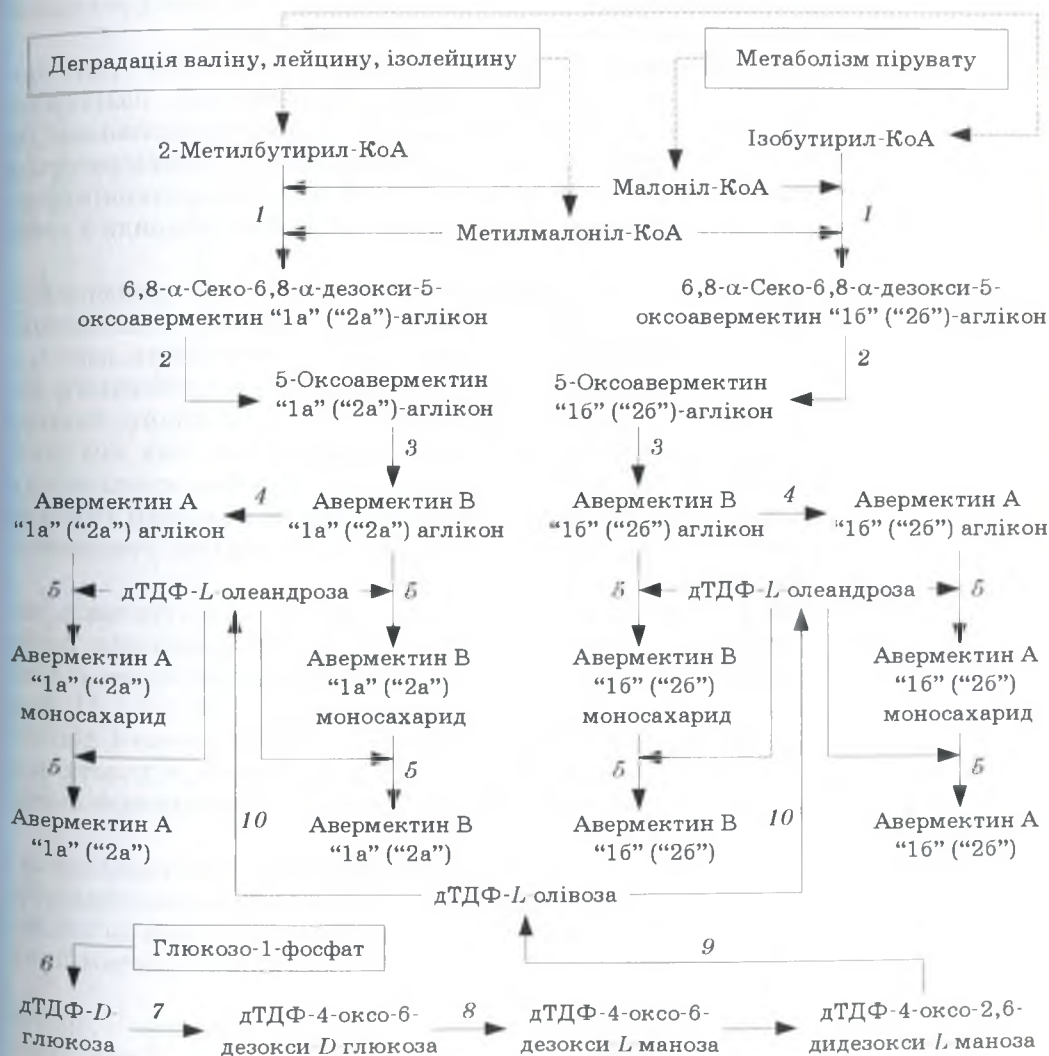


Рис. 5.91. Схема біосинтезу авермектинів:

Ферменти: 1 — полікетидсинтаза I типу; 2 — цитохром P450-гідроксилаза; 3 — C-5-кеторедуктаза; 4 — C-5-O-метилтрансфераза; 5 — глікозилтрансфераза; 6 — дТДФ-глюкозосинтаза; 7 — дТДФ-глюкозо-4,6-дегідратаза; 8 — дТДФ-4-дегідрорамнозо-3,5-епімераза; 9 — дТДФ-4-кето-6-дезоксигексозо-4-редуктаза; 10 — дТДФ-6-дезоксигексозо-3-O-метилтрансфераза

Вихідними сполуками для синтезу лактонного макроциклу є 2-метилбутирил-КоА, ізобутирил-КоА, метилмалоніл-КоА і малоніл-КоА, які утворюються у процесі розщеплення валіну, лейцину, ізолейцину і метаболізму пірувату.

дТДФ-*L*-Олеандроза синтезується з глюкозо-1-фосфату. Перші чотири реакції синтезу олеандрози аналогічні утворенню мікарози у процесі синтезу еритроміцинів (див. *рис. 5.89*). Продукт цих реакцій (дТДФ-4-оксо-2,6-дидезокси-*L*-маноза) перетворюється на дТДФ-*L*-олівозу (фермент *дТДФ-4-кето-6-дезоксидеокси-L-гексозо-4-редуктаза*), яка за участю *дТДФ-6-дезоксидеокси-L-гексозо-3-О-метилтрансферази* трансформується у дТДФ-*L*-олеандрозу.

Синтез агліконів авермектину В відбувається в результаті трьох послідовних реакцій, що каталізуються такими ферментами: *полікетидсинтазою типу I*, *цитохром-Р450-гідроксилазою*, *С-5-кеторедуктазою*. За участю *С-5-О-метилтрансфераз* аглікони авермектину В перетворюються на аглікони авермектину А. Далі конденсацією олеандрози і агліконів (фермент *глікозилтрансфераза*) синтезуються авермектинмоносахариди і авермектини.

Біосинтез анзаміцинів (рифаміцинів). Основа структури анзаміцинів, що містять нафталінове ядро (рифаміцини, стрептоварицин, толіпоміцин, галоміцин), бере початок від ланцюга, утворюваного конденсацією двох малонатних і восьми метилмалонатних одиниць. Характерною особливістю анзаміцинів є наявність угруповання, відповідального за ініціацію синтезу ланцюга. Встановлено, що це 3-аміно-5-гідроксибензойна кислота, яка утворюється з УДФ-глюкози у модифікованому шляху біосинтезу ароматичних амінокислот (*рис. 5.92*). Метилмалонатні одиниці можуть походити з пропіонової кислоти, якщо вона добавлена до культури, проте зазвичай утворюються ізомеризацією сукцинату.

Станом на 2005 р. встановлено нуклеотидну послідовність усіх генів, що кодують синтез ферментів, які беруть участь в утворенні рифаміцинів, проте не всі вони ідентифіковані. Точна назва і класифікаційний номер відомі лише для *транскетолази* (*глікольальдегідтрансфераза*, КФ 2.2.1.1), яка здійснює перетворення амінофруктозо-6-фосфату на іміноеритрозо-4-фосфат (див. *рис. 5.92*). Основа структури рифаміцинів утворюється за участю чотирьох ферментів (6—9), попередньо названих *рифаміцинполікетидсинтазами I типу*.

Характерними особливостями біосинтезу рифаміцинів є часткова циклізація ланцюга з утворенням другого ароматичного кільця, конденсованого з кільцем молекули-ініціатора, і замикання макроциклу амідним зв'язком. Структуру першого проміжного продукту синтезу рифаміцинів (рифаміцину W), а також рифаміцинів SV і В показано на *рис. 5.93*.

Полікетиди II типу. Біосинтез доксорубіцину. Доксорубіцин — протипухлинний антибіотик — належить до полікетидних продуктів II типу (*рис. 5.94*).

Вихідними сполуками для його синтезу є 7,9,12-декакетиди, які утворюються в результаті конденсації малоніл-КоА, метилмалоніл-КоА і бутаніл-КоА (*рис. 5.95*). В утворенні 12-дезоксикаланової кислоти беруть участь чотири ферменти, два з яких належать до *кетואцилсинтаз*, а два інші поки

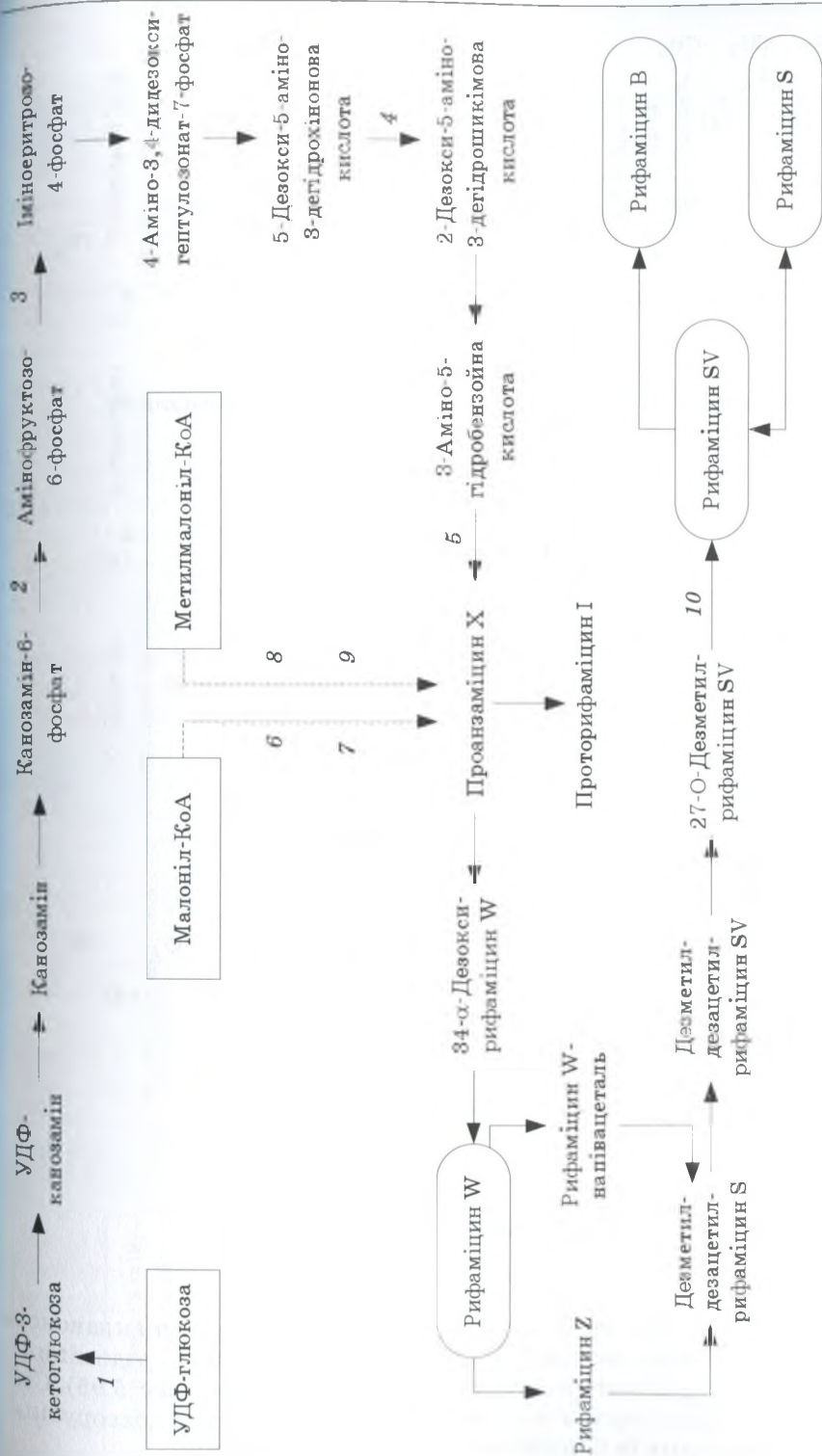


Рис. 5.92. Схема біосинтезу рифаміцинів:

ферменти: 1 — глікозилтрансфераза; 2 — ізомераза, що перетворює альдози на кетози; 3 — транскеталаза (глікольальдегідтрансфераза); 4 — амінодегідроксінонатдегідратаза; 5 — 3-аміно-5-гідроксibenзоатсинтаза (рифаміцинамідсинтаза); 6, 7, 8, 9 — рифаміцинопікетидсинтаза I типу; 10 — C-27-O-метилтрансфераза

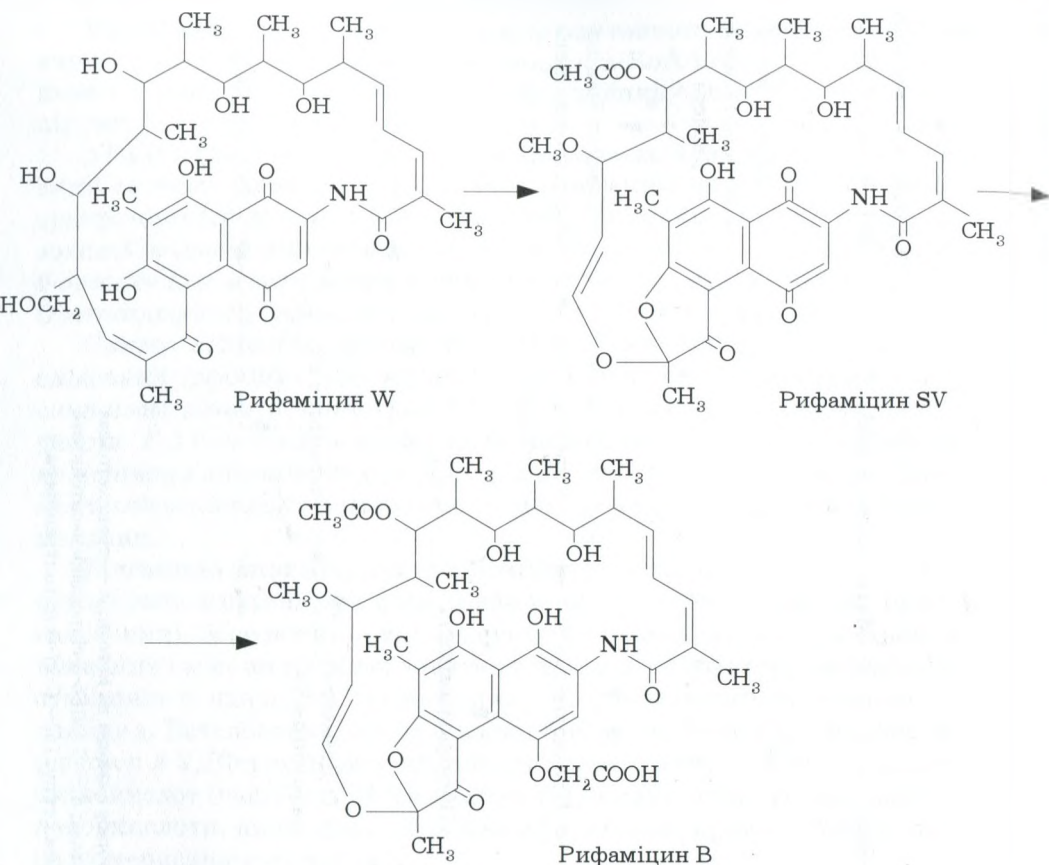


Рис. 5.93. Утворення рифаміцину В

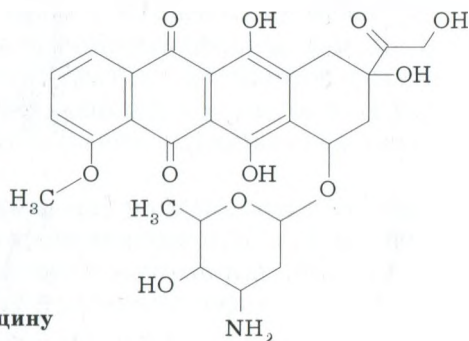


Рис. 5.94. Структурна формула доксорубіцину

що не ідентифіковано. Під дією *оксидоредуктази* утворюється акланонові кислота, яка через метиловий ефір, аклавікетон, аклавінон, родоміцин і похідні карміноміцину перетворюється на доксорубіцин (див. рис. 5.95). Станом на 2004 р. більшість ферментів, що беруть участь у синтезі доксорубіцину, ідентифіковано, проте їх класифікаційні номери невідомі.

5.5.2.5. Терпеноїдні антибіотики. Біосинтез фузидієвої кислоти. Серед вторинних метаболітів грибів є багато продуктів з терпеноїдною структурою, утворюваною конденсацією ізопренових одиниць (точніше, ізопентенілпірофосфатних одиниць), за якою відбувається циклізація. Ізопентенілпірофосфатні одиниці синтезуються з ацетату з утворенням мевалонової кислоти як проміжного продукту (рис. 5.96).

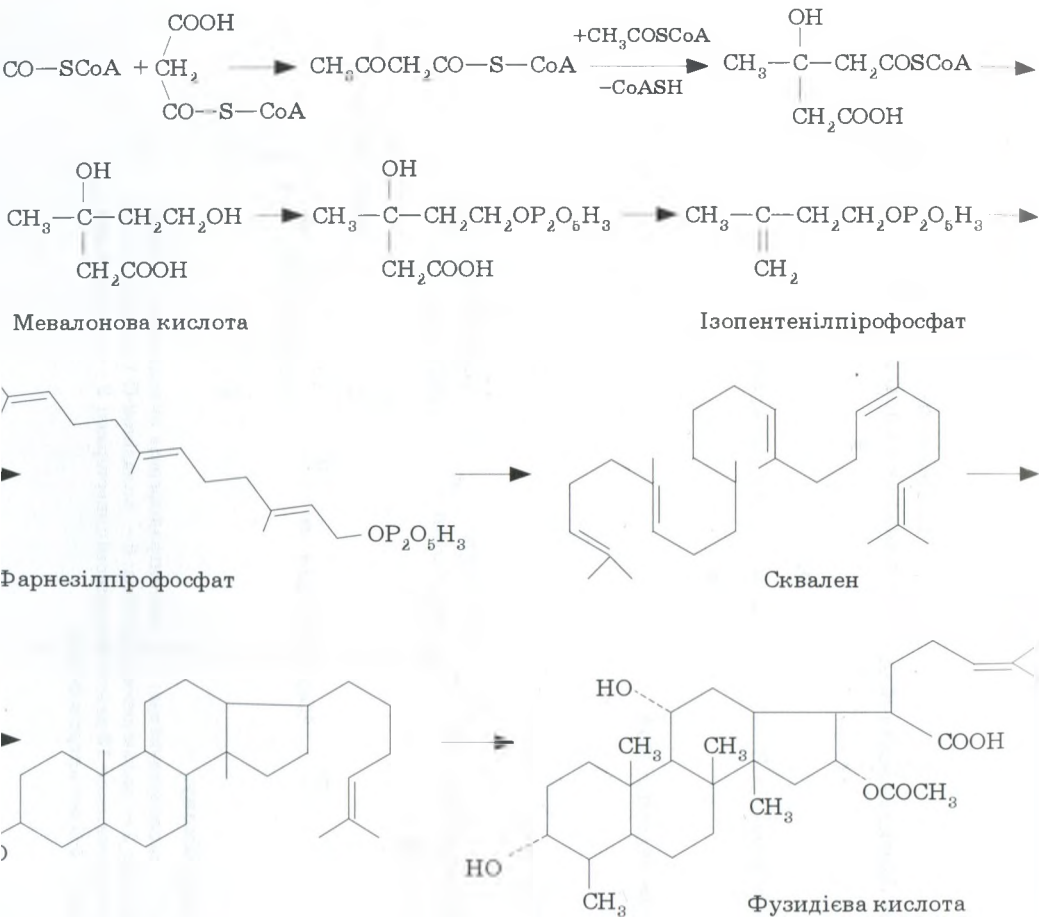


Рис. 5.96. Передбачуваний шлях біосинтезу фузидієвої кислоти

Єдиний важливий з практичного погляду антибіотик, утворюваний у терпеноїдному шляху біосинтезу, — фузидієва кислота, якій притаманна стероїдна структура. Слід зазначити, що цефалоспорин Р, синтезований *Cephalosporium*, є стероїдом і, найімовірніше, також утворюється терпеноїдним шляхом. Очевидно, біосинтез фузидієвої кислоти здійснюється стероїдним шляхом, причому як проміжний продукт утворюється сквален. Спрощену схему біосинтезу фузидієвої кислоти показано на рис. 5.96.

5.5.2.6. Біосинтез аміноглікозидних антибіотиків (стрептоміцин, неоміцин). Формально аміноглікозидні антибіотики слід називати не полімерами, а олігомерами, оскільки вони складаються з небагатьох мономерних одиниць, зазвичай з трьох чи чотирьох. Ці одиниці являють собою циклічний багатоатомний спирт з шістьма вуглецевими атомами і кілька вуглеводів, з'єднаних глікозидними зв'язками. Деякі гідроксильні групи циклітолу і вуглеводів заміщені аміногрупою чи модифікованою аміногрупою, що й дало назву цьому класу антибіотиків.

За деякими своїми особливостями ці структури нагадують полісахариди бактеріальної капсули і клітинної стінки, наприклад, ліпополісахариди клітинної стінки ентеробактерій з їх довгими ланцюгами аміносахаридів і аміноспиртів. Тому можна передбачити, що аміноглікозидні антибіотики синтезуються за допомогою вже вивчених шляхів біосинтезу бактеріальних полісахаридів. Їх біосинтез можна поділити на дві стадії: послідовність реакцій, що приводять до перетворення глюкози в індивідуальні ланки, з яких складається ланцюг; полімеризація цих ланок утворенням глікозидних зв'язків.

Реакції, в яких один вуглевод перетворюється на інший, зазвичай відбуваються без перебудови порядку розміщення вуглецевих атомів. І в циклітолах порядок вуглецевих атомів такий самий, як і в молекулі глюкози. Циклітоли утворюються шляхом замикання зв'язку між атомами С-1 і С-6. У первинному метаболізмі вуглеводи перетворюються на нуклеозиддифосфатсахариди (дезоксинуклеозиддифосфатсахариди), як у класичному прикладі перетворення УДФ-глюкози на УДФ-галактозу. Етерифікація у положенні 1 нуклеозиддифосфатом є звичайним шляхом активації вуглеводу, необхідним для утворення глікозидного зв'язку, і, отже, для олігомеризації або полімеризації.

Основні аміноглікозидні антибіотики можна поділити на групи залежно від структури їх аміноциклітолу (див. підрозділ 5.5.1.4). Слід зазначити, що, незважаючи на структурну подібність, біосинтез різних аміноциклітолів є різним. Наприклад, дезоксистрептамін не є попередником стрептидину, а міоїнозит, попередник стрептидину, не включається у дезоксистрептамін.

На сьогодні з аміноглікозидних антибіотиків детально досліджено біосинтез тільки стрептоміцину.

Біосинтез стрептоміцину. Молекулу стрептоміцину (див. підрозділ 5.5.1.4) можна розглядати як трисахарид, утворений із стрептидину (аміноциклітол), *L*-стрептози і *N*-метил-*L*-глюкозаміну.

Схему біосинтезу стрептоміцину показано на рис. 5.97. Вихідною сполукою для синтезу всіх складових стрептоміцину є глюкоза. Під дією *гексокінази* (КФ 2.7.1.1) або *глюкокінази* (КФ 2.7.1.2) глюкоза перетворюється на глюкозо-6-фосфат. Взаємоперетворення глюкозо-6-фосфату і глюкозо-1-фосфату здійснює фермент *фосфоглюкомутаза* (КФ 5.4.2.2). З глюкозо-1-фосфату утворюється НДФ-*N*-метил-*L*-глюкозамін і дТДФ-*L*-дигідрострептоза.

В утворенні дТДФ-*L*-дигідрострептози беруть участь такі ферменти: *глюкозо-1-фосфаттимідилтрансфераза* (КФ 2.7.7.24, утворення дТДФ-глюкози); *дТДФ глюकोзооксидоредуктаза* (КФ 4.2.1.46, утворення дТДФ-4-оксо-6-дезоксид-*D*-глюкози); *дТДФ-4 дегідрорамнозо-3,5 епімераза* (КФ 5.1.3.13,

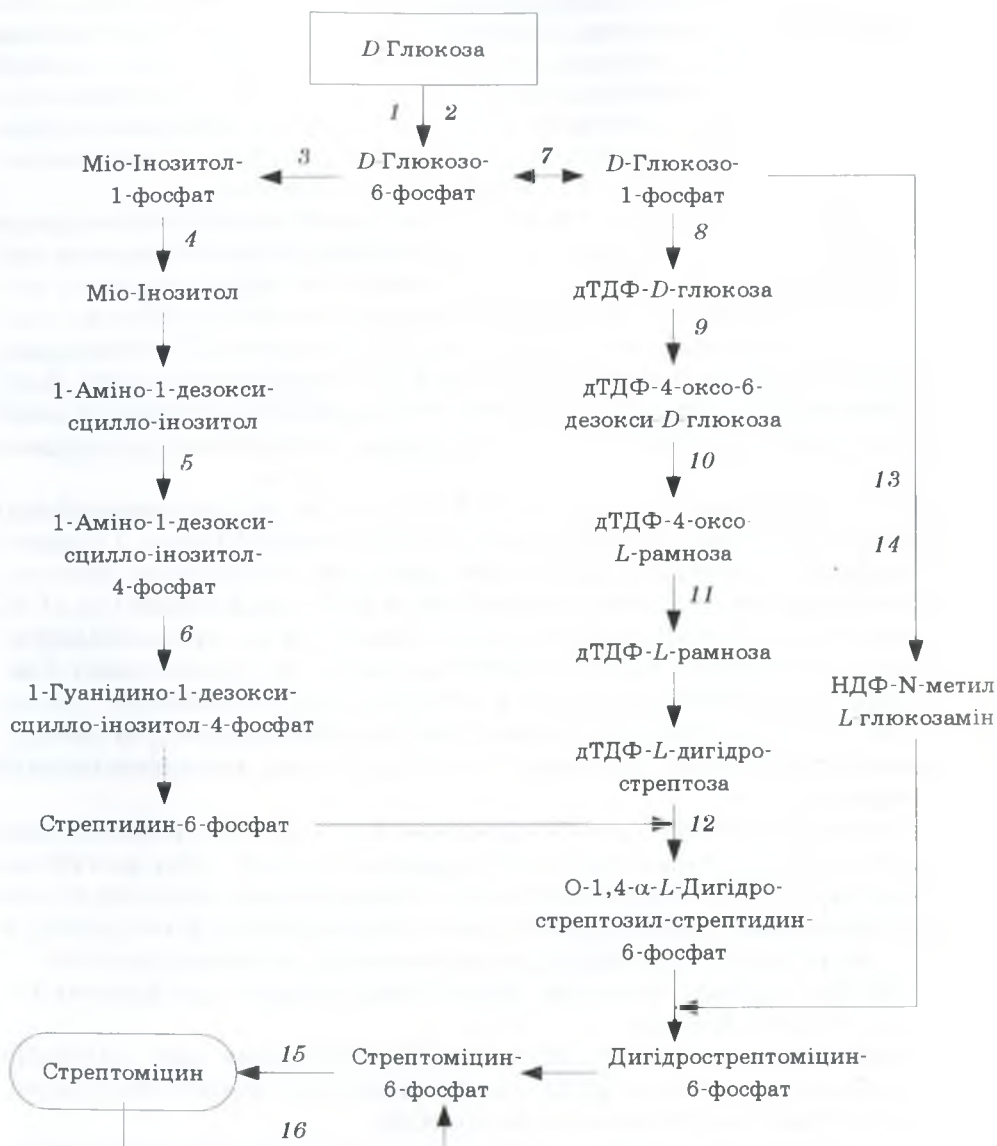


Рис. 5.97. Схема біосинтезу стрептоміцину:

ферменти: 1 — гексокіназа; 2 — глюкокіназа; 3 — інозитол-3-фосфатсинтаза; 4 — інозитол-1-фосфатфосфатаза; 5 — сцилло-інозамін-4-кіназа; 6 — сцилло-інозамін-4-фосфат-амінінотрансфераза; 7 — фосфоглюкомутаза; 8 — глюкозо-1-фосфат-тимідилтрансфераза; 9 — дТДФ-глюкозооксидоредуктаза; 10 — дТДФ-4-дегідрорамнозо-3,5-епімераза; 11 — дТДФ-4-дегідрорамнозоредуктаза; 12 — дТДФ-дигідрострептозострептідин-6-фосфат-дигідрострептозилтрансфераза; 13, 14 — ферменти, що беруть участь у синтезі N-метил-*L*-глюкозаміну; 15 — стрептоміцин-6-фосфатаза; 16 — стрептоміцин-6-кіназа

утворення дТДФ-4-оксо-*L*-рамнози); *дТДФ 4-дегідрорамнозоредуктаза* (КФ 1.1.1.133, утворення дТДФ-*L*-рамнози). На сьогодні фермент, який каталізує перетворення дТДФ-*L*-рамнози на дТДФ-*L*-дигідрострептозу, залишається невідомим.

Глюкозо-6-фосфат є вихідною сполукою для синтезу стрептидину. З глюкозо-6-фосфату спочатку утворюється міо-інозитол-1-фосфат (*інозитол-3-фосфатсинтаза*, КФ 5.5.1.4), далі — міо-інозитол (*інозитол-1-фосфат-фосфатаза*, КФ 3.1.3.25) і 1-аміно-1-дезоксисцилло-інозитол-4-фосфат). Утворення 1-гуанідино-1-дезоксисцилло-інозиту-4-фосфату каталізує *сцилло-інозамін-4-кіназа* (КФ 2.1.4.2). Детальніше біогенез стрептидину показано на рис. 5.98.

Стрептидин-6-фосфат, утворений з 1-гуанідино-1-дезоксисцилло-інозиту-4-фосфату, полімеризується з дигідрострептозою (фермент *дТДФ дигідро стрептозострептидин-6-фосфат-дигідрострептозил-трансфераза*, КФ 2.4.2.27) і далі з глюкозаміном, утворюючи дигідрострептоміцин-6-фосфат, який через стрептоміцин-6-фосфат перетворюється на стрептоміцин (фермент *стрептоміцин-6-фосфатаза*, КФ 3.1.3.39) (див. рис. 5.97).

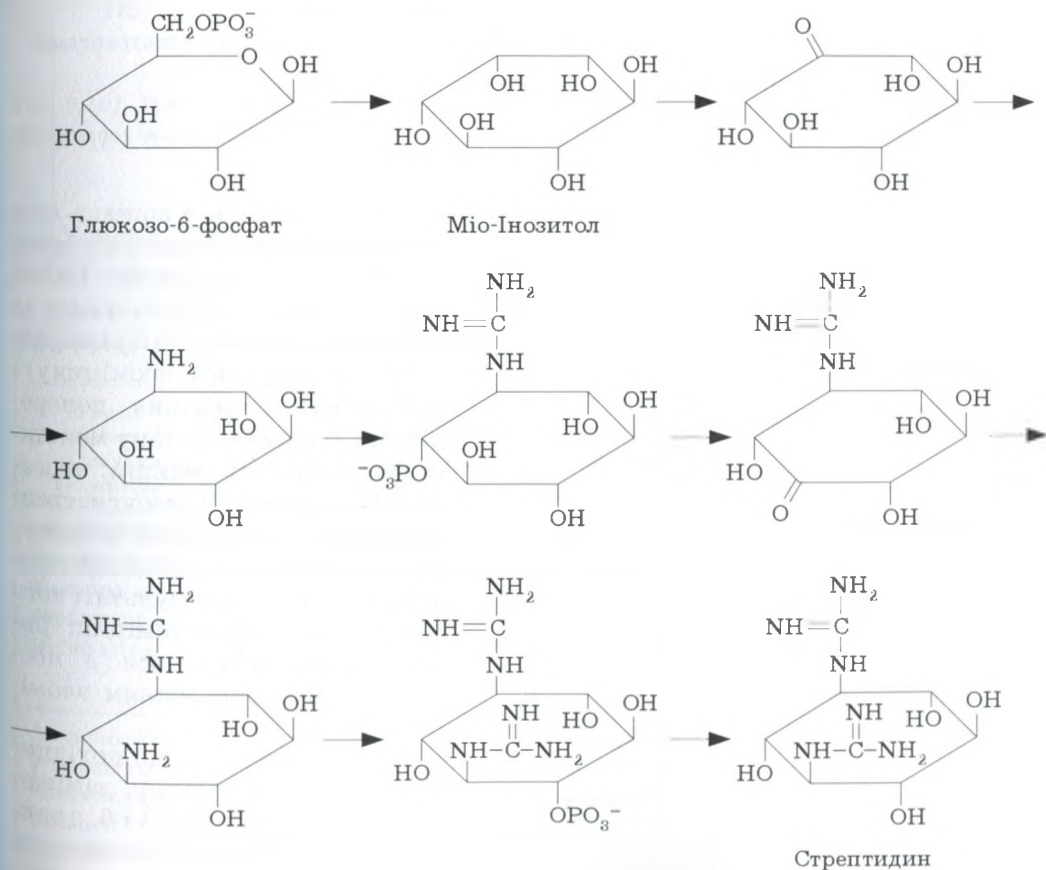


Рис. 5.98. Біогенез стрептидину

Біосинтез неоміцину. Неоміцин — найдослідженіший із дезоксистрептамінвмісних антибіотиків, проте лише деякі аспекти його біогенезу нині встановлено. Дезоксистрептамін відрізняється від стрептидину за своїм походженням. Передбачається, що дигідрострептамін утворюється з глюкози через похідне інозину (рис. 5.99). Крім дезоксистрептаміну, неоміцин містить рибозу і два аміносахариди (неозамін В і неозамін С) (рис. 5.100). Рибоза, найімовірніше, утворюється з глюкози відщепленням С-1 у пентозофосфатному шляху. Неозамін В і неозамін С утворюються з глюкози через глюкосамін без перебудови розміщення атомів вуглецю. Гіпотетичний шлях їх біосинтезу показано на рис. 5.101.

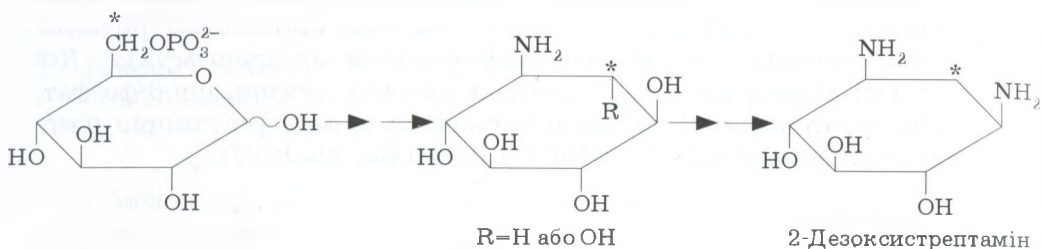


Рис. 5.99. Гіпотетичний шлях біосинтезу 2-дезоксистрептаміну

Як відбувається зшивка всіх складових з утворенням кінцевого продукту — невідомо. Проте виділення ди- і трисахаридів із мутантних штамів *Streptomyces fradiae* (продуцента неоміцину) і дослідження введення попередників вказують на таку можливу послідовність реакцій: неозамін С зв'язується з дезоксистрептаміном з утворенням неаміну; рибоза утворює глікозидний зв'язок з неаміном, у результаті чого синтезується рибостаміцин; рибостаміцин зв'язується з неозаміном В із утворенням неоміцину.

Слід зазначити, що похідними дезоксистрептаміну, заміщеного за положеннями 4 і 6, є такі аміноглікозидні антибіотики, як канаміцин, гентаміцин, тобраміцин і сизоміцин.

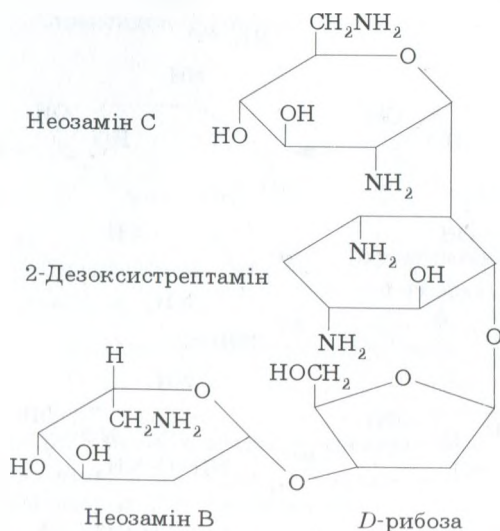


Рис. 5.100. Структурна формула неоміцину

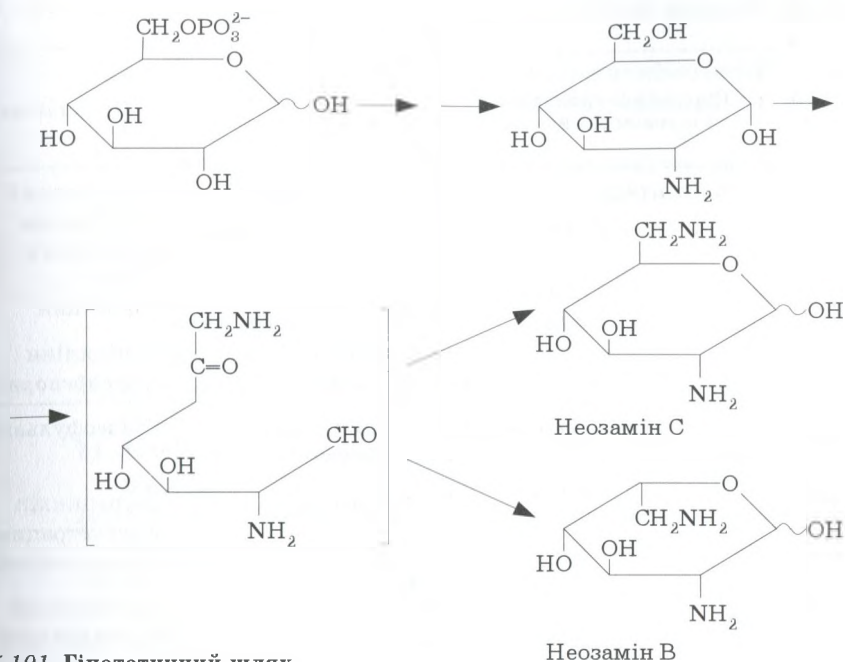


Рис. 5.101. Гіпотетичний шлях біосинтезу неозамінів

У табл 5.17 наведено підсумкові дані щодо шляхів синтезу антибіотиків різної хімічної природи.

Таблиця 5.17. Біосинтез антибіотиків

Групи антибіотиків за шляхом біосинтезу	Підгрупи антибіотиків за шляхом біосинтезу	Хімічна природа і назва групи антибіотиків	Представники
Антибіотики, що походять від єдиного первинного метаболіту	—	Антибіотик з ароматичною структурою	Хлорамфенікол
	—	Нуклеозидні антибіотики	Кордицепін Туберцидин Тойокаміцин Сангіваміцин
Антибіотики, утворювані конденсацією кількох метаболітів	—	Аміносахарид, ацильований похідним проліну	Лінкоміцин
	—	Похідне вуглеводу, кумарину і бензойної кислоти	Новобіоцин

Групи антибіотиків за шляхом біосинтезу	Підгрупи антибіотиків за шляхом біосинтезу	Хімічна природа і назва групи антибіотиків	Представники
Антибіотики, утворювані олігомеризацією або полімеризацією	Поліпептиди	Нерибосомальні пептиди β -лактамі антибіотики	Грамїцидин S Бацитрацин Поліміксин Нізін Блеоміцин Пеніциліни Цефалоспорини
	Антибіотики, утворювані полімеризацією ацетатних і пропіонатних одиниць	Гетероциклічні антибіотики Тетрацикліни 12-, 14- і 16-членні макроліди (полікетиди I типу) Полікетиди II типу Анзаміцини	Гризеофульвін Тетрациклін Хлортетрациклін Окситетрациклін Еритроміцин Олеандоміцин Тилозин Авермектини Доксорубіцин Рифаміцини Стрептоваріцини Толіпоміцин Галоміцин
	Антибіотики, утворювані конденсацією ізопренових одиниць	Терпеноїдні антибіотики	Фузидієва кислота
	Антибіотики, утворювані олігомеризацією аміноциклітолу і похідних вуглеводів	Аміноглікозиди	Стрептоміцин Канаміцини Гентаміцини Неоміцин

КОНТРОЛЬНІ ЗАПИТАННЯ ДО ПІДРОЗДІЛУ 5.5

1. Дайте визначення поняття «антибіотики».
2. Як класифікуються антибіотики за механізмом біологічної дії?
3. Які найважливіші антибіотики мікробного походження Ви знаєте?

4. Охарактеризуйте основні біосинтетичні шляхи, що ведуть до утворення антибіотиків.
5. Як Ви розумієте поняття «родина» антибіотиків?
6. Які метаболічні шляхи біосинтезу комплексу споріднених сполук?
7. Як здійснюється біогенез родини рифаміцинів і еритроміцинів?
8. Охарактеризуйте групи антибіотиків за їхньою хімічною природою.
9. Наведіть приклади антибіотиків, що походять від єдиного первинного метаболіту. Які первинні метаболіти використовуються для їхнього синтезу?
10. Які антибіотики утворюються конденсацією кількох метаболітів?
11. Конденсацією яких метаболітів утворюються лінкоміцин і новобіоцин?
12. У яких реакціях метаболізму ростового субстрату утворюються інтермедіати, необхідні для синтезу новобіоцину?
13. Які антибіотики утворюються олігомеризацією або полімеризацією?
14. Які особливості притаманні біогенезу поліпептидних антибіотиків?
15. Чому поліпептидні антибіотики називають нерибосомальними пептидами?
16. Як здійснюється біосинтез граміцидину S?
17. Які ферментні комплекси беруть участь у синтезі бацитрацину?
18. Які досліді підтвердили утворення бокового ланцюга пеніциліну G з фенілоцтової кислоти?
19. Які сполуки є вихідними для синтезу пеніцилінів і цефалоспоринов?
20. У яких реакціях метаболізму ростового субстрату утворюються інтермедіати, необхідні для синтезу пеніцилінів і цефалоспоринов?
21. Які антибіотики утворюються конденсацією ацетатних і пропіонатних одиниць?
22. У чому полягають принципові відмінності синтезу жирних кислот від біосинтезу вторинних метаболітів?
23. Як відбувається біогенез ланцюга, з якого походять антибіотики, утворювані з ацетату-пропіонату?
24. Як відбувається утворення ароматичних кілець із поліпептидних ланцюгів?
25. Як здійснюється біосинтез гризеофульвіну?
26. Яка сполука є загальним попередником тетрациклінів? Як вона утворюється?
27. У яких реакціях метаболізму ростового субстрату утворюються інтермедіати, необхідні для синтезу тетрациклінів?

28. Які основні етапи синтезу макролідних антибіотиків?
29. У яких реакціях метаболізму ростового субстрату утворюються інтермедіати, необхідні для синтезу еритроміцинів?
30. Як відбувається утворення вуглеводної складової еритроміцинів?
31. Які сполуки називаються авермектинами?
32. У чому полягає практичне значення авермектинів?
33. Які сполуки є вихідними для синтезу лактонного макроциклу авермектинів?
34. Як утворюється олеандроза під час синтезу авермектинів?
35. Як відбувається синтез агліконів авермектинів?
36. Які сполуки є вихідними для синтезу анзаміцинів?
37. Як утворюються метилмалонатні одиниці для синтезу анзаміцинів?
38. Які сполуки є вихідними для синтезу доксорубіцину?
39. У яких реакціях метаболізму ростового субстрату утворюються інтермедіати, необхідні для синтезу доксорубіцину?
40. Які антибіотики називаються терпеноїдними?
41. Яка сполука є попередником синтезу фузидієвої кислоти?
42. Які стадії біосинтезу аміноглікозидних антибіотиків?
43. Яка сполука є вихідною для синтезу стрептоміцину?
44. Які реакції приводять до утворення з глюкози стрептидину і стрептози?
45. Які особливості притаманні біосинтезу неоміцину?
46. На які групи поділяються антибіотики за шляхом біосинтезу?
47. На які підгрупи поділяються антибіотики, утворювані олігомеризацією або полімеризацією?
48. Назвіть представників полікетидних антибіотиків I і II типу.
49. Які антибіотики входять до групи анзаміцинів?
50. Які антибіотики входять до групи аміноглікозидів?

5.6. БІОСИНТЕЗ ПРОДУКТІВ БРОДІННЯ

5.6.1. Загальна характеристика процесу бродіння

Бродіння — це такий метаболічний процес, у якому регенерується АТФ, а продукти розщеплення органічного субстрату можуть бути одночасно і донорами, і акцепторами водню. Загальну схему бродіння показано на *рис. 5.102*. Органічний субстрат є джерелом енергії та вуглецю. Реакції синтезу АТФ є реакціями окиснення. Від окисненого вуглецю клітина позбавляється, виділяючи CO_2 . Окремі етапи окиснення являють собою дегідрування, за якого водень переноситься на НАД. Акцепторами водню, який міститься у вигляді НАДН, є проміжні продукти розщеплення субстрату. За рахунок НАДН ці проміжні продукти відновлюються, а продукти відновлення виводяться з клітини.

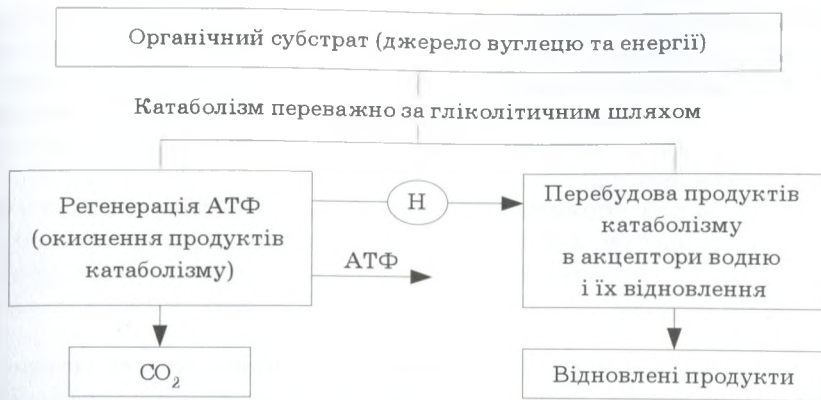
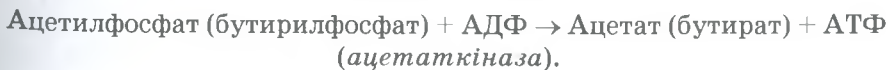


Рис. 5.102. Загальна схема бродіння

У процесі зброджування вуглеводів та інших субстратів утворюються (окремо чи в суміші) такі продукти, як етанол, лактат (молочна кислота), пропіонат, форміат, бутират, сукцинат, ацетат, *n*-бутанол, 2,3-бутандіол, ацетон, 2-пропанол, CO₂ та H₂. Залежно від того, які продукти переважно утворюються, розрізняють спиртове, молочнокисле, маслянокисле, пропіонове, мурашинокисле та оцтовокисле бродіння. Молекулярний кисень у процесах бродіння участі не бере. Більшість мікроорганізмів, які здійснюють бродіння, є облигатними анаеробами або факультативними аеробами, здатними рости як у присутності кисню, так і без нього. При цьому кисень пригнічує бродіння і воно змінюється диханням.

У процесі зброджування глюкози утворюється від одного до чотирьох молей АТФ. У фосфорилюванні на рівні субстрату беруть участь такі три найважливіші реакції:



У більшості мікроорганізмів використовуються перші дві реакції. При цьому необхідні акцептори водню утворюються з пірувату або ацетил-КоА. У процесі зброджування одного моля глюкози утворюється лише два або три моля АТФ, а продуктами бродіння є лактат, етанол, ацетон, бутират, *n*-бутанол, 2-пропанол, 2,3-бутандіол, капронат, ацетат, CO₂ та H₂.

При використанні третьої реакції, яка каталізується *ацетаткіназою*, утворюється додатковий АТФ. Ацетилфосфат утворюється з ацетил-КоА за допомогою *фосфотрансацетилази*:



Крім того, можливе утворення ацетилфосфату з фосфорильованих сахаридів (ксилулозо-5-фосфату, фруктозо-6-фосфату) за участю *фосфокетоксилази*.

Здатність бактерій здійснювати третю реакцію залежить від того, чи можуть вони виділяти молекулярний водень. При перенесенні відновлювальних еквівалентів (електронів) на протони вони можуть виділятися у вигляді молекулярного водню.

Найважливішими з практичного погляду продуктами бродіння є етанол, молочна кислота, ацетон, 2-пропанол, бутанол.

5.6.2. Утворення етанолу

Основними продуцентами етанолу є дріжджі *Saccharomyces cerevisiae* та бактерії (*Zytopomonas mobilis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Sarcina ventriculi*).

Утворення етанолу дріжджами. Катаболізм глюкози у процесі зброджування її до етанолу та CO_2 здійснюється за гліколітичним шляхом. Глюкоза окиснюється до пірувату. Перетворення пірувату на етанол проходить двома етапами (рис. 5.103): піруват декарбоксилюється *піруватдекарбоксилазою* до ацетальдегіду; ацетальдегід відновлюється *алкогольдегідрогеназою* до етанолу за участю НАДН. При цьому переноситься водень, який утворився під час дегідрування триозофосфату. Окисно-відновний баланс таким чином зберігається.

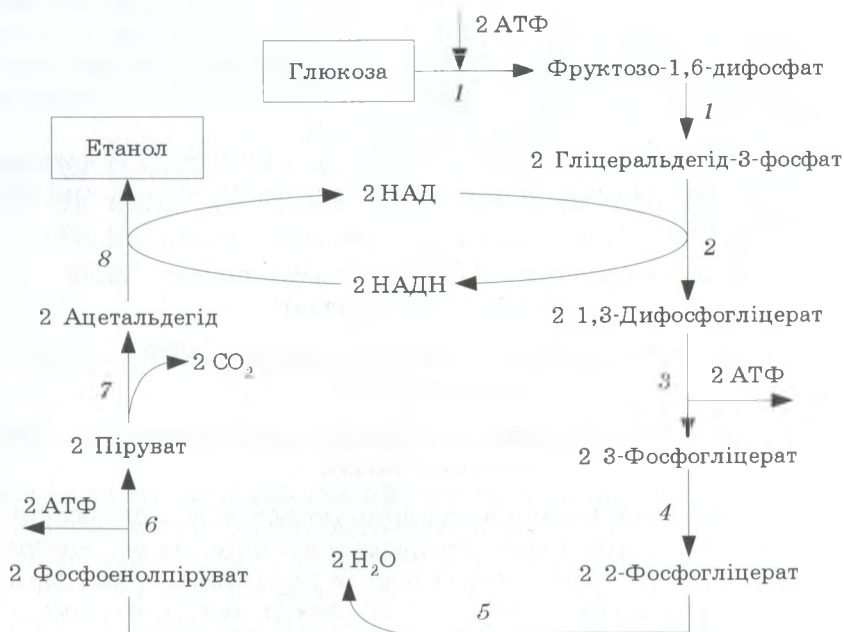


Рис. 5.103. Зброджування дріжджами глюкози з утворенням етанолу і CO_2 :

ферменти: 1 — ферменти шляху Ембдена — Мейергофа — Парнаса; 2 — гліцеральдегідфосфатдегідрогеназа; 3 — фосфогліцераткіназа; 4 — фосфогліцератмутатаза; 5 — енолаза; 6 — піруваткіназа; 7 — піруватдекарбоксилаза; 8 — алкогольдегідрогеназа

Форми бродінь, відкриті К.Нейбергом. Якщо до дріжджів, які зброджують глюкозу, додати бісульфіт (він є нетоксичним для дріжджів), то з'явиться новий продукт — гліцерин і одночасно знизиться вихід етанолу та CO_2 . Ацетальдегід зв'язується бісульфітом з утворенням ацетальдегідсульфіту і тому не може бути акцептором водню — етанол не утворюється. Замість ацетальдегіду таким акцептором водню є діоксиацетонфосфат. Він відновлюється до гліцерин-3-фосфату і дефосфорилується до гліцерину. Бродіння за присутності бісульфіту використовують у промисловості для одержання гліцерину. Це *друга форма* бродіння за Нейбергом.

Якщо у процесі бродіння у розчин додати бікарбонат натрію або двоазміщений фосфорнокислий натрій, також утворюється гліцерин, оскільки ацетальдегід перетворюється в результаті реакції дисмутації на етанол та оцтову кислоту і тому не може бути акцептором водню. Це *третья форма* бродіння за Нейбергом. *Першою формою* бродіння є нормальне дріжджове бродіння.

Ефект Пастера. Зброджування дріжджами глюкози — процес анаеробний, хоча дріжджі є аеробними мікроорганізмами. В анаеробних умовах бродіння відбувається дуже інтенсивно, але спостерігається слабкий ріст. Під час аерації бродіння послаблюється, починається дихання і активний ріст. У деяких дріжджів бродіння можна майже пригнітити посиленою аерацією (ефект Пастера). Л.Пастер відкрив цей ефект понад сто років тому. Він властивий не тільки дріжджам, а й усім факультативно аеробним клітинам, у тому числі й клітинам тканин вищих тварин.

Утворення етанолу бактеріями. Відомий для дріжджів шлях утворення етанолу (гліколіз, піруватдекарбоксилазна реакція, відновлення ацетальдегіду) з усіх досліджених бактерій виявлений тільки у *Sarcina ventriculi*. Бактерія *Zyotomonas mobilis* розщеплює глюкозу за КДФГ-шляхом, піруват розкладається у піруватдекарбоксилазній реакції на ацетальдегід і CO_2 , ацетальдегід відновлюється до етанолу. Єдиними продуктами бродіння у цьому разі є етанол, вуглекислий газ і невеликі кількості молочної кислоти.

5.6.3. Утворення молочної кислоти

Продуцентами молочної кислоти є молочнокислі бактерії, які здійснюють молочнокисле бродіння (табл. 5.18).

Гомоферментативні молочнокислі бактерії утворюють тільки одну молочну кислоту (вона становить не менше як 90 % усіх продуктів бродіння). Глюкоза катаболізується за гліколітичним шляхом. Водень, який відщеплюється під час дегідрування гліцеральдегід-3-фосфату у вигляді НАДН, передається на піруват (рис. 5.104). За присутності *лактатдегідрогенази* піруват відновлюється до лактату. Лише невелика частина пірувату декарбоксилюється та перетворюється на оцтову кислоту, етанол і CO_2 , а також ацетоїн. Гомоферментативне молочнокисле бродіння здійснюють стрептококи, серед лактобацил — *Lactobacillus lactis*, *L.bulgaricus*, *L.delbrueckii*, *L.acidophilus*.

Гетероферментативні молочнокислі бактерії не використовуються для промислового одержання молочної кислоти, оскільки, крім лактату, вони утворюють і інші продукти бродіння (етанол, ацетат).

Таблиця 5.18. Гомо- і гетероферментативні молочнокислі бактерії і конфігурація утвореної молочної кислоти

Молочнокислі бактерії	Бродіння		Конфігурація молочної кислоти
	гомоферментативне	гетероферментативне	
<i>Lactobacillus</i>			
<i>L. delbrueckii</i>	+	—	D (—)
<i>L. lactis</i>	+	—	D (—)
<i>L. bulgaricus</i>	+	—	D (—)
<i>L. casei</i>	+	—	L (+)
<i>L. plantarum</i>	+	+	DL
<i>L. brevis</i>	—	+	DL
<i>L. fermentum</i>	—	+	DL
<i>Streptococcus</i>			
<i>S. faecalis</i>	+	—	D (—)
<i>S. lactis</i>	+	—	D (—)
<i>S. cremoris</i>	+	—	D (—)
<i>Leuconostoc</i>			
<i>L. mesenteroides</i>	—	+	D (—)
<i>L. dextranum</i>	—	+	D (—)
<i>Bifidobacterium</i>			
<i>B. bifidum</i>	—	—	(+)

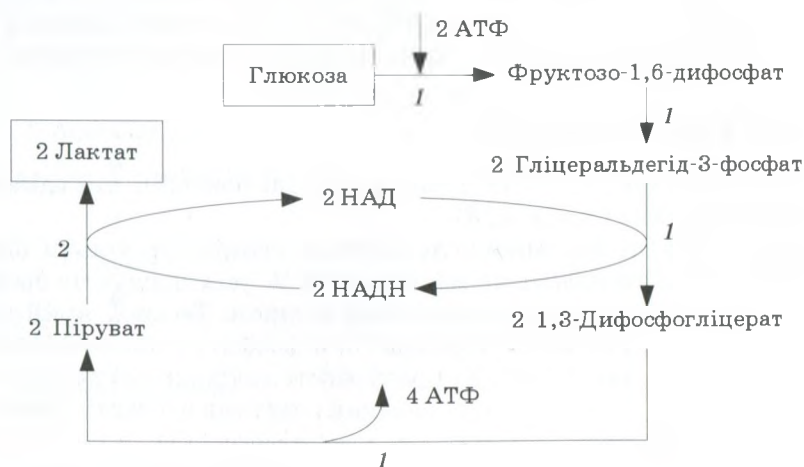


Рис. 5.104. Утворення лактату з глюкози у процесі гомоферментативного молочнокислого бродіння:

1 — ферменти шляху Ембдена — Мейсргофа — Парнаса; 2 — лактатдегідрогеназа

Бродіння, яке здійснюється *Bifidobacterium bifidum*. Біфідобактерії розщеплюють глюкозу на молочну кислоту та ацетат. Причому вони не мають ні альдолази, ні глюкозо-6-фосфатдегідрогенази. У цих бактерій глюкоза перетворюється на фруктозо-6-фосфат за гліколітичним шляхом, а потім фруктозо-6-фосфат за допомогою активних фосфокетолаз — на ацетилфосфат і ксилулозо-5-фосфат. Ксилулозо-5-фосфат у свою чергу дає ацетилфосфат і гліцеральдегідфосфат. Ацетилфосфат відновлюється до ацетату, а гліцеральдегідфосфат через піруват — до лактату.

Молочнокислі бактерії утворюють *D*(-), *L*(+) або *DL*-форми молочної кислоти (див. табл. 5.18). Продукенти *D*(-)-форми молочної кислоти можуть утворювати тільки такий оптичний ізомер, у той час як продукенти *L*(+)-форми завжди утворюють і деяку кількість *D*(-)-ізомеру. Більшість бактерій, які утворюють суміш *D*- і *L*-форми лактату, містять дві лактатдегідрогенази, що різняться за властивою їм стереоспецифічністю.

5.6.4. Продукти маслянокислого та ацетоно-бутилового бродіння

Масляна кислота (бутират), *n*-бутанол, ацетон, пропанол є типовими продуктами бродіння анаеробних спороутворювальних бактерій (кlostридій).

Катаболізм глюкози здійснюється за гліколітичним шляхом. Водень, що утворюється у процесі дегідрування гліцеральдегідфосфату, переноситься на органічні кислоти або кетони, які утворюються з пірувату або ацетил-КоА. Типовим для кlostридій процесом зброджування глюкози є бродіння, характерне для *Clostridium butyricum* і *Clostridium acetobutyricum* (рис. 5.105).

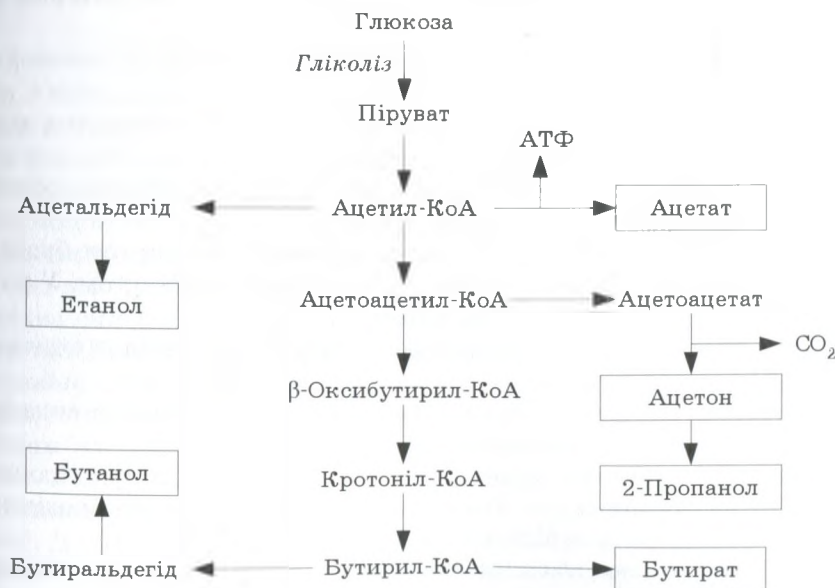


Рис. 5.105. Зброджування глюкози *Clostridium butyricum* і *Clostridium acetobutyricum* з утворенням бутирату і органічних розчинників

Утворення бутирату починається з конденсації двох молекул ацетил-КоА і утворенням ацетоацетил-КоА, який потім відновлюється до β -оксибутирил-КоА і бутирил-КоА. Із ацетил-КоА за участю *фосфотрансацетилази* та *ацетаткінази* може утворюватись вільний ацетат, а також молекула АТФ. У міру утворення ацетату та бутирату і зумовленого накопиченням цих кислот підкислення середовища починають синтезуватись ферменти, що каталізують утворення ацетону та бутанолу. Ацетоацетил-КоА трансформується в ацетоацетат, декарбоксилювання якого дає ацетон. За відновлення ацетону утворюється пропанол. Відновлення бутирил-КоА дає бутанол. У процесі зброджування глюкози кlostридіями може також утворюватись і етанол (за відновлення ацетил-КоА).

Молекулярний водень може виділятися із НАДН, одержаного дегідруванням гліцеральдегідфосфату та окисненням пірувату. Чим більше молекулярного водню буде одержано, тим менше потрібно синтезувати органічних акцепторів водню (ацетоацетил-КоА).

Оскільки ацетон, 2-пропанол і бутанол є важливими органічними розчинниками, бродиння, яке здійснюється кlostридіями, має велике практичне значення.

КОНТРОЛЬНІ ЗАПИТАННЯ ДО ПІДРОЗДІЛУ 5.6

1. Який метаболічний процес називається бродинням? Які особливості притаманні бродинню?
2. Чому у процесі бродиння спостерігається слабкий ріст мікроорганізмів?
3. Яка максимальна кількість молекул АТФ може синтезуватись у процесі бродиння і за якими механізмами?
4. За яких умов у процесі бродиння може утворюватись додатковий АТФ в ацетаткіназній реакції?
5. Чим відрізняється бродильний тип метаболізму від метаболізму аеробних гетеротрофів?
6. Які мікроорганізми можуть здійснювати спиртове бродиння?
7. Назвіть форми спиртового бродиння за Нейбергом. У чому полягає суть ефекту Пастера?
8. Як відбувається перетворення пірувату на етанол під час спиртового бродиння?
9. Чим відрізняється гомоферментативне молочнокисле бродиння від гетероферментативного?
10. Які ферменти беруть участь в утворенні лактату з глюкози?
11. Які особливості притаманні молочнокислому бродинню, що здійснюється біфідобактеріями?
12. Як здійснюється процес маслянокислого і ацетоно-бутилового бродиння?

5.7. СИНТЕЗ ФЕРМЕНТІВ

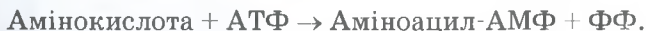
Ферменти — це білки, яким притаманна каталітична функція. Отже, синтез ферментів складається із біосинтезу амінокислот — складових білків та синтезу білка (транскрипція ДНК, трансляція мРНК).

Біосинтез амінокислот детально було розглянуто раніше (див. підрозділ 5.2).

5.7.1. Синтез білка

Транскрипція ДНК. Виникає закономірне запитання: як інформація, що міститься в генах, визначає специфічну активність та інші властивості ферментів, і як вона перетворюється на амінокислотну послідовність білка? ДНК як носій спадкової інформації не є матрицею для синтезу поліпептидів. Біосинтез білків відбувається на рибосомах, які безпосередньо з ДНК не стикаються. Передавання записаної в ДНК інформації до місць синтезу білка здійснюють *матричні (інформаційні) РНК*. Ці РНК є одноланцюговими. мРНК синтезується на одному з ланцюгів ДНК, причому механізм цього процесу схожий на механізм реплікації ДНК. Утворення мРНК починається на 5'-кінці і за послідовністю основ ланцюг мРНК є комплементарним ланцюгу ДНК. Отже, під час синтезу мРНК просто копіюється нуклеотидна послідовність ДНК. Цей процес називається *транскрипцією*.

Трансляція ДНК. Амінокислоти з'єднуються в поліпептидний ланцюг за порядком, який визначається триплетами мРНК. У цьому процесі беруть участь мРНК, тРНК, рибосоми, ряд ферментів, АТФ. Спочатку амінокислоти за участю АТФ активуються з утворенням аміноацил-АМФ:



Від АМФ аміноацильна група переноситься на кінцевий нуклеотид тРНК. Активація та приєднання амінокислоти до відповідної тРНК відбувається за участю фермента *аміноацил-тРНК-синтетази*. Цей фермент розпізнає і амінокислоту, і відповідну їй тРНК. Існує 20 таких синтетаз — по одній на кожну амінокислоту. Якщо для амінокислоти існує кілька кодонів, то для кожної такої амінокислоти існує і кілька тРНК. Різні тРНК, призначені для однієї й тієї самої амінокислоти, називаються *ізоакцепторними тРНК*. Отже, відповідна синтетаза може приєднувати амінокислоту до кількох ізоакцепторних тРНК. У молекулі тРНК є ділянка, комплементарна кодону мРНК (*антикодон*). Амінокислоти з'єднуються на рибосомах (рис 5.106). Рибосома переміщується вздовж мРНК, починаючи з 5'-кінця, і з кожним її переміщенням на один триплет наступна амінокислота встановлюється транспортною РНК у потрібне положення і приєднується своєю аміногрупою до карбоксильної групи попередньої амінокислоти (утворюється поліпептидний зв'язок). До мРНК прикріплюється кілька рибосом, так що на одній і тій самій матриці одночасно синтезуються кілька поліпептидних ланцюгів. Такий комплекс однієї мРНК із рибосомами називається *полісомою*. На кінці мРНК міститься кодон, від якого залежить відділення сформованого поліпептидного ланцюга від рибосоми (УАА, УАГ, УГА).

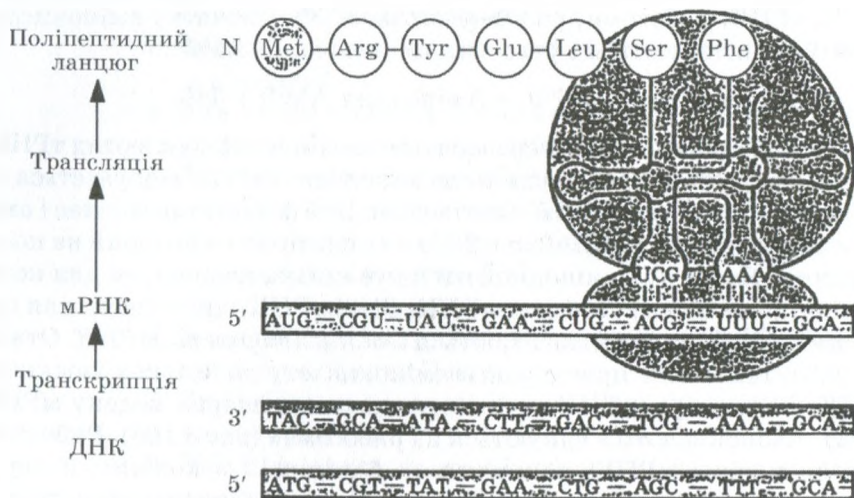
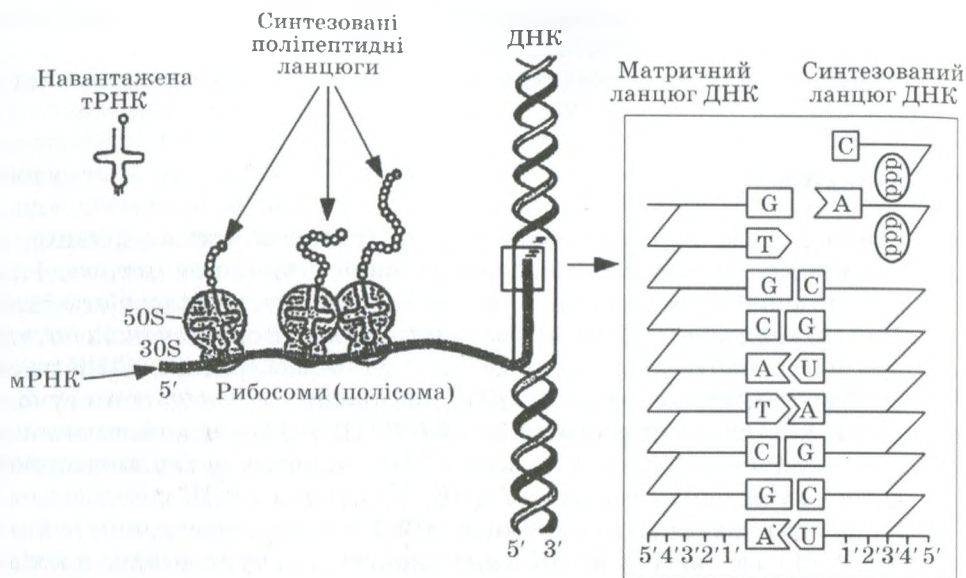


Рис. 5.106. Біосинтез білка:

перенесення генетичної інформації здійснюється двома етапами. Спочатку на матричному ланцюгу ДНК утворюється мРНК. Потім під час переміщення рибосоми вздовж мРНК (на схемах — зліва направо) різні тРНК підводять до неї амінокислоти і встановлюють їх у положення, що визначається триплетами мРНК. Амінокислоти з'єднуються між собою пептидними зв'язками

Отже, нуклеотидна послідовність ДНК є «закодованою інструкцією», яка визначає (за посередництва мРНК) структуру специфічного білка. Передавання інформації від ДНК через РНК на білок називають «центральною догмою» молекулярної біології. Так відбувається перенесення інформації у всіх організмів, у яких генетичним матеріалом є ДНК (еукаріоти, прокаріоти, ДНК-віруси).

Серед РНК-вірусів є такі, у яких РНК реплікується безпосередньо на матриці РНК. Проте у деяких РНК-онковірусів спочатку відбувається синтез ДНК, тобто РНК є матрицею для синтезу ДНК. Інформація, що міститься у вірусній РНК, передається на ДНК *зворотною транскрипцією* (за участю фермента *зворотної транскриптази*). Цей фермент використовується в генній інженерії (якщо як носій інформації виділяють не ДНК, а відповідну мРНК, то остання повинна бути переписана в ДНК, яка і вбудовується в плазмід). У прокаріотів зворотну транскрипцію не виявлено.

КОНТРОЛЬНІ ЗАПИТАННЯ ДО ПІДРОЗДІЛУ 5.7

1. Які етапи синтезу ферментів?
2. Як відбувається біосинтез амінокислот у мікроорганізмів?
3. Як здійснюється транскрипція ДНК під час синтезу білка?
4. Як відбувається трансляція ДНК у процесі синтезу білка?
5. Які РНК називаються ізоакцепторними?
6. Що таке антикодон?
7. Дайте визначення поняття «центральна догма» молекулярної біології.
8. Який процес називається зворотною транскрипцією?

6.1. БІОТЕХНОЛОГІЯ АМІНОКИСЛОТ

Нині з усіх можливих способів одержання амінокислот явна перевага віддається мікробному синтезу. Хоча організацію промислового біосинтезу амінокислот (особливо з використанням ауксотрофних мутантів) не можна назвати простою, все ж мікробіологічне виробництво позбавлене практично усіх недоліків, притаманних хімічному синтезу. Так, основною перевагою мікробного синтезу амінокислот є одержання їх у біологічно активній *L*-формі.

Організацію промислового виробництва *L*-амінокислот за допомогою мікроорганізмів можна здійснити за двома схемами. Вони різняться насамперед стадією одержання культуральної рідини. За першою схемою передбачається виробництво культуральної рідини двома етапами (двостадійний спосіб), за другою — одним етапом (одностадійний спосіб).

Двостадійний спосіб базується на використанні як джерела вуглецевого живлення одного з попередників біосинтезу цільової амінокислоти, який може бути одержаний хімічним чи біологічним методом. Утворення і підготовка необхідного попередника є першою стадією виробництва. Ця сама стадія включає також і біосинтез ферментного препарату (зазвичай мікробного походження), який здійснюватиме трансформацію попередника у цільову амінокислоту. Для цього у виробничих умовах вирощують продуцент ферментів (одержують біомасу). Біомасу відділяють від культуральної рідини центрифугуванням і використовують або безпосередньо для трансформації, або після попереднього руйнування клітин різними способами (механічними, фізико-хімічними, хімічними). Друга стадія — це процес трансформації попередника у амінокислоту за допомогою ферментних систем мікроорганізму, вирощеного на першій стадії. Прикладом двостадійного способу одержання амінокислот може бути виробництво *L*-лізину з *D,L*- α -аміно- ϵ -капролактаму.

Одностадійний спосіб синтезу амінокислот за допомогою мікроорганізмів передбачає культивування певного штаму — продуцента цільової амінокислоти на середовищі заданого складу за певних умов культивування. Штам-продуцент характеризується здатністю до надсинтезу амінокислоти. Зазвичай як надсинтетики амінокислот використовують регуляторні або ауксотрофні мутанти (див. підрозділ 5.3.3.3).

6.1.1. Технологія одержання лізину

Продуцентами лізину є грампозитивні бактерії — представники родів *Corynebacterium* і *Brevibacterium*.

Середовище для вирощування продуцента містить як джерело вуглецю мелясу, оцтову кислоту або їх суміш, як джерело азоту — солі амонію та сечовину, кукурудзяний екстракт, гідролізати кормових, хлібопекарських дріжджів і казеїну. Такі гідролізати є, крім того, джерелом ростових факторів (вітамінів та амінокислот) для ауксотрофних мутантів. Середовище також містить одно- та двоаміщений фосфат калію. Температура вирощування 28—30 °C, pH упродовж усього процесу культивування підтримують на рівні 7,0—7,2. У разі використання оцтової кислоти як джерела вуглецевого живлення здійснюють її дробне подавання у ферментатор; при цьому концентрація оцтової кислоти в середовищі не повинна перевищувати 1,5—2,0 % (ацетат пригнічує синтез ферментів ЦТК). Дробне подавання меляси у процесі культивування продуцента лізину також дає змогу підвищити вихід цієї амінокислоти. Недостатня аерація призводить до накопичення молочної кислоти та аланіну, тому витрати повітря під час культивування повинні становити приблизно 1 м³ повітря на 1 м³ середовища на 1 годину.

Виробництво кормового препарату лізину. Технологія виробництва кормового концентрату лізину ґрунтується на випарюванні культуральної рідини до 40 % за сухою речовиною. Для цього попередньо нагріту до 95—100 °C культуральну рідину подають на багатокорпусну вакуум-випарну установку і концентрують у 3,5—4 рази. Під час нагрівання лізин частково розкладається, тому вихідну культуральну рідину стабілізують 25 %-м розчином гідросульфату натрію (0,4 % об'єму рідкої фази), а потім підкислюють концентрованою соляною кислотою до pH 4,5—5,0. При цьому утворюється монохлоргідрат лізину, який є стійкішим до температури. Так одержують рідкий концентрат лізину.

Кормовий концентрат лізину одержують висушуванням рідкого концентрату на розпилювальній сушарці при температурі не вище як 90 °C. Для зниження гігроскопічності сухого концентрату до нього перед висушуванням додають наповнювачі: пшеничні висівки, бентоніт, негашене вапно, кісткове борошно. Найчастіше використовують пшеничні висівки: їх вносять в упарений концентрат до вологості 70 % (утворення пасти). Така паста висушується на конвекційній стрічковій сушарці до гранул необхідного розміру. Концентрат містить 7—10 % лізину.

Виробництво висококонцентрованих кормових препаратів. Культуральну рідину підкислюють сірчаною кислотою до pH 1,6—2,0 і подають на батарею іонообмінних колон, заповнених сульфокатіонітом КУ-2-8 в амонійній формі. Після проведення стадії адсорбції сорбат промивають водою. Елюцію лізину з колон здійснюють 0,5—5,0 %-м розчином аміаку, елюат випарюють у вакуумі при 60 °C до 30—50 % сухих речовин, підкислюють концентрованою соляною кислотою до pH 4,9. Утворений монохлоргідрат лізину висушують. Кінцевий продукт містить до 70 % лізину.

Виробництво кристалічного високоочищеного лізину. Культуральна рідина після біосинтезу без додаткової стабілізації надходить на фільтраційну

установку для відділення клітин продуцента. Фільтрат звільняють від пігментів (з м'яси) адсорбцією на активованому вугіллі або аніонітах. Такий освітлений розчин з рН 7,0 надходить на іонообмінні колонії. Наступні стадії аналогічні виробництву висококонцентрованого препарату, за винятком стадії одержання монохлоргідрату лізину. Розчин монохлоргідрату лізину після додаткового вакуум-випарювання при 60 °С охолоджують до 12—14 °С, утворені кристали фільтрують під тиском азоту на нутч-фільтрі. Якщо кристали пігментовані, то їх із нутч-фільтра спрямовують у кристалізатор, де при 70 °С розчиняють у 3—4 об'ємах деіонізованої води, охолоджують, очищають на сорбенті і повертають на стадію вакуум-випарювання. До очищеного концентрату лізину додають 3—4 об'єми етанолу і здійснюють кристалізацію з водно-спиртового розчину. Кристали відфільтровують, промивають чистим етанолом і висушують при 60 °С під вакуумом. У такому препараті вміст лізину становить 97—98 %.

6.2. БІОТЕХНОЛОГІЯ ФЕРМЕНТНИХ ПРЕПАРАТІВ

До сьогодні описано понад 3000 ферментів, проте лише кілька з них одержують у промисловості. Перший патент на грибну амілазу був зареєстрований І.Такаміне у 1894 р.

Амілази використовують у хлібопекарській і текстильній промисловості, пептидази — у м'ясо-молочній і шкіряній промисловості; поліферментні препарати (глюкоаваморин, пектоаваморин тощо) — у сільському господарстві. Багато які ферменти є компонентами мийних засобів.

Як лікарські засоби використовуються гідролази: гіалуронідаза (може бути мікробного і тваринного походження, наприклад лідаза), протеази, ліпази, амілази; з інших класів — *L*-аспарагіназа, стрептаза (препарат стрептодеказа), стрептокіназа тощо.

Рестрикційні ендонуклеази — найважливіший «інструмент» для виконання генно-інженерних робіт.

У мікроорганізмів виявлено понад 1500 різних ферментів, причому в кожній клітині міститься в середньому 100 тис. молекул ферментів. За останні 40 років майже всі нові ферментні препарати одержано за допомогою мікроорганізмів. Така «монополія» ферментів мікробного походження зумовлена високою швидкістю росту мікроорганізмів-продуцентів на доступних і відносно дешевих поживних середовищах, а також можливістю модифікації ферментів методами генетичної інженерії.

Ферменти і ферментні системи можуть функціонувати *in vitro*, проте їх джерелом є живі організми, з певною генетичною програмою, тому фізіологічно-біохімічні властивості продуцента визначають і характеристику біокатализатора. Так, бактерії-термофіли синтезують термостабільні ферменти, які значно ефективніші при підвищених температурах, ніж відповідні ферменти психрофілів.

За даними 1990 р. на світовому ринку комерційний оборот від реалізації технічних ферментних препаратів становив 800 млн доларів. 80 % усіх ферментів технічного призначення використовувались у таких трьох галузях,

як гідроліз крохмалю — 40 %, виробництво детергентів — 30, виробництво сирів — 10 %. На сьогодні товарообіг промислово одержуваних ферментів становить понад 1 млрд доларів на рік.

Як показує аналіз реалізації ферментів за останні 10 років, виробництво ферментів мікробного походження має тенденцію до зростання — в середньому 5—7 % на рік (деякі експерти називають цифри 10—15 %).

6.2.1. Особливості культивування мікроорганізмів — продуцентів ферментів

Найбільшу кількість продуцентів ферментів виявлено серед мікроміцетів, проте й бактерії здатні синтезувати промислово важливі ферменти. Більшість ферментів є екзогенними (містяться в культуральній рідині), хоча ряд ферментів виділяють із біомаси (ендогенні ферменти).

Серед виділених із різних джерел штамів є активні продуценти ферментів, проте найвисокопродуктивніші штами одержано за допомогою фізичного та хімічного мутагенезу. Зазвичай активні штами, ізольовані з природних джерел, піддають дії мутагену кілька разів, тобто здійснюють ступінчасту селекцію. Часто ефективним виявляється комбінована дія фізичних і хімічних мутагенів. Так, використання етиленіміну та УФ опромінення дало змогу одержати надзвичайно активні штами *Aspergillus awamori* — продуценти амілолітичного та протеолітичного ферментних комплексів.

Велике значення у виробництві ферментів мікробного походження має зберігання продуцентів. Як правило, уникають частих пересівів, оскільки при цьому суттєво знижується продуктивність штамів. Тому штами-продуценти ферментів зберігають на агаризованому середовищі під шаром вазелінової олії, а найкращим способом зберігання є ліофілізація культур.

Більшість ферментів, які синтезуються мікроорганізмами, є індукцибельними, тобто для їх синтезу необхідна наявність у поживному середовищі відповідного індуктора. Цікаво, що не завжди індуктором є субстрат, на який діє фермент. Так, якщо для утворення ліпази *Aspergillus niger* індуктором є олія, рибонуклеази — нуклеїнові кислоти, то для підвищеного синтезу α -амілази бактеріями *Bacillus polymyxa* недостатньо наявності в середовищі розчинного крохмалю; необхідно вносити також і гідролізат казеїну.

У разі промислового одержання ферментів як індуктори використовують різні відходи: для синтезу пектолітичних ферментів — буряковий жом, целюлозолітичних — солому, висівки. Проте ці індуктори водонерозчинні, що суттєво ускладнює технологію. Тому як індуктори використовують екстракти таких нерозчинних субстратів. Альтернативою є також використання як індукторів синтезу ферментів прогідролізованої біомаси інших мікроорганізмів. Так, біосинтез пектолітичних ферментів грибами було підвищено у 2,5 рази з уведенням у середовище екстракту біомаси самого продуцента. При цьому кількість екстракту бурякового жому була знижена на 9 %.

Одержують ферменти глибинним (найчастіше) та поверхневим культивуванням продуцента. У назві ферменту це відображають великими літерами Г і П відповідно (наприклад, амілосубтилін Г3х). Цифра у назві ферменту означає ступінь очищення (3х — неочищений, 10х та 20х — високоочищені).

Сама назва ферменту складається з природи ферменту (перша частина назви — аміло-) та видової назви продуцента (друга частина назви — субтилін — продуцент *Bacillus subtilis*).

6.2.2. Виділення та стабілізація ферментів

Вибір методу виділення та очищення ферментів залежить від їх локалізації (в клітинах чи культуральній рідині), а також від області застосування. Неочищені ферментні препарати одержують висушуванням і наступним розмелюванням грибного міцелію разом з твердим субстратом (висівками, жомом) або висушуванням продуцента разом з культуральною рідиною на розпилювальній сушарці. Висушені ферментні препарати розмелюють на порошок і в такому вигляді використовують. Питома ферментативна активність таких препаратів невелика, але вони дешевші і достатньо стабільні під час зберігання. Так одержують амілази, протеази, целюлази для сільського господарства і деяких галузей промисловості.

Сиропи одержують згущенням культуральної рідини, звільненої від біомаси продуцента. Не всі способи концентрування, використовувані в лабораторній практиці, придатні для промислового виробництва. Найширше використовуються такі методи: без зміни фаз (мембранні); із зміною фаз (виморожування, випарювання). Концентрування за допомогою мембран базується на тому, що склад рідини можна змінювати пропусканням її через мембрану з селективною проникністю.

Для концентрування термолабільних рідин використовується прийом, який базується на вибірковій кристалізації води в розчині при 0 °C: вода перетворюється на кристали льоду, при цьому збільшується концентрація розчинених речовин. Кристали льоду відділяються центрифугуванням або пресуванням. Така операція повторюється багаторазово до досягнення необхідної концентрації ферменту.

У процесі випарювання відбувається розділення розчину на дві частини: воду, що видаляється у вигляді пари, та збагачений розчинними речовинами концентрат. У ферментній промисловості найчастіше здійснюють випарювання під вакуумом.

Ферментні препарати висушують у вакуумі у процесі розпилювання або з замороженого стану. Після висушування препарат стабілізують додаванням до нього стабілізаторів або наповнювачів: крохмалю, декстринів, неорганічних нейтральних сполук, тальку і т.ін. У деяких випадках для стабілізації ферментів додають у культуральну рідину хелатуючі агенти.

У промисловості високий ступінь очищення ферментів не завжди потрібен. Таке очищення повинно бути у разі використання ферментів як терапевтичних препаратів. Для використання таких ферментів застосовують метод мікрокапсулювання. Крім того, широко використовують іммобілізовані ферменти.

Для очищення і розділення комплексних ферментних препаратів використовують іонообмінні смоли. Таким методом вдається розділити ферменти пектолітичного комплексу грибів, очистити та виділити пектинестерази, полігалактуронази та пектинтрансєлімінази.

Загальну схему виділення та очищення ендо- та екзогенних ферментних препаратів наведено на рис. 6.1 і 6.2.

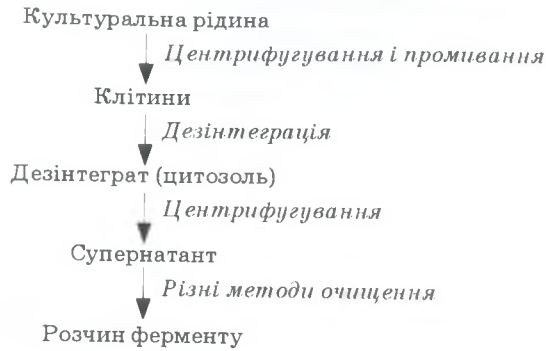


Рис. 6.1. Схема одержання мікробних ендоферментів

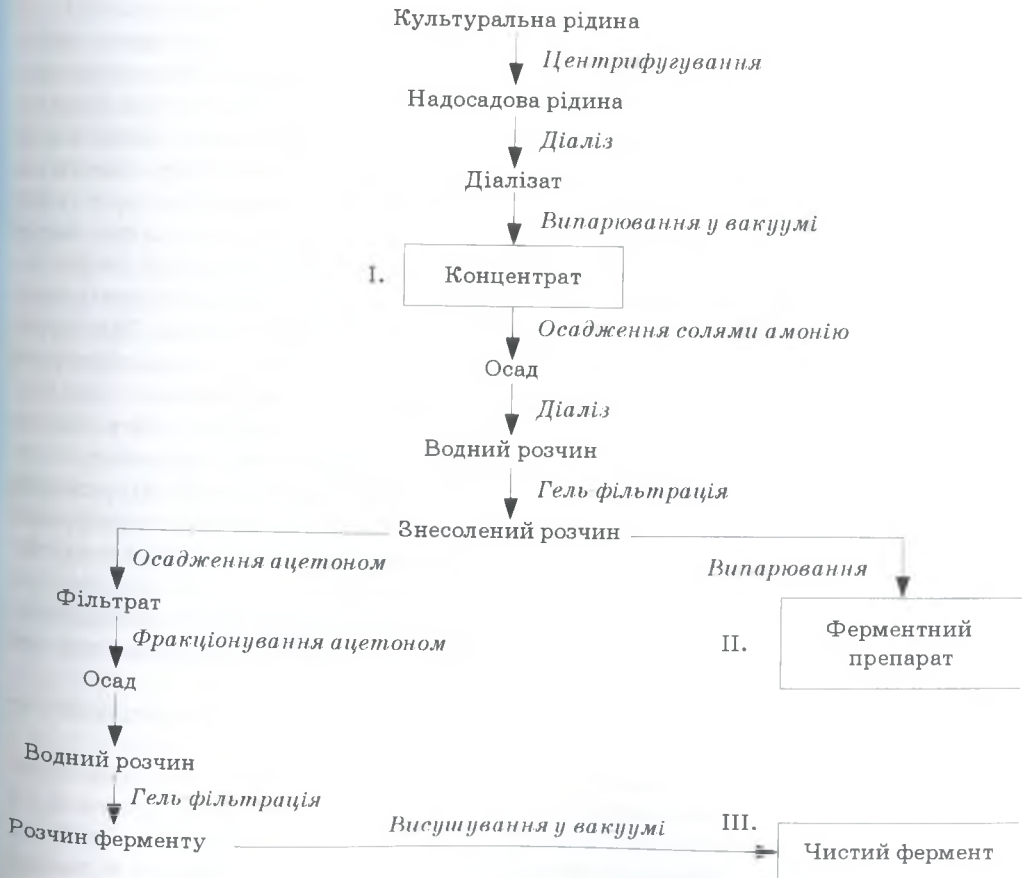


Рис. 6.2. Загальна схема одержання екзоферментів

Дезінтеграцію клітин можна здійснювати різними способами: механічним, біохімічним (обробка відповідними ферментами-гідролазами) тощо. Супернатант піддають обробці з метою звільнення від нуклеїнових кислот (дія нуклеазами, високомолекулярними катіонами-поліетиленімінами тощо), від інших білків (хроматографічні методи).

Важливим і перспективним способом реалізації каталітичних функцій біокатализаторів є їх *імобілізація*, що забезпечує багатократне використання ферменту, пролонгацію його дії, стабільність, можливість застосування в безперервних біотехнологічних процесах, виключення потрапляння ферменту в цільовий продукт.

6.2.3. Імобілізовані ферменти

Імобілізованими називаються ферменти, штучно зв'язані з нерозчинним носієм, здатні зберігати свої каталітичні властивості.

У 1971 р. на першій конференції з інженерної ензимології було узаконено термін «*імобілізовані ферменти*». Проте у поняття «*імобілізація*» у наш час вкладають ширший зміст, ніж зв'язування на нерозчинному носії, а саме: повне або часткове обмеження свободи руху білкових молекул.

Імобілізовані ферменти мають ряд переваг порівняно з вільними молекулами. Насамперед такі ферменти як гетерогенніші каталізатори легко відділяються від реакційного середовища, можуть використовуватися багаторазово й забезпечують безперервність каталітичного процесу. Крім того, імобілізація може забезпечувати зміну властивостей ферменту, таких як субстратна специфічність, стійкість, залежність активності від зовнішніх факторів. Імобілізовані ферменти довговічніші у тисячі та десятки тисяч разів та стабільніші, ніж вільні ензими. Так, при температурі 65 °C термоін-активація лактатдегідрогенази, імобілізованої у 60 % поліакриламідному гелі, повільніша у 3600 разів порівнянно з нативним ферментом. Такі переваги забезпечують високу економічність, ефективність і конкурентоспроможність технологій з використанням імобілізованих ферментів.

6.2.3.1. Носії для імобілізації ферментів. Матеріалам для імобілізації ферментів повинні бути притаманні такі властивості: нерозчинність; висока хімічна й біологічна стійкість; гідрофільність; достатня проникність як для ферментів, так і для коферментів, субстратів і продуктів реакції; здатність носія легко активуватися (переходити в реакційноздатну форму).

Жоден із використовуваних у наш час матеріал-носій не відповідає повністю наведеним вимогам. Проте існує широкий набір носіїв, придатних для імобілізації певних ензимів за конкретних умов.

Залежно від природи носії поділяються на органічні й неорганічні матеріали.

Органічні полімерні носії. Існуючі органічні полімерні носії можна поділити на два класи: природні й синтетичні. У свою чергу кожен клас органічних полімерних носіїв поділяється на групи залежно від їхньої будови. Серед природних полімерів виділяють білкові, полісахаридні й ліпідні носії, а серед синтетичних — поліметиленові, поліамідні й поліефірні.

До переваг природних носіїв варто віднести їхню доступність, поліфункціональність і гідрофільність, а до недоліків — біодеградабельність і достатньо високу вартість.

Із полісахаридів для іммобілізації найчастіше використовують целюлозу, декстран, агарозу та їхні похідні. Для посилення хімічної стійкості лінійні ланцюги целюлози й декстрану поперечно зшивають епіхлоргідрином. В отримані сітчасті структури легко вводяться різні іоногенні групи.

Із природних аміносахаридів як носії для іммобілізації використовують хітин, що у значних кількостях накопичується у вигляді відходів у процесі промислової переробки крабів і креветок. Хітин хімічно стійкий і має добре виражену пористу структуру.

Серед білків практичне застосування як носії знайшли структурні протеїни, такі як кератин, фіброїн, колаген і продукт переробки колагену — желатина. Ці білки дуже поширені в природі, тому доступні в значних кількостях, дешеві й мають велику кількість функціональних груп для зв'язування ферменту. Білки здатні до біодеградації, що дуже важливо для конструювання іммобілізованих ферментів медичного призначення. До недоліків білків як носіїв у цьому разі варто віднести їх високу імуногенність.

Синтетичні полімерні носії. Завдяки різноманітності й доступності матеріали цієї групи широко використовуються як носії для іммобілізації. До них належать полімери на основі стиролу, акрилової кислоти, полівінілового спирту; поліамідні й поліуретанові полімери. Більшість синтетичних полімерних носіїв характеризуються високою механічною міцністю, можливістю варіювання пористості, а також здатністю до модифікації введенням різних функціональних груп. Деякі синтетичні полімери можуть бути виготовлені у різних формах (трубки, волокна, гранули).

Носії неорганічної природи. Як такі носії найчастіше використовують матеріали зі скла, глини, кераміки, графітової сажі, силікагелю, а також сілохромі, оксиди металів. Їх можна піддавати хімічній модифікації, наприклад покривати плівкою оксидів алюмінію, титану, гафнію, цирконію або обробляти органічними полімерами. Основна перевага неорганічних носіїв — легкість регенерації. Подібно до синтетичних полімерів, неорганічним носіям можна надати будь-якої форми й одержувати їх з будь-яким ступенем пористості. На сьогодні існує величезна кількість різноманітних носіїв для іммобілізації ферментів. Проте для кожного індивідуального ферменту, використовуваного в певному технологічному процесі, необхідно підбирати оптимальні варіанти як носія, так умов і методів іммобілізації.

6.2.3.2. Методи іммобілізації ферментів. Існують два принципово різних методи іммобілізації ферментів:

- без виникнення ковалентних зв'язків між ферментом і носієм (фізичні методи іммобілізації);

- з утворенням ковалентного зв'язку між ними (хімічні методи іммобілізації).

Кожен із цих методів реалізується різними способами.

Фізичні методи іммобілізації ферментів. Здійснюються вони адсорбцією ферменту на нерозчинному носії включенням ензимів у пори поперечношитоного гелю у напівпроникні структури або двофазні системи.

Адсорбція ферментів на нерозчинних носіях. За адсорбційної іммобілізації білкова молекула втримується на поверхні носія за рахунок електростатичних, гідрофобних, дисперсійних взаємодій і водневих зв'язків. Адсорбція була першим методом іммобілізації ферментів (Дж. Нельсон, Е. Гріффіт, 1916), проте нині не втратила свого значення й стала найпоширенішим способом одержання іммобілізованих ферментів у промисловості. У літературі описано одержання адсорбційним способом понад 70 іммобілізованих ферментів з використанням головним чином таких носіїв, як кремнезем, активоване вугілля, графітова сажа, різні глини, пористе скло, полісахариди, синтетичні полімери, оксиди алюмінію, титану й інших металів. Останні застосовуються найчастіше. Ефективність адсорбції молекули білка на носії визначається питомою поверхнею (щільністю центрів сорбції) і пористістю носія.

Процес адсорбції ферментів на нерозчинних носіях відрізняється простою й забезпечується під час контакту водного розчину ферменту з носієм (статичним способом, з перемішуванням, динамічним способом з використанням колонок). З цієї метою розчин ферменту змішують із носієм, наприклад свіжим осадом гідроксиду титану, і висушують у м'яких умовах. Активність ферменту за такого варіанта іммобілізації зберігається практично на 100 %, а питома концентрація білка досягає 64 мг на 1 мл носія.

До недоліків адсорбційного методу варто віднести невисоку міцність зв'язування ферменту з носієм. За зміни умов іммобілізації може відбуватися десорбція ферменту, його втрата й забруднення продуктів реакції. Істотно підвищити міцність зв'язування ферменту з носієм може попередня його модифікація (обробка іонами металів, поліфункціональними агентами — полімерами, білками, гідрофобними сполуками, моношаром ліпідів тощо). Іноді, навпаки, модифікації піддається молекула вихідного ферменту, проте найчастіше це супроводжується зниженням його активності.

Іммобілізація ферментів включенням у гелі. Спосіб іммобілізації ферментів включенням у тривимірну структуру полімерного гелю дуже поширений завдяки своїй простоті й унікальності. Метод застосовується для іммобілізації не тільки індивідуальних ферментів, а й мультиензимних комплексів і навіть інтактних клітин. Іммобілізацію ферментів у гелі здійснюють двома способами:

- фермент уводять у водний розчин мономеру, а потім полімеризують. В результаті чого виникає просторова структура полімерного гелю із включеними всередину молекулами ферменту;

- фермент вносять у розчин уже готового полімеру, який потім переводять у гелеподібний стан.

Іммобілізація ферментів у гелях забезпечує рівномірний розподіл ензиму в об'ємі носія. Більшість гелевих матриць має високу механічну, хімічну, теплову й біологічну стійкість і забезпечує можливість багаторазового використання ферменту, включеного в його структуру. Проте такий метод непридатний для іммобілізації ферментів, що діють на водонерозчинні субстрати.

Іммобілізація ферментів у напівпроникні структури. Сутність цього способу іммобілізації полягає у відділенні водного розчину ферменту від водного розчину субстрату за допомогою напівпроникної мембрани, що пропускає

кає низькомолекулярні молекули субстратів і кофакторів, але затримує більші молекули ферменту. Розроблено кілька модифікацій цього методу, з яких найчастіше застосовують мікрокапсулювання й включення ферментів у ліпосоми.

Перший спосіб запропонований Т. Чангом у 1964 р. і полягає в тому, що водний розчин ферменту включається всередину замкнутої мікрокапсули, стінки якої утворені напівпроникним полімером. Один із механізмів виникнення мембрани на поверхні водних мікрокапсул ферменту полягає в реакції міжфазної поліконденсації двох сполук, одна з яких розчинена у водній, а інша — в органічній фазі.

Розмір одержуваних капсул становить десятки або сотні мікрометрів, а товщина мембрани — соті частки мікрометра.

Переваги методу мікрокапсулювання такі: простота; універсальність; можливість багаторазового використання нативного ферменту; можливість іммобілізувати не тільки індивідуальні ферменти, а й мультиензимні комплекси, цілі клітини й окремі фрагменти клітин.

До недоліків методу варто віднести неможливість інкапсульованих ферментів здійснювати перетворення високомолекулярних субстратів.

Близьким до інкапсулювання методом іммобілізації можна вважати включення водних розчинів ферментів у ліпосоми, що являють собою сферичні або ламелярні системи подвійних ліпідних бішарів. Уперше даний спосіб для іммобілізації ферментів був застосований у 1970 р. Дж. Вайсманом і Дж. Сессом.

Етапи одержання ліпосом:

- із розчинів ліпиду (найчастіше лецитину) випаровують органічний розчинник;

- тонку плівку ліпідів, що залишилася, диспергують у водному розчині ферменту;

- у процесі диспергування відбувається самозбирання бішарових ліпідних структур ліпосом, що містить розчин ферменту.

Ферменти, іммобілізовані включенням у структуру ліпосом, використовують переважно в медичних і наукових цілях, оскільки значна частина ферментів у клітині локалізована у ліпідному матриксі біологічних мембран, тому вивчення ліпосом має велике значення для розуміння закономірностей процесів життєдіяльності в клітині.

Інші прийоми іммобілізації ферментів, засновані на фізичних методах, менш поширені.

Хімічні методи іммобілізації ферментів. Іммобілізація ферментів утворенням нових ковалентних зв'язків між ферментом і носієм — найуживаніший спосіб одержання промислових біокатализаторів.

На відміну від фізичних методів цей спосіб іммобілізації забезпечує міцне й незворотне зв'язування ферменту з носієм, що часто супроводжується стабілізацією молекули ензиму. Проте розташування ферменту щодо носія на відстані одного ковалентного зв'язку створює певні труднощі в здійсненні каталітичної реакції. Фермент відокремлюють від носія за допомогою вставки (зшивка, спейсер), у ролі якої найчастіше виступають біфункціональні й поліфункціональні агенти (бромціан, гідразин, сульфурилхлорид,

глутаровий діальдегід та ін.). У цьому разі структура іммобілізованого ферменту включає носій, вставку й фермент, з'єднані між собою ковалентними зв'язками.

Принципово важливо, щоб в іммобілізації ферменту брали участь функціональні групи, не потрібні для його каталітичної функції. Так, глікопротеїни зазвичай приєднують до носія через вуглеводну, а не через білкову частину молекули ферменту.

Кількість методичних прийомів, розроблених для здійснення ковалентної іммобілізації ферментів, надзвичайно велика. Всі методи хімічної іммобілізації класифікують залежно від природи реакційної групи носія, що вступає у взаємодію з молекулою ферменту. Далі наведено приклади, що ілюструють деякі способи хімічної іммобілізації ферментів.

Іммобілізація ферментів на носіях з гідроксигрупами. Найпоширенішим методом утворення ковалентного зв'язку між ферментом і полісахаридним носієм є бромціановий метод, запропонований у 1967 р. Р. Аксеном, Дж. Поратом і С. Ернбаком. Під час обробки носія бромціаном виникають реакційноздатні ціанати й імідокарбонати, які при взаємодії з нуклеофільними аміногрупами ферменту утворюють похідні ізосечовини й уретанів.

Іммобілізація ферментів на носіях з аміногрупами. Первинні аміногрупи носія, пов'язані з ароматичним кільцем, попередньо перетворюють на солі діазонію, які потім піддають різноманітним реакціям. У такі реакції вступають фенольні, імідазольні, амінні, гуанідинові, тіольні групи білків. Так, у лужному середовищі фенольні радикали тирозину утворюють міцні азосполуки, у складі яких білок зв'язаний з носіями.

Важливо, що *n*-амінофенільні функції можуть бути легко введені в різноманітні носії.

Іммобілізація на носіях з активованими похідними карбоксильної групи. Найчастіше для з'єднання аміногруп білка з ацильними групами носія використовують ангідриди, галогенангідриди, активовані ефіри й інші похідні карбонових кислот. Реакційна здатність похідних карбонових кислот у реакціях приєднання аміногруп ферменту зменшується від галогенангідридів до ефірів.

Іммобілізація на носіях з сульфгідрильними групами. Сульфгідрильні групи носія й ферменту легко окиснюються з утворенням дисульфідних зв'язків під дією кисню повітря.

Іммобілізація хімічним приєднанням біокаталізатора до носія відрізняється високою ефективністю й міцністю зв'язку. Незважаючи на це, методи ковалентної іммобілізації ферментів усе ще малодоступні для промислового використання через складність й високу вартість. Проте вони залишаються незамінними інструментами для проведення наукових і лабораторних досліджень зі створення ензимів із заданими властивостями.

6.2.3.3. Промислові процеси з використанням іммобілізованих ферментів. Поеднання унікальних каталітичних властивостей ензимів з перевагами іммобілізованих ферментів як гетерогенних каталізаторів дало змогу створити нові промислові технологічні процеси. Слід зазначити, що всі вони належать до виробництва харчових продуктів і лікарських препаратів.

Нині у світі розроблено такі великотоннажні виробництва з використанням іммобілізованих ферментів і клітин:

- одержання глюкозофруктозних сиропів;
- одержання оптично активних *L*-амінокислот із їх рацемічних сумішей;
- синтез *L*-аспарагінової кислоти з фумарату амонію;
- синтез *L*-аланіну з *L*-аспарагінової кислоти;
- синтез *L*-яблучної кислоти з фумарової кислоти;
- одержання безлактозного молока;
- одержання цукрів з молочної сироватки;
- одержання 6-амінопеніциланової кислоти.

6.2.3.4. Біосенсиори на основі іммобілізованих ферментів. Висока ефективність біологічних каталізаторів і специфічність їхньої дії дає змогу розглядати ферменти як ідеальні реагенти для аналітичної хімії. Завдяки таким властивостям ферментів вони можуть бути використані для виявлення різних речовин у надзвичайно низьких концентраціях. Нині створено штучні аналітичні системи різних конструкцій (біосенсиори, датчики, ферментні електроди, проточні аналізатори), що містять іммобілізовані ферменти й клітини і призначені для автоматичного детектування продуктів ензиматичних реакцій. Наприклад, використання іммобілізованої глюкозооксидази дає змогу визначати концентрацію глюкози за кількістю іонів водню, виділеного під час окиснення глюкози.

Залежно від концентрації аналізованих речовин вибирають той або інший спосіб їх детекції. Так, кількісний вміст пероксиду водню, ммоль/л, можна визначити одним із таких методів:

Полярографічний	0,1
Колориметричний	$0,1 \cdot 10^{-3}$
Люмінесцентний	$0,1 \cdot 10^{-6}$

Нині розробляються біодатчики нового покоління, принцип дії яких базується на афінних взаємодіях за типом фермент-інгібітор, антитіло-антиген, агоніст(антагоніст)-клітинний рецептор, а також на основі напівпровідникових структур і мезоелектричного ефекту. Останні два типи біодатчиків дають можливість створювати сенсиори, чутливі до газів, що має істотне значення для створення роботів, які реагують на зміни зовнішніх факторів.

Технологічні варіанти реакторів з іммобілізованими ферментами досить різноманітні — колони, трубки, порожнисті волокна та ін. З їхньою допомогою на практиці визначають концентрацію широкого спектра сполук — глюкози, амінокислот, сечовини, пеніциліну, АТФ, НАДН, ФМН, стероїдів, тригліцеридів, жовчних кислот і багатьох інших (J. Aylott, R. Kopelman, 2000). Так, американськими дослідниками сконструйовано мікродатчик на основі глюкозооксидази й рутенієвого барвника, іммобілізованих у поліакриламідній матриці з використанням субмікронних оптичних волокон. Мікробіосенсор може бути введений у клітину і навіть в окремі її органели для вимірювання вмісту в них глюкози й кисню. Запропоновано датчики для проведення експрес-аналізу похідних діоксину (Nomura et al., 2000), а також оцінювання вмісту біогенних амінів (з допомогою моноамінооксидази)

у харчових продуктах методом імунодетекції. Для визначення сечовини ферментним електродом потрібно лише 30 с.

Біосенсиори на основі іммобілізованих ферментів допомагають виконувати десятки швидких і точних аналізів під час діагностики захворювань, контролювати вміст шкідливих речовин (інсектицидів, пестицидів, добрив) у харчових продуктах і в повітрі. Біосенсиори застосовуються у вирішенні аналітичних завдань у хімічній і мікробіологічній промисловості, а також у наукових дослідженнях.

6.3. ВИРОБНИЦТВО ОРГАНІЧНИХ КИСЛОТ

Тепер біотехнологічним способом у промислових масштабах одержують ряд органічних кислот. Причому лимонну, глюконову, кетоглюконову та ітаконнову кислоти одержують тільки мікробіологічним синтезом, молочну, саліцилову і оцтову — як хімічним, так і мікробіологічним способом, а яблучну — хімічним і ензиматичним.

6.3.1. Оцтова кислота

На сучасних підприємствах найчастіше виробляють оцет *циркуляційним способом Фрінгса* з використанням апаратів, наповнених стружкою. На деяких підприємствах робоча камера, заповнена стружкою, досягає об'єму 60 м³. На стружці іммобілізуються оцтовокислі бактерії, стружка через спеціальну розподільну систему зрошується поживним розчином, що містить спирт, оцтову кислоту та мінеральні солі.

З допомогою насоса розчин багаторазово циркулює через апарат до повного окиснення спирту і утворення 9%-го розчину оцтової кислоти. Близько 10 % спирту у цьому процесі втрачається. Цикл триває 5–6 діб, після чого знову повторюється.

У процесі одержання оцту циркуляційним способом питома продуктивність досягає 6–8 кг кислоти за добу з 1 м³ робочої місткості апарата. На початку 60-х років XX ст. оцтовокислі бактерії почали культивувати у ферментерах за методом періодичного глибинного культивування.

Процес одержання оцту періодичним глибинним способом такий:

- від попереднього циклу в апараті залишається рідина (близько 1/3 робочого об'єму апарату), яка є посівним матеріалом для наступного циклу;
- в апарат заливається (до робочого об'єму) поживний розчин, що містить оцтову кислоту й спирт. Перемішувальний пристрій інтенсивно перемішує суміш, а через аератор безперервно подається повітря;
- деякий час в апарат порціями додають розчин спирту;
- після того як концентрація оцту досягне 9–10 %, близько 2/3 об'єму рідини відбирається як готовий продукт, і цикл повторюється.

Продуктивність апаратів для глибинного культивування у кілька разів вища, ніж апаратів, заповнених стружкою. Крім того, у таких апаратах значно нижчі втрати етанолу і немає потреби у використанні стружки.

6.3.2. Молочна кислота

Сировиною для виробництва молочної кислоти є товарний цукор, картопляний і кукурудзяний крохмаль, меляса, рафінадна та кукурудзяна крохмальна патока, молочна сироватка, зернові культури, гідролізати деревини, сульфітні луги.

Підготовка поживного середовища з меляси та цукрової патоки полягає в освітленні цих субстратів і розведенні водою до 10—12% -ї концентрації з наступною інверсією з допомогою сірчаної або хлористоводневої кислоти. У середовище вводять необхідні для живлення бактерій сполуки фосфору у вигляді суперфосфату або інші поживні речовини у вигляді водного екстракту солодових паростків. Після нейтралізації до рН 6,5 та введення 2 % крейди (до маси цукру) середовище стерилізують, а потім піддають зброджуванню гомоферментативними молочнокислими бактеріями.

За використання крохмаловмісної сировини здійснюють оцукрювання крохмалю кислотою, ферментами солоду або пліснявих грибів. Як джерело азотного живлення в середовище вводять борошно з насіння бобових рослин (горох, квасоля, соя та ін.) або водний екстракт із солодових паростків.

Готове оцукрене середовище передають на ферментацію. Під час ферментації до поживного середовища кілька разів на добу (3—4 рази) додають крейду (для підтримання стабільного рівня рН у межах 6,3—6,5).

Молочнокисле бродіння здійснюють при температурі 49—50 °С. Зниження температури до 46—48 °С спричиняє різке послаблення біохімічної активності культури та сприяє розвитку сторонньої мікрофлори. Підвищення температури до 53—55 °С також спричиняє інактивацію культури та уповільнення бродіння. Позитивно впливають на молочнокисле бродіння біологічно-активні речовини. З цією метою до поживного середовища додають екстракт солодових паростків. За нормального бродіння за добу бактеріями зброджується близько 1—1,5 % цукрів, а весь процес закінчується за 7—11 діб.

Значну роль у технології виробництва молочної кислоти відіграють обробка збродженого розчину та фільтрування. Для відокремлення крейди та колоїдів зброджений розчин нагрівають до 80—90 °С, а потім змішують із хлорним вапном до слабколужної реакції. Суміш витримують упродовж 3—5 год для відстоювання.

Для вилучення твердих часток шар із відстоїним розчином лактату кальцію декантують.

Лактат кальцію розщеплюють до молочної кислоти після його центрифугування. Для запобігання обвуглюванню лактату сірчаною кислотою цю процедуру здійснюють при температурі 60—70 °С.

Для відокремлення іонів заліза отриману вологу молочну кислоту при температурі 60—70 °С оброблюють жовтою кров'яною сіллю. При цьому в осад випадає берлінська синь.

Молочна кислота знебарвлюється методом адсорбції з допомогою активованого вугілля. Упарювання продукту відбувається на вакуум-апаратах за тиску 10—15 кПа та надлишкового тиску пари 0,2 МПа.

Схема мікробіологічного виробництва молочної кислоти така:

- розмноження чистої культури молочнокислих бактерій;
- молочнокисле бродіння при 45—50 °С;
- оброблення зброженого розчину хлорним вапном (80—90 °С);
- фільтрування;
- кристалізація лактату кальцію;
- гідроліз лактату кальцію сульфатною кислотою;
- оброблення вологої молочної кислоти жовтою кров'яною сіллю та активованим вугіллям;
- фільтрування;
- I ступінь випарювання молочної кислоти до 50% -ї концентрації;
- фільтрування;
- II ступінь випарювання молочної кислоти до 80% -ї концентрації;
- фільтрування;
- розлив.

6.3.3. Лимонна кислота

Виробництво лимонної кислоти за участю грибів — давній біотехнологічний процес. Воно було налагоджено у 1893 р. Лимонна кислота використовується в харчовій, фармацевтичній, косметичній промисловості.

Відомі два способи ферментації *Aspergillus niger* — поверхневий і глибинний. Перший здійснюють на підприємствах малої та середньої потужності на рідкому середовищі і методом твердофазної ферментації на щільному середовищі (наприклад в Японії).

Культивування на поверхні щільного середовища. Цей спосіб, як правило, здійснюється за тріступеневою схемою. На першій стадії гриб *A. niger* вирощують на поверхні скошеного сусло-агару (або іншого середовища) в пробірках, на наступних стадіях його розмножують на рідкому середовищі в колбах Ерленмейера або на щільному — в алюмінієвих кюветах для отримання конідій, які збирають аспіраційним способом, підсушують у термокамері при 28—30 °С і змішують із активованим вугіллям. Цей посівний матеріал надалі використовують для засівання зернового субстрату (риса, пшениці та ін.) у металевих кюветах.

Під час ферментації рН субстрату знижується до 1,8—2,0. Після закінчення процесу лимонна кислота разом із невеликою кількістю одночасно синтезованих глюконової та щавлевої кислот екстрагується водою, а потім осаджується у вигляді солі кальцію.

Поверхнєве культивування на рідкому середовищі. Цей спосіб реалізується в неглибоких кюветах із алюмінію площею 8,5—12 дм² з висотою бортиків від 7 до 20 см. Кювети розміщують на стелажах у термостатованих «бродильних камерах» (по 8—10 штук на стелаж). Ці кювети мають зливний штуцер. «Бродильні камери» обладнані вентиляцією. Температура в камерах підтримується на рівні (35±1) °С, висота поживного середовища з м'ясою — 6—12 см. Вміст вуглеводів у середовищі становить близько 12 %. Під час ферментації рН середовища поступово знижується з 6,8—7,0 до 4,5 упродовж перших трьох діб і до 3,0 — до кінця процесу (8—9 доба). Макси-

мальне кислотоутворення відбувається на 5—6 добу, а максимальна інтенсивність росту міцелію спостерігається на 4 добу, що супроводжується активним тепловиділенням та утворенням діоксиду вуглецю.

Із трьох варіантів технологічного процесу (періодичний, змінний і доливний) найкращим є доливний, за якого на 6—7 добу при концентрації цукру в середовищі на рівні 3—4 % під плівку доливають стерильний свіжий розчин меляси (без поживних солей) у кількості 30—35 % від початкового об'єму. У результаті цього тривалість ферментації збільшується з 8—9 до 12 діб. У кінці ферментації культуральну рідину зливають з-під плівки, плівку промивають стерильною водою і під неї заливають свіже поживне середовище з мелясою (без солей). Ферментація триває ще 4—6 діб.

Глибинне культивування. Такий спосіб виробництва лимонної кислоти має ряд суттєвих переваг: він ефективніший, легко піддається механізації та автоматизації.

Штами *A. niger*, які використовують для поверхневого культивування, непридатні для глибинного культивування. Найактивнішим у нашій країні вважається мутантний штам *A. niger* № 288/9.

Глибинним способом лимонну кислоту одержують двома стадіями:

— поетапне вирощування інокуляту в інокуляторі та посівному апараті за безперервного перемішування упродовж 20—36 год при температурі $(31 \pm 1)^\circ\text{C}$. Вміст посівного апарата становить приблизно $1/10$ місткості ферментера;

— вирощування міцелію та накопичення лимонної кислоти в ферментері впродовж 5—10 діб на мінерально-мелясному середовищі, що містить 3—4 % цукрів. На цій стадії тричі доливають $(26 \pm 1)\%$ -й розчин меляси з метою доведення кінцевої концентрації цукру в середовищі до 12—15 %.

Меляса є джерелом вуглецю в середовищі, проте перед використанням її звільняють від іонів заліза, магнію та інших металів за допомогою жовтої кров'яної солі (фероціаніду калію). Перетворення меляси на кислоту завершується відділенням міцелію фільтрацією.

Культуральна рідина містить суміш органічних кислот — лимонної, щавлевої, глюконової, а також неутілізовані цукри у приблизному співвідношенні (45—50):3:1:7.

Виділення лимонної кислоти з культуральної рідини базується на її здатності утворювати малорозчинний цитрат кальцію під час нейтралізації розчином вапняного молока — $\text{Ca}(\text{OH})_2$ або крейдою — CaCO_3 за рН 6,8—7,0.

Цитрат кальцію разом з оксалатом кальцію випадає в осад, а глюконат кальцію залишається в розчині. Осад промивають гарячою водою. Промитий цитрат кальцію розкладають сірчаною кислотою, в результаті реакції отримують розчин лимонної кислоти та гіпс (сульфат кальцію), який випадає в осад. Розчин лимонної кислоти після відділення гіпсу спрямовують на двостадійне упарювання в вакуум-апаратах. На першій стадії розчин випарюють до густини 1,24—1,26, що відповідає концентрації лимонної кислоти близько 70 %. Розчин лимонної кислоти після першого випарювання обробляють активованим вугіллям.

У процесі випарювання розчину лимонної кислоти випадає сульфат кальцію, який не тільки забруднює розчини, а й відкладається на поверхні нагріву, знижуючи коефіцієнт її тепловіддачі.

Гіпс відділяється від розчину на фільтр-пресі, а фільтрований розчин для подальшого концентрування до густини 1,35—1,38 (69—71 мас. % безводної кислоти) надходить на друге упарювання під вакуумом. Потім розчин відфільтровують на контрольному фільтр-пресі і спрямовують на кристалізацію.

Останнім часом розроблена досить ефективна технологія очищення розчинів лимонної кислоти фільтрацією через іонітну установку. Застосування іонообмінного очищення розчинів лимонної кислоти має такі переваги:

- практично повністю видаляються мінеральні та частково органічні домішки;
- знижується зольність кристалічної лимонної кислоти в 10 разів;
- стабілізується якість готового продукту та підвищується випуск кислоти вищого ґатунку з 30 до 60 %;
- виключається використання фероціаніду калію для осадження важких металів;
- ліквідується механічне очищення поверхні випарних апаратів;
- підвищується температура початку кристалізації і тим самим підвищується вихід кристалів до 10—12%.

Завершальними операціями технологічного процесу є кристалізація, центрифугування і висушування лимонної кислоти. Ці стадії багато в чому визначають якість і вихід лимонної кислоти. Кристалізація відбувається за постійного перемішування та закінчується, коли температура кристалізованої маси знижується до температури охолодника (холодна вода або розсіл). Температурний режим кристалізації: охолодження від 70 до 37 °C проводять зі швидкістю 10 °C за 1 годину. При кінцевій температурі розчин витримують 30 хв для дозрівання кристалів.

У кристалізатори вводять затравку у вигляді дрібних кристалів лимонної кислоти розміром близько 0,25 мм у кількості 0,05 % (за масою розчину, що кристалізується). Сучасна технологія передбачає одноступеневу безперервну кристалізацію лимонної кислоти.

Отримані кристали після вібраційної сушарки фракціонуються. Кристали, розмір яких не відповідає стандарту, розчиняють і подають на випарювання. Такі нестандартні кристали можуть бути використані також як затравка для наступної кристалізації. Висушені кристали надходять у продаж як моногідрат лимонної кислоти.

6.3.4. Глюконова кислота

Для одержання глюконової кислоти використовують селекціоновані штами *Aspergillus niger*, які культивуються у ферментаторах за інтенсивної аерації і перемішування, при температурі 30 °C і рН середовища 6,0—7,0. Технологічний процес передбачає один із двох варіантів нейтралізації середовища крейдою або розчином їдкого натру. У першому варіанті поживне середовище повинно містити 10—15 % глюкози, оскільки глюконат кальцію обмежено розчиняється у воді при 30 °C (близько 40 г/л); у другому — утворюється глюконат натрію, який добре розчиняється у воді (до 400 г/л при 30 °C і 569 г/л — при 80 °C) і тому концентрацію глюкози у поживному середовищі можна підвищити до 35 %.

За варіантом з використанням крейди склад поживного середовища такий, %: глюкоза — 10—15, сульфат магнію — 0,016, дигідрофосфат калію — 0,02, гідрофосфат амонію — 0,04 і карбонат кальцію — 2,6. Замість глюкози можна використовувати гідролізований крохмаль.

Технологічний процес реалізують у періодичному або у безперервному режимі. Безперервний процес ефективніший за швидкістю і виходом цільового продукту (понад 95 % від використаної глюкози).

Оскільки селекціонований штам *A. niger* продукує тільки глюконову кислоту, для її виділення у вигляді натрієвої солі культуральну рідину просто фільтрують, упарюють і висушують. У разі одержання кислоти технічний глюконат натрію піддають перекристалізації і хімічно переводять у кислоту.

Апаратурне оформлення технологічного процесу одержання глюконової кислоти багато в чому нагадує виробництво лимонної кислоти глибинним методом.

Відокремлений міцелій гриба використовують для виділення ферменту глюкозооксидази, який використовується у харчовій і фармацевтичній промисловості. Глюконову кислоту та її солі використовують як лікарський препарат для прискорення згортання крові (глюконат кальцію призначають у разі гострих і хронічних кровотеч), для виготовлення мийних засобів (глюконат натрію), а також у фотографічних процесах, літографії, виготовленні фарб, для очищення металів тощо.

6.3.5. Ітаконова кислота

Ітаконова кислота синтезується пліснявими грибами роду *Aspergillus*, зокрема *A. itaconicus* і *A. terreus*. Промислове виробництво базується на використанні *A. terreus* (наприклад штам ЕУУ-417). Утворення ітаконової кислоти з вуглеводних джерел пов'язане з ЦТК, її попередником є *цис*-аконітова кислота.

Технологічний процес одержання ітаконової кислоти подібний до виробництва лимонної кислоти, оскільки ферментацію продуцента здійснюють поверхневим або глибинним способом.

Поверхнєве вирощування продуцента здійснюють у кюветах, глибинне — у ферментаторах, обладнаних мішалками і барботерами.

Ітаконова кислота у концентрації 7 % інгібує ріст продуцента, тому у процесі біосинтезу необхідна її нейтралізація. Для цього найчастіше використовують гідроксид амонію, з допомогою якого підтримують рН середовища на рівні 3,8, в результаті чого синтезується до 150—200 г/л цільового продукту. Активаторами біосинтезу ітаконової кислоти є катіони магнію, міді і цинку.

Джерелом вуглецю зазвичай є меляса, розбавлена водою до 8 % (за вмістом вуглеводів). У середовище також додають, г/л: магнію сульфат — 4,5, амонію нітрат — 2,5, цинку сульфат — 0,0044, кукурудзяний екстракт — 4 мл, жовту кров'яну сіль — 0,25. Таке середовище або подібні до нього інші варіанти середовищ використовують для поверхневого і глибинного (в останньому разі знижують концентрацію вуглеводів до 1—2 %) культивування продуцента. Оптимальний рівень рН середовища для біосинтезу ітаконової

кислоти становить 1,8—2,3. Тривалість культивування в кюветах зазвичай становить 10—12 днів при 35 °C; у разі глибинного культивування тривалість процесу скорочується до 2—3 діб з аерацією 1/8 об'ємів повітря на 1 хв на один об'єм середовища.

Вихід ітаконової кислоти за поверхневим культивуванням досягає 36—38 % у перерахунку на 100 г спожитої глюкози, за глибинним — 65 % і вище.

Після закінчення ферментації міцелій сепарують, промивають, віджимають і передають у збірник відходів; культуральну рідину освітлюють активованим вугіллем, упарюють приблизно до 1/10 первинного об'єму і передають на кристалізацію ітаконової кислоти. Кристали кислоти центрифугують, висушують і фасують. Додатково очищати кислоту можна перекристалізацією з 25 % -х водних розчинів.

Ітаконову кислоту використовують у хімічному синтезі високоякісних смол, волокон типу «нітрон», детергентів, лікарських речовин, барвників і інших органічних сполук.

З інших органічних кислот, синтезованих нижчими міцеліальними грибами (наприклад *Rhizopus nigricans*), привертає увагу біотехнологів фумарова кислота. Ця кислота здатна трансформуватися в малеїнову, яка широко використовується для хімічного синтезу деяких лікарських речовин, смол, лаків і фарб.

6.4. ВИРОБНИЦТВО ВІТАМІНІВ

6.4.1. Вітамін B₁₂

Ціанкобаламін, або вітамін B₁₂ одержують тільки мікробіологічним синтезом. Його продуцентами є прокаріоти і перш за все пропіоновокислі бактерії, які й у природних умовах утворюють цей вітамін. Мутанти *Propionibacterium shermanii* M-82 і *Pseudomonas denitrificans* M-2436 продукують на рідкому середовищі до 58—59 мг/л ціанкобаламіну. Останніми роками отримано штами, які синтезують до 150 мг/л вітаміну B₁₂.

Нині світове виробництво цього вітаміну становить близько 12 т на рік. Це зумовлено його важливою функцією в організмі людини — цей вітамін є протианемійним чинником. У зв'язку з цим на медичні потреби витрачають понад 65 % одержуваного вітаміну, а решта використовується в тваринництві.

Виробництво ціанкобаламіну з використанням *P. freudenreichii* var. *shermanii* здійснюється в періодичному режимі без доступу кисню. Середовище містить глюкозу, кукурудзяний екстракт, солі амонію і кобальту, рН на рівні 7,0 підтримують додаванням NH₄OH. Тривалість ферментації становить 6 діб. Через 3 доби культивування у середовище вносять 5,6-диметилбензімідазол — попередник вітаміну B₁₂ і продовжують ферментацію ще 3 доби. Ціанкобаламін накопичується в клітинах бактерій, тому операції з виділення вітаміну включають: сепарацію клітин, екстракцію водою при рН 4,5—5,0 і температурі 85—90 °C, за присутності стабілізатора (0,25 % розчину нітриту натрію). Екстракція відбувається упродовж 1 год, після чого

екстракт охолоджують, нейтралізують розчином їдкого натру, додають коагулянти білків — хлорид тривалентного заліза і сульфат алюмінію, осад відділяють фільтруванням. Фільтрат упарюють і додатково очищають іонним обміном і хроматографією, після чого здійснюють кристалізацію вітаміну при 3—4 °С з водно-ацетонового розчину. Кристалічний ціанкобаламін можна одержувати з допомогою резорцину або фенолу.

Беручи до уваги високу світлочутливість вітаміну B_{12} , всі операції технологічного процесу необхідно проводити у затемнених умовах (або при червоному світлі).

6.4.2. Одержання вітаміну B_{12} з допомогою метаногенних бактерій

На основі ацетобутилової і спиртової барди з додаванням метанолу і солей кобальту одержують кормовий препарат КМБ₁₂ — концентрат, що містить вітамін B_{12} та інші ростові речовини. Біологічним агентом у даному разі є змішана культура первинних і вторинних анаеробів, з яких продуцентом є термофільні метаноутворювальні бактерії.

Ацетобутилову барду одержують видаленням розчинників із культуральної рідини *Clostridium acetobutyricum*. Вихідна барда має температуру близько 100 °С і є практично стерильною. Перед подаванням у ферментатори її охолоджують до 55–57 °С. Замість ацетобутилової барди для вирощування метаногенних бактерій може бути використана мелясно-спиртова барда.

Стадії одержання концентрату вітаміну такі:

- культивування змішаної культури метаногенів (у залізобетонних ферментаторах безперервним способом);
- згущення культуральної рідини;
- висушування згущеної маси на розпилювальній сушарці.

Перед випарюванням додають соляну кислоту до рН 5,0—5,3 і сульфат натрію (0,07—0,1 %), а також здійснюють дегазацію нагріванням до 90—95 °С під атмосферним тиском. Одержаний сухий концентрат, крім B_{12} (100 мг/кг препарату), містить також ряд стимуляторів росту.

6.4.3. Вітамін B_2

Рибофлавін, або вітамін B_2 міститься у клітинах різних мікроорганізмів, оскільки є коферментом у складі флавопротеїнів (ФМН, ФАД). Флавопротеїни синтезують різні мікроорганізми — бактерії, дріжджі і нитчасті гриби. Проте як продуценти рибофлавіну можуть використовуватися штами, які утворюють на рідких середовищах понад 0,5 г/л цього вітаміну. Високоактивними продуцентами є *Ashbyii gossypii*, *Erernothecium ashbyii*, здатні синтезувати понад 15 г/л вітаміну B_2 . Інші продуценти утворюють не більше як 1 г/л вітаміну (*Candida guilliermondii*). Методами генної інженерії одержано штам *Bacillus subtilis*, який синтезує до 13 г/л рибофлавіну.

Основним недоліком *Erernothecium ashbyii* є його нестабільність. Для підтримання штаму в активному стані упродовж тривалого часу (8—10 місяців) рекомендується здійснювати систематичні пересівання на агаризоване середовище з відбором найбільш інтенсивно забарвлених помаранчевих колоній.

Високий вихід рибофлавіну у *E. ashbyii* корелює із вмістом азоту пуринів і інших азотистих джерел. Як джерела вуглецю для синтезу B_2 використовують глюкозу або сахарозу, практикують використання дріжджового і кукурудзяного екстрактів, соєвого борошна, а також жирів (олій). Рідкі поживні середовища для одержання інокуляту і виробничої ферментації можуть дещо різнитися. Наприклад, посівний матеріал отримують на середовищі, що містить сахарозу, пептон, кукурудзяний екстракт, дигідрофосфат калію, сульфат магнію, соняшникову олію. Тривалість вирощування продуцента становить 2 доби при 27—30 °C (залежно від штаму). Для одержання інокуляту в пробірках використовують середовище, що містить соєве борошно, буряковий цукор, агар, pH 6,8 (1-й варіант) або дріжджовий автолізат, пептон, глюкозу, агар, pH 6,8 (2-й варіант). Тривалість вирощування — 5—7 діб.

Середовище для вирощування продуцента в колбах має такий склад: соєве борошно, буряковий цукор (1-й варіант) або пептон, буряковий цукор, кукурудзяний екстракт, KH_2PO_4 , $MgSO_4$, соняшникова олія (2-й варіант). Тривалість культивування — 48 год.

Середовище для інокулятора містить буряковий цукор, кукурудзяний екстракт, KH_2PO_4 , технічний жир. Тривалість вирощування — 21—26 год. Середовище для основної ферментації зазвичай включає кукурудзяне і соєве борошно, сахарозу, кукурудзяний екстракт, дигідрофосфат калію, карбонат кальцію, хлорид натрію і ненасичений жир.

Середовище стерилізують у змішувачі при 120—122 °C упродовж 1 год. Культивування в ферментаторі ведуть до початку лізису клітин і появи спор. Зазвичай ферментацію здійснюють упродовж 5 діб при pH 5,5—7,7. Після споживання сахарози (приблизно через 30 год) починає накопичуватися вітамін B_2 : спочатку — в міцелії, пізніше — у культуральній рідині.

Для одержання кормового препарату рибофлавіну культуральну рідину випарюють у вакуумі до 30—40 % сухих речовин, і сироп висушують на розпилювальній сушарці, суху плівку подрібнюють до порошкоподібного стану. Одержаний продукт із залишковою вологістю 8 %, що містить 1,5—2,5 % рибофлавіну, 20 % білка, тіамін, нікотинову кислоту, піридоксин, ціанкобаламін, мікроелементи та інші речовини, використовується у тваринництві.

У разі високого вмісту рибофлавіну останній можна виділяти як індивідуальну речовину (субстанцію) медичного призначення.

Для *Candida guilliermondii* важливо регулювати вміст заліза у поживному середовищі, оптимальні концентрації іонів заліза становлять 0,005—0,05 мкг/мл. За таких умов певні штами дріжджів можуть утворювати за 5—7 днів більше як 0,5 г/л вітаміну. Звичайно, для промислового виробництва такий вихід рибофлавіну занадто низький, тому нині як продуценти використовують штами грибів — *E. ashbyii* та *Ashbyii gossypii*.

6.4.4. Ергостерин

Попередником вітаміну D, якому притаманна антирахітична дія, є ергостерин, виявлений у клітинних мембранах еукаріот. Вміст ергостерину у дріжджових клітинах коливається в межах 0,2—11 %.

У разі недостачі в організмі гормону 1,25-дигідроксихолекальциферолу, попередником якого є вітамін D₃, у дітей розвивається рахіт, у дорослих — остеомаляція.

Трансформація ергостерину у вітамін D₂ (ергокальциферол) відбувається під впливом ультрафіолетового опромінювання. Фізіологічна активність вітамінів D₂ і D₃ рівноцінна.

Найвищі кількості стеринів (понад 10 % у біомасі) синтезують штами *Saccharomyces carlsbergensis*. Крім дріжджів, продуцентами ергостерину можуть бути міцеліальні гриби — аспергіли і пеніцили, у біомасі яких міститься 1,2—2,2 % ергостерину. Встановлено, що полієнові антибіотики, які діють на клітинну мембрану дріжджів, помітно стимулюють вміст ергостерину в біомасі.

Важливою умовою синтезу ергостерину дріжджами є інтенсивна аерація. В анаеробних умовах у клітинах накопичується попередник ергостерину — сквален. Кисень індукує синтез стеринів активацією *епоксидази сквалену* — першого ферменту біосинтетичного шляху. Індукція синтезу ергостерину починається за 0,03 % O₂ у газовій фазі і досягає максимуму за концентрації 2 %.

Другою важливою умовою синтезу ергостерину є надлишок вуглецю в середовищі за ліміту азоту, тобто високе співвідношення C/N. Проте для дріжджів роду *Candida* високий показник C/N супроводжується накопиченням ліпідів, а не ергостерину.

Стадії одержання ергостерину у виробничих умовах:

- підготовка посівного матеріалу;
- розмноження початкової культури і накопичення інокуляту;
- ферментація;
- сепарація клітин;
- опромінення клітин ультрафіолетовими променями;
- висушування;
- пакування готового продукту.

Інокулят одержують на середовищах, що забезпечують повноцінний розвиток клітин. Основне середовище з ацетатом (активатором біосинтезу стеринів), збагачене джерелом вуглецю із зниженим вмістом азоту (високе значення C/N), засівають великим об'ємом інокуляту. *n*-Алкани та ацетат є кращими вуглецевими субстратами для синтезу ергостерину, ніж вуглеводи. Стимуляторами синтезу є також вітаміни і насамперед пантотенова кислота, яка у складі КоА бере участь у побудові молекули ергостерину. Синтез стеринів не пов'язаний із ростом дріжджів. Вміст стеринів у біомасі збільшується у разі старіння культури, стеринуотворення продовжується після припинення росту.

Культивування дріжджів (ферментацію) здійснюють при оптимальній температурі і за рівня аерації 2 % O₂ у газовій фазі. Через 3—4 доби, залежно від ростових характеристик і біосинтетичної здатності культури, клітини сепарують і піддають вакуум-висушуванню. Потім сухі дріжджі опромінюють ультрафіолетовими променями з довжиною хвилі 280—300 нм. За дії на дріжджі опромінення вміст ергостерину збільшується в 2—3 рази, що пояснюється пригніченням процесу амінування, що в свою чергу приводить до підвищення синтезу ліпідів.

Опромінювання дріжджів можна проводити до сепарації клітин у тонкому шарі 5 % суспензії, враховуючи малу проникну здатність ультрафіолетових променів.

Опромінені сухі дріжджі використовують у тваринництві. Їх випускають під назвою «кормові гідролізні дріжджі, збагачені вітаміном D₂». У такому препараті міститься не менше як 46 % сирого білка, незамінні амінокислоти (лізин, метіонін, триптофан) і 5000 МО/г вітаміну D₂.

У разі одержання кристалічного вітаміну D₂ клітини продуцента гідролізують соляною кислотою при 110 °С, потім температуру знижують до 75—78 °С і додають етанол. Суміш фільтрують при 10—15 °С, масу, що залишилася після фільтрації, промивають водою, висушують, подрібнюють, нагрівають до 78 °С і двічі обробляють потрійним об'ємом етанолу (у співвідношенні 3:1). Спиртові екстракти упарюють до 70 % вмісту сухих речовин. Одержаний «ліпідний концентрат» обробляють розчином їдкого натру. Ергостерин кристалізується з неомиленої фракції концентрату при температурі 0 °С. Його можна очистити повторними перекристалізаціями. Кристали ергостерину висушують, розчиняють у сірчаному ефірі, опромінюють, видаляють ефір відгонкою, розчин вітаміну D₂ концентрують і кристалізують.

«Кислотний фільтрат» зазвичай упарюють до 50 % вмісту сухих речовин і використовують як вітамінний концентрат.

Для одержання масляного концентрату D₂ розчин вітаміну після фільтрації розбавляють олією до стандартної концентрації.

6.4.5. Промислове одержання каротиноїдів

Каротиноїди — це ізопреноїдні сполуки, що синтезуються багатьма пігментованими мікроорганізмами — представниками родів *Aleuria*, *Blacheslea*, *Corynebacterium*, *Flexibacter*, *Fusarium*, *Halobacterium*, *Phycomyces*, *Pseudomonas*, *Rhodotorula*, *Sarcina*, *Sporobolomyces* тощо. Всього описано близько 500 каротиноїдів.

Із однієї молекули β-каротину під час гідролізу, наприклад у кишечнику людини, утворюються дві молекули вітаміну А.

Каротиноїди локалізуються у вигляді складних ефірів і глікозидів у клітинній мембрані мікроорганізмів або у вільному стані — у ліпідних гранулах у цитоплазмі. Каротиноїд ретиналь у галофільній бактерії *Halobacterium halobium* зв'язаний з білком через залишок лізину, він бере участь у синтезі АТФ завдяки генерації трансмембранного потенціалу. Основна функція каротиноїдів — захисна. Їх біосинтезу в клітинах сприяє світло. Як продуценти β-каротину найчастіше використовують зигоміцети *Blacheslea trispora* і *Choanephora conjuncta*. За сумісного вирощування різностатевих штамів цих грибів на спеціально підібраних середовищах вихід каротину становить близько 3—4 г/л середовища.

Поживні середовища для продуцентів β-каротину достатньо складні і містять джерела вуглецю, азоту, вітамінів, мікроелементів, спеціальних стимуляторів (гідрол, кукурудзяно-соеве борошно, олії, гас, β-іонон або ізопренові димери тощо). β-іонон можна замінити значно дешевшою цитрусовою пульпою або цитрусовою м'ясою. Як замінники β-іонону також використо-

вують циклогексан, циклогексанон та їх триметилпохідні. За присутності β -іону або його замінників активаторами каротиногенезу є сукцинімід, ізоніазид, піролідон. Стимулятори вносять у культуральне середовище, коли продуцент переходить у продуктивну фазу.

Процес одержання β -каротину за допомогою *Blakeslea trispora* багатостадійний. Спочатку (+) і (-) штами вирощують окремо. Спільне вирощування здійснюють на стадії виробничої ферментації при 26 °C і посиленій аерації. Тривалість ферментації становить 6—7 днів. Каротиноїди екстрагують ацетоном або іншим полярним розчинником і переводять у неполярний розчинник. У разі вилучення білково-каротиноїдних комплексів використовують поверхнево-активні речовини в концентрації 1—2 %. Для очищення і розділення гомологів можна використовувати методи хроматографії або набір розчинників. Вітамін А з β -каротину легко одержують гідролізом.

6.4.6. Вітамін С

Аскорбінова кислота, або вітамін С, — це протицинготний вітамін, наявний у всіх вищих рослин і тварин. Тільки людина і мікроорганізми не здатні до синтезу цього вітаміну. Оцтовокислі бактерії родів *Acetobacter*, *Gluconobacter* здійснюють синтез напівпродукту вітаміну — *L*-сорбози з *D*-сорбіту. Повний синтез аскорбінової кислоти є змішаним — хімічно-ферментативним.

Біологічна стадія процесу одержання вітаміну С каталізується мембранозв'язаною поліолдегідрогеназою, а етапи хімічної такі:

- конденсація сорбози з діацетоном з отриманням діацетон-*L*-сорбози;
- окиснення діацетон-*L*-сорбози до діацетон-2-кето-*L*-гулонової кислоти з наступним гідролізом для одержання 2-кето-*L*-гулонової кислоти;
- енолізація 2-кето-*L*-гулонової кислоти з подальшою трансформацією у *L*-аскорбінову кислоту.

Для одержання *L*-сорбози штам *G. oxydans* культивують на середовищі, що містить 20 % сорбіту, кукурудзяний або дріжджовий екстракт, за інтенсивної аерації (8—10 г O_2 /л·год). Вихід *L*-сорбози може досягати 98 % за одну—дві доби. В експоненційній фазі росту можна додатково внести у середовище до 25 % сорбіту. *G. oxydans* може окиснювати і вищі концентрації сорбіту (30—50 %) завдяки високій активності поліолдегідрогенази клітинної біомаси. Ферментацію бактерій проводять у періодичному або безперервному режимі. Принципово доведена можливість отримання *L*-сорбози з сорбіту за допомогою іммобілізованих у поліакриламідному гелі клітин.

Аскорбінову кислоту використовують як антиоксидант у медичній та харчовій промисловості.

6.5. БІОТЕХНОЛОГІЯ ПОЛІСАХАРИДІВ

6.5.1. Вплив умов культивування на синтез мікробних полісахаридів

Здатність до синтезу ЕПС — полімерів вуглеводної природи, локалізованих зовні клітинної стінки, виявлена у багатьох мікроорганізмів, проте рівень синтезу полісахаридів коливається в широких межах як для різних проду-

центів ЕПС, так і для одного й того самого продуцента в різних умовах його культивування.

Дослідження динаміки росту мікробних клітин і утворення ЕПС у періодичному процесі показує, що максимальна питома швидкість їх синтезу найчастіше не збігається у часі з максимальною швидкістю росту продуцентів і досягається в стаціонарній фазі росту, що характерно для біосинтезу вторинних метаболітів.

Основним вуглецевим субстратом для синтезу ЕПС є вуглеводи (глюкоза, сахароза, мальтоза, меласа, крохмаль, молочна сироватка, лактоза та ін.). Проте мікроорганізми здатні синтезувати ЕПС не тільки у процесі вирощування на вуглеводах, а й на C_1 - (метан, метанол) та C_2 -сполуках (етанол, етиленгліколь), а також на різних вуглеводнях. Слід зазначити, що існуючі промислові виробництва мікробних ЕПС (наприклад, ксантану, альгінату, склероглюкану) ґрунтуються на використанні вуглеводної сировини. На сьогодні відомий лише один мікробний полісахарид емульсан, одержуваний у промисловому масштабі на основі етанолу.

Показано, що застосування дробного способу подачі субстрату приводить до підвищення синтезу ЕПС. Особливо доцільним такий спосіб подачі субстрату є за використання як джерел вуглецю метанолу й етанолу, високі концентрації яких здатні пригнічувати ріст продуцентів. Крім того, під час культивування продуцентів ЕПС на метанолі й етанолі в умовах примусової аерації і зниження концентрації спиртів у результаті їх виносу з відпрацьованим повітрям дробний спосіб подачі субстрату дає можливість підтримувати концентрацію спиртів на необхідному для оптимального синтезу ЕПС рівні.

Для одержання мікробних ЕПС як джерело азотного живлення використовують мінеральні (амонійні солі, нітрати) та органічні компоненти (дріжджовий і кукурудзяний екстракти, пептон, сечовина). У деяких випадках органічний азот, а також поєднання органічного і мінерального азоту сприяє підвищенню синтезу ЕПС мікроорганізмами порівняно з використанням тільки мінеральних джерел азоту.

Для кожного продуцента ЕПС існує певне оптимальне співвідношення вуглецю і азоту в середовищі, яке забезпечує максимальний синтез ЕПС. Значення C/N у середовищі культивування продуцентів ЕПС коливається в межах 7—20. Крім того, можна однозначно стверджувати, що лімітування росту продуцента азотом в умовах надлишку вуглецю є необхідною умовою підвищення синтезу ЕПС.

Концентрація фосфатів, що забезпечує максимальну продукцію ЕПС, і наявність певних іонів металів у середовищі культивування повинна визначатись експериментально для кожного продуцента.

Здебільшого температура і рН, оптимальні для росту продуцента, є оптимальними і для синтезу ЕПС. Проте в деяких випадках зниження або підвищення температури культивування продуцентів відносно оптимальної для їх росту приводить до збільшення концентрації синтезованих ЕПС. Підтримання рН середовища на постійному рівні впродовж процесу культивування більшості продуцентів також супроводжується підвищенням кількості утворюваних ЕПС.

Рівень аерації на початку процесу культивування продуцентів ЕПС визначається їх фізіологічними особливостями (зокрема відношенням продуцента до кисню). Проте у міру синтезу ЕПС і збільшення в'язкості культуральної рідини виникає потреба в підвищенні рівня аерації і посиленні масопереносу. Ці обставини необхідно враховувати у виборі конструкції апаратів для культивування продуцентів ЕПС, зокрема типу їх перемішувальних пристроїв.

Мікробні ЕПС можна одержувати як у періодичному, так і в безперервному процесі. Під час розроблення технології одержання ЕПС тривалість процесу періодичного культивування, як і швидкість розбавлення середовища за безперервного культивування, повинні бути визначені експериментально для кожного з досліджуваних продуцентів ЕПС. Для більшості мікроорганізмів максимальний синтез ЕПС в умовах безперервного культивування відзначається за низьких швидкостей розбавлення середовища ($0,03-0,5 \text{ год}^{-1}$).

6.5.2. Вплив умов культивування на фізико-хімічні властивості полісахаридів

Умови культивування впливають не тільки на такі показники процесу, як кількість ЕПС, швидкість їх утворення, вихід ЕПС від субстрату, а й на фізико-хімічні властивості синтезованих ЕПС.

Важливою характеристикою мікробних ЕПС є реологічні властивості їхніх розчинів, які значною мірою залежать від якісного та кількісного складу полісахаридів. Відмінності в реологічних характеристиках ЕПС, синтезованих одним продуцентом, можуть бути зумовлені його здатністю синтезувати кілька різних за фізико-хімічними властивостями полімерів (*Alcaligenes faecalis var. myxogenes* утворює глюкан і курдлан), а також зміною кількості бокових замісників у складі ЕПС залежно від умов культивування. Крім того, в процесі безперервного культивування можливе виникнення варіантів продуцентів, які синтезують ЕПС із різними властивостями (*Xanthomonas campestris*, *Azotobacter vinelandii*). На фізико-хімічні властивості мікробних ЕПС значною мірою впливають такі фактори, як тривалість ферментації, склад середовища, спосіб подавання субстрату, рівень аерації та ін. При цьому основний ланцюг полісахариду найчастіше залишається незмінним, а найбільших змін зазнають бокові ланцюги ЕПС — їх довжина, склад, кількість розгалужень, а також склад і природа замісників — ацильних залишків, О-метильних груп, залишків піровиноградної та інших оксикислот, сульфатів і фосфатів.

Отже, дослідження впливу умов культивування продуцента на склад і властивості синтезованих ЕПС є одним з необхідних завдань біотехнології мікробних ЕПС.

6.5.3. Промислове виробництво ксантану

Інші комерційні назви ксантану: біополімер Хс, келцан, келтрол. Продуцент вирощують на середовищі, яке містить 1–5 % вуглеводів (кукурудзяний крохмаль, цукор-сирець, меляса та ін.), органічні сполуки азоту, двозаміщений

фосфорнокислий калій і мікроелементи. рН середовища — 6,5—7,2. Ферментацію здійснюють в аеробних умовах упродовж 72 год. Для поліпшення властивостей ЕПС під час ферментації в середовище додають формальдегід. Кількість синтезованого ксантану перевищує 20 г/л. Полімер використовують у вигляді в'язкої культуральної рідини або порошку, висушеного в потоці гарячого повітря. Для одержання сухого препарату полісахарид відділяють від клітин центрифугуванням (з попереднім розбавленням культуральної рідини), концентрують у вакуумі, осаджують органічними розчинниками (етанол, метанол, ацетон, ізопропанол).

6.6. КЛЮЧОВІ ПРОБЛЕМИ ПРОМИСЛОВОГО ВИРОБНИЦТВА МІКРОБНИХ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН

Незважаючи на комерційно привабливі властивості мікробних ПАР та їх значні переваги порівняно з синтетичними аналогами, промислове виробництво цієї групи речовин в Україні донині не реалізовано, а факторами, що стримують впровадження технологій мікробних ПАР у світі є високі витрати на біосинтез (сировина, енергетика), виділення та очищення цільового продукту, а також недостатньо висока концентрація синтезованих ПАР.

У зв'язку з цим потенційними шляхами підвищення ефективності технологій мікробних ПАР є такі:

- використання дешевих ростових субстратів (продуктів переробки основної сировини або відходів різних галузей промисловості);
- оптимізація умов культивування продуцента й пошук нових рентабельних методів виділення та очищення ПАР;
- одержання мутантних і рекомбінантних штамів мікроорганізмів-надсинтетиків ПАР.

Тепер дослідники активно реалізують перші два підходи, тимчасом як використання рекомбінантних штамів-продуцентів ПАР донедавна не розглядалося як ефективний інструмент зниження собівартості виробництва мікробних ПАР.

6.6.1. Альтернативні субстрати для одержання мікробних поверхнево-активних речовин

Відомо, що для переважної більшості біотехнологічних процесів вартість компонентів поживного середовища становить близько 20—30 % загальних витрат на виробництво. У зв'язку з цим одним із шляхів зниження собівартості цільового продукту є використання як ростових субстратів дешевої промислової сировини (наприклад, жирів рослинного походження), а також відходів харчової промисловості (олієжирової, спиртової, молочної) та сільськогосподарського сектора (крохмаловмісні речовини).

Показано, що жири рослинного походження можуть використовуватися як ефективна та дешева сировина для синтезу ПАР. Так, соняшникова, соєва, рапсова, кукурудзяна олії можуть бути субстратами для синтезу рамноліпідів, софороліпідів, манозоліпідів. Проте ці сполуки є харчовою сиро-

виною, що обмежує їх застосування у біотехнологічних процесах. З дешевих рослинних нехарчових олій потенційними субстратами для синтезу ПАР є, наприклад, касторова олія та олія жожоба. Крім різних рослинних олій субстратами для одержання ПАР можуть бути побічні продукти їх виробництва. Так, показана можливість використання відходів виробництва соєвої та соняшникової олій для синтезу рафінатів штамами *Pseudomonas aeruginosa* AT10 та *P. aeruginosa* LB1. За присутності у середовищі культивування *Candida antarctica* та *C. apicola* відходів виробництва соняшникової олії кількість синтезованих гліколіпідів становила відповідно 10,5 і 13,4 г/л. Промислові жировмісні відходи інших галузей, зокрема стічні води м'ясопереробної промисловості, відходи миловарного виробництва, можуть також бути потенційними субстратами для синтезу ПАР. Варто зауважити, що такі субстрати доступні у необхідних кількостях і дешеві, що повністю виключає залежність виробництва ПАР від сировинної бази.

Є відомості про використання для синтезу ПАР відходів молочної промисловості, зокрема сироватки. Так, під час культивування *Pseudomonas aeruginosa* BS2 на середовищі з сирною сироваткою кількість синтезованих рафінатів становить 0,92 г/л, що перевищує показники синтезу ПАР на синтетичних середовищах. Використання сироватки як субстрату може вирішити проблему утилізації цього відходу молочної промисловості та суттєво знизити витрати на виробництво ПАР.

Як альтернативну сировину для виробництва ПАР також застосовують крохмалевмісні відходи. Так, синтез ліпопептидів *Bacillus subtilis* здійснюють на середовищах, що містять відходи картоплепереробних виробництв. Побічний продукт виробництва борошна з маніоки є субстратом для синтезу сурфактину *Bacillus subtilis* ATCC 21332 та *B. subtilis* LB5a. За використання такого субстрату кількість ліпопептидів досягає 2,2—3,0 г/л. Субстратами для виробництва ПАР можуть бути такі крохмалевмісні речовини, як рідкі відходи переробки рису, обробки злаків, патоки, кукурудзяного борошна.

Наші дослідження показали можливість використання для синтезу поверхнево-активних речовин гідрофільних субстратів (етанол, гліцерин), які порівняно з гідрофобними сполуками мають такі переваги: по-перше, вони водорозчинні і тому технологічніші, по-друге, ці субстрати значно дешевші. Із забруднених нафтою зразків ґрунту і води нами було виділено нафтоокиснювальні бактерії, ідентифіковані як *Acinetobacter calcoaceticus* K-4, *Nocardia vaccinii* K-8, *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 і встановлено здатність цих штамів синтезувати метаболіти з поверхнево-активними і емульгуювальними властивостями під час росту на різних гідрофобних і гідрофільних субстратах. Слід зазначити, що бактерії родів *Rhodococcus* і *Acinetobacter* ростуть на етанолі, проте донині немає даних про синтез ними ПАР на цьому субстраті. Відомості про утворення поверхнево-активних речовин представниками роду *Nocardia* навіть на гідрофобних субстратах дуже обмежені.

Результати наших досліджень показали, що *R. erythropolis* ЕК-1 під час росту на етанолі синтезує ПАР у незначних кількостях. Поверхневий натяг культуральної рідини (σ) становив 50–55 мН/м, умовна концентрація ПАР (ПАР*) досягала 1,1—1,2, а концентрація ПАР — 0,4—0,43 г/л, тоді як під час росту культури на гідрофобних субстратах ці показники були значно

вищі. Подальші експерименти показали, що заміна амонійного джерела азоту на нітратне у середовищі культивування *R. erythropolis* ЕК-1, підвищення концентрації етанолу до 2 %, підтримання співвідношення вуглець/азот на рівні 36:1 дали змогу збільшити показники синтезу ПАР у три рази. Максимальний синтез ПАР у процесі культивування *A. calcoaceticus* К-4 на етанолі (умовна концентрація ПАР 3,6; емульгувальна активність розбавленої у 50 раз культуральної рідини 96 %) спостерігався за наявності як джерела азоту у середовищі сечовини, а також дріжджового автолізу та мікроелементів у співвідношенні С/Н 60:1 і використання інокуляту з кінця експоненційної фази росту у концентрації 10 %.

Показано можливість синтезу ПАР у процесі вирощування *Nocardia vaccinii* К-8 на гліцерині. Встановлено умови культивування *N. vaccinii* К-8 на середовищі з 0,5 % гліцерину, в яких показники синтезу ПАР підвищувалися у кілька разів. Так, умовна концентрація ПАР досягає значень 4,2—5,0 за наявності у середовищі іонів заліза і дріжджового автолізу, за використання інокуляту, вирощеного на гліцерині до середини експоненційної фази росту, тривалості культивування 168 год.

6.6.2. Ефективні й економічно обґрунтовані методи виділення та очищення поверхнево-активних речовин

Одним із найважливіших факторів, що визначає рентабельність будь-якого біотехнологічного виробництва, є метод виділення та очищення цільового продукту. Для багатьох продуктів мікробного синтезу витрати на очищення становлять приблизно 60 % загальних витрат на виробництво. Для виділення поверхнево-активних речовин у промисловості використовується ряд традиційних методів, зокрема кислотне осадження, екстракція органічними розчинниками, кристалізація, осадження сульфатом амонію, центрифугування тощо. Останніми роками було розроблено кілька нових методів для виділення позаклітинних ПАР: ультрафільтрація, сорбція на полістирольних матрицях та активованому вугіллі, іонообмінна хроматографія. Основною перевагою цих методів є можливість організації безперервного технологічного процесу та одержання високоочищених ПАР.

Слід зазначити, що у хроматографічних методах для здійснення процесів десорбції використовуються високотоксичні органічні розчинники (ацетон, метанол, хлороформ). Останніми роками в промисловості почали успішно застосовувати альтернативні розчинники типу метил-трет-бутилового етеру. Зокрема така технологія застосовується для виділення та очищення ПАР, синтезованих бактеріями роду *Rhodococcus*. Ці розчинники дешевші і менш токсичні, що дає змогу суттєво скоротити витрати на фінішних стадіях виділення ПАР і мінімізувати потенційну екологічну небезпеку. Зазначені переваги запропонованих розчинників надають можливість створення на їх основі конкурентоздатніших технологій.

У ряді випадків використання одного методу є недостатнім для повного виділення ПАР чи одержання високоочищених препаратів. Тому тепер широко застосовуються багатоступеневі схеми, що мають кілька послідовних етапів концентрування культуральної рідини (її супернатанту) та очищення

ПАР від супутніх домішок. Така схема дає змогу одержувати поверхнево-активні препарати різного ступеня чистоти. Так, сконцентрована культуральна рідина або неочищені препарати ПАР, одержані на перших стадіях технологічного процесу, характеризуються низькою вартістю і можуть використовуватися у нафтовидобувній, текстильній галузях та для очищення екосистем від нафтових забруднень. Високоочищені препарати ПАР, що застосовуються виключно у фармацевтичній, харчовій, косметичній промисловості, можуть бути одержані в результаті додаткових етапів очищення вихідних напівпродуктів. Така багатоступенева технологія повинна впроваджуватися на підприємствах, що виробляють продукцію для широкого спектра галузей промисловості.

6.6.3. Мутантні і рекомбінантні штами — надсинтетики поверхнево-активних речовин

Крім оптимізації складу поживного середовища та умов культивування, вибору ефективного методу виділення цільового метаболіту, комерційна складова будь-якого біотехнологічного процесу залежить від потенційних можливостей штаму-продуцента. У сучасних умовах промислові масштаби виробництва потребують використання нових високоактивних мутантних і рекомбінантних штамів, здатних до максимально повної трансформації субстратів у поверхнево-активні речовини. Використання таких «модифікованих» продуцентів дасть змогу підвищити ефективність технологічного процесу та одержувати ПАР із заданими властивостями. Для одержання надпродуцентів ПАР використовуються транспозони, іонізуюче випромінювання, хімічні мутагени типу N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідин або процеси селекції на основі резистентності до іонних детергентів тощо.

Останніми роками було одержано ряд високоефективних рекомбінантних штамів-надсинтетиків ПАР. Так, з використанням як вектора плазміді рC112 сконструйовано штам *Bacillus subtilis* MI 113 введенням гена *lpa 14*, відповідального за синтез сурфактину. На середовищах із соєвим борошном рекомбінантний штам синтезував у 8 разів більше сурфактину, ніж вихідний. Створено ряд рекомбінантних штамів *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens* — надсинтетиків рамноліпідів.

Застосування генно-інженерних методів дає змогу не тільки підвищити продуктивність штамів, а й змінювати хімічний склад синтезованих ними поверхнево-активних речовин. Так, зміна нуклеотидної послідовності гена, що кодує синтез сурфактину, супроводжувалась зміною складу ферментного комплексу і як наслідок синтезом нового ПАР (ліхенізин) штамом *Bacillus subtilis*.

Відомо, що *Pseudomonas aeruginosa* (продуцент рамноліпідів) не здатний використовувати для росту і біосинтезу ПАР лактозу. Введення у клітини бактерій гена *lacZY* з *Escherichia coli* дало змогу створити штами, які синтезують рамноліпіди на середовищі з молочною сироваткою.

Нещодавно було створено новий рекомбінантний штам *Gordonia amarae* введенням стійкого гена гемоглобіну (*vgb*), що дало змогу у чотири рази підвищити синтез трегалозоліпідів.

6.7. ВИРОБНИЦТВО АНТИБІОТИКІВ

Основні етапи виробництва антибіотиків подібні, тому немає потреби розглядати технологію виробництва кожного антибіотика окремо.

Оскільки антибіотичні речовини є вторинними метаболітами, для їх надсинтезу доцільно лімітувати ріст продуцента. Таким лімітувальним фактором під час біосинтезу пеніциліну є глюкоза, стрептоміцину — фосфати. Середовище для синтезу пеніциліну містить, %: глюкозу — 1,5, лактозу — 5 (лактоза знімає катаболітну репресію глюकोзи), сульфат амонію, фосфати — 0,5—1, кукурудзяний екстракт — 2—3, попередник антибіотику — фенілоцтову кислоту — 0,3—0,6, крейду — 0,5—1, піногасник — 0,5—1; температуру ферментації підтримують на рівні 22—26 °C при pH 5,0—7,5 і аерації 1 м³ повітря на 1 м³ середовища за 1 хв; тривалість ферментації — 4 доби.

Здатність актиноміцетів до синтезу різних гідролаз дає змогу використовувати для синтезу антибіотиків білкові середовища (соеве і рибне борошно, білок клейковини пшениці тощо), а також крохмаль. Так само, як і для продуцентів інших мікробних метаболітів, для кожного продуцента антибіотиків оптимальні умови його надсинтезу визначають експериментально. Наприклад, одержання посівного матеріалу і виробничий біосинтез у разі *Streptomyces kanamyceticus* здійснюють на соєво-крохмальному середовищі. Основну ферментацію проводять при 27—28 °C упродовж 4—5 діб із підтриманням pH на рівні 7,1—7,6.

Середовище для вирощування *S. floridae* (продуцент біоміцину, або флориміцину) містить глюкозу або гідрол, соєве борошно, кукурудзяний екстракт, нітрати, крейду; температуру підтримують у межах 27—29 °C, pH 7,0—7,3.

6.7.1. Основні стадії промислового одержання антибіотиків

6.7.1.1. Підготовка поживного середовища та посівного матеріалу. У разі використання невеликих об'ємів середовища використовують періодичний метод стерилізації. Середовище нагрівається до 120—130 °C безпосередньо у ферментаторі, витримується при цій температурі упродовж 30—60 хв і охолоджується.

Стерилізація великих об'ємів середовища здійснюється безперервним методом. Приготовлене середовище зі спеціального апарата насосом подається в стерилізаційну колонку, через яку пропускається гостра пара (тиск пари близько 0,5 МПа). У колонці середовище нагрівається до температури стерилізації (близько 130 °C) і надходить у витримувач, де при температурі 125—130 °C витримується упродовж 5—10 хв. Із витримувача стерильне середовище надходить у змішувиковий холодильник, в якому воно охолоджується до 30—35 °C, після чого подається у ферментатор.

Якщо до складу середовища входять термолабільні компоненти, вони стерилізуються окремо у м'якших умовах і після стерилізації подаються у ферментатор.

Посівний матеріал підготовляють так: вирощують продуцент на скошеному агаризованому середовищі, в колбах на качалках (дві генерації), в першому інкуляторі (10 л), в другому інкуляторі (100—500 л).

Продуценти антибіотиків, як правило, вирощуються на багатих поживних середовищах.

6.7.1.2. Біосинтез антибіотика. Процес біосинтезу антибіотиків здійснюють в умовах глибинного культивування продуцента у ферментаторах, оснащених барботерами, через які подається стерильне повітря, та мішалками (пропелерними, турбінними та ін.). Останнім часом для виробництва антибіотиків використовують економічніше низькочастотне вібраційне перемішування культуральної рідини.

Підтримання необхідної температури забезпечується сорочкою ферментатора або системою змішувиків. Змішувачі використовуються також для подавання пари для стерилізації або води для охолодження. Для біосинтезу антибіотиків використовуються апарати об'ємом 50, 100 м³ і більше. Стерилізуються вони перегрітою парою. Повітря стерилізується через спеціальні фільтри, заповнені скляною ватою або активованим вугіллям.

Піна, що утворюється внаслідок продування повітря через ферментатор, негативно впливає на синтез антибіотиків. Для піногасіння використовують рослинну олію (соеву, соняшникову), мінеральні масла (вазелінове, парафінове), спирти та вищі жирні кислоти.

Використовують також механічні способи піногасіння (відсмоктування піни через спеціальні труби, руйнування бульбашок піни сильним струменем рідини) і аеродинамічні.

6.7.1.3. Попередня обробка рідини. Антибіотики здебільшого накопичуються в культуральній рідині, проте частина їх може залишатись у клітинах продуцента. Якщо антибіотик виділяється із клітин у культуральну рідину, його екстрагують органічними розчинниками, які не змішуються з рідкою фазою, осаджують у вигляді нерозчинної сполуки або сорбують на іонообмінних смолах.

Із клітин антибіотики виділяють за допомогою екстракції органічними розчинниками. Якщо антибіотик міститься і у культуральній рідині, і в клітинах, його спочатку переводять у фазу, з якої найлегше виділити. Так, антибіотик із культуральної рідини і клітини з антибіотиком переводять в осад, а потім його екстрагують.

Перед виділенням антибіотика із культуральної рідини необхідно відокремити тверду фазу (біомасу) від рідкої. У такому разі, як правило, використовують фільтрацію (фільтр-прес, нутч-фільтр, друк-фільтр) або центрифугування (центрифуги, сепаратори).

Якість твердої фази помітно позначається на ефективності фільтрування. Можна відзначити таку закономірність: нативна бактеріальна маса фільтрується гірше, ніж міцеліальна. Вищі актиноміцети здатні формувати нитчасті структури і їх відокремлення фільтруванням відбувається легше, ніж інших бактерій.

Шляхи підвищення ефективності фільтрування: оброблення культуральної рідини електролітами, теплова коагуляція, додавання фільтрувальних наповнювачів, кислотна коагуляція тощо.

Труднощі виділення антибіотиків зумовлені багатокомпонентністю культуральних рідин і малою концентрацією в них цільових продуктів. Так, пеніцилін може накопичуватися приблизно до 3 г/л при 8 %-му виході від субстрату. При цьому сухі речовини після відділення міцелію зазвичай становлять близько 3—6 %, з яких лише 15—30 % припадає на антибіотик. У зв'язку з цим культуральну рідину піддають такій обробці, щоб антибіотик переходив у ту фазу, з якої його можна найповніше виділити. У ряді випадків цього можна досягти підкисленням (тетрациклін) або, навпаки, підлуженням (новобіоцин) культуральної рідини, додаванням солей щавлевої кислоти (еритроміцин) тощо до або після коагуляції і осадження білків із нативних розчинів.

Якщо для виділення антибіотика застосовують іонний обмін, то нативний розчин необхідно звільнити від іонів-конкурентів (розчинні оксалати — для видалення іонів кальцію; натрію триполіфосфат — для зв'язування іонів магнію; жовта кров'яна сіль — для осадження іонів заліза).

6.7.1.4. Виділення та очищення антибіотика. У культуральній рідині, крім антибіотика, містяться неспожиті компоненти середовища, продукти метаболізму та автолізу клітин. Видалення таких добавок є першою і важливою стадією очищення антибіотика. Для цього використовують такі методи.

Екстракція. Часто для очищення антибіотика від різних домішок його багаторазово переводять із одного розчинника в інший з попереднім осадженням-кристалізацією. Такий прийом називається перекристалізацією.

Іонообмінна сорбція. У процесі пропускання водних розчинів антибіотиків, які за хімічною природою є кислотами, основами або амфотерними сполуками, через колонки з відповідними іонообмінними смолами, вони сорбуються на них, а розчин з домішками проходить через колонку. Адсорбований антибіотик десорбують (процес елюції), в результаті чого одержують більш очищений та сконцентрований препарат.

Осадження. Антибіотик обробляють органічними або неорганічними речовинами з метою переведення його в осад. Осад за допомогою фільтрування або центрифугування відділяють від нативного розчину, промивають і висушують. Сухий осад розчиняють і з розчину екстрагують антибіотик або знову осаджують (кристалізують).

Однією зі стадій хімічного очищення антибіотиків є концентрування розчинів відгонкою більшої частини розчинника, зазвичай під вакуумом.

6.7.1.5. Одержання готової продукції, виготовлення лікарських форм, фасування. Антибіотики для ін'єкцій повинні бути стерильними, тому одержання таких препаратів, приготування лікарських форм, фасування та пакування здійснюються в асептичних умовах.

Після виділення та хімічного очищення антибіотик висушують. Більшість антибіотиків термолабільні. Для їх висушування застосовують такі методи: ліофілізація або висушування на розпилювальній сушарці (розчин пневматично розпилюється до дуже дрібних крапель у камері потоком нагрітого повітря) або вакуум-висушування у спеціальних шафах.

6.7.2. Біологічний і фармакологічний контроль

Біологічний контроль проводять для визначення стерильності препарату. Для цього використовують два методи:

- антибіотик інактивують (наприклад, пеніциліни обробкою пеніциліназами) і висівають на відповідні поживні середовища;
- для більшості антибіотиків не існує біологічних інактиваторів їхньої активності, тому для таких препаратів виявляють наявність стійких і чутливих форм мікроорганізмів.

Фармакологічний контроль здійснюють на тваринах (гостра та хронічна токсичність). Показники гострої токсичності — один із критеріїв якості антибіотика. Визначають максимальну дозу, що переноситься твариною, а також LD_{50} та LD_{100} (دوزи, що спричиняють загибель відповідно 50 % та всіх тварин).

6.8. ОДЕРЖАННЯ ПРОМИСЛОВО ВАЖЛИВИХ СТЕРОЇДІВ

Здатність мікроорганізмів до трансформації речовин найповніше реалізувалася при одержанні промислово важливих стероїдів.

В основі промислового одержання багатьох високовартісних продуктів (протизапальні та протипухлинні препарати, транквілізатори, анестезувальні засоби та статеві гормони) лежать процеси гідроксилування кортикостерону та його похідних. Кортикостерон — наднирковий гормон, бере участь у регуляції водно-сольового, вуглеводного та білкового обмінів. Промислове виробництво найважливішого протизапального препарату преднізолону здійснюється мікробним гідроксилуванням кортикостерону.

Подальші успіхи у виробництві стероїдних препаратів пов'язують із застосуванням іммобілізованих клітин, використанням оптимального поєднання біологічних і хімічних перетворень, а також із удосконалюванням технології очищення одержуваних сполук. Середовища для біотрансформації досить складні, а реакція вимагає суворого контролю за кожним її параметром (рН, температура, тривалість). Так, середовище окиснення кортизолу у преднізолон клітинами *Arthrobacter simplex* містить пептон, глюкозу й кукурудзяний екстракт. Через добу до суміші додають речовину S Рейхштейна. Процес ведуть строго в нейтральному середовищі при температурі 28 °C упродовж 120 год. Вихід преднізолону становить 93 %.

Великомасштабне виробництво преднізолону біотрансформацією стероїдів дало змогу знизити вартість цього препарату у 200 разів.

Найважливішим джерелом стероїдних гормонів є культура клітин рослин. Так, культура клітин діоскорей дельтоподібної (*Dioscorea deltoidea*) кореневого походження продукує фітостерин діосгенін і його глікозидні похідні (сапоніни). Важливо, що здатність до надсинтезу фураностанолових глікозидів окремих штамів діоскорей, наприклад ДМ-ОГ, стабільно підтримувалася упродовж 27 років. Отже, культивування клітин рослин *in vitro* являє собою нове вирішення проблеми промислового одержання вторинних метаболітів.

6.9. ОДЕРЖАННЯ МІКРОБНИХ ІМУНОБІОЛОГІЧНИХ ПРЕПАРАТІВ

До мікробних імунобіологічних препаратів належать вакцини, діагностикуми, алергени, бактеріофаги, пробіотики.

6.9.1. Вакцини

6.9.1.1. Вакцини з клітин патогенних мікроорганізмів. Етапи технології одержання живих вакцин такі:

- розмноження вакцинного штаму шляхом кількох пересівів (від культури на агаризованих середовищах у пробірках до ферментатора) в оптимальних умовах, тривалість етапу залежить від швидкості розмноження мікроорганізму, режим культивування — періодичний;
- сепарація культуральної рідини або центрифугування;
- ресуспендування клітин у відповідному розчиннику (суміш сахарози і желатини — для вакцин БЦЖ, вода — для туляремічної вакцини тощо);
- розлив суспензії в ампули або флакони;
- ліофільне висушування, запаявання ампул або закоркування флаконів.

Живі вакцини не повинні містити консервантів або інших інгібіторів росту вакцинних штамів. Живі вакцини вводять зазвичай одноразово.

Приклади живих вакцин наведено у розділі 5.1.

Інактивовані (вбиті) вакцини. Технологія виготовлення таких вакцин:

- вирощування стандартного виробничого штаму на відповідному поживному середовищі;
- знешкодження (інактивування) клітин;
- відділення клітин (зазвичай центрифугуванням);
- ресуспендування клітин в ізотонічному розчині хлориду натрію до певної концентрації;
- контроль на відсутність живих клітин патогену, імуногенність, стерильність та за іншими показниками.

Клітини знешкоджують одним із таких методів: прогріванням, обробленням формаліном, ацетоном, етанолом. Інактивовану клітинну суспензію розливають в ампули або флакони і зберігають при 2—8 °С. Основний спосіб застосування вбитих вакцин — підшкірні ін'єкції.

Приклади інактивованих вакцин наведено у розділі 5.1.

6.9.1.2. Вакцини з клітинних компонентів патогенних мікроорганізмів. Полісахаридні вакцини. Полісахариди, або глікани визначають антигенну специфічність ряду збудників інфекційних захворювань. Такими є *менінгококова* і *пневмококова* вакцини. Вакцинні штами вирощують на рідких поживних середовищах, клітини сепарують, промивають водою і капсульний матеріал екстрагують для переведення полісахариду у водний розчин. Якщо глікан накопичується і в культуральній рідині, то його можна виділити в чистому вигляді.

Із водних розчинів менінгококові полісахариди осаджують катіонним ПАР — бромідом гексадецилтриметиламонію, пневмококові — етанолом.

Додатково очищувати такі препарати можна обробленням водних розчинів тими самими реагентами.

Менінгококові і пневмококові полісахаридні вакцини, як правило, є полівалентними. Менінгококові вакцини містять зазвичай чотири типи глікану, пневмококові — 23 типи (відомо понад 80 сероварів пневмококів). Очищені полісахариди з наповнювачем (лактозою) рекомендовані як вакцинні препарати.

Полісахаридний Vi-антиген із *Salmonella typhi* (штам Ty2) входить до складу черевнотифозної спиртової вакцини. У 1 мл такого препарату міститься $5 \cdot 10^8$ клітин *S. typhi* і 400 мкг Vi-антигена. Вакцину вводять підшкірно.

У США виготовляють полісахаридні вакцини з деяких видів *Pseudomonas* (зокрема *P. fluorescens*).

Рибосомальні вакцини. Рибосоми прокаріот містять приблизно 60 % РНК і 40 % білка, у еукаріот відповідно — 55 і 45 %. У стаціонарній фазі росту бактеріальна клітина містить 10^4 рибосом, їх кількість найвища в експоненційній фазі. Вперше рибосомальний препарат з авірулентного штаму *Mycobacterium tuberculosis* одержали А.С. Юманс та Р.П. Юманс у 1965 р. Рибосоми у чистому вигляді не застосовують як вакцини, проте збагачені ними полісахаридні та інші антигенні препарати використовують на практиці. Найвідоміший препарат «Рибомуніл D-53», що випускається у Франції. Він містить рибосоми з клітин *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *S. pyogenes* та *Haemophilus influenzae* з додаванням протеоглікану *S. pneumoniae*. «Рибомуніл D-53» рекомендують для профілактики захворювань дихальної системи і лікування ринітів, риносинуситів і ринофарингітів.

Відомий препарат у вигляді екстракту з клітин *Streptococcus mutans*, збагачений рибосомами. Схема його одержання така:

— дезінтеграція 100 г нативних клітин *S. mutans* (серотип g) за допомогою скляних кульок у 100 мл 10^{-2} М фосфатного буфера (рН 7,4) з 10^{-2} М $MgCl_2$ (ФМБ) та 3 мкг/мл ДНК-ази;

— незруйновані клітини та їх уламки відокремлюють двократним центрифугуванням (по 10 хв при 27 000 та 47 000 g);

— рибосоми відмивають 5 разів у ФМБ-буфері упродовж 2,5 год при 250 000 g з наступним двократним центрифугуванням по 20 хв при 47 000 g, а потім фільтрують через стерильний мембранний фільтр (0,45 мкм) і одержують препарат-екстракт *S. mutans*, збагачений рибосомами.

6.9.1.3. Вакцини з продуктів метаболізму патогенних мікроорганізмів. Токсини й анатоксини. Окремі види патогенних мікроорганізмів утворюють екзотоксини, які можуть бути віднесені до «факторів агресії». Це високополімерні термолабільні білки — продукти матричного синтезу, які виділяються в навколишнє середовище. У разі потрапляння в організм людини екзотоксини спричиняють серйозні пошкодження функцій певних тканин або систем. Наприклад, правцевий токсин належить до нейротоксинів, що порушують функцію нервово-м'язового апарата; гангренозні токсини є некротоксинами, що індукують пошкодження тканин; екзотоксини певних штамів кишкової палички ушкоджують кишечник тощо. За механізмом дії на тканини вони подібні до ферментів. Деякі токсини застосовують для діагностики певних захворювань.

Оброблення екзотоксинів формаліном спричиняє їх повне знешкодження та збереження антигенних властивостей. Знешкоджені токсини називаються *анатоксинами*, або *токсоїдами*. Їх використовують для одержання антитоксичних сироваток (глобулінів). Стадії технології отримання екзотоксинів:

- культивування відповідного штаму патогенного мікроорганізму на відповідному поживному середовищі і за оптимального режиму (рН, температура, аерація або анаеробіоз, тривалість вирощування), інактивація клітин формаліном при 37—40 °С;

- відокремлення клітин від анатоксинмісної культуральної рідини;

- очищення, концентрування, додавання адсорбенту;

- фасування, пакування.

Як адсорбенти зазвичай використовують неорганічні речовини — гідроксид алюмінію, фосфат алюмінію, фосфат кальцію тощо, які створюють депо анатоксинів в організмі у разі їх введення. Завдяки використанню адсорбентів вдається підвищити ефективність імунізації.

Очищені адсорбовані анатоксини — це рідкі препарати-суспензії, що розшаровуються на білий, світло-коричневий або жовтуватий осад і прозору надосадкову рідину. У медицині використовують такі анатоксини: ботуліновий, гангренозний, дифтерійний, стафілококовий, правцевий.

6.9.1.4. Вірусні вакцини. Вірусні вакцини також поділяють на живі та інактивовані. Для виготовлення обох типів вірусних вакцин необхідно накопичити вірусний матеріал (віріони) з використанням курячих ембріонів або культури тканин із нирок мавп, курячого ембріона, диплоїдних клітин людини. Так, вакцинний авірулентний вірус грипу накопичують в алантоїсній рідині ембріона, яку потім видаляють і центрифугують. Якщо одержують живу вакцину, то вірус суспендують, розводять до потрібної концентрації і піддають ліофільному висушуванню.

Для одержання вакцини проти жовтої лихоманки також уражають курячий ембріон, в нервових тканинах якого накопичується патоген (атенуйований штам 17 D). Подальші етапи технології: гомогенізація ембріона в стерильній воді, центрифугування, ліофілізація вірусовмісної рідини.

Культури тканин, уражені вірусами, вирощують у рідких середовищах, тому вірусний матеріал можна одержати після фільтрації культуральної рідини. Вакцинні штами вірусів зазвичай атенуйовані, тому стадія інактивації відсутня. Винятком із цього правила є вакцини проти сказу та поліомієліту, які не інактивують.

Живі ослаблені вірусні вакцини у вигляді суспензій втрачають свою потенційну активність досить швидко, тому їх зберігають або в замороженому стані, або додають стабілізатори — сахарозу, хлорид магнію. Очищений вірусний матеріал, готовий для одержання вакцин, або готові вірусні вакцини зберігають при -70 °С.

Вірусні вакцини не поєднують в собі різні види вірусів, проте інактивована і жива поліомієлітні вакцини або вбита грипозна вакцина майже завжди містять різні серотипи вірусів.

Живі вірусні вакцини: грипозні інтраназальні для дітей і дорослих (профілактичні), грипозна пероральна для дітей і дорослих (лікувально-профі-

лактична), проти жовтої лихоманки, кору, краснухи, поліомієлітна пероральна.

До інактивованих вірусних вакцин належать: антирабічні суха МІВП і типу Фермі, проти кліщового енцефаліту.

Субодиничні, або розщеплені, вакцини є імуногенними субодиницями (антигенні детермінанти), що складаються з невеликої кількості амінокислот, з'єднаних з білком-носієм. Такі вакцини можна одержувати з кон'югованих або некон'югованих білків вірусних оболонок. Наприклад, субодинична грипозна вакцина містить глікопротеїн-гемаглютинін з одного або кількох штамів вірусу.

Стадії технології одержання гемаглютиніну з грипозних віріонів:

- накопичений в алантоїсній рідині курячого ембріона вірусний матеріал сепарують, піддають мікрофільтрації і мембранному концентруванню приблизно у 50 разів, у разі потреби додатково очищують ультратрифуванням у градієнті густини розчину сахарози;

- концентрований віріонний матеріал обробляють катіонною ПАР і відокремлюють гемаглютиніни ультрафільтрацією з подальшими діалізом і стерилізуючим фільтруванням;

- стандартизують і контролюють субодиничну вакцину (особливо — на відсутність живих грипозних вірусів).

Синтетичні вакцини — різновид субодиничних вакцин, у яких антигени — синтетичні поліпептиди, синтезовані біоорганічним способом. Вони досконаліші й безпечніші, невірулентні, добре зберігаються. Для створення таких препаратів потрібна повна розшифровка антигенних детермінант (епітопів) на поверхні мікробної клітини. Пептиди, що стимулюють імунітет, складаються з окремих амінокислот. Вони індукують вироблення антитіл проти вірусів грипу, ящуру, гепатиту, дифтерійного токсину. Оскільки субодиничним синтетичним вакцинам притаманні слабкі імуногенні властивості, для стимуляції імунної відповіді використовують ад'юванти (англ. *adjuvant* — той, що допомагає). Як ад'юванти використовують гідроксид алюмінію, індиферентні масла тощо, які збільшують антигенні частки й створюють у місці введення депо вакцини. Такі властивості також має мурамова кислота, що міститься у клітинній стінці кишкової палички. Препарати, синтезовані на її основі, підсилюють імуногенність антигенів у вакцині, підвищують секреторну функцію макрофагів.

6.9.1.5. Генно-інженерні вакцини. Технологія одержання таких вакцин базується на перенесенні фрагментів хромосомної ДНК чи плазмід із бактерій або вірусів у клітини інших видів бактерій або дріжджів. Ген, який продукує білок-антиген проти певних хвороб, переносять в організм реципієнта, яким зазвичай є кишкова паличка, сінна бацила, дріжджі. У мікробній клітині відбувається синтез необхідних антигенних детермінант (епітопів), які потім використовують для приготування вакцин.

Таким шляхом досягнута продукція поверхневого антигену вірусу гепатиту В (HBsAg) дріжджовими клітинами. Цей антиген відокремлюють від дріжджів-продуцентів і використовують для одержання вакцини.

Із подібних препаратів найперспективнішими можуть бути рекомбінантні (полівалентні) вакцини, які конструюють на основі великих вірусів. Для

цієї мети зазвичай використовують добре вивчений і безпечний геном вісповакцини. До нього можна ввести кілька генів, що кодують необхідні білки. Одержано рекомбінантні вакцини проти сказу, грипу й гепатиту. Такі препарати забезпечують імунітет проти кількох інфекцій одночасно.

Методами генної інженерії можна одержати полівалентні вакцини проти бактеріальних, вірусних і паразитарних хвороб.

Порівняно з іншими біологічними препаратами (класичними) вакцини, сконструйовані методами генної інженерії, мають ряд переваг: вони безпечні (не містять інфекційної нуклеїнової кислоти), вільні від баластних речовин, стабільні, можуть зберігатися при кімнатній температурі.

Технологія рекомбінантних ДНК (рДНК-біотехнологія) інтенсивно розвивається у цьому напрямку і має майбутнє на шляху створення нових генно-інженерних вакцин, а також білкових імуногенів та інших білків, у тому числі стафілококового білка А і стрептококового білка М.

6.9.2. Діагностикуми

Діагностичні прийоми для виявлення інфекційних захворювань можуть бути зведені до серо-, алерго- та фагодіагностики. Діагностикуми — це антигенні препарати для серодіагностики. Алергодіагностику здійснюють методом алергічних проб з алергенами на людях (на тваринах — в експерименті або за наявності у них інфекційних захворювань). Фаги оцінюють за літичною дією на чутливих клітинах відповідних видів бактерій.

Діагностикуми можуть являти собою вбиті клітини з вираженою чутливістю до специфічних антитіл, а також окремі, добре вивчені антигенні компоненти. Так, у ентеробактерій відомі Н-, О- і Vi-антигени, з яких перший — термолабільний, другий і третій — термостабільні. На цьому базується їх виділення з клітин. Джгутиковий Н-антиген ізолюють за допомогою 0,2 % -го розчину формаліну через добу після його додавання і витримки при 37 °С; О- і Vi-антигени екстрагують при підвищених температурах водою або іншими розчинниками. Такі антигени використовують також і в адсорбованому вигляді на еритроцитах, заздалегідь оброблених таніном або формаліном.

Бактерійні й еритроцитарні діагностикуми використовують відповідно в реакціях аглютинації та гемаглютинації.

Крім наведених діагностикумів, відомі такі:

- діагностикум бруцельозу з убитих фенолом бруцел і зафарбований метиленовим синім;
- грипозний діагностикум у вигляді суспензії інактивованих формаліном або мертіюлятом віріонів з алантоїсної рідини курячих ембріонів;
- діагностикум інактивованого вірусу кліщового енцефаліту (суспензія мозку білих мишей, уражених цим вірусом); еритроцитарний Vi-діагностикум, що містить Vi-антиген *Salmonella typhi*;
- О-діагностикум сальмонельозний, що включає О-антиген із різних груп сальмонел;
- кардіоліпіновий антиген для реакції мікропреципітації для діагностики сифілісу; цей антиген містить три очищених ліпіди: 0,03 % 1,3-дифос-

фатгліцерину (кардіоліпін), 0,27 % фосфатидилхоліну (лецитин) та 0,9 % холестерину в абсолютному етанолі.

6.9.3. Алергени

Алергени за походженням поділяють на мікробні, рослинні і тваринні. Їх використовують для діагностики патологічних процесів, у розвитку яких помітну роль відіграє сенсibilізація макроорганізму відповідним антигеном-алергеном.

Мікробні алергени одержують різними способами:

- нативні алергени — це суспензія вбитих бактерій і розчинних продуктів їх метаболізму;

- очищені алергени — це осаджені і ліофільно висушені термостабільні фракції фільтратів 5–6-добових бульйонних культур бактерій, у яких містяться понад 80 % білків, близько 7 % вуглеводів і до 10 % нуклеїнових кислот.

До бактерійних належать такі алергени: антраксин, бруцелін, дизентерії, дифтеріоїду, лістерійний, малоїн, катаральної нейсерії, лепромін, орнітозний, палички дифтерійної нетоксигенної, кишкової палички, несправжньо-дифтерійної палички, синьогнійної палички, пестин, стафілококові видові, стрептококові видові, токсоплазмін, ентерококовий, альттуберкулін Коха, туберкулін очищений (PPD-Л), туберкулін очищений сухий (PPD), тулярін тощо.

Грибкові алергени зазвичай виділяють із клітин зрілих культур, рідше — з культуральних рідин. Це білково-вуглеводні комплекси, які випускаються в ампулах по 1 мл.

З грибкових алергенів відомі такі: бластоміцин, гістоплазмін, кандидин, кокцидіоїдин, а також алергени з деяких цвілевих грибів (аспергілів, пеніцилів) та дерматофітів.

6.9.4. Бактеріофаги

Бактеріофаги використовують для фаготипування бактерій і з лікувально-профілактичною метою.

Для індикації бактерій виготовляють так звані видові і типові фаги: черевно-тифозні Vi-типові, дизентерійні індикаторні, паратифозні В-типові, сальмонельозний індикаторний, стафілококові типові.

Фаги для профілактики і лікування інфекційних захворювань випускають моно- і полівалентними, їх не можна замінити діагностичними фагами, так само як і діагностичні фаги не можна використовувати замість лікувально-профілактичних. Лікувально-профілактичними фагами є моновалентні стафілофаги, стрептококовий фаг, фаг піоціанеус, фаги протейний і колі-протейний, колі-фаг, полівалентний дизентерійний (рідкий, сухий і в супозиторіях), полівалентні сальмонельозні (рідкий і сухий).

Етапи одержання фагів:

- зараження бактеріофагами чутливих бульйонних культур штамів певних видів;
- лізис бактерійних клітин;

- стерилізаційне фільтрування (фаги проходять через фільтр);
 - тестування фільтратів за еталонними культурами чутливих бактерій;
- У рідкі препарати лікувально-профілактичних фагів додають консерванти.

6.9.5. Пробіотики

Концепція оздоровлення людини та запобігання старінню організму уведенням у харчовий раціон кисломолочних продуктів була висунута російським мікробіологом І.І. Мечниковим майже століття тому.

Практичним втіленням цієї концепції стало застосування ацидофільних лактобацил з терапевтичною метою, започатковане у США у 20-і роки ХХ ст. Вітчизняні дослідники почали вивчати це питання у 50-х роках минулого століття. Найбільший інтерес до пробіотиків з'явився 10—15 років потому, коли широке використання антибіотиків спричинило порушення мікробіоценозів людини та тварин.

У науковому і в повсякденному житті значного поширення набули поняття «пробіотики», «пребіотики», «пребіотичні продукти», «еубіотики».

Термін «пробіотики» в дослівному перекладі означає «для життя». Пробіотики — синонім поняття «еубіотики» — це живі мікроорганізми або ферментовані продукти, які позитивно впливають на здоров'я людини.

Уперше термін «пробіотик» був вжитий Р. Паркером у 70-х роках минулого століття для позначення живих мікроорганізмів, які вводилися у корми тварин для стимуляції росту та набуття стійкості до стресів. Пізніше, у 1989 р. у роботах Фуллера це поняття стало об'єднувати живі мікроорганізми, які надходять до шлунково-кишкового тракту та покращують якість життя хазяїна в результаті нормалізації його мікробної системи.

Більшість спеціалістів і дослідників відносять до пробіотиків-еубіотиків представників нормальної мікрофлори кишечника, біфідобактерії та лактобацили. Їх називають класичними пробіотиками.

Еубіотики поділяють на дві великі групи:

- еубіотики на основі чистих культур мікроорганізмів — пробіотики, симбіотики (препарати, що складаються з 6—8 пробіотиків; від слова «симбіоз») або мультибіотики.
- еубіотики змішаного складу (з додаванням амінокислот, мікроелементів, моно- та дисахаридів тощо) — симбіотики з різними, так званими пребіотичними речовинами.

Функціональна роль еубіотиків різноманітна, проте останнім часом велика увага приділяється підвищенню неспецифічної імунорезистентності.

Останніми роками в практику починають впроваджуватися аутопробіотики, діючою основою яких є штами нормальної мікрофлори, ізольовані від конкретного індивідуума і призначені для корекції його мікроекології.

Вимоги до мікроорганізмів, використовуваних як основа пробіотиків:

- ізольованість із організму тих видів тварин і людини, для яких вони і будуть призначені;
- позитивний вплив на організм хазяїна, підтверджений лабораторними дослідженнями і клінічними спостереженнями;

- за тривалого використання не повинні викликати побічних ефектів;
- високий колонізаційний потенціал, тобто мають зберігатися в травному тракті до досягнення максимальної позитивної дії (бути стійкими до низьких значень рН, жовчних кислот, антимікробних субстанцій, що продукуються ендogenous мікрофлорою; добре адгезуватися до епітелію відповідних слизових оболонок);
- стабільні характеристики як у клінічному, так і в технологічному плані;
- висока швидкість росту і розмноження в умовах, найближчих до таких у кишковому тракті, за їхнього культивування *in vitro*.

6.9.5.1. Технологічні аспекти одержання біфідумбактерину. Перший лікувальний комерційний препарат під назвою «еугалан», що містить живі біфідобактерії, був розроблений у 1956 р. німецькою фірмою «Topfer GmbH». У Німеччині в 1964 р. був створений і перший біфідомісний препарат для дітей — *Lactana B milk*.

Перший вітчизняний лікувальний препарат біфідобактерій «Біфідумбактерин сухий» розроблений у 1972 р. у Московському НДІ епідеміології і мікробіології ім. Г. Н. Габричевського. Відповідно до Фармакопейної статті ФС-42-132 ВР-88 від 08.07.88 р. та Інструкції із застосування «Біфідумбактерину сухого», затвердженій 29.01.90 р., цей препарат являє собою ліофільно висушену в середовищі культивування у флаконах, ампулах чи спресовану в таблетки мікробну масу живих, антагоністично активних штамів *Bifidobacterium bifidum* I, 791, ЛВА-3 чи *B. longum* B379M.

Основні технологічні особливості одержання біфідумбактерину:

- для вирощування виробничого штаму біфідобактерій використовують поживні середовища на основі печінкового бульйону з додаванням хлориду натрію, пептону і лактози;
- біфідобактерії вирощують без доступу повітря;
- для ліофілізації препарату використовують сахарозо-желатинову суміш із додаванням знежиреного молока (30—40 %). Доза сухого біфідумбактерину містить 10^8 — 10^9 живих клітин. Флакони з сухим препаратом містять п'ять доз.

Терапевтичний ефект «Біфідумбактерину сухого» визначають наявні в ньому живі біфідобактерії, яким притаманна антагоністична активність проти широкого спектра патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів.

В Японії у 1990 р. на ринку було понад 50 харчових продуктів, що містять живі біфідобактерії. У Франції за останні п'ять років кількість кисломолочних продуктів, виготовлених із використанням біфідобактерій, збільшилася більш як у три рази і становить 12 % усього обсягу реалізованих йогуртів. Схожі тенденції спостерігаються і в багатьох європейських і північноамериканських країнах.

6.9.5.2. Технологічні аспекти одержання лактобактерину. Пробиотики на основі лактобацил випускаються у вигляді фармакопейних препаратів у різних лікарських формах — таблетки, ампули, свічки, що містять ліофілізовані бактерії («Лактобактерин», «Ацилакт», «Ацитол»), а також у вигляді біологічно активних харчових добавок (сухі чи рідкі закваски ацидофільних лактобацил типу «Наріне») і різних продуктів функ-

ціонального харчування (ферментовані лактобацилами молоко, фруктови, овочеві соки тощо).

На основі заквасок, виготовлених із використанням селекціонованих штамів мезофільних лактобацил (*Lactobacillus fermentum*, *L. plantarum*, *L. casei*, *L. brevis*), розроблено технологію виробництва пшеничного хліба, що перешкоджає розвитку картопляної хвороби. Крім того, використання подібних заквасок, не змінюючи реологічних властивостей тіста, бродильну активність дріжджів, поліпшує якість хліба з пшеничного борошна за рахунок збільшення в ньому вмісту вільних амінокислот, редуруючих цукрів, карбонільних сполук, органічних кислот, амінного азоту та ін.

Для виготовлення ліофілізованих фармакопейних препаратів на основі монокультур лактобацил («Лактобактерин») у Росії найчастіше використовують виробничі штами *L. fermentum* 90 — TC4 і *L. plantarum* ВРАЗ. Показання до застосування «Лактобактерину сухого» такі, як і для «Біфідумбактерину сухого».

Етапи одержання лактобактерину:

— молочнокислі бактерії *L. fermentum* і *L. plantarum* вирощують на середовищах, приготовлених на основі гідролізату молока, солодового екстракту або капустиного відвару з додаванням 1,5 % желатини глибинним способом з перемішуванням, але без аерації при 37 °C;

— проби з реактора відбирають під тиском азоту;

— у процесі культивування добавляють розчин глюкози або лактози, за 8—10 год одержують мікробні суспензії, що містять 10—15 млрд живих клітин в 1 мл;

— перед ліофілізацією в суспензію бактерій добавляють як стабілізатор сахарозу, пептон і обрат молока у кількості 5—10 %;

— ампули з сухим препаратом запаюють під вакуумом, флакони закорковують в атмосфері інертного газу; одна доза сухого лактобактерину містить 6—7 млрд живих клітин; в ампулах може міститись 1—3 дози, у флаконах — до 20 доз.

Штами *Lactobacillus* окремо або в комплексі вводять у йогурти, молочні сніданки, різноманітні напої, десерти, сири, підсолоджене молоко та ін.

Лактобацилам притаманна виражена антагоністична активність і здатність до адгезії, що зумовлює важливу роль цих мікроорганізмів у підтриманні колонізаційної резистентності. Завдяки таким властивостям лактобацили пригнічують ріст і розмноження представників сторонньої мікрофлори, що надходять ззовні, запобігають приживленню останніх, блокуючи рецептори клітин слизових оболонок від адгезинів потенційно патогенних бактерій.

6.9.5.3. Технологічні аспекти одержання колібактерину. Першим вітчизняним пробіотичним препаратом на основі кишкових паличок була «Коліпростокваша», запропонована російським мікробіологом Л. Г. Перетцем у 1931 р. для відновлювальної бактеріальної терапії. Вона являла собою молоко, заквашене живою культурою кишкової палички, виділеної із сухого препарату «Мутафлор», який німецький професор А. Ніссле свого часу надав Л. Г. Перетцу для його лікування. Переконавшись на собі в нешкідливості «Коліпростокваши» навіть за тривалого застосування, Л. Г. Пе-

ретц разом із клініцистами розробив методику її використання для лікування хронічних захворювань травної системи, діарей різної етіології та інших проявів функціональних розладів.

У 1944 р. Л. Г. Перетц ввів у практику варіант штаму кишкової палички *E. coli* M17, ізольованого А. Ніссле з кишечнику людини, яка пройшла курс лікування «Коліпростоквашею». У 1959 р. під керівництвом Л. Г. Перетца були виготовлені перші серії «Колібактерину сухого» ліофільним висушуванням культуральної рідини з біомасою кишкових паличок. В одній дозі цього препарату навіть після 9 років зберігання залишалося до $9 \cdot 10^9$ клітин. У грудні 1960 р. розпочато промисловий випуск «Колібактерину сухого» спочатку у м. Горький (тепер — Нижній Новгород), потім у Москві та інших містах СРСР.

«Колібактерин сухий» і «Біфікол» (суміш спільно вирощених культур *B. bifidum* 1 і *E. coli* M17) призначають дорослим, а також дітям, починаючи з 6-місячного віку для лікування гострих кишкових інфекцій бактеріальної і вірусної природи, для доліковування реконвалесцентів цих інфекцій, хворим колітами, ентероколітами на фоні дисбактеріозу, що виникає внаслідок тривалого живлення чи контакту з антимикробними препаратами різного походження.

Етапи технології одержання колібактерину:

- на початку виробничого циклу відновлюють штам *E. coli* M-17 із стану анабіозу послідовними пересівами на рідких та агаризованих середовищах. Для накопичення біомаси використовують казеїнові середовища з вмістом амінного азоту 200—270 мг%, з додаванням 1,25—2,0 % харчової желатини;

- біомасу накопичують у реакторах при 37 °С в умовах аерації та перемішування за рН 7,2—8,0 і тривалості вирощування 6—7 год; наприкінці культивування концентрація живих клітин у культуральній рідині досягає 35—40 млрд в 1 мл;

- суспензію перед заморожуванням розливають у скляні ампули або заморожують без попереднього фасування (для виготовлення таблеток);

- під час ліофілізації колібактерину до суспензії перед заморожуванням додають 10 % сахарози; препарат зневоднюють у сублімаційних камерних установках під високим вакуумом (до $5 \cdot 10^{-3}$ мм рт.ст.); вологість кінцевого продукту становить 2—4 %;

- для таблетування і виготовлення інших неампульованих форм до сухого напівфабрикату додають лактозу (2 %), тальк медичний (до 2 %), стearат кальцію чи магнію (до 1 %);

- для контролю якості кінцевого продукту визначають кількість життєздатних клітин в одній дозі, а також антагоністичну активність щодо тест-культури — збудника дизентерії Флекснера і Зонне; доза сухого колібактерину повинна містити не менше як 10 млрд живих клітин.

За використання штаму як закваски для молока одержують приємний на смак кисломолочний продукт, що зберігає усі властивості лікарського препарату і пропонується як ефективний пробіотичний засіб у комплексному лікуванні і профілактиці дисбактеріозів.

6.9.5.4. Препарати на основі *Bacillus subtilis*. На фармацевтичному ринку колишнього СРСР було представлено кілька препаратів

на основі *Bacillus subtilis*, відомих під комерційною назвою «Споробактерин»/«Бактисповін», «Бактисубтіл», «Біоспорин» та ін. Основою цих препаратів є різні штами сінної палички, вони використовуються у гастроентерологічній практиці і досі.

На основі *B. subtilis* 2335, трансформованого плазмідною, що контролює синтез інтерферону α -2, створено рекомбінантний пробіотичний штам, який зберігає всі корисні властивості вихідного штаму і характеризується наявністю антивірусних та імуномодуючих властивостей в результаті продукції інтерферону. На моделі тварин продемонстровано, що рекомбінантний пробіотик (комерційна назва — «Субалін») дуже перспективний для використання у медицині та ветеринарії.

Позитивну дію пробіотичних препаратів на основі *B. subtilis* на організм пов'язують із вираженою антагоністичною активністю цих бактерій щодо багатьох потенційних збудників кишкових інфекцій, а також продукуванням ними великої кількості різноманітних (насамперед протеолітичних) ферментів.

Проте вживання людиною (навіть з лікувальною метою) великої кількості живих бактерій і спор *B. subtilis* не може не викликати занепокоєння. Сінна паличка для людини — чужорідний мікроорганізм. Багаторічні спостереження свідчать про здатність представників цього виду бактерій спричиняти харчові токсикоінфекції.

Для запобігання ризику можливих ускладнень у хворих найдоцільнішим є виробництво очищених лікарських препаратів із культуральної рідини сінної палички, які б не містили живих бактерій і спор цього мікроорганізму.

Багато дослідників вважають, що препарати типу «Бактисубтіл», «Бактиспорин», що містять антибіотичні сполуки, слід вивести з категорії пробіотиків для людини і розглядати їх як різновид природних комплексних неочищених антибіотиків.

Такий підхід не виключає можливості використання бактеріальних препаратів на основі сінної палички у сільському господарстві. Деякі штами *B. subtilis* продукують до 70 різноманітних антибіотикоподібних субстанцій, багато різних ферментів і вітамінів. Не викликає сумніву можливість використання препаратів на основі сінної палички для боротьби з хворобами і шкідниками рослин, а також для запобігання псуванню кормових добавок у тваринництві.

КОНТРОЛЬНІ ЗАПИТАННЯ ДО РОЗДІЛУ 6

1. Яка основна перевага мікробного синтезу амінокислот?
2. Охарактеризуйте одно- та двостадійний способи одержання амінокислот.
3. Охарактеризуйте основні етапи одержання препаратів лізину.
4. У чому полягають особливості культивування мікроорганізмів — продуцентів ферментів.
5. Які методи застосовують для виділення та стабілізації ферментів?

6. Які основні етапи одержання ендо- та екзогенних ферментних препаратів?
7. Що означає термін «імобілізовані ферменти»?
8. Які носії використовуються для імобілізації ферментів?
9. Якими методами можна імобілізувати ферменти?
10. Як і для чого використовується мікрокапсулювання?
11. Охарактеризуйте основні етапи одержання ліпосом.
12. Які біосенсиори на основі імобілізованих ферментів застосовуються для аналітичних цілей?
13. Охарактеризуйте основні стадії виробництва оцтової кислоти.
14. Які поживні середовища застосовуються на різних стадіях технологічного процесу виробництва оцтової кислоти?
15. Охарактеризуйте основні компоненти поживних середовищ, використовуваних для біосинтезу молочної кислоти.
16. Назвіть основні стадії біотехнології виробництва молочної кислоти.
17. Назвіть переваги і недоліки глибинного і поверхневого способів виробництва лимонної кислоти.
18. Чому у виробництві лимонної кислоти використовують штами *A. niger*, резистентні до високих концентрацій заліза та інших металів?
19. Порівняйте різні способи очищення лимонної кислоти.
20. На яких стадіях технологічного процесу виробництва лимонної кислоти використовуються декантери, сепаратори, центрифуги, випарні апарати?
21. Які компоненти входять до складу поживних середовищ, використовуваних у виробництві глюконової та ітаконової кислот?
22. Назвіть продуцентів вітаміну B_{12} .
23. Яку функцію в організмі людини виконує ціанкобаламін?
24. Який склад поживного середовища для промислового культивування продуцента вітаміну B_{12} ?
25. Охарактеризуйте основні стадії одержання вітаміну B_{12} за допомогою метаногенних бактерій.
26. Охарактеризуйте мікроорганізми — продуценти рибофлавіну.
27. Які поживні середовища використовуються для промислового культивування продуцентів вітаміну B_2 ?
28. Які основні умови синтезу ергостерину дріжджами?
29. Які стадії одержання ергостерину у виробничих умовах?
30. Для чого здійснюється опромінення дріжджів при одержанні ергостерину?
31. Яку роль відіграють каротиноїди у мікроорганізмів, рослин, тварин?
32. Охарактеризуйте мікроорганізми — продуценти каротину.
33. Які хімічні сполуки є стимуляторами каротиногенезу?
34. Які речовини використовуються як сировина в процесі мікробіологічного синтезу каротиноїдів?

35. Охарактеризуйте основні стадії технології виробництва каротиноїдів з використанням *Blakeslea trispora*.
36. Які етапи має хімічний спосіб одержання вітаміну С?
37. Як одержують *L*-сорбозу?
38. Як умови культивування продуцента впливають на синтез і фізико-хімічні властивості мікробних полісахаридів?
39. Охарактеризуйте основні стадії виробництва ксантану.
40. Які основні шляхи підвищення ефективності технологій мікробних ПАР?
41. Які методи застосовуються для виділення та очищення ПАР?
42. Як одержують високоефективні рекомбінантні штами — надсинтетики ПАР?
43. Охарактеризуйте основні стадії промислового одержання антибіотиків.
44. Як здійснюється попереднє оброблення культуральної рідини, виділення та очищення антибіотиків?
45. Як одержують промислово важливі стероїди?
46. Які мікробні препарати відносять до імунобіологічних?
47. Охарактеризуйте етапи одержання живих та інактивованих вакцин.
48. Які вакцини одержують із клітинних компонентів патогенних мікроорганізмів?
49. Що таке токсини і анатоксини?
50. У чому полягає технологія одержання екзотоксинів?
51. Як виготовляють вірусні вакцини?
52. Що таке синтетичні вакцини?
53. Охарактеризуйте способи одержання алергенів.
54. Для чого використовуються бактеріофаги? Як їх одержують?
55. Дайте визначення понять «пробіотики», «еубіотики», «пребіотики», «симбіотики».
56. Які вимоги до мікроорганізмів, використовуваних як основа пробіотиків?
57. Охарактеризуйте основні стадії одержання біфідумбактерину, лактобактерину, колібактерину.
58. Які існують препарати на основі *Bacillus subtilis*?
59. Чому вживання препаратів на основі *Bacillus subtilis* викликає занепокоєння?

7.1. ВИРОБНИЦТВО МОЛОЧНИХ ПРОДУКТІВ

У наш час виготовлення молочних продуктів є другим за значенням після виробництва алкогольних напоїв харчовим виробництвом, яке базується на використанні мікроорганізмів.

7.1.1. Сири

У процесі виготовлення сиру в молоко вносять культуру бактерій як закваску та інкубують упродовж певного, необхідного для скисання молока, часу, після чого додають фермент для розщеплення білка з метою одержання щільного згустку (так званий сичужний фермент, що синтезується у четвертому відділі шлунка теляти, або протеолітичний фермент, одержаний мікробіологічним синтезом). Утворений згусток відокремлюють від сироватки, вміщують під прес для видалення залишків води й сушать, загорнувши в тканину. Під час дозрівання деяких сортів сиру на поверхні сирних голівок створюються сприятливі для розвитку мікроорганізмів умови.

Фактори, що визначають різноманітність сортів сиру:

- фізіолого-біохімічні властивості використовуваних для закваски мікроорганізмів;
- температура, при якій здійснюється виготовлення сиру;
- наявність вторинної мікрофлори на поверхні сиру.

М'які сири (із вмістом води від 50 до 80 %) поділяються на *дозрілі й недозрілі*.

Недозрілий м'який сир — це продукт, готовий до вживання вже після первинної обробки.

У процесі виробництва поверхню дозрілих м'яких сирів (камамбер або бри) засівають дріжджами й різними видами гриба *Penicillium*. Якщо сир має бути напівтвердим, його прогрівають упродовж короткого часу для зниження вмісту води у згустку до 45 %. Деякі сорти м'яких сирів (наприклад цефіла) мають смак свіжого сиру; сири типу лимбургського вимочують у розсолі, який сприяє розвитку поверхневої дріжджової і бактеріальної мікрофлори.

Тверді сири (cheder), в яких вміст води становить 40 % і менше, можуть мати просту бактеріальну флору.

Деякі сорти твердих сирів різняться тим, що у процесі виготовлення сирну масу засівають спорами цвілі (зазвичай *Penicillium roqueforti*), які починають проростати за доступу повітря після проколювання голівок сиру.

Розвиток пеніцилів усередині сиру надає йому специфічного смаку й аромату, характерного для кожного сорту. Прикладами таких сирів є стилтон, датський голубий, рокфор та горгонзола.

Третій клас твердих сирів, до яких належить грюйгер різниться тим, що під час їх виробництва у закваску додають пропіоновокислі бактерії, наприклад *Propionibacterium shermanii*. Ці бактерії не тільки надають сиру особливого смаку, а й виділяють вуглекислий газ, який, накопичуючись усередині, утворює характерні для таких сортів сиру «вічка». До цього класу належать також швейцарські сири зі своєрідним смаком й ароматом завдяки розвитку поверхневої дріжджової та бактеріальної мікрофлори.

7.1.2. Кисломолочні напої

Хоча технології виготовлення кисломолочних продуктів різняться між собою, вони мають кілька спільних етапів.

I етап — приготування закваскових культур. Для цього використовують виробничі штами мікроорганізмів, що попередньо пройшли перевірку на безпечність і мають клінічно доведений позитивний ефект на організм людини. Штами повинні зберігатися в умовах низьких температур (-4°C або у рідкому азоті) чи бути ліофільно висушеними. Для виготовлення кожної серії продукту потрібно використовувати нову ампулу.

Бажано, щоб виробничим культурам була притаманна здатність до накопичення упродовж 6—18 год біомаси у такій кількості, щоб до завершення процесу концентрація мікроорганізмів була не менше як 10^7 клітин у 1 мл чистого продукту.

II етап — приготування сировини і матеріалів. Сировина і матеріали повинні також проходити ретельну перевірку відповідно до вимог Держсанепідемнагляду. Доцільно використовувати в технологічному процесі сировину і матеріали, піддані високотемпературній стерилізації (140°C упродовж кількох секунд) або стерилізації автоклавуванням чи ультрафільтрацією.

Виробничі штами активно розвиваються в незбираному, знежиреному і згущеному молоці (вміст сухих речовин — не менше як 18—24 %), вміст білка — 3,7—4,0 % (до вихідного молока додається 4 % і більше сухого знежиреного молока). У сировину також вносяться речовини, що забезпечують необхідну в'язкість і текстуру продукту (пектини, агар, крохмаль тощо), — стабілізатори.

Іноді для збільшення в'язкості й щільності згустків готового продукту додають іони кальцію у вигляді цитрату або глютамату. За використання стабілізаторів молоко повільно нагрівається до $50\text{—}70^{\circ}\text{C}$ упродовж 1,5—2 год для їхнього повного розчинення і формування невеличких казеїнових глобул, вкритих жиром.

III етап — заквашування живильної основи. У стерильні ферментатори з молоком вноситься необхідна кількість закваски. Найчастіше закваски вносять у молоко, охолоджене до $40\text{—}42^{\circ}\text{C}$. У процесі заквашування можна контролювати рН, температуру, концентрацію кисню тощо. Зазвичай ферментацію здійснюють до досягнення рН 4,8, після чого продукт без різкого перемішування (для уникнення розрідження згустку) охолоджують до $20\text{—}25^{\circ}\text{C}$ і

розфасовують. При такій температурі утворюється продукт з найкращою в'язкістю та стійкістю згустку.

IV етап — асептичний (стерильний) розлив. Продукт охолоджують з 20—25 °С до 6 °С упродовж 8—10 год, щоб не порушити структуру кисломолочного продукту.

V етап — контроль готової продукції за органолептичними, мікробіологічними та іншими показниками.

7.2. КОНСЕРВУВАННЯ ПЛОДІВ І ОВОЧІВ

Консервування плодів і овочів у розчині солі — найдавніший процес, який базується на ферментативній активності мікроорганізмів. Консервування було відоме ще задовго до появи сучасних методів виготовлення консервів і заморожування. Цей спосіб усе ще використовується в деяких країнах для консервування капусти, олив й огірків. У процесі консервування плоди й овочі послідовно обробляють розсолами з різною концентрацією солі. Кінцева концентрація солі для капусти становить 2 %, а для олив — 18 %. Іноді плоди й овочі потребують попередньої обробки. Оливи, наприклад, містять дуже гіркий фенольний глікозид — олеуропейн, і для усунення гіркоти перед засолюванням їх обробляють розведеним розчином гідроксиду натрію.

У розсолі овочі піддаються послідовному впливу різних мікроорганізмів:

- спочатку відбувається переважний розвиток нативної аеробної мікрофлори, присутньої на поверхні овочів;

- потім розвиток молочнокислих бактерій, які спільно з дріжджами (*Saccharomyces* і *Torulopsis*) здійснюють бродіння з утворенням молочної й оцтової кислот;

- далі спостерігається переважний розвиток дріжджів, оскільки для них створюються сприятливіші умови, ніж для молочнокислих бактерій; бродіння закінчується після вичерпання вуглеводів, хоча й після цього на поверхні розсолу утворюється плівка в результаті розвитку інших видів дріжджів (*Pichia*, *Debaromyces* і *Candida*).

Отже, консервування здійснюється в результаті розвитку (бродіння) нативної природної мікрофлори, присутньої на плодах і овочах. Для забезпечення суворішого контролю за процесом консервування нині розробляються (і вже є певні успіхи) спеціальні закваскові бактеріальні культури (звичай молочнокислих бактерій) для використання у консервуванні плодів і овочів.

7.3. ФЕРМЕНТОВАНІ ПРОДУКТИ, ЗБАГАЧЕНІ БІЛКОМ. БІЛОК ОДНОКЛІТИННИХ

Якщо молоко й овочі переробляються за допомогою мікроорганізмів в основному з метою збереження поживних речовин у продуктах, то в інших традиційних харчових продуктах, одержаних ферментацією, розвиток мікроорганізмів сприяє поліпшенню їх смаку й аромату. При цьому одночасно

з розмноженням мікроорганізмів підвищується вміст білка у готовому продукті. Такі продукти вперше почали виготовляти на Сході. Основою для них є риба або рослинний матеріал (зазвичай соєві боби).

Ферментовані рибні продукти вживаються в їжу в основному тільки на Сході, тимчасом як продукти з ферментованих соєвих бобів популярніші у світі.

До ферментованих продуктів рослинного походження належать різні види *темпі*. Якісно виготовлене темпі являє собою корж з рослинного матеріалу, повністю вкритий зовні й пронизаний усередині білим міцелієм одного з видів цвілевого гриба роду *Rhizopus*. У назві таких продуктів після слова «темпі» вказується назва рослинного матеріалу, використаного для виготовлення даного виду темпі. Наприклад, *темпі кеделе* виготовляється з соєвих бобів (кеделе індонезійською означає соя), *темпі банкрег катъянг* — з арахісу, *темпі ентхое* — з кокосових горіхів.

Етапи технології виготовлення темпі:

- рослинний матеріал замочують у воді, лущать, варять або обробляють паром;

- у сирю масу додають невелику кількість готового темпі для інокулювання *Rhizopus*;

- суміш розміщують у лотках або загортають у бананове листя (якщо темпі виготовляється у домашніх умовах) і витримують до необхідного рівня розвитку міцелію.

Темпі зазвичай не вживають у сирому вигляді, а добре просмажують у кокосовій олії або готують іншим способом. Цей продукт, що містить до 40 % білка, дуже поширений в Індонезії.

В інших країнах використовуються інші способи приготування місцевих ферментованих продуктів. У Японії, наприклад, відомий продукт під назвою *нато*, який одержують обробкою соєвих бобів мікроміцетом *Aspergillus oryzae*.

Традиційна китайська страва *суфу* — м'який сироподібний продукт — виготовляють ферментуванням маси соєвих бобів мікроміцетами, зазвичай роду *Mucor*.

Іншим різновидом цих продуктів є *ангкак*, батьківщиною якого також вважається Китай. Одержують його ферментуванням рису за участю *Monascus purpureus*. У даному разі ферментацію здійснюють для надання рису червоного кольору.

До добре відомих продуктів ферментації соєвих бобів належить соєвий соус. Він був відомий у Китаї упродовж сотень років, а відтіля поширився в інших східних країнах, зокрема в Японії, яка нині є його головним виробником.

Етапи технології виготовлення соєвого соусу:

- соус виготовляють ферментуванням підсоленої суміші з соєвих бобів і пшеничних зерен мікроміцетом *Aspergillus oryzae*, у результаті чого одержують суміш під назвою *коджі*;

- далі коджі вміщують у посудину з сольовим розчином для приготування суміші *моромі*. Необхідно періодично перемішувати масу й підтримувати переважно низьку температуру. Процес виготовлення моромі у більших

резервуарах триває від 8 до 19 місяців. До мікроорганізмів, які беруть участь в одержанні моромі, належать в основному бактерії *Pediococcus soyaе*, дріжджі *Saccharomyces rouxii* і різні види дріжджів роду *Torulopsis*. Іноді ці мікроорганізми додають до маси як закваскову культуру. У результаті мікробного метаболізму моромі збагачується молочною та іншими кислотами, а також етиловим спиртом;

— після завершення бродіння моромі віджимають, а потім розфасовують готовий соєвий соус. Макуху зазвичай використовують на корм тваринам.

Логічним продовженням ідеї збагачення білком за допомогою мікроорганізмів є їх вирощування у великих масштабах і використання біомаси як білкового продукту для людини й кормів для тварин. Уперше ця ідея була реалізована в Німеччині під час першої світової війни через нестачу продовольства. Було налагоджено процес вирощування пивних дріжджів *S. cerevisiae*, що дало змогу замінити 60 % імпортованого продовольства. Дріжджі додавали в основному у супи й ковбасні вироби.

За допомогою харчових дріжджів було зроблено важливий внесок у вирішення продовольчої проблеми у Німеччині під час другої світової війни. У кількох промислових центрах було організовано виробництво особливих штамів харчових дріжджів *Candida arborea* і *Candida utilis*. У 60-і роки XX ст. розроблено технологічні процеси вирощування штамів *Candida lipolytica*, здатних використовувати як джерела вуглецю й енергії *n*-алкани (аліфатичні вуглеводні із нерозгалуженим ланцюгом) нафти. Дріжджі *C. lipolytica* подібні за властивостями до *C. utilis*, проте їм притаманна здатність до асиміляції *n*-алканів.

У цей період було уведено термін «білок одноклітинних» для позначення нового виду харчових продуктів і кормів мікробного походження. Перше промислове виробництво білка одноклітинних на основі *n*-алканів було налагоджено компанією «British Petroleum». Продукт одержав назву «топрин». На жаль, він уже ніколи не зможе виправдати покладених на нього надій у зв'язку зі зростанням цін на нафту. Крім того, компанії не вдалося довести, що топрин не має токсичних властивостей.

Інші дві компанії — німецька «Hoechst AG» та англійська «Imperial chemical industries» — налагодили виробництво білка одноклітинних з використанням як субстрату метану. Англійська компанія організувала промислове культивування метилотрофних бактерій *Methylophilus methylotrophus* на заводі потужністю 75 тис. т продукції на рік. Ці бактерії можуть окиснювати метан, проте для безпеки процесу (суміш метану й повітря вибухонебезпечна) метан спочатку перетворюють хімічним способом у метанол, який використовують як джерело вуглецю й енергії *M. methylotrophus*. Готовий продукт у вигляді гранул одержав назву «прутин».

Нині зльоти й падіння комерційного виробництва білка одноклітинних значною мірою зумовлені ринковою ситуацією у світі. Ріст цін на нафту суттєво знизив інтерес до цих продуктів як джерела дешевого білка порівняно з соєвими бобами й рибним борошном. У колишньому СРСР працювало 86 установок із виробництва білка одноклітинних, на 12 з них основною сировиною для вирощування дріжджів були вуглеводні.

7.4. ХЛІБОПЕКАРСТВО

Хлібопекарство виникло на зорі розвитку людства. Першим хлібом були прісні коржі, випечені із суміші борошна з водою. Точно не відомо, коли вперше тісто було замішано на дріжджах. Основний результат, до якого приводить заквашування тіста, полягає у збільшенні його об'єму завдяки утворенню бульбашок двоокису вуглецю в результаті розщеплення цукру дріжджами. Утворені бульбашки CO_2 залишаються у тісті й надають йому під час випікання характерної структури. Тісто може закваситися й у результаті спонтанного росту дріжджів у суміші борошна й води або у разі додавання до неї збродженого пива.

Нині хлібопекарство й пов'язане з ним масове виробництво пекарських дріжджів є однією з найскладніших галузей промислової мікробіології. Хоча коржі із прісного тіста усе ще випікаються в багатьох регіонах світу, більша частина хліба в промислово розвинених країнах виготовляється з борошна (зазвичай пшеничного), замішаного на воді з додаванням дріжджів, солі, цукру й жиру, останній надає хлібу розсипчастості. Після вимішування тісто підходить при 25°C або вищій температурі, при цьому дріжджі *Saccharomyces cerevisiae* у процесі бродіння розщеплюють цукри на спирт і вуглекислий газ. Деякі цукри, у тому числі додані до тіста сахароза, відразу ж розщеплюються дріжджами. Але крім неї є ще цукри (мальтоза й глюкоза), що вивільняються із крохмалю під дією ферментів α -амілази та β -амілази, які входять до складу борошна й активуються водою. Мальтоза зазвичай зброджується дріжджами у кінці процесу заквашування тіста, коли інші цукри повністю використані.

Хоча основна функція дріжджів у процесі випікання хліба полягає в утворенні CO_2 завдяки зброджуванню вуглеводів борошна, дріжджі сприяють і ряду інших позитивних змін у тісті. Так, під впливом дріжджів змінюється структура й текстура тіста, зумовлена зміною структури глютеніну, основного білка пшениці, в результаті розщеплення внутрішньомолекулярних дисульфідних (S—S)-зв'язків. Продукти дріжджового бродіння змінюють також смак випеченого тіста й трохи підвищують його поживну цінність.

За останні двадцять п'ять років процес хлібопекарства зазнав значних змін, спрямованих насамперед на вдосконалення швидкої машинної обробки тіста. Метою всіх прискорених методів хлібопекарства є скорочення тривалості цього процесу, у зв'язку з чим заквашування тіста здійснюють при вищій температурі (зазвичай близько 35°C), а до тіста вносять більшу кількість дріжджів, у тому числі штамів з високою ферментативною активністю. Інтенсивне перемішування тіста також позитивно впливає на його структуру.

Сучасна хлібопекарська промисловість невіддільна від виробництва пекарських дріжджів. До середини XIX ст. для заквашування тіста використовували тільки пивні дріжджі, які залишаються після варіння пива. Проте зі збільшенням обсягів хлібопекарських виробництв пивних дріжджів стало недостатньо. Для забезпечення потреб хлібопекарства з'явилися спеціалізовані заводи з виробництва пекарських дріжджів. На цих підприємствах спеціально відібрані штами *Saccharomyces cerevisiae* вирощуються в умовах

аерації на поживних середовищах, приготовлених на основі меляси. Масове виробництво пекарських дріжджів повинно здійснюватися у строго контрольованих умовах, щоб можна було щодня забезпечувати хлібопекарські підприємства високоякісними дріжджами з постійною зброджуваною здатністю.

7.5. ВИРОБНИЦТВО СПИРТНИХ НАПОЇВ

Виробництво спиртних напоїв також базується на збродженні цукрів дріжджами *S. cerevisiae*, проте у цьому разі основною вимогою є одержання спирту, а не двоокису вуглецю. Спиртні напої поділяються на три категорії:

- вино й пиво, одержувані збродженням фруктових соку або оцукреного екстракту зерна;
- міцні вина, у які додається спирт;
- спирт, одержуваний перегананням вина або пива.

7.5.1. Пиво

Більша частина пива виготовляється з ячменю, хоча іноді для цього використовують і інші зернові культури.

Основні технологічні стадії виготовлення пива:

- зерна ячменю спочатку осолоджують, тобто пророщують упродовж короткого проміжку часу. Основна мета солодіння — утворення комплексу амілазних ферментів, здатних розщеплювати крохмаль;

- осолоджений ячмінь подрібнюють і змішують з водою при температурі не вище як 67 °С. За кілька годин ферменти розщеплюють довгі ланцюги крохмалю на дрібніші вуглеводні фрагменти, крім того, частково гідролізуються білки і утворені продукти здатні асимілюватися дріжджами;

- отриманий водний екстракт (солодове сусло) звільняють від уламків зерна і варять, додаючи хміль для надання пиву характерного смаку. У процесі варіння сусла з хмелю екстрагуються різні речовини, при цьому відбувається інактивація ферментів і осадження білків;

- до сусла вносять дріжджі *S. cerevisiae*, які здійснюють спиртове бродіння. Під час бродіння відбувається п'ятикратне збільшення біомаси дріжджів;

- інші продукти метаболізму дріжджів значною мірою визначають смак пива. До них належать спирти (аміловий, ізоаміловий та фенілетиловий, які містяться у пиві в концентрації кількох міліграмів на 1 л), коротколанцюгові кислоти (оцтова й масляна), а також їхні ефіри;

- наприкінці ферментації дріжджі видаляють із пива й залишають його для дозрівання на певний період часу.

- після фільтрації і пастеризації готове пиво розливають у тару.

Зазвичай у пивоварінні використовують два типи дріжджів. Для приготування лагерного пива традиційно застосовують дріжджі, які осаджуються під час бродіння на дно ферментера. Ці «низові» дріжджі були вперше виділені у чисту культуру близько 100 років тому датським ботаніком Е. К. Хан-

сеном, який працював у Карлсберзькому інституті у Копенгагені. Вони отримали назву *Saccharomyces carlsbergensis*. Інші дріжджі, використовувані у пивоварінні, піднімаються на поверхню під час бродіння. Ці «верхові» дріжджі класифікують як *Saccharomyces cerevisiae*. Систематики нині не поділяють ці дріжджі на два види, проте у пивоварінні користуються двома різними назвами. Упродовж багатомісячної практики пивоваріння штами пивних дріжджів підбирали емпірично, проте у наш час намагаються змінити генетичну структуру пивних дріжджів відповідно до потреб кожного індивідуального виробника пива.

7.5.2. Технологія виробництва вина

Технологія виробництва вина набагато простіша. Порівняно з виготовленням пива вона мало змінилася за п'ять тисяч років.

Основні етапи виробництва вина: з червоного й білого винограду спеціально виведених сортів вицавлюють сік, який піддають зброджуванню. Донедавна зброджування здійснювалося самовільно нативною мікрофлорою шкірки свіжозібраного винограду. Така природна мікрофлора має кілька різних видів дріжджів, у тому числі й *Saccharomyces*. Нині для зброджування використовують спеціально виведені штами *Saccharomyces cerevisiae*. Дріжджі, які здійснюють перший етап бродіння, пригнічуються утворюваним спиртом. Зброджування виноградного соку відбувається при температурі від 7 до 14 °C. Після завершення процесу бродіння вино фільтрують і розливають у пляшки.

Виробляють вина періодичним або безперервним способом. Під час безперервного процесу у бродильні чани постійно надходить сік і видаляється готове вино, проте таким способом виготовляють тільки дешеві вина. Аналогічно виготовляються вина і з іншої сировини (фруктові вина).

Виробництво рисового вина (*sake*) більше схоже на виготовлення пива, оскільки рис містить крохмаль, а не легкозасвоювані дріжджами вуглеводи, як у виноградному соку.

Етапи процесу одержання *sake*:

- спорами *Aspergillus oryzae* засівають оброблений парою рис, інкують упродовж 5–6 днів при температурі близько 35 °C, в результаті одержують продукт під назвою «коджі»;

- коджі змішують з наступною порцією пропареного рису і вносять дріжджі «*sake*» (один із штамів *Saccharomyces cerevisiae*), закваскова культура має назву «мото»;

- мото зброджує основну частину пропареного рису (моромі) за три тижні.

Саке містить 20 % спирту за об'ємом.

Міцні вина. Зазвичай кріплення вина — це просте додавання відповідної кількості спирту у вино з наступною короткою витримкою і повторним внесенням спирту до необхідної концентрації. Винятком є такі вина, як фіно й херес Амонтільядо, виготовлені в провінції Херес в Іспанії. Після кріплення вони дозрівають за доступу повітря, що сприяє розмноженню поверхневої мікрофлори, представленій різними дріжджами. Продукти метаболічної

активності дріжджів надають вишуканий букет смаку й аромату цим маркам хересу.

Додавання спирту до вина для його зміцнення спочатку використовували з метою припинення процесу бродіння і запобігання інфікуванню. Міцне вино, що містить 15—20 % об. спирту, стійке до мікробної контамінації.

7.5.3. Виробництво напоїв на основі ректифікованого спирту

Виробництво напоїв на основі отриманого із зерна ректифікованого спирту відрізняється від виробництва пива (за винятком самого процесу переганяння) тільки відсутністю стадії варіння. Тому ферменти, що містяться у суслі, продовжують функціонувати під час бродіння, в результаті розщеплюється більше вуглеводів й збільшується кількість утвореного спирту.

Напої на основі ректифікованого спирту різняться характером процесу переганяння. Шотландські *віскі* відганяють у невеликих перегінних кубах типу горщиків, тоді як інші сорти віскі одержують переганянням на ректифікаційних установках безперервної дії. У процесі виробництва багатьох спиртних напоїв зброжена рідина подається у перегінні апарати разом із дріжджами, які також сприяють утворенню характерного смаку й аромату готового напою. Таку саму роль відіграють і сполуки, екстраговані рідиною з деревини бочок, у яких спиртні напої типу віскі й кон'яку витримуються роками.

Етапи технології одержання кукурудзяного віскі (*бурбону*) такі:

- кукурудзу змішують із меншою кількістю жита і осолодженого ячменю й подрібнюють, до суміші додають теплу воду;
- сусло із заторного чана переносять у бродильний чан, в який додають дріжджі;
- після бродіння зброжену суміш перекачують у ректифікаційну установку;
- конденсат збирають у високий бак, а потім витримують кілька років у дубових бочках перед розливом у пляшки.

КОНТРОЛЬНІ ЗАПИТАННЯ ДО РОЗДІЛУ 7

1. Які фактори визначають різноманітність сортів сиру?
2. Яки сири називають м'якими?
3. У чому полягає особливість виробництва дозрілих м'яких сирів?
4. Охарактеризуйте класи твердих сирів.
5. Які основні етапи виготовлення кисломолочних продуктів?
6. Як готують сировину і матеріали для одержання кисломолочних продуктів?
7. Як відбувається процес заквашування молока?
8. Назвіть ферментовані продукти, збагачені білком.

9. У чому полягають основні етапи виготовлення темпі, суфу, соєвого соусу?
10. Що таке «топрин»?
11. Охарактеризуйте історичні аспекти виробництва білка одноклітинних.
12. Яку роль відіграють дріжджі у процесі хлібопечення?
13. Які основні етапи процесу хлібопечення можна виділити?
14. На які категорії поділяються спиртні напої?
15. Охарактеризуйте основні стадії виготовлення пива.
16. Чому технологія виробництва вина вважається простішою порівняно з виготовленням пива?
17. Як одержують рисове вино саке?
18. Як одержують міцні вина?
19. Чим різняться напої на основі ректифікованого спирту?
20. Охарактеризуйте основні етапи технології одержання напоїв на основі ректифікованого спирту.

Використання біотехнологічних методів для вирішення проблем навколишнього середовища, таких як переробка відходів, очищення води, усунення забруднень, становить предмет екологічної біотехнології.

Екологічна біотехнологія — це новітній підхід до охорони й збереження навколишнього середовища за спільного використання досягнень біохімії, мікробіології, генетичної інженерії й хімічних технологій.

У процесі кругообігу забруднювальних речовин в екосистемах величезну роль відіграють мікроорганізми. Крім використання діяльності мікроорганізмів у харчовій, фармацевтичній, хімічній промисловості й у генній інженерії, з'явилася можливість їхнього застосування для переробки відходів життєдіяльності людини. Проте багато створених людиною низькомолекулярних сполук (отрутохімікати, детергенти) і високомолекулярних полімерів виявилися стійкими й дуже повільно розкладаються мікроорганізмами, а деяким з них притаманна біологічна активність: вони виявляють мутагенну, канцерогенну, тератогенну дію, а також порушують структуру клітини.

До речовин, що виявляють канцерогенний, мутагенний ефект, належать: хлорорганічні сполуки — дихлордифенілтрихлорметилметан (ДДТ), поліхлорпірен, поліхлоркамфен, гексахлорбутадиєн; похідні дитіокарбамінової кислоти — цирам, цинеб, тетраметилтіурамдисульфід (ТМТД); похідні карбамінової кислоти — беноміл, піримор, бетанал; похідні сечовини — которан, а також хлорофос, фталофос, базудин, гетерофос, дихлофос, каптан, фолфет, каптофол.

До речовин, що спричиняють резистентність у шкідників, патогенів, бур'янів, належать інсектициди й акарициди — ДДТ, токсафен, ендрин, малатіон, фосмет, хлорофос, араміт; фунгіциди — мідний купорос, каптан, агрозан, додин, фталан, цинеб, родан, фігон.

До речовин, що стимулюють відкладення яєць і розмноження шкідників, належать ДДТ, меркаптофос, диметеоат, метилмеркаптофос.

Деякі речовини, що забруднюють біосферу, за своїм походженням є природними сполуками. Наприклад, компонент деревини лігнін, утворюваний у значних кількостях як відхід целюлозно-паперової промисловості. До небезпечних полютантів (забруднювачів) природного походження належать і багато ароматичних й галогеновмісних вуглеводнів.

8.1. БІОТРАНСФОРМАЦІЯ КСЕНОБІОТИКІВ

Чужорідні речовини (*ксенобіотики*), потрапляючи в організм людини й тварин, піддаються біотрансформації (окисненню, відновленню, гідролізу, кон'югації та іншим процесам) за участю ферментних систем.

Як приклади процесів біотрансформації деяких ксенобіотиків і забруднювальних речовин можна навести окиснення симазину з утворенням канцерогену; окиснення диетиламіну з утворенням канцерогенного продукту в шлунку ссавців; окиснення (епоксидація) альдрину з утворенням токсичного епоксиду альдрину (реакція проходить в організмі хребетних, а також здійснюється багатьма ґрунтовими організмами); відновлення чотирихлористого вуглецю в печінці з утворенням проміжного трихлорметильного радикалу, здатного вступати в реакції окиснення й переводити інші молекули в перекисні сполуки, які ушкоджують печінку; трансформація оксиду миш'яку з утворенням триметильованого похідного миш'яку.

Серед ксенобіотиків, внесених людиною в біосферу, чимала частина належить до похідних нафталіну й саліцилової кислоти. У перетворенні цих сполук бере участь велика кількість ферментів, у тому числі й мікробного походження.

8.2. ОДЕРЖАННЯ ЕКОЛОГІЧНО ЧИСТОЇ ЕНЕРГІЇ. БІОГАЗ

Екологічно чисті джерела енергії не чинять негативного впливу на довкілля, тимчасом як традиційно використовувані джерела енергії — ГЕС, ТЕС, АЕС спричиняють серйозні порушення у навколишньому середовищі. Так, гідроелектростанції є причиною затоплення територій, зміни ландшафту, загибелі біоценозів. Теплоелектростанції забруднюють атмосферу, порушують альгологічний баланс, спричиняють відчуження земель. Атомні електростанції створюють загрозу радіаційного забруднення. Спалювання нафти й газу викликає підвищенням концентрації CO_2 , утворення смогу і, крім того, призводить до зменшення ресурсів нафти й газу.

Екологічно чисту енергію можна одержувати перетворенням сонячної енергії в електричну за допомогою сонячних колекторів, а також з біогазу й мікробного етанолу (біоетанолу).

Біогаз — це суміш, яка зазвичай містить 65 % метану, 30 % вуглекислого газу, 1 % сірководню й незначних домішок азоту, кисню, водню й чадного газу. Енергія, що виділяється у процесі спалювання 28 м³ біогазу, еквівалентна енергії 16,8 м³ природного газу, 20,8 л нафти, 18,4 л дизельного палива. В основі одержання біогазу лежить процес метаногенезу (утворення метану).

Метаногенез — складний мікробіологічний процес, у якому органічна речовина розкладається до діоксиду вуглецю й метану в анаеробних умовах. Мікробіологічному анаеробному розкладанню піддаються практично всі сполуки природного походження, а також значна частина ксенобіотиків органічної природи. В анаеробному процесі метаногенезу виділяють три послідовні стадії, у яких беруть участь понад 190 різних мікроорганізмів.

На *першій стадії* під впливом екстрацелюлярних ферментів ферментативному гідролізу піддаються складні багатовуглецеві сполуки — білки, ліпіди й полісахариди. Разом з гідролітичними бактеріями функціонують і мікроорганізми, які зброджують моносахариди, органічні кислоти.

На *другій стадії* (ацидогенез) у процесі ферментації беруть участь дві групи мікроорганізмів: ацетогенні й гомоацетатні бактерії. Ацетогенні мік-

роорганізми зброджують моносахариди, спирти й органічні кислоти з утворенням H_2 , CO_2 , нижчих жирних кислот, в основному ацетату, спиртів і деяких інших низькомолекулярних сполук. Деградація бутирату, пропіонату, лактату з утворенням ацетату і молекулярного водню відбувається за спільної дії ацетогенних бактерій, здатних до асиміляції H_2 . Гомоацетатні мікроорганізми засвоюють H_2 і CO_2 , а також деякі одновуглецеві сполуки через стадію утворення ацетил-КоА й перетворення його на низькомолекулярні кислоти, в основному на ацетат.

На заключній, *третій, стадії* анаеробного розкладання відходів утворюється метан. Найчастіше метан синтезується через стадію відновлення CO_2 молекулярним воднем. Метаногенні бактерії здатні також використовувати як субстрат для синтезу метану форміат, метанол, метиламін і ацетат.

Метаногенез займає особливе місце і в утилізації відходів. Цей процес дає змогу одержувати біогаз як локальне джерело енергії і використовувати біомасу (відхід) як органічне добриво, захищаючи навколишнє середовище від забруднень. 90—95 % використовованого вуглецю метаноутворювальні бактерії перетворюють на метан і лише 5—10 % вуглецю трансформується у біомасу.

У процесі анаеробної переробки відходів тваринницьких ферм мікрофлора метантенків (анаеробних ферментаторів) формується переважно з мікрофлори шлунково-кишкового тракту даного виду тварин і мікрофлори навколишнього середовища. До мікроорганізмів, які найчастіше беруть участь у цьому процесі, належать *Lactobacillus acidophilus*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Peptostreptococcus productus*, *Bacteroides uniformis*, *Eubacterium aerofaciens*, *Bacteroides succinogenes* і *Ruminococcus flavefaciens*, *Methanobacterium mobile*, *Methanobrevibacter ruminantium* і *Methanosarcina* ssp. Після певного часу функціонування метантенка при відповідному температурному режимі і з використанням постійного субстрату утворюється порівняно стабільний консорціум мікроорганізмів.

Для одержання біогазу можна використовувати відходи сільського господарства, зіпсовані продукти, стоки крохмалопереробних підприємств, рідкі відходи цукрових заводів, побутові відходи, стічні води міст і спиртових заводів. Процес здійснюється при температурі 30–60 °C і рН 6–8.

Аналіз сучасного стану проблем і перспектив одержання біогазу свідчить про те, що анаеробна конверсія органічних відходів у метан є найконкурентоспроможнішою сферою біоенергетики. Основна перевага біогазу полягає в тому, що він є поновлюваним джерелом енергії, і його виробництво буде існувати доти, доки існує життя на Землі.

8.3. ВИРОБНИЦТВО ЕТАНОЛУ

Енергію можна одержувати переробкою на етанол вуглеводів із рослинної сировини. Перспективними для одержання етанолу є такі субстрати, як меляса, картопля, маніока, стебла кукурудзи, злаки, топінамбур (земляна груша). Велику кількість етанолу одержують із гідролізатів деревини або з сульфітних лугів — відходів паперових фабрик. Одержаний спирт можна змішу-

вати з бензином у співвідношенні 1:9 (або навіть 1:4) і використовувати для заправки машин.

Збільшення обсягів виробництва етанолу зумовлено широким його використанням у хімічній промисловості (як розчинник, антифриз, екстрагент, вихідний субстрат для синтезу багатьох розчинників, барвників, лікарських препаратів, мастильних матеріалів, клеїв, мийних засобів, пластифікаторів, вибухових речовин і смол для виробництва синтетичних волокон).

Як рослинну сировину для виробництва етилового спирту використовують маніоку, злаки (особливо кукурудзу), топінамбур, цукрову тростину, ананас, цукрові буряки, сорго. Під час переробки цукрової тростини її ретельно вичавлюють, целюлозу (гніт) відокремлюють від солодкого соку й спалюють (енергію використовують для перегонки), а сік концентрують, стерилізують і піддають бродінню. Цей розчин відокремлюють від твердих компонентів і далі з 8–10%-го спиртового розчину перегонкою одержують етанол. З рідини, що залишилася (стілаж) після відповідної переробки одержують компоненти добрив із виходом 2–3 %. Барду після перегонки використовують як корм для сільськогосподарських тварин.

Прекрасною сировиною для одержання етанолу є маніока, здатна рости й у напівпустельних районах. З 1 т маніоки вдається одержати 80 л етанолу, а з 1 т цукрової тростини — 60–65 л.

У США широко використовують суміш із 6–9 м³ бензину і 1 м³ етанолу (газохол). У 28 штатах функціонують близько 800 станцій, проте для заміни всього бензину, що споживається в США, на газохол потрібно щорічно виробляти 45,6 млрд л етанолу, що значно перевищує обсяги виробництва спирту, у тому числі зі злаків.

Серед інших технічних культур перспективним для виробництва біопалива вважається топінамбур. З інуліну, що міститься в бульбах топінамбура, вирощеного на 1 га, після гідролізу й бродіння можна одержати 30–50 гл ацетонобутанолової суміші. У Франції вперше здійснено заміну 10 % чистого бензину сумішшю метанолу й ацетонобутанолу.

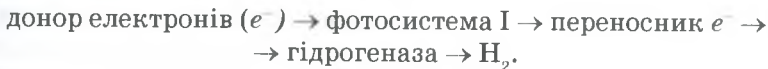
8.4. БІОТЕХНОЛОГІЯ ПЕРЕТВОРЕННЯ СОНЯЧНОЇ ЕНЕРГІЇ

Зменшення запасів корисних копалин висуває на перший план проблему створення й впровадження *поновлюваних джерел енергії* й сировини, одержуваних за допомогою біосистем (рослин і фототрофних бактерій, здатних з високою ефективністю конвертувати сонячну енергію в енергію хімічних зв'язків). Резерви сонячної енергії досить великі: на поверхню земної кулі її потрапляє близько $5 \cdot 10^{20}$ ккал на рік, що у 10 000 разів більше, ніж енергії, одержаної з корисних копалин. Кількість енергії, що падає на загальну площу пустель на Землі ($2 \cdot 10^7$ км²), досягає $5 \cdot 10^{18}$ кВт·год. Якби вдалося освоїти цю енергію з коефіцієнтом корисної дії хоча б 5 %, то рівень світової енергетики зріс би більш як у 200 разів. Навіть якщо майбутнє населення Землі досягне 10 млрд чоловік, то енергія, одержана з земної поверхні, у 10–12 разів буде перевищувати необхідні потреби. Нині проводяться дослідження з освоєння сонячної енергії, що потрапляє на поверхню морів і океанів.

В економічно розвинутих країнах широке застосування біосистем здатне забезпечити понад 15 % виробництва енергії. В останні 10–15 років намічено нові шляхи біотрансформації сонячної енергії з використанням *фотосинтезу*. Окремі мікробіологічні системи характеризуються високою ефективністю фотосинтезу. Так, у результаті окисного фотосинтезу, здійснюваного хлорелою в оптимальних умовах культивування, утворюється 130–140 л O_2 з 1 м² освітлюваної поверхні на добу. Відомо, що однією з особливостей процесу фотосинтезу є зниження ефективності перетворення сонячної енергії за високої інтенсивності світла. Нові технології дають змогу підвищити ефективність фотосинтезу за таких умов. Розробляються системи, здатні ефективно поглинати світловий потік за рахунок збагачення реакційними центрами фотопоглинальних пігментів. Поглинання квантів світла також посилюється із збільшенням швидкості лімітувальної стадії електронного транспорту. Так, проведення процесу при підвищених температурах термофільними мікроорганізмами підвищує ефективність перетворення сонячної енергії за високої інтенсивності світла.

8.5. ФОТОВИРОБНИЦТВО ВОДНЮ

Відомо, що хлоропласти рослин (наприклад шпинату) за присутності штучного донора електронів і бактеріального екстракту, що містить фермент гідрогеназу, здатні продукувати водень:



Гідрогеназа одержує електрони від ферредоксину. Як донори електронів використовуються різні органічні сполуки. Процес здійснюється за опромінення видимим світлом. Ця форма одержання енергії має такі переваги: доступність субстрату фотолізу (води) і джерела енергії (сонячне світло); одержання екологічно чистого водню.

Водень має вищу теплотворну здатність порівняно з вуглеводнями, крім того, одержання водню можна розглядати як поновлюваний процес, який залежить тільки від стабільності виділених хлоропластів. Замість хлоропластів для одержання водню можливе використання і штучних донорів e^- (замість води) та інших поглинальних світло пігментів (замість хлорофілу), наприклад, із ціанобактерій.

Галофільна бактерія *Halobacterium halobium* здатна використовувати світлову енергію за допомогою пурпурового пігменту *бактеріородопсину*, локалізованого у мембрані клітин. Молекула пігменту складається з одного поліпептидного ланцюга, зв'язаного із світлочутливою молекулою ретиналю. Під впливом сонячного світла конформація пігменту змінюється, що супроводжується перенесенням протонів через мембрану, тобто пігмент діє як протонний насос. Молекули бактеріородопсину розміщені у мембрані тріадами, і перекачування протонів через мембрану забезпечує створення електрохімічного градієнта протонів ($\Delta \mu_{H^+}$).

Розпочато дослідження перенесення молекул пігменту у штучні системи підвищення ефективності їхнього використання. Так, фізіологічно активні бактерії *H. halobium* вміщують у невеликі водойми з високою концентрацією NaCl та інших мінеральних солей для запобігання біозабрудненню. У деяких штабів галобактерій бактеріородопсин становить близько половини маси ліпідних мембран, і з 10 л бактеріальної культури можна одержати 0,5 мг чистих родопсинів. У таких біомембранах міститься до 100 000 молекул родопсину. Біомембрани фіксують на особливий підкладці, якій притаманні властивості, необхідні для транслокації протонів, проте не інших іонів. Для цього придатні пористі підкладки, насичені ліпідами, які, зливаючись із мембраною, суцільним шаром вкривають поверхню носія. Мембранні фрагменти можна змішувати й з акриламідом з утворенням гелю. Замість створення щільних шарів молекул бактеріородопсину ліпіди можуть утворювати *протеоліпосоми*, які вбудовують у структури, здатні забезпечувати ефективне перекачування протонів.

1.6. ОЧИЩЕННЯ СТИЧНИХ ВОД

Найважливіша проблема екологічної біотехнології — очищення стічних вод. Щорічна витрата води на земній кулі за всіма видами водопостачання становить 3300–3500 км³, при цьому в сільському господарстві — 70 % усього водоспоживання. Для виробництв хімічної, целюлозно-паперової, енергетичної промисловості, чорної й кольорової металургії та побутових потреб населення потрібна також значна кількість води. Більша частина цієї води після її використання повертається в ріки й озера у вигляді стічних вод.

На сучасному етапі раціонального споживання водних ресурсів можна досягти ефективнішим використанням і відтворенням ресурсів прісних вод, розробленням нових біотехнологічних процесів, що запобігають забрудненню водойм, а також мінімізують споживання свіжої води.

Забруднення поверхневих і підземних вод бувають таких типів:

- механічне, що супроводжується підвищенням вмісту механічних домішок і належить до поверхневих видів забруднень;
- хімічне, зумовлене присутністю у воді органічних і неорганічних речовин токсичної й нетоксичної дії;
- біологічне, пов'язане з наявністю у воді різноманітних патогенних бактерій, грибів і дрібних водоростей;
- радіоактивне;
- теплове.

Основними джерелами забруднення й засмічення водойм є недостатньо очищені стічні води промислових і комунальних підприємств, великих тваринницьких комплексів, відходи розробок корисних копалин (води шахт, рудників), викиди водного й залізничного транспорту, хімічні речовини інтенсивного рослинництва (пестициди, мінеральні добрива) тощо.

Стічні води содових, сульфатних, азотно-тукових заводів, збагачувальних фабрик свинцевих, цинкових, нікелевих руд містять кислоти, луги, іони важких металів. Стічні води нафтопереробних, нафтохімічних заводів, під-

приємств органічного синтезу містять різні нафтопродукти, аміак, альдегіди, смоли, феноли й інші шкідливі речовини. Внаслідок окисних процесів знижується вміст у воді кисню, погіршуються її органічні показники.

Нафта й нафтопродукти є основними забруднювачами внутрішніх водойм, вод і морів Світового океану. Забруднена нафтою вода стає токсичною і є загрозою для всього живого: 12 мл нафти роблять непридатною для вживання 1 т води.

Шкідливим забруднювачем промислових вод є фенол, що міститься в стічних водах багатьох нафтохімічних підприємств, а також стічні води целюлозно-паперової промисловості. Окиснення деревної маси супроводжується поглинанням значної кількості кисню, що призводить до загибелі ікри, мальків і дорослих риб.

Стічні води з підвищеною радіоактивністю (понад 100 кюрі на 1 л) підлягають захороненню у підземні безстічні басейни й спеціальні резервуари.

Значною мірою забруднюють водойми мийні синтетичні засоби, широко використовувані у побуті, промисловості й сільському господарстві. Пестициди, потрапляючи у водойми, накопичуються у планктоні, бентосі, рибі й по ланцюгові живлення потрапляють в організм людини, негативно впливаючи як на окремі органи, так і на організм у цілому.

Стічні води, які є відходами шкіряної й целюлозно-паперової промисловості, цукрових і пивоварних заводів, підприємств м'ясо-молочної, консервної й кондитерської промисловості, спричиняють органічні забруднення водойм. Нагріті стічні води теплових електростанцій є причиною теплового забруднення, що різко змінює термічний режим, негативно впливає на флору й фауну водойм. При цьому створюються сприятливі умови для масового розвитку у водоймищах синьо-зелених водоростей (так зване «цвітіння води»).

8.6.1. Методи очищення стічних вод

Методами очищення стічних вод є механічні, хімічні, фізико-хімічні та біологічні.

Використання того або іншого методу в кожному конкретному випадку визначається характером і ступенем шкідливості домішок.

Механічні методи. Із стічних вод відстоюванням й фільтруванням видаляють механічні домішки. Грубодисперсні частки залежно від розмірів уловлюються ґратами, ситами. Механічне очищення дає змогу видаляти з побутових стічних вод до 60–75 % нерозчинних домішок, а з промислових — до 95 %.

Хімічний метод. У стічні води додають різні хімічні реагенти, які вступають у реакцію із забруднювачами й осаджують їх у вигляді нерозчинних осадів. Хімічне очищення зменшує кількість нерозчинних домішок на 95, а розчинних — на 25 %.

Фізико-хімічні методи. Використовують їх для видалення тонкодисперсних і розчинених неорганічних домішок, а також з метою розкладання органічних речовин, які важко піддаються окисненню. В арсеналі таких методів — електроліз, окиснення, сорбція, екстракція, іонообмінна хроматографія, ультразвук, високий тиск та ін.

Біологічний метод. Він базується на використанні закономірностей біохімічного й фізіологічного самоочищення рік та інших водойм. Для очищення стічних вод використовують біофільтри, біологічні ставки й аеротенки.

У біофільтрах стічні води пропускають через шар грубозернистого матеріалу, вкритого тонкою бактеріальною плівкою, яка й забезпечує інтенсивне біологічне окиснення. У біологічних ставках в очищенні стічних вод беруть участь всі організми, що населяють водойму. В аеротенках процеси біологічного очищення інтенсифікуються завдяки аерації та перемішуванню.

Стічні води спочатку піддають механічному, а потім хімічному очищенню. Хлорування рідким хлором або хлорним вапном застосовують для видалення хвороботворних бактерій. Для дезінфекції використовують також ультразвук, озонування, електроліз та інші методи.

Аеробний біологічний метод є ефективним для очищення комунально-побутових стоків, відходів підприємств нафтопереробної, целюлозно-паперової промисловості, а також підприємств з виробництва штучних волокон. Слід зазначити, що використання біологічного методу очищення стічних вод дає змогу розкласти відносно прості органічні й амонійні сполуки.

Для очищення стічних вод застосовують і анаеробний процес — метаногенез, що здійснюється в реакторах (метантенках) в основному двох типів: у реакторах без фіксації біомаси й у реакторах з прикріпленою (фіксованою) біомасою. Як підкладка, до якої прикріплюється біомаса, використовують дрібний пісок, окис алюмінію та інші носії. Останнім часом анаеробне метанове бродіння застосовують і для детоксикації стоків. Анаеробні бактерії, крім деградації вуглеводів, ліпідів, білків, нуклеїнових кислот, здатні руйнувати й багато відходів нафтохімічної промисловості, наприклад бензойну кислоту.

Адаптовані асоціації анаеробів деградують ацетальдегід, ацетон, бутанол, етилацетат, етилакрилат, гліцерин, нітробензол, фенол, пропанол, пропіленгліколь, кротонову, фумарову й валеріанову кислоти, вінілацетат, парафіни, синтетичні полімери й багато інших речовин.

8.6.2. Осади міських стічних вод та їх використання

Залежно від ступеня обробки осад (відстій) міських стічних вод поділяють на *первинний* (неопрацьований), що складається із твердих речовин; *вторинний* — тверді речовини, що виділяються після вторинного відстоювання, або осад з біофільтрів очисних споруд; *третинний* — результат третинного відстоювання стічних вод (вапно й глина); *осад, що перегнив в анаеробних умовах*.

До висушування осад містить велику кількість води (до 95 %). Після деякої стабілізації осаду, що досягається його зброджуванням, вміст твердих речовин становить 30 %.

Вміст органічних речовин у міських стічних водах коливається від 50 % у перегнилому твердому залишку до 70 % у неопрацьованому осаді. Хімічний склад типових осадів може бути охарактеризований так, %: азот (N) — до 2, фосфор (P_2O_5) — 4, калій — до 0,5. У невеликих кількостях виявлені Cd, Cu, Ni, Zn, Hg і Pb. Енерговміст неопрацьованого відстою становить

близько 16 284 кДж/рік. Проте практичне використання осадів як палива неефективне через високий вміст у них води — енергія, яка буде виділятися у процесі згорання, буде витрачатися на видалення води. Спалювати осад можна лише після їх висушування.

КОНТРОЛЬНІ ЗАПИТАННЯ ДО РОЗДІЛУ 8

1. Що є предметом екологічної біотехнології?
2. Які речовини проявляють канцерогенний і мутагенний ефект?
3. Що означає поняття «ксенобіотики»?
4. Які приклади процесів біотрансформації ксенобіотиків можна навести?
5. Якими шляхами можна одержувати екологічно чисту енергію?
6. Що таке біогаз?
7. Який процес лежить в основі одержання біогазу?
8. Охарактеризуйте три стадії анаеробного процесу метаногенезу.
9. Які порушення у навколишньому середовищі спричиняють гідро-, тепло- та атомні електростанції?
10. З яких мікроорганізмів формується мікрофлора метантенків?
11. Які субстрати є перспективними для одержання етанолу?
12. Які проводяться дослідження з освоєння сонячної енергії біосистемами?
13. Які переваги одержання енергії конверсією біомаси у водень?
14. Як використовує світлову енергію галофільна бактерія *Halobacterium halobium* і яке її застосування у практиці?
15. Охарактеризуйте методи очищення стічних вод.



ОСНОВНІ ПОНЯТТЯ ГЕНЕТИЧНОЇ ІНЖЕНЕРІЇ

Важливою складовою сучасної біотехнології є генетична інженерія. **Генетична інженерія** — це керування генетичним апаратом організмів введенням чи видаленням специфічних генів за допомогою техніки сучасної молекулярної біології (www.nbiar.vt.edu).

На відміну від звичайної селекції, яка упродовж тривалого часу випробовує безліч комбінацій генів, генетична інженерія дає змогу вводити в генетичний апарат об'єкта один ген чи групу генів, відповідальних за прояв корисної ознаки. Такий підхід значно прискорює досягнення необхідного результату.

Генна інженерія як новий напрям біотехнології виникла на початку 70-х років ХХ ст. Її становленню сприяло відкриття ферментів, названих *рестрикційними ендонуклеазами*, чи *рестриктазами*. Ці ферменти здатні розпізнавати певну послідовність нуклеотидів двоспіральної ДНК і розщеплювати її фосфорнодієфірні зв'язки обох ланцюгів з утворенням фрагментів ДНК. На сьогодні виділені рестриктази здатні розпізнавати понад 150 місць розщеплення ДНК (сайтів рестрикції).

Рестриктази по-різному розщеплюють ДНК: одні вносять розриви по осі симетрії, інші — зі зміщенням з утворенням сходинки. У першому випадку утворюються так звані *тупі кінці*, у другому — *липкі*. Фрагменти з липкими кінцями мають на своїх кінцях односторонні взаємно комплементарні ділянки завдовжки понад 3 нуклеотиди. Такі фрагменти зручні для створення рекомбінантних ДНК.

Рекомбінантні ДНК — це ДНК, утворені об'єднанням *in vitro* (у пробірці) двох чи більше фрагментів ДНК, виділених з різного біологічного матеріалу.

Два фрагменти ДНК різного походження, утворені під дією однієї і тієї самої рестриктази, можуть з'єднуватися між собою з утворенням водневих зв'язків між нуклеотидами комплементарних односторонніх ділянок.

Для з'єднання некомплементарних один одному кінців, використовують так звані *лінкери*, чи перехідники — синтетичні олігонуклеотиди, які містять від 2 до 10 нуклеотидів із сайтів рестрикції. Фрагменти ДНК, одержані за допомогою рестриктаз, «зшиваються» ферментами — *лігазами*.

Далі одержану у пробірці рекомбінантну ДНК треба перенести у живі клітини і забезпечити стабільне підтримання нової генетичної інформації. Це досягається за допомогою так званих векторних молекул.

Векторними молекулами, чи **векторами**, називають молекули ДНК, які використовують для перенесення чужорідної ДНК і забезпечують її реплікацію і, можливо, експресію.

Експресія гена — це прояв генетичної інформації, записаної у гені, у формі рибонуклеїнової кислоти, білка та фенотипової ознаки.

Вектори дають змогу здійснювати введення в клітину додаткової генетичної інформації. Як вектори зазвичай використовують плазмід, бактеріофаги, віруси тварин.

Плазмід — кільцеві позахромосомні ДНК, здатні до автономної реплікації. Останнім часом з'явилися повідомлення про існування в клітинах бактерій лінійних плазмід.

Бактеріофаги — віруси, що інфікують бактерії.

Перші плазмід-вектори було виділено з бактерій. Потім більшість векторів було сконструйовано за допомогою методів генної інженерії відповідно до завдань досліджень.

Векторні молекули повинні відповідати таким вимогам:

- вектор повинен мати ділянку, чутливу до певної рестриктази;
- вектор повинен реплікуватися у реципієнтних клітинах і містити маркерний ген.

Маркерний ген після введення вектора у клітину надає їй ознаки, за якими легко виявляють наявність вектора. Як маркерні гени зазвичай використовують гени стійкості до антибіотиків.

Слід зазначити, що саме включення маркерних генів у рослини викликає занепокоєння у громадськості, оскільки їх продукти можуть бути алергенними та токсичними. На сьогодні розроблено методи видалення маркерних генів із трансгенних рослин.

Генетична конструкція, введена у ДНК генно-модифікованого організму (ГМО), характеризується наявністю трьох ділянок, які виявляють у процесі ідентифікації продуктів, отриманих з використанням ГМО. До них належать: *промотор* — «старт»-сигнал, початок гена, *сам ген* і *термінатор* — «стоп»-сигнал, який визначає кінець гена.

9.1. МЕТОДИ СТВОРЕННЯ ТРАНСГЕННИХ РОСЛИН

У процесі створення трансгенних рослин використовують природний генетичний вектор, яким є плазмід грамнегативних ґрунтових бактерій *Agrobacterium tumefaciens*. Майже всі дводольні рослини, на відміну від злакових та інших однодольних, чутливі до агробактерій.

У генній інженерії використовують в основному плазмід *A. tumefaciens* і *A. rhizogenes*. Ці плазмід (*Ti* — у разі *A. tumefaciens* і *Ri* — у разі *A. rhizogenes*), потрапивши в організм рослини, починають експресувати чужорідні гени (*онкогени*), що супроводжується утворенням пухлин. З метою використання плазмід як векторів учені реконструюють їх заміною онкогенів (так звана *T-ДНК*) на ті гени, які необхідно ввести в рослину. Одним із найпоширеніших способів введення чужорідної ДНК у дводольні рослини є використання *проміжного вектора*.

Основні етапи цього способу такі: *T-ДНК* за допомогою рестриктаз вирізають із плазмід і вводять у вектор (плазмід pBR 322) для клонування в *E. coli*, плазмід з *T-ДНК* розмножують, вбудовують чужорідний ген всередину

Т-області і знову розмножують. Одержану рекомбінантну плазмиду вводять у клітини нативного штаму *A. tumefaciens*, який містить повну Ті-плазмиду. У результаті подвійної рекомбінації між гомологічними ділянками Т-ДНК, частина рекомбінантної плазмиди з чужорідним геном, включиться у Ті-плазмиду, замінивши в ній нормальну Т-ДНК. Бактеріями, що містять Ті-плазмиду з вбудованими генами, уражують рослини.

Метод біологічної балістики (біолістики) на сьогодні один із найефективніших методів трансформації однодольних рослин.

Він має такі етапи: на дрібні частинки золота чи вольфраму (діаметр 0,6—1,2 мкм) напиляються ДНК-вектори, що мають необхідну для трансформування генну конструкцію. Частинки з напиленою ДНК наносяться на целофанову підкладку і вміщуються всередину біолістичної гармати. Стисненням повітрям частинки з величезною швидкістю (300—600 м/с) викидаються з гармати і, розриваючи клітинні стінки, потрапляють до цитоплазми і ядер клітин, розміщених під гарматою. Далі клітини обережно переносять на середовище для подальшого культивування і регенерації.

За допомогою біолістичної гармати було трансформовано такі однодольні рослини, як кукурудза, рис, пшениця, ячмінь.

9.2. ВИКОРИСТАННЯ ТРАНСГЕННИХ РОСЛИН

Основні завдання генної інженерії щодо створення трансгенних рослин у сучасних умовах розвитку сільського господарства досить різноманітні.

Перше місце серед модифікованих рослин займають трансгенні рослини з генами стійкості до гербіцидів. Їх кількість становить понад 70 %. З використанням цих генів одержано трансгенні сою, кукурудзу, картоплю, бавовник та ін.

На другому місці трансгенні рослини, стійкі до комах-шкідників (близько 22 %). Ґрунтова грампозитивна бактерія *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) продукує у процесі споруутворення ендотоксини, названі *Cry-білками*. Їм притаманна селективна інсектицидна дія, проте вони безпечні для ссавців. Слід зазначити, що різні класи білків ефективні у знищенні різних комах-шкідників.

На третьому місці трансгенні рослини, які характеризуються одночасною стійкістю до гербіцидів і комах (7 %). Наприклад, кукурудза стійка до раундапу і до кукурудзяного метелика.

Найменш поширеною поки що залишається група трансгенних культур, стійких до бактеріальних, вірусних і грибних захворювань (менше 1 %).

Введення гена вірусної оболонки дало можливість створити трансгенні форми огірків, кавунів, цукіні, картоплі, стійких до різних вірусів. Нині такі трансгенні рослини проходять польові випробовування.

Активно проводяться дослідження з клонування генів для захисту рослин від грибних хвороб. Одержано трансгенну картоплю, стійку до фітофторозу та фузаріозу, в ДНК якої введено ген стільбенсинтази.

Розроблено способи одержання трансгенних рослин, стійких як до бактеріальної, так і грибною інфекції. Завдяки введенню гена, відповідального

за синтез ферменту, який окиснює глюкозу з утворенням перекису водню, одержано картоплю, стійку як до м'якої гнилі (захворювання спричиняють бактерії роду *Erwinia*), так і до фітофтори.

Відносно недавно відкрито короткі пептиди, багаті залишками цистеїну, дефензини, яким притаманні антимікробні властивості. Нині створюються трансгенні рослини томатів, картоплі, рапсу, моркви, яблуні і груші з геном *rs* дефензинів редьки. Аналогічна робота проводиться з метою створення трансгенної капусти і малини.

Досить перспективними є дослідження з одержання трансгенних рослин, стійких до абіотичних факторів (наприклад до холоду). Так, одержано трансгенні рослини, здатні витримувати упродовж 2 діб низькі температури, згубні для звичайних рослин.

Проводяться також дослідження зі створення трансгенних рослин, що містять білки із заданим амінокислотним складом. Так, нині клоновано гени запасних білків сої, гороху, квасолі, кукурудзи, картоплі.

Перспективним напрямом є створення трансгенних рослин, які несуть гени, відповідальні за синтез вакцин проти різних хвороб. Так, у разі споживання таких сирих плодів і овочів відбувається вакцинація організму. За умови введення гена нетоксичної субодиниці ентеротоксину холери у картоплю і згодовування сирих бульб піддослідним мишам, у останніх утворювалися антитіла до холери. Такі «їстівні» вакцини можуть стати ефективним, простим і недорогим методом імунізації людей.

На початку 2000 р. трансгенні рослини вирощували у дванадцяти країнах світу. На сьогодні площі, зайняті трансгенними культурами рослин, перевищують 40 млн га.

9.3. МЕТОДИ СТВОРЕННЯ ТРАНСГЕННИХ ТВАРИН

У 1982 р. на обкладинці одного з номерів журналу «Nature» було вміщено фотографію двох десятиденних мишей. Одна з них одержана введенням у зиготу (запліднену яйцеклітину) гена гормону росту пацюка. Ця трансгенна миша була удвічі більшою за контрольну. Експресія гена пацюка привела до утворення миші-гіганта. Це була не перша спроба введення чужого гена в ембріон, проте саме після публікації статті в тому журналі почалося створення трансгенних, у тому числі й сільськогосподарських, тварин з новими заданими спадковими властивостями.

Відомі два основних методи одержання трансгенних тварин. Перший з них — мікроін'єкція чужорідної ДНК у зиготу — розроблений для одержання трансгенних мишей. Пізніше цей метод стали використовувати і для одержання великих тварин: кроликів, кіз, овець, корів.

На першому етапі такої роботи створюється генетична конструкція з заданими властивостями. Так, якщо дослідник хоче одержати трансгенну тварину, в якій чужорідний ген експресується в клітинах епітелію молочної залози і його продукт виділяється в молоко, то створюється конструкція, яка містить рекомбінантну ДНК *трансгена* і промотор гена казеїну — білка, що входить до складу молока. В ідеальному випадку ця конструкція повинна

працювати тільки в клітинах молочної залози і тільки під час лактації, не спричиняючи побічного впливу на організм трансгенної тварини.

Генна конструкція у складі бактеріального вектора клонується в культурі бактерій *E. coli*, виділяється і переводиться в лінійну форму, яка порівняно з кільцевою ДНК ефективніше вбудовується у геном ембріона.

На наступному етапі генетичну конструкцію вводять ін'єкцією в одноклітинний ембріон — *зиготу*. У зиготі батьківський і материнський генетичний матеріал розміщений у двох *пронуклеусах*, оточених ядерною мембраною. Необхідна кількість копій генетичної конструкції за допомогою мікропіпетки, закріпленої у мікроманіпуляторі, вводиться у чоловічий пронуклеус, розмір якого після ін'єкції збільшується майже удвічі. Потім ембріони пересаджують самці-реципієнту, більша частина з них нормально імплантується і розвивається до народження.

Проте далеко не всі тварини, народжені з таких ін'єкованих зигот, несуть чужорідний ген. Трансгенні тварини зазвичай є «мозаїчними» за введеним геном, тобто містять його не у всіх тканинах організму. Така ситуація потребує відповіді на три запитання: чи був введений трансген у геном? Чи несуть трансген статеві клітини? Чи експресується чужорідний ген?

Якщо конструкція містила промотор одного з білків молока і передбачалася експресія трансгена в клітинах молочної залози, то постає ще одне запитання: чи виділяється трансгенний білок у молоко?

Коли, нарешті, в результаті довгого і складного шляху одержано тварини, що відповідають усім цим вимогам, можна вважати, що робота зі створення лінії трансгенних тварин завершена.

Другий метод одержання трансгенних тварин передбачає використання **ембріональних стовбурових клітин (ЕСК)**.

Вперше лінія ЕСК була одержана з бластоцист миші у 1981 р. *Бластоциста* — це рання стадія ембріонального розвитку, на якій відбувається імплантація зародку у стінку матки. ЕСК клітини є поліпотентними, тобто в культурі вони можуть диференціюватися у клітини всіх типів тканин.

Етапи одержання трансгенних мишей за допомогою ЕСК: ЕСК одержують із внутрішньої клітинної маси бластоцисти миші. Їх трансформують вектором, що несе трансген, культивують і ідентифікують трансформовані клітини. Популяцію трансформованих клітин знову культивують і вводять у бластоцисти, які потім імплантують у матку «сурогатних» матерів. Схрещуючи тварин, що несуть трансген у клітинах зародкової лінії, одержують лінії трансгенних мишей.

За використання ЕСК (на відміну від методу мікроін'єкцій у зиготу) ще на етапі роботи з культурою ЕСК можна визначити, як вбудовано трансген у геном клітини та кількість вбудованих копій, а іноді й перевірити експресію введеного трансгена, що дає можливість вибрати лінію ЕСК з найкращими властивостями. Частина цих клітин можна заморозити в рідкому азоті і зберігати упродовж багатьох років.

Використання ЕСК відкрило нові можливості для створення тварин з додатково введеними або з виключеними (нокаутованими) генами.

За останні кілька років такі клітинні лінії були отримані з бластоцист багатьох інших ссавців. Постійно поповнюється список цих видів: золотавий

хом'ячок (1988), свиня (1990), вівця (1990), корова (1992), кролик (1993), пацюк (1994), норка (1992), мавпа (1995) і навіть людина (1994).

Для птахів таких ЕСК клітин не виявлено, тому використовують метод із рекомбінантними ембріональними клітинами, який має такі етапи: виділяють клітини бластодекти з курячого ембріона, трансформують їх за допомогою ліпосом (ліпосоми — сферичні утворення, оболонки яких складаються із фосфоліпідів, що захищають ДНК від нуклеаз), повторно вводять у підзародкову область відкладених яєць.

Частина отриманих нащадків є химерами, тому що містять невелику кількість клітин донора (*химера* — це організм, який містить клітини, тканини та органи різних організмів). Проте деякі з них, що несуть трансген у клітинах зародкової лінії, під час схрещування можуть дати початок трансгенним лініям птахів.

У 1996 р. в журналі «Nature» було опубліковано сенсаційне повідомлення — методом перенесення ядра клоновано вівцю Доллі.

Етапи клонування трансгенних тварин: ядро яйцеклітини видаляють за допомогою мікропіпетки; культивують епітеліальні клітини молочної залози дорослої особини та індукують їхній перехід у фазу спокою; здійснюють злиття позбавлених ядра яйцеклітин у фазі спокою і клітин молочної залози; вирощують відновлені яйцеклітини в культурі до ранніх стадій ембріогенезу; імплантують їх у матку «сурогатної» матері, де й відбувається їх подальший розвиток.

Ця методика в майбутньому повинна дати можливість клонувати ідеальні тварини-продуценти.

9.4. ВИКОРИСТАННЯ ТРАНСГЕННИХ ТВАРИН

Створення трансгенних тварин може сприяти вирішенню багатьох проблем, з якими людство зіштовхується упродовж усієї своєї історії. Це насамперед продовольча проблема, а також розробка і одержання у достатній кількості лікарських препаратів.

Основним напрямом розвитку технології одержання трансгенних тварин є їх використання як живих «фабрик» (біореакторів) з виробництва біологічних активних речовин (в основному білків), які виділяються у молоко.

Одержання білка зводиться до процесу, відомого людині упродовж тисяч років, — доїння.

Нині як біореактори, здатні виділяти трансгенні продукти в молоко, використовують переважно мишей. Миші є зручним об'єктом для аналізу експресії введеної генної конструкції, на них відпрацьовують методики, які потім використовують для одержання великих трансгенних тварин.

У підмосковних Горках (Росія) живе череда трансгенних овець. Ці тварини, яким був «підсаджений» ген бика, продукують з молоком *хімозин* великої рогатої худоби — фермент, необхідний для виробництва твердого сиру. За старою технологією хімозин одержували з екстрактів тканини шлунка новонароджених телят. Тільки від однієї трансгенної вівці за одну лактацію можна одержати до 30 г ферменту, якого вистачить для одержання 30 т сиру.

У Великій Британії виведено породу корів, молоко яких ідеально підходить для приготування сиру чеддер.

Є розробки з пересадження гена, що кодує білок лактоферин. Цей білок використовують для штучного вигодовування дітей. У природі він є тільки в людському молоці, тому одержати препарат у великих кількостях неможливо через брак відповідної сировини. Виробництво ж лактоферину з молока трансгенних тварин зніме ці проблеми.

Нині активно ведуться роботи з одержання тварин-продуцентів рекомбінантних *імуноглобулінів* людини, які повинні з'явитися уже найближчими роками. Є відомості про розробки, спрямовані на одержання свиней, здатних продукувати *інтерферон* людини, потреби в якому у сучасній медицині достатньо великі.

Трансгенні тварини дають змогу вирішити ще одну проблему, пов'язану з очищенням білків. Навіть якщо після очищення в препараті залишається якісь домішки, то це будуть нетоксичні для людини білки молока.

Після одержання гігантської трансгенної миші були намагання таким самим методом збільшити розміри і більших ссавців, проте ці роботи виявилися невдачливими. Розміри тварин з підвищеним рівнем продукції гормону росту не збільшилися, а самі тварини отримали різноманітні порушення будови кісток. Водночас ці роботи стали підґрунтям для вивчення функціонування чужорідного гена в організмі трансгенної тварини і знайшли застосування в створенні здатних до швидкого росту трансгенних риб і швидкого набору маси м'ясних порід.

Крім того, трансгенні тварини почали активно використовувати як генетичні моделі з метою вивчення спадкових захворювань людини, розроблення методів генної терапії і створення «банку» органів тварин для пересадження людині.

9.5. ОДЕРЖАННЯ ІНСУЛІНУ

Інсулін — гормон підшлункової залози, який бере участь у регуляції вуглеводного обміну і підтримує нормальний рівень цукру в крові. Недостача цього гормону в організмі призводить до одного з найтяжчих захворювань — цукрового діабету. Нині цукровий діабет є третім захворюванням (після серцево-судинних захворювань і раку), що спричиняє найвищу смертність на планеті.

Інсулін — невеликий глобулярний білок, що містить 51 амінокислотний залишок і складається із двох поліпептидних ланцюгів, з'єднаних між собою двома дисульфідними містками. Синтезується він у вигляді одноланцюгового попередника — препроінсуліну, що містить кінцевий сигнальний пептид (23 амінокислотних залишки) і 35-ланковий сполучний пептид (С-пептид). За видалення сигнального пептиду в клітині утворюється проінсулін з 86 амінокислотних залишків, у якому А- і В-ланцюги інсуліну з'єднані С-пептидом, що й забезпечує їм необхідну орієнтацію під час замикання дисульфідних зв'язків. Після протеолітичного відщеплення С-пептиду утворюється інсулін.

Відомо кілька форм цукрового діабету. Найважча форма, для лікування якої хворому необхідний інсулін (інсулінзалежна форма захворювання), спричинена вибірковою загибеллю клітин, здатних синтезувати цей гормон (клітини острівців Лангерганса у підшлунковій залозі). Форма цукрового діабету, що не потребує лікування інсуліном, зустрічається частіше і з нею можна упоратися за допомогою відповідних дієт і режиму.

Зазвичай підшлункова залоза великої рогатої худоби й свиней не використовується у м'ясній і консервній промисловості, а постачається у вагонах-рефрижераторах на фармацевтичні підприємства, де здійснюють екстракцію гормону. Для одержання 100 мг кристалічного інсуліну необхідно 800—1000 кг вихідної сировини.

Синтез обох ланцюгів і з'єднання їх дисульфідними зв'язками для одержання інсуліну був здійснений у 1963—1965 рр. колективами дослідників США, Китаю та Німеччини. Данська компанія «Novo Industry» розробила метод перетворення інсуліну свині на інсулін людини заміщенням 30-го залишку аланіну у В-ланцюгові на залишок треоніну. Одержані інсуліни не відрізнялися за активністю та тривалістю дії.

Роботи з генно-інженерного одержання інсуліну розпочалися кілька десятиліть тому. У 1978 р. з'явилося повідомлення про одержання штаму кишкової палички, яка продукувала щурячий проінсулін (США).

У цьому самому році було синтезовано окремі ланцюги людського інсуліну за допомогою експресії їхніх синтетичних генів у клітинах *E. coli*. Кожен з одержаних синтетичних генів добудовувався до 3'-кінця гена ферменту β -галактозидази й вводився у векторну плазмиду (pBR322). Клітини *E. coli*, трансформовані такими рекомбінантними плазмідами, синтезували гібридні (химерні) білки, які містили фрагменти β -галактозидази і А- або В-пептид інсуліну, приєднаний до ферменту через залишок метіоніну. У процесі обробки химерного білка бромціаном пептид звільняється, проте досягти замикання дисульфідних містків між утвореними ланцюгами інсуліну було важко.

У 1981 р. вдалося синтезувати ген-аналог проінсуліну — міні-С-проінсулін, у якому 35-членний С-пептид було замінено на сегмент із шести амінокислот: Арг—Арг—Глі—Сер—Ліз—Арг і показано можливість його експресії у клітинах *E. coli*.

У 1980 р. У.Гілберт із співробітниками виділили мРНК інсуліну з пухлини β -клітин підшлункової залози пацюка й за допомогою зворотної транскриптази одержали з неї комплементарну ДНК (кДНК). Одержану кДНК вбудували у середню частину гена пеніцилінази плазмиди pBR322 *E. coli*. Рекомбінантна плазміда містила інформацію про структуру проінсуліну. У результаті трансляції мРНК у клітинах синтезувався гібридний білок, який складався з послідовностей пеніцилінази і проінсуліну. Проінсулін вищеплювали з такого білка обробкою трипсином.

У 1978 р. здійснено синтез двох структурних генів, що кодують синтез нейропептидів: *лейцин-енкефаліну* й *брадикініну*. Синтезований ген лейцин-енкефаліну мав два «липки» кінці. Цей ген з фрагментом природної ДНК, що містить промотор і проксимальну частину гена β -галактозидази *E. coli*, ввели у плазмиду-вектор pBR322, після чого обробили сумішшю рестриктаз — *EcoRI* і *BamHI*. Одержана рекомбінантна плазміда pЕк була трансформована

в клітини *E. coli*. У результаті експресії вбудованого гена бактерія почала продукувати гібридний (химерний) білок, що містить на N-кінці фрагмент β -галактозидази, а на C-кінці — послідовність нейропептиду. За допомогою бромціану химерний білок розщеплювали *in vitro* і одержували активний лейцин-енкефалін.

Аналогічно синтезовано *соматостатин* — гормон гіпоталамуса. Молекула соматостатину складається з 14 амінокислотних залишків. Соматостатин пригнічує виділення інсуліну й гормону росту людини. У Національному медичному центрі «Норе» (Каліфорнія, США) було здійснено хіміко-ферментативний синтез гена завдовжки у 42 нуклеотиди, здатного кодувати соматостатин. Кодуючу соматостатин ділянку ДНК отримано хімічним синтезом із тринуклеотидів. З 52 нуклеотидних пар синтетичного гена 42 пари належали структурному гену гормону, а інші служили для його приєднання до плазміди pBR322, а також до сегмента лактозного оперона (*lac*) з геному *E. coli* або до β -галактозидазного гена. Синтетичний ген соматостатину був вбудований у плазміді pBR322 *E. coli* наприкінці гена, відповідального за синтез β -галактозидази. Між двома цими генами був розміщений кодон метіоніну. Після введення рекомбінантної плазміди в бактеріальну клітину кишкова паличка стала синтезувати гібридний білок, з якого одержували соматостатин обробленням бромціаном. Такий складний спосіб одержання гормону був необхідний, оскільки соматостатин, синтезований у вигляді вільних молекул, швидко деградує під дією бактеріальних протеаз. Перший синтез соматостатину генно-інженерним способом було здійснено у 1977 р. Г. Бойером. Вихід гормону становив 10 000 молекул на одну клітину. Зі 100 г біомаси *E. coli*, вирощеної у ферментері об'ємом 8 л, вдалося виділити 5 мг соматостатину, стільки само, скільки можна виділити зі 100 г овечих мізків.

9.6. СИНТЕЗ СОМАТОТРОПІНУ

Соматотропін (або гормон росту людини, ГРЛ) секретується передньою ділянкою гіпофізу. Уперше з гіпофізу він був виділений і очищений у 1963 р. Нестача соматотропіну призводить до виникнення захворювання, яке називається гіпофізарною карликовістю, з частотою один випадок на 5000 чоловік. ГРЛ є видоспецифічним. Зазвичай його одержують із гіпофізу трупів, проте в недостатній кількості, якої вистачає лише для лікування третини хворих на гіпофізарну карликовість у розвинених країнах. Основними виробниками гормону є Швеція, Італія, Швейцарія й США.

Молекула ГРЛ складається зі 191 амінокислотного залишку. Препарат із трупного матеріалу — це суміш кількох білків, з яких п'ять мають розмір 22 кДа, деякі є димерами, а інші — фрагментами, утворюваними у процесі протеолізу. Лікування таким препаратом призводило до того, що у 30 % хворих проти гормону вироблялися антитіла, які зводили нанівець його біологічну активність.

Враховуючи цю обставину, нині ГРЛ синтезують методами генетичної інженерії в спеціально сконструйованих клітинах бактерій. Синтезований у клітинах *E. coli* білок містить додатковий залишок метіоніну на N-кінці мо-

лекули. Біосинтез ГРЛ зі 191 амінокислотним залишком здійснено у 1979 р. Д. Геделем зі співробітниками. Спочатку клонували дволанцюгову кДНК. Далі розщепленням одержували послідовність, що кодує фрагмент гормону, який не містив перших 23 амінокислоти, а також синтетичний полінуклеотид, відповідальний за синтез ділянки, що потребує ці 23 амінокислоти зі стартовим АТГ-кодоном на початку. Потім два фрагменти поєднували і приєднували до *lac*-промотору й ділянки зв'язування рибосом. Кінцевий вихід гормону становив 2,4 мкг на 1 г біомаси, тобто 100 000 молекул гормону на клітину. Синтезований гормон на кінці поліпептидного ланцюга містив додатковий залишок метіоніну і характеризувався високою біологічною активністю. З 1984 р. після клінічних випробувань компанією «Genentec» (Сан-Франциско, США) було розпочато масштабне виробництво бактеріального соматотропіну.

ГРЛ у клітинах *E. coli* і на культурі клітин тварин одержано у 1982 р. в Інституті Пастера (Париж) і в Інституті молекулярної біології (Москва). Виявилося, що в бактеріальних клітинах можливий синтез аналогів ГРЛ, за допомогою яких вивчали ділянки молекули, важливі для стимулювання росту й процесу гліюкогенезу на молекулярному рівні.

Великий інтерес викликає виділення й синтез поліпептиду, якому притаманна повна біологічна активність *гіпоталамічного рилізінг-фактора соматотропіну* (СТГ-РФ). Введення цього фактора дає змогу компенсувати нестачу соматотропіну. Отже, наявність генно-інженерних СТГ-РФ та ГРЛ є дуже важливим чинником успішного лікування таких станів, як деякі форми діабету, регенерація тканин після опіків та ін. Припускають, що СТГ-РФ можна використати й для збільшення маси свійських тварин, оскільки йому не притаманна видова специфічність, і він здатний стимулювати звільнення гормону росту у тварин.

β-Ендорфін — опіат мозку — пептид, який містить 31 амінокислотний залишок, синтезований у генетично сконструйованих клітинах у 1980 р. групою вчених із Австралії й США. *β-Ендорфін*, синтезований *E. coli*, являє собою гібридний білок із *β*-галактозидазою. Етапи синтезу *β*-ендорфіну такі: одержання шляхом зворотної транскрипції кДНК, що кодує білок-попередник, який містить, крім послідовності *β*-ендорфіну, послідовності АКТГ і *β*-ліпотропіну (*β*-ЛТГ), які потім видаляють. *β-Ендорфін*, одержаний із гібридного білка і ретельно очищений, характеризувався високою біологічною активністю. Він специфічно взаємодівав із антисироваткою проти *β*-ендорфіну. Від *β*-ендорфіну людини генно-інженерний ендорфін відрізнявся за двома амінокислотами, і ці відмінності можна легко усунути на нуклеотидному рівні заміною двох кодонів у ДНК бактеріальної плазміді.

9.7. ОДЕРЖАННЯ ІНТЕРФЕРОНІВ

Інтерферони були відкриті в 1957 р. у Національному інституті медичних досліджень у Лондоні як фактори стійкості до вірусної інфекції. Було встановлено, що клітини тварин, уражені вірусом, виділяють у середовище фактор, який забезпечував новим клітинам стійкість до вірусної інфекції: він

немов би перешкоджав (інтерферував) розмноженню вірусів у клітині, завдяки чому був названий *інтерфероном* (ІФН).

Відомі три групи інтерферонів: α -інтерферони (α -ІФН), утворювані за дії вірусів на лейкоцити; β -інтерферони (β -ІФН), які синтезуються за дії вірусів на фібробласти; γ -інтерферони, які продукують Т-лімфоцити у відповідь на присутність бактеріальних і вірусних антигенів або антисироваток проти поверхневих детермінант лімфоцитів.

β - та γ -інтерферони — глікопротеїни являють собою типові глобулярні білки, причому частка α -спіральних структур становить 40—75 %. У α -ІФН виявлено два дисульфідні зв'язки. Інтерферони є низькомолекулярними видоспецифічними білками, які складаються з 146—166 амінокислотних залишків.

Найдослідженішими з усіх інтерферонів людини є α -ІФН, який кодується більше як 20 генами. γ -ІФН на відміну від гетерогенного класу α -ІФН представлений усього одним індивідуальним білком, який кодується одним геном. Щодо β -ІФН, то на сьогодні виділено тільки один білок, який відповідає β -інтерферону людини — інтерферон β_1 , якому притаманна практично вся противірусна активність, виявлена після індукції фібробластів. Не виключена наявність у геномі кількох генів, що кодують різні β -інтерферони. Інтерферони відповідають за першу лінію оборони проти інфекції.

Інтерферони широко використовуються для лікування різних важких захворювань — гострого вірусного гепатиту, розсіяного склерозу, остеосаркоми, мієломи й деяких видів лімфом. Їх також призначають при лікуванні меланом, ряду пухлин гортані, легенів і мозку.

Оскільки інтерферони є видоспецифічними, необхідно використовувати їх препарати, отримані з клітин людини. Традиційно їх виділяють із крові людини (з 1 л крові можна виділити всього 1 мкг інтерферону, тобто приблизно одну дозу для ін'єкції). Упродовж тривалого часу понад половину світового виробництва інтерферонів забезпечувала Фінляндія (Гельсінкі), а пізніше — Франція. З 1980 р. одна з японських компаній налагодила виробництво лімфобластоїдного інтерферону з лімфобластоїдних клітин. З цією метою культура цих клітин індукувалася вірусом Сендай, після чого ІФН виділяли за допомогою хроматографічних колонок, заповнених моноклональними антитілами проти одержуваного інтерферону. У Швеції лімфобласти вирощували у ферментерах об'ємом 2000 л. Одержані інтерферони очищали за допомогою моноклональних антитіл. Із усіх видів інтерферонів для промислового виробництва найбільш придатним є β -ІФН, оскільки фібробласти, одержувані з тканин плоду, можна підтримувати в культурі клітин.

Наведені методи одержання ІФН характеризуються низьким виходом, високою вартістю й недостатньою чистотою препарату. На сьогодні найперспективнішим методом є біосинтез ІФН генетично сконструйованими мікроорганізмами. Проте використання генно-інженерних технологій для одержання ІФН людини має певні труднощі. У пулі мРНК еукаріотичних клітин вміст ІФН-кодуючих надзвичайно малий — лише близько 0,1 %. Проте кДНК, одержані зворотним транскрибуванням, були клоновані в *E. coli*, що у 1980 р. стало революційною подією в теоретичних і прикладних дослідженнях ІФН. Ген ІФН був вбудований у векторну ДНК, до нього приєднали

бактеріальні регуляторні елементи, що програмують його транскрипцію й трансляцію в бактеріальній клітині.

Встановлено, що ІФН синтезуються в клітині спочатку у вигляді попередників, які містять на N-кінці поліпептидного ланцюга сигнальний пептид. Цей пептид потім відщеплюється, і в результаті утворюється зрілий ІФН з повною біологічною активністю. Бактерії не містять ферментів, здатних відщепити сигнальний пептид з утворенням зрілого білка. Тому у плазміді потрібно ввести тільки ту частину гена, яка кодує ІФН, і видалити частину, відповідальну за утворення сигнального пептиду. Ген ІФН має три ділянки розщеплення рестриктазою *Sau3A1*, одна з яких міститься поруч із сигнальною послідовністю. Неповне розщеплення гена цією рестриктазою дає змогу виділити його фрагмент, який кодує зрілий ІФН, проте без першого цистеїну. Триплет ATG, відповідальний за синтез цистеїну, відщеплюється рестриктазою разом з сигнальною частиною. Для відновлення нуклеотидної послідовності повного гена хімічним синтезом одержано невеликий фрагмент ДНК, що містив даний триплет, а також сусідній з ним триплет ATG — точку ініціації синтезу білка. Цей фрагмент приєднали до ізольованої частини зрілого гена і такий реконструйований ген ІФН ввели в плазмід, щоб з ним поруч була розміщена ділянка ДНК-промотор, яка забезпечує початок синтезу мРНК. Екстрактам із *E. coli*, що містять таку плазмід, притаманна протівірусна активність.

Синтезований генно-інженерним способом ІФН був виділений, очищений, і його фізико-хімічні властивості виявилися близькими до властивостей ІФН, одержаного з крові донорів. Вдалося одержати бактерії, здатні синтезувати до 5 мг інтерферону на 1 л бактеріальної суспензії, яка містить приблизно 10^{11} бактеріальних клітин, що у 5000 разів перевершує кількість ІФН, одержувану з 1 л крові донорів. З використанням генно-інженерних технологій у різних лабораторіях одержано штами бактерій, здатні синтезувати інтерферони α -, β - і γ -типів. Недоліком застосування *E. coli* для одержання β - і γ -інтерферонів є відсутність у цих бактеріях апарату глікозилювання еукаріотичних білків, що призводить до синтезу неглікозильованих молекул. І хоча неглікозильовані β - і γ -ІФН практично повністю зберігають протівірусну активність, ця особливість стримує використання генно-інженерних препаратів у медичній практиці.

Нині гени ІФН клоновані в дріжджах і клітинах вищих еукаріот, здатних здійснювати глікозилювання.

У 1981 р. у США вперше для синтезу лейкоцитарного ІФН людини були використані генетично сконструйовані клітини дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*. Високий рівень експресії гена *LeIF* і заміна бактерій клітинами дріжджів дали змогу збільшити виробництво інтерферону у 10 разів.

Численні дослідження були присвячені хімічному синтезу гена, відповідального за утворення лейкоцитарного ІФН людини, який складається з 166 амінокислотних залишків. Такий ген, який містив 514 нуклеотидних пар (н.п.), синтезований у 1982 р. групою англійських учених. У Росії у 1984 р. здійснено повний синтез гена α -ІФН розміром приблизно 600 н.п. (Інститут біоорганічної хімії під керівництвом М. М. Колосова).

Незважаючи на успіхи, досягнуті в області одержання генно-інженерних

ІФН і їхнього застосування для лікування різних вірусних захворювань, зокрема, тому числі й онкологічних, нині все ще залишається багато невирішених питань. Так, не всі гени інтерферонів ідентифіковано, виявлено нові гени α_1 , мало відомо про гени фібробластного інтерферону (крім гена β_1), до кінця не розшифровано механізми їхнього біосинтезу й взаємодії з іншими речовинами.

Механізм дії інтерферону можна звести до таких основних етапів:

— зв'язуючись з клітинними рецепторами, інтерферони ініціюють синтез двох ферментів: 2',5'-олігоаденілатсинтетази й протеїнкінази за рахунок ініціації транскрипції відповідних генів;

— обидва ферменти виявляють свою активність за присутності дволанцюгових РНК, які є продуктами реплікації багатьох вірусів або містяться в х віріонах;

— фермент 2',5'-олігоаденілатсинтетаза каталізує синтез 2',5'-оліго-1-аденілатів (з АТФ), які активують клітинну рибонуклеазу L , а протеїнкіназа фосфорилує (і тим самим активує) фактор ініціації трансляції IF_2 ;

— у результаті цих реакцій інгібується біосинтез білків й розмноження вірусу (деградація іРНК і рРНК) в інфікованій клітині.

Ймовірні й інші механізми дії ІФН, наприклад, інактивація тРНК, порушення процесів метилювання та ін.

КОНТРОЛЬНІ ЗАПИТАННЯ ДО РОЗДІЛУ 9

1. Що таке генетична інженерія?
2. Які особливості притаманні рестрикційним ендонуклеазам?
3. Охарактеризуйте терміни «рекомбінантні ДНК», «вектори», «маркерні гени».
4. Що таке трансгенні організми?
5. Які ДНК-конструкції використовують для генної модифікації організмів?
6. Як створюють трансгенні рослини?
7. У чому полягає спосіб уведення чужорідної ДНК за допомогою проміжного вектора?
8. Як одержують трансгенні рослини методом біологічної балістики?
9. Які властивості мають трансгенні рослини?
10. Які види генно-модифікованих рослин застосовуються у народному господарстві?
11. Яку роль відіграють Ті-плазмідні у генетичній інженерії рослин?
12. Які методи використовують для одержання трансгенних тварин?
13. Які досягнення генетичної інженерії тварин Вам відомі?
14. У чому полягає сутність методу мікроін'єкцій ДНК?

15. Як здійснюють клонування тварин методом перенесення ядер?
16. Охарактеризуйте будову і властивості білка інсуліну.
17. Охарактеризуйте етапи генно-інженерного одержання інсуліну.
18. Які основні етапи генно-інженерного одержання соматостатину?
19. Охарактеризуйте будову і властивості білка соматотропіну.
20. Які основні етапи генно-інженерного одержання соматотропіну?
21. Що таке інтерферони?
22. Охарактеризуйте методи одержання інтерферонів.
23. Які переваги і недоліки притаманні генно-інженерному способу одержання інтерферонів?
24. Охарактеризуйте механізм дії інтерферонів.
25. У чому полягають переваги використання еукаріотичних клітин для генно-інженерного одержання інтерферонів порівняно з клітинами прокаріот?

10.1. КЛІТИННА ІНЖЕНЕРІЯ РОСЛИН

Клітинна інженерія рослин є важливою складовою сучасної біотехнології. Вона базується на використанні культури клітин, тканин і прогoplastів рослин, а також на явищі *тотипотентності* — унікальної власливості рослинних клітин. Тотипотентність (лат. *totus* — весь, *potentia* — сила) — це властивість клітини реалізувати генетичну інформацію, що забезпечує її диференціювання і розвиток до цілого організму, тобто від клітин, ізольованих з різних тканин рослини, можна регенерувати цілу рослину. Тотипотентність у рослин реалізується у процесі загоєння ран — на раневій поверхні рослин у результаті неорганізованої проліферації (розмноження, поділу) клітин вони ростуть хаотично і відбувається утворення *калуса* (від лат. *callus* — мозоль, товста шкіра).

Метод культивування ізольованих клітин і тканин на штучних поживних середовищах у стерильних умовах *in vitro* дістав назву *культури ізольованих тканин*.

Роль цього методу у біотехнології варто розглядати в трьох напрямках.

Перший напрямок — здатність ізольованих рослинних клітин продукувати цінні для медицини, парфумерії, косметики й інших галузей промисловості вторинні метаболіти: алкалоїди, стероїди, глікозиди, гормони, ефірні олії та ін. Як правило, ці речовини одержують із калусної тканини, вирощеної на щільному (агаризованому) або рідкому (суспензійна культура) поживному середовищі. З використанням клітинних технологій одержують такі медичні препарати, як діосгенін із клітин діоскореї (необхідний для синтезу гормональних препаратів), тонізуючі речовини з клітин женьшеню. Продуктивність клітин у результаті клітинної селекції може значно перевищувати продуктивність цілих рослин. Перевагою такого способу одержання речовин вторинного синтезу є також можливість використання для цього рослин, що не ростуть у наших природних умовах, і одержання продукції впродовж усього року.

Другий напрямок — використання культури ізольованих тканин для розмноження й оздоровлення посадкового матеріалу. Цей метод, названий *мікроклональним розмноженням рослин*, дає змогу одержувати сотні тисяч рослин на рік від однієї меристеми — ділянки тканини, за рахунок якої відбувається ріст.

Третій напрямок — використання ізольованих клітин у селекції рослин, що дає можливість одержувати рослини, стійкі до різних несприятливих факторів середовища: посухи, засолення, низьких і високих температур,

фітопатогенів, важких металів тощо. Цей напрямок також передбачає створення нових рослин злиттям ізольованих протопластів і одержання нестатевих (соматичних) гібридів.

10.1.1. Етапи розвитку культивування ізольованих клітин і тканин рослин

Спроби культивувати ізольовані клітини тканини рослин робилися давно. Можна виділити кілька етапів.

I етап (1892—1902). Німецькі дослідники Х. Фехтінг, С. Рехінгер, Дж. Хаберландт намагалися культивувати в розчині сахарози різні рослинні тканини. Не досягнувши позитивних результатів, ці вчені висловили ряд ідей і гіпотез, що підтвердилися пізніше. Так, Дж. Хаберландт висунув гіпотезу про тотипотентність будь-якої живої рослинної клітини, тобто здатність клітин реалізувати свій потенціал розвитку і давати початок утворенню цілої рослини за певних умов культивування.

II етап (1902—1922). Створено перші поживні середовища для культивування тканин тварин. Ці середовища були природного походження і містили плазму крові та зародкову рідину. Спроби виростити ізольовані рослинні тканини на штучних поживних середовищах з рослинними екстрактами виявилися невдалими, оскільки використовувалися малопридатні для росту клітини і тканини вищих рослин.

III етап (1922—1932). Американський учений В. Роббінс і німецький вчений В. Котте показали можливість культивування на щільних поживних середовищах меристемних шматочків кореня томатів і кукурудзи. Проте через певний час рослинні тканини гинули.

IV етап (1932—1940). Французький учений Р. Готре показав можливість тривалого культивування в умовах *in vitro* рослинних тканин за рахунок періодичного пересіву їх на свіже поживне середовище. Згодом за допомогою цього методу багато рослин було введено в культуру тканин.

V етап (1940—1960). З відкриттям у 1955 р. нового класу фітогормонів — *цитокинінів* дослідники отримали можливість стимулювати поділ клітин шматочка тканини серцевини паренхіми тютюну, позбавленої провідних пучків. Залежно від концентрації і співвідношення стимуляторів росту можна було підсилювати поділ клітин, підтримувати ріст калусної тканини, індукувати морфогенез (процес формування, росту та розвитку органів, тканин і клітин). Було встановлено позитивну дію натуральних екстрактів рослин для підтримання неорганізованого клітинного росту і стимулювання процесів морфогенезу в культурі калусних тканин і клітинних суспензій.

VI етап (1960—1975). Професор Нотінгемського університету Е. Кокінг розробив ферментативний метод одержання ізольованих протопластів із коренів і плодів томату і культивування їх у контрольованих умовах. Співробітники Е. Кокінга здійснили штучне злиття протопластів, що відкрило новий шлях до створення соматичних гібридів. Французький учений Ж. Морель розробив метод мікророзмноження рослин в умовах *in vitro* з використанням меристемної культури і застосовував його для одержання оздоровленого посадкового матеріалу орхідей.

VII етап (1975 р. — дотепер). Триває швидкий розвиток техніки *in vitro*, вивчення біології об'єктів культивування, розробляються методи електрозлиття ізольованих протопластів, методи мутагенезу і клітинної селекції, удосконалюється метод глибинного культивування клітин з використанням ізольованих протопластів і векторів, створених на основі Ti- та Ri-плазмід *Agrobacterium tumefaciens* і *A. rhizogenes*, методи одержання гаплоїдних рослин тощо. Отже, за останні десятиліття зроблено великий крок уперед у розвитку технічних прийомів роботи з ізольованими тканинами і клітинами рослин.

10.1.2. Умови та методи культивування ізольованих клітин і тканин рослин

Необхідною умовою роботи з культурою ізольованих тканин є дотримання суворої стерильності. Всі маніпуляції з ізольованими тканинами здійснюються в асептичних умовах (ламінар-боксі) стерильними інструментами. Стерильності треба дотримувати і під час культивування ізольованих тканин. Рослинні тканини самі по собі можуть стати джерелом зараження: на їхній поверхні завжди перебуває епіфітна мікрофлора. Тому необхідна поверхнева стерилізація ізольованих від рослини фрагментів (*експлантів*). Частину рослини, з якої буде взято експлант, попередньо промивають водою з детергентом і споліскують чистою водою. Потім рослинний матеріал стерилізують у розчинах дезінфікувальних речовин.

Ізольовані клітини і тканини культують на багатокомпонентних поживних середовищах. Нині відома велика кількість різних за складом поживних середовищ, серед яких *середовище Мурасіге і Скуга* найуніверсальніше. Середовища можуть істотно різнитися за складом, проте всі вони повинні обов'язково містити необхідні рослинам макро- і мікроелементи, вуглеводи, вітаміни, фітогормони та їхні синтетичні аналоги. Вуглеводи (завичай це сахароза або глюкоза) входять до складу будь-якої поживної суміші в концентрації 2–3 %. Вони необхідні, оскільки більшість калусних тканин позбавлена хлорофілу і не здатна до автотрофного живлення. Високий вміст нітратів, іонів амонію, калію, фосфату сприяє швидкому росту клітин. У середовище можуть бути додані різні рослинні екстракти (солодовий, дріжджовий, томатний сік).

Як додаткове джерело азоту у складі середовищ використовують амінокислоти або гідролізат казеїну. До складу середовищ включають водорозчинні вітаміни: тіамін, рибофлавін, біотин, пантотенову кислоту, піридоксин, аскорбінову кислоту. Обов'язковими компонентами поживних середовищ є *фітогормони*. До них належать *ауксини*, що спричиняють диференціювання клітин експланта, і *цитокініни*, які індукують клітинні поділи. За зміни співвідношення між цими фітогормонами чи додаванням інших можуть бути спричинені різні типи морфогенезу. Якщо відношення ауксинів до цитокінінів високе, утворюються корені, якщо низьке — паростки.

Природний ауксин у рослинах представлений в основному β -індоліл-3-оцтовою кислотою (гетероауксин, ІОК). Найбільш виражений ефект ауксину виявляється у стимуляції росту. Для практичних цілей у сільському госпо-

дарстві часто застосовують не ІОК, а синтетичні ауксини, оскільки в рослинах вони не руйнуються ІОК-оксидазою.

Дія цитокінінів виявляється насамперед у прискоренні клітинних поділів через посилення синтезу ДНК, РНК і білків. Завдяки цьому сповільнюється старіння клітин і підвищується їхня стійкість до несприятливих факторів середовища.

Для культивування протопластів до складу поживних середовищ вводять *абсцизову кислоту*, яка є антагоністом ауксинів і цитокінінів, тобто протидіє прояву їх активності.

Прискорений ріст рослин, зокрема з клітин калусу, відбувається під дією продуктів обміну речовин гриба *Gibberella fujikuroi*. Ці речовини (терпеноїди), виділені у чистому вигляді, дістали назву гіберелінів. Вони здатні стимулювати не тільки ріст рослин, а і їх цвітіння. Гібереліни належать до умовно статевих гормонів. Наприклад, у гарбузових вони сприяють утворенню чоловічих квіток. Гібереліни безпосередньо впливають на біосинтез ферментів, наприклад α -амілаз та інших гідролаз у насіннях злаків, що проростають. Для практичних цілей найчастіше використовують гіберелову кислоту, яка виробляється у промислових умовах. У складі поживних середовищ гіберелову кислоту використовують для підтримання росту суспензійних культур, а також для індукції утворення пагонів.

Вплив фізичних факторів. На ріст і розвиток рослинних тканин *in vitro* впливають різні фізичні фактори — світло, температура, аерація, вологість.

Світло. Більшість калусних тканин можуть рости в умовах інтенсивного освітлення або в темряві, оскільки вони не здатні до фотосинтезу. Разом з тим світло може бути фактором, що сприяє морфогенезу й активує процеси вторинного синтезу. Як джерело світла використовують люмінесцентні лампи.

Температура. Для більшості калусних культур оптимальною температурою є 26 °С. На відміну від росту культур клітин і тканин індукція морфогенезу відбувається при нижчих температурах (18–20 °С).

Аерація. Для вирощування суспензійних культур велике значення має аерація. Особливо важливим є забезпечення киснем клітин у великих об'ємах ферментерів. У процесі вирощування клітин у малих об'ємах (у колбах) необхідна аерація досягається постійним перемішуванням суспензії.

Вологість. Оптимальна вологість у приміщенні, де ростуть культури, повинна становити 60–70 %.

10.1.3. Культура калусних тканин

Для виробництва біологічно активних речовин використовують калусну тканину, яку одержують поверхневим або глибинним суспензійним культивуванням.

Калусні клітини отримують із фрагментів тканин різних органів вищих рослин, вміщуючи шматочки такої тканини у поживне середовище (пробірки, колби, чашки Петрі). Основною умовою перетворення клітини рослини на калусну є присутність у поживному середовищі двох груп фітогормонів: ауксинів і цитокінінів. Ауксини викликають процес *дедиференціювання*

літини, готуючи її до поділу, а цитокініни забезпечують проліферацію дедиференційованих клітин.

Дедиференціювання — перехід спеціалізованих клітин до проліферації, тобто до поділу і розмноження. Диференціювання — комплекс процесів, що умовляють відмінності між клітинами, тобто утворення спеціалізованих клітин.

Якщо в поживне середовище без гормонів умістити шматочок стебла, іста, кореня (без верхівки) або інший експлант, що містить спеціалізовані диференційовані клітини, то клітини не поділяються і калусна тканина не утворюється. Це пов'язано із нездатністю диференційованих клітин до поділу.

Калусна клітина має свій цикл розвитку і повторює розвиток будь-якої клітини: поділ, видовження і диференціювання, після чого настає старіння і ідмирання клітини. Для уникнення старіння, втрати здатності до поділу і ідмирання калусних клітин первинний калус, який виникає на експлантах, через 4—6 тижнів переносять на свіже поживне середовище.

Калусна тканина *in vitro* зазвичай білого або жовтуватого, рідше світло-зеленого кольору. Темно-коричневе забарвлення з'являється внаслідок старіння калусних клітин і зумовлене накопиченням у них фенолів, які окиснюються до хінонів. Для запобігання утворенню цих сполук у поживні середовища додають антиоксиданти. Калусна тканина аморфна і не має конкретної анатомічної структури, проте залежно від походження й умов вирощування вона може бути різної консистенції — пухкою, середньої щільності, цільною.

Калусні клітини *in vitro* зберігають багато фізіолого-біохімічних властивостей нормальних клітин. Їм притаманна здатність до синтезу вторинних метаболітів. Морозостійкість і здатність до загартовування властиві калусним клітинам, отриманим із морозостійких рослин. Загальним для калусних пористих клітин є стійкість до дії високих температур, осмотично активних речовин, високої концентрації розчинних солей.

Калусні клітини характеризуються властивостями, які не притаманні нормальним клітинам. Вони містять специфічні білки, а кількість білків, характерних для фотосинтезувальних клітин листків, у калусних клітинах значно менша або їх зовсім немає.

Калусні клітини характеризуються значною генетичною гетерогенністю (різна кількість хромосом) і фізіологічною асинхронністю. У результаті виводу з-під контролю організму ріст калусних клітин відбувається неорганізовано, асинхронно і необмежено. За умови перенесення на свіже поживне середовище культура калусної тканини моркви, отримана Р. Готре понад 100 років тому, донині росте в колекції.

Клітинний цикл у калусних клітин триваліший, ніж у рослин, які ростуть у відкритому ґрунті.

Особливістю калусних культур є вікова гетерогенність: у калусній тканині одночасно присутні як молоді, так і старі клітини.

Значні відмінності спостерігаються в енергетичному обміні калусних клітин. Вони споживають менше кисню порівняно з нормальними клітинами, що свідчить про зміну обмінних процесів у бік конструктивного (а не енергетичного) метаболізму.

10.1.4. Суспензійна культура

Для глибинного культивування й одержання суспензійних культур необхідно використовувати лінії клітин, які утворюють невеликі агрегати (по 5—10 клітин). Придатніша для цього калусна тканина пухкого типу, що легко фрагментується на окремі клітини і невеликі агрегати за умови перемішування її в рідкому середовищі. Крива росту калусних клітин має S-подібну форму.

Ріст клітинної популяції у процесі періодичного культивування. Розрізняють такі фази ростового циклу:

— *латентна фаза (лаг-фаза)*, у період якої клітини не розмножуються і не ростуть, але відбувається активний процес поглинання води і поживних речовин;

— *експоненційна фаза* — упродовж цього періоду відбувається експоненційне збільшення кількості клітин у результаті їхнього інтенсивного поділу. Розрізняють ранню і пізню експоненційну фазу. Упродовж *ранньої* експоненційної фази спостерігається ряд цитологічних змін: у клітинах зникає велика вакуоль, відбувається збільшення об'єму цитоплазми, збільшується кількість полірибосом і мітохондрій. Поряд з цитологічними змінами відбувається й активація клітинного метаболізму: збільшується вміст РНК, білка, ДНК, інтенсивність поглинання кисню. Усі ці процеси супроводжуються активним поділом клітин і утворенням клітинних агрегатів. Упродовж *пізньої* експоненційної фази спостерігається сповільнення клітинного поділу, проте розмір клітин збільшується;

— *лінійна фаза* дуже коротка. Питома швидкість росту культури в цій фазі практично постійна;

— *фаза сповільнення росту* (рання стаціонарна фаза) — у цей період середній розмір клітин продовжує зростати, стає помітна гетерогенність клітинної популяції і починається синтез вторинних речовин;

— до періоду *стаціонарної фази* суспензійна культура досягає максимуму сухої ваги. У культуральній рідині накопичуються продукти метаболізму, що пригнічують ріст культури. Для запобігання загибелі клітин суспензійну культуру пересівають (субкультивують) на свіже середовище. У середньому від початку культивування до стаціонарної фази росту минає 21—28 днів.

Тривалість ростового циклу залежить від умов культивування, вихідної концентрації і фізіологічного стану інокуляту, складу й об'єму поживного середовища, видоспецифічності вихідної культури.

10.1.5. Культура протопластів

Створення нових форм рослин можливе завдяки технології одержання та злиття протопластів. Протопласт — це частина клітини, що залишається після видалення клітинної стінки (зазвичай ферментативним або механічним способом).

Для одержання протопластів використовують препарати целюлази і пектинази мікробного походження (продуценти — мікроміцети родів *Myrothe-*

cium, Aspergillus, Trichoderma та ін.), а також з травного соку равлика *Helix pomatia*.

Для виділення протопластів використовують різні тканини рослин, а також калусні і суспензійні культури. Основні етапи одержання, ізоляції і культивування протопластів такі: ізольовані листки молодих рослин стерилізують упродовж 1 хв у 70%-му спирті, а потім упродовж 20 хв у 2%-му розчині гіпохлориту натрію. Після промивання листків стерильною водою видаляють нижній епідерміс і розрізають на дрібні частини. Нарізані фрагменти листків вміщують у чашки Петрі в суміш ферментів пектинази і целюлази. Інкують фрагменти листків у ферментній суміші в темряві або при розсіяному світлі до 15—18 год при температурі 25 °С. Після цього протопласти очищують від епідермісу і листових жилок фільтруванням через капронову тканину. Від ферментів протопласти відмивають триразовим центрифугуванням при 170 g упродовж 2 хв. Відмиті протопласти ресуспендують у поживному середовищі, що містить 13 % маніту, до концентрації $4 \cdot 10^5$ протопластів у 1 мл. Густина суспензії протопластів повинна бути оптимальною для кожної культури. Суспензію протопластів переносять у чашки Петрі з рідким або агаризованим середовищем і культивують при температурі 26—28 °С у темряві або при розсіяному світлі. Утворені клітинні колонії переносять на поверхню агаризованого середовища і культивують на світлі. Для культивування протопластів можуть бути використані модифікації середовищ Мурасіге або Гамборга. Для підтримання стабільності протопластів (до утворення клітинної стінки) необхідно забезпечити в середовищі відповідний рівень осмотичного тиску. Як осморегулятори використовують глюкозу, маніт, сорбіт, ксилозу, сахарозу чи суміші цих речовин. Після регенерації клітинної стінки і розвитку клітинних колоній осморегулятори видаляють із середовища.

Відсутність клітинної стінки у протопластів надає їм властивості, відмінні від цілих клітин. Завдяки тому, що протопласти здатні поглинати макромолекули й органели, їх використовують як реципієнти для трансформації, а також в експериментах із клітинної селекції і мутагенезу. Ізольовані протопласти служать джерелом для виділення неушкоджених і функціонально активних субклітинних і цитоплазматичних структур і органел (хлоропластів, ядер, хромосом). Здатність протопластів зливатися один з одним використовується для одержання соматичних гібридів.

10.1.6. Метод мікроклонального розмноження рослин

Порівняно з традиційними методами розмноження, які використовуються в сільськогосподарській практиці, клональне розмноження в культурі дає ряд переваг:

- коефіцієнт розмноження вищий, ніж за звичайних методів;
- ріст можна підтримувати упродовж усього року;
- тисячі рослин можуть рости на невеликій площі;
- відбувається оздоровлення рослин від вірусів і патогенів;
- можна отримувати рослини, які важко розмножуються або зовсім не розмножуються вегетативно, наприклад пальма.

Основні методи, що використовуються у процесі мікроклонального розмноження рослин, — активація розвитку вже існуючих у рослині меристем та індукція виникнення адвентивних бруньок на експланті (адвентивні бруньки — це бруньки, утворювані з клітин і тканин рослин, нездатних до цього процесу).

10.2. БІОТЕХНОЛОГІЯ КЛІТИН ТВАРИН І ЛЮДИНИ

Розвитку даного напрямку біотехнології сприяла розробка методу культур тканин у 50-і роки ХХ ст. і широке впровадження його у вірусологічну практику. З відкриттям принципів *гібридомної* технології одержано у 1975 р. *моноклональні антитіла*. Ця найважливіша подія у медицині і біології другої половини ХХ ст. стала початком масового виробництва препаратів на базі біотехнології клітин.

Без культур тканин неможливо уявити сучасну медичну і ветеринарну імунопрофілактику й діагностику вірусних інфекцій. Реальною стала можливість використання культур тканин у трансплантології.

Окремим напрямом є використання культур тканин для одержання біологічно активних речовин. Здатність до синтезу активних речовин притаманна диференційованим клітинам, які спеціалізувалися у процесі розвитку на виконанні певної функції. Так, клітини ендокринних залоз синтезують і виділяють гормони.

Одержання таких культур тканин пов'язане з певними труднощами, оскільки клітини погано ростуть поза організмом і необхідні спеціальні умови для унеможливлення втрати здатності до синтезу речовин. Проте деяких успіхів у цьому напрямі досягнуто. Наприклад, отримано культури β -клітин підшлункової залози людини, бика, свині, які продукують інсулін.

Неможливо переоцінити значення методу культур тканин для розвитку імунології. Успіхи культивування імунокомпетентних клітин створили можливості для розвитку цілого ряду самостійних наукових напрямів. Відомо, що клітинам, які реалізують імунну відповідь, притаманна висока секреторна активність. Так, відомо багато лімфокінів, близько 60 монокінів і т.ін. З культур тканин можна виділити цілий ряд імуномодуляторів та імуномедіаторів (у тому числі інтерлейкіни, інтерферони), а також ряд неспецифічних біологічно активних речовин — *лізоцим, комплемент, простагландини* та ін.

Отже, існує можливість практичного використання культур тканин для одержання певних біологічно активних речовин.

Крім того, культури є моделлю для вирішення цілого ряду теоретичних питань щодо природи й властивостей імунокомпетентних клітин, кооперації клітин імунітету, імунорегуляції.

Впровадження в практику генно-інженерних методів розширило можливості використання секреторних властивостей культивованих клітин. Можна передбачити, що в найближчому майбутньому використання культур клітин знайде таке саме широке застосування, як і культивування мікроорганізмів. Прикладне значення клітинних культур полягає у масовому культивуванні клітин — продуцентів інтерферонів, гормонів, ферментів, алкалоїдів та інших речовин.

Біотехнологія культур тканин розвивається у двох напрямках:

- розробляються методи й лабораторна апаратура, що забезпечують керований розвиток клітин у культурі для використання переважно у лабораторіях для науково-дослідних цілей;
- розробляється апаратура й технологія культивування клітин у промислових масштабах.

Методів культивування клітин поза організмом багато: можна культивувати шматочки органів, цілі ембріони, нарізані або подрібнені тканини.

Культури тканини залежно від властивостей клітин поділяють на такі групи:

- **первинні** культури тканин, одержані після дезагрегації шматочків тканини; ці культури не довго залишаються життєздатними;
- **перевивні** культури тканин, пристосовані до життя *in vitro*.

Якщо для наукових досліджень у лабораторних умовах можуть бути використані різні типи тканин і способи культивування, то для промислового культивування використовуються лише дезагREGOVANІ клітини, частіше — перевивні, рідше — первинні культури.

Останнім часом з'явилася ще одна група культур тканин — клітини, одержані генно-інженерними або іншими методами сучасної біотехнології, які потребують спеціальних умов культивування.

Для одержання первинно трипсинізованих культур найзручніше використовувати ембріональні тканини — шкірно-м'язову, ниркову, легеневу та ін. Ембріональні клітини характеризуються вираженою проліферативною активністю поза організмом і стабільністю геному.

За допомогою протеолітичних ферментів можна субкультивувати моношарові первинні культури, проте свої властивості й здатність до росту вони зберігають упродовж лише кількох пересівів.

Суттєвим досягненням у роботі з культурами тканини стало одержання диплоїдних культур, які надають нові можливості для діагностичної вірусології та виробництва вірусних препаратів.

На певному етапі субкультивування культура зазнає значних генотипових й фенотипових змін. Генотипові зміни супроводжуються проявами анеуплоїдії, поліплоїдії, а також якісними змінами у каріотипі. При цьому істотно змінюються властивості клітин — їх морфологія, біохімічна активність і, головне, ростові характеристики: клітини набувають здатності до необмеженого розмноження в культурі.

На сьогодні відомо понад 400 перевивних ліній клітин, отриманих від близько 40 різних видів тварин.

Культури тканин людини й тварин є основними об'єктами, використовуваними вірусологами для репродукції вірусів, вивчення цитопатичної дії вірусів і впливу на вірусну інфекцію різних факторів, у тому числі й терапевтичних засобів. Із розвитком методу культур тканин розширюються області його практичного використання. Типовим прикладом є культури лейкоцитів людини. У клінічну практику впроваджено метод визначення імунологічного статусу організму за результатами реакції бласт-трансформації лімфоцитів. Беруть первинну, так звану короткострокову, культуру лімфоцитів і визначають результат дії мітогена фітогемаглютиніну на Т-лімфоцити.

Довгоіснуючі лінії лімфоцитів використовуються для продукції інтерферону й одержання лімфокінів та інших імунорегуляторів.

Крім того, у культурах лейкоцитів розмножуються віруси практично всіх таксономічних груп. Лімфоцити є зручним джерелом антигенів для приготування антилімфоцитарних сироваток. Перспективи використання лейкоцитарних культур у вірусології необмежені.

Прикладом впровадження нової біотехнології клітин людини в медичну практику є також одержання культур кровотворних тканин, що дають змогу вивчати параметри гемопоезу, вирішуючи таким чином діагностичні й диференційно-діагностичні завдання. Так, дослідження морфологічних, цитохімічних і функціональних властивостей культивованих моноцитоїдних клітин людини відкриває нові можливості у діагностиці моноцитарних лейкозів. Крім того, культура гемопоетичних клітин може бути використана для трансплантації, а також для імунотерапії лейкозів.

Як зазначалося, у лабораторних умовах використовуються різні методи культивування різних типів клітин. Для промислового культивування найперспективнішими є перевивні культури клітин. Основна перевага їх перед первинними культурами — необмежений термін культивування та відсутність вірусів і мікоплазм, які можуть міститися у первинних культурах.

Перевивні культури, проте, не позбавлені недоліків. Найсерйознішим з них є трансформація клітин, яка відбувається зі зміною каріотипу і властивостей клітин, причому не виключено набуття клітинами онкогенних можливостей. Тому для виробництва вірусних вакцин усе ж використовують первинні культури тканин.

Для культивування клітин використовують такі природні середовища: коагуляти (згустки плазми), біологічні рідини (сироватка), тканеві екстракти (ембріональний екстракт).

Нині розроблено ряд синтетичних середовищ для культивування клітин тканин. Усі вони містять як основу суміш неорганічних солей, відому як фізіологічний або збалансований сольовий розчин. Функція цього розчину полягає в підтриманні рН і осмотичного тиску середовища, а також у забезпеченні біологічного агента необхідними неорганічними речовинами. Всі середовища містять низькомолекулярні речовини, причому кількість інгредієнтів перевищує 50, у тому числі глюкоза, необхідні амінокислоти, вітаміни тощо. Із синтетичних для культивування тканин найчастіше використовують середовище 199, Ігла, ВМЕ, Маккоя, RPMI, Фішера та ін.

Більшість клітин ростуть на поверхні субстрату у вигляді моношару. Поряд з моношаровими культурами існують суспензійні культури, в яких клітини ростуть у вигляді суспензії.

У промислового культивуванні клітин вирішальним моментом є розроблення й використання відповідної апаратури — культиваторів, що забезпечують оптимальні умови для росту й розмноження клітин.

Для керованого реакторного культивування клітин найзручнішим є суспензійний метод. Вирощування клітин у суспензії можна вважати ідеальним методом для ряду цілей, оскільки він забезпечує однорідні умови для клітин, близькі до тих, що створюються під час вирощування мікроорганізмів, а також забезпечує великий вихід клітин. Проте до такого типу культивування

даються не всі клітини, а лише трансформовані, такі як HeLa, KB, ВНК-1, а також лейкоцитарні культури.

Для промислового одержання суспензійних культур необхідні апарати, що відповідають двом головним вимогам: конструкція повинна бути раціональною, щоб забезпечити інтенсивне перемішування середовища, і клітини повинні перебувати в м'яких умовах. Не завжди легко дотримати обох вимог.

Більшість клітин добре ростуть на поверхні скла (або пластику) у вигляді моношару. Це типовий прийом вирощування клітин — у вигляді одношарової стаціонарної культури. Для лабораторних потреб клітини вирощують у плоских скляних матрацах. Для промислового культивування клітин використовують *ролерне культивування*: клітини вирощують на стінці циліндричних посудин, які обертаються. Ролерні культури прості, надійні, економічні. У процесі вирощування клітин центральною проблемою залишається підвищення ефективності використання компонентів середовища, продуктивності клітин, збільшення доступної для росту клітин поверхні.

Ролерні культури мають значні переваги порівняно зі стаціонарними: за тієї самої кількості поживного середовища площа, займана клітинами, принаймні в 10 разів більша. Сконструйовано спеціальні культиватори, в яких згорнута поверхня росту перебуває в рухливому стані, що забезпечується обертанням культиватора.

Ще одним підходом у культивуванні клітин є їх вирощування на носіях (скляні трубки, кульки, гранули сефадексу, пластикові зерна, спіралі тощо). Створено апарати, в яких площа росту збільшується за рахунок нерухомо розташованих сфер діаметром 3—10 мм або коротких сегментів трубок, горизонтально розташованих пластин, напівпроникних плівок. Оптимальні умови для росту клітин створюються шляхом перфузії середовища між елементами насадки. Для керування процесом необхідне дослідження кінетики росту клітин на мікроносіях і аналіз гідродинамічних умов.

Отже, сучасний етап характеризується розвитком ефективних великомасштабних систем культивування клітин людини й тварин, виробництва культиваторів, а також самих клітин, поживних середовищ, широким впровадженням асептичних методів роботи, використанням комплексних схем контролю основних характеристик, у тому числі антигенності клітин.

Розроблення нових методів промислового культивування клітин відкриває можливості для одержання медикаментів, клітинних метаболітів та інших високоактивних речовин із заданими властивостями.

0.2.1. Одержання моноклональних антитіл

Моноклональні антитіла використовують для діагностики інфекційних захворювань в імуоферментному, радіоімунному та імуофлуоресцентному аналізах. Моноклональні антитіла — це білки (імуноглобуліни), синтезовані одним клоном клітин, що реагують з певними чужорідними сполуками (антигенами).

Щоб одержати моноклональні антитіла, ізолюють і підтримують лінію імфоцитів, здатних продукувати антитіла певної специфічної спрямованості. Клітини-продуценти антитіл не здатні рости *in vitro*. Злоякісна пухлина

(міелома) синтезує значні кількості аномальних імуноглобулінів й здатна до необмеженого росту *in vitro*. Розроблено методику злиття клітин мієломи з лімфоцитами, при цьому гібридна клітина (гібридома), як і пухлинна, здатна до необмеженого росту й одночасно синтезує антитіла, як лімфоїдна. Завдання зводиться до виявлення клону клітин, які продукують антитіла необхідної специфічної спрямованості. Одержання моноклональних антитіл проходить кількома етапами:

- відомим антигеном імунізують тварин, потім із селезінки виділяють В-лімфоцити;

- злиттям (гібридизацією) В-лімфоцитів і мієломних клітин одержують суміш лімфоцитів гібридних і мієломних клітин;

- суміш клітин культивують на середовищі ГАТ (містить гіпоксантин—аміноптерин—тимідин), що супроводжується загибеллю лімфоцитів і мієломних клітин, оскільки на цьому середовищі можуть рости тільки гібридоми;

- гібридомні клітини розсівають (клонують) так, щоб у лунці панелі для мікрокультивування виявилася тільки одна клітина, яка дає початок клону;

- після розмноження клітин оцінюють їхню здатність синтезувати потрібні антитіла (проводять скринінг);

- клонування повторюють і відбирають стабільний клон, здатний продукувати антитіла заданої специфічності.

Клітини гібридом можна тривалий час зберігати в замороженому стані (у рідкому азоті). Моноклональні антитіла виділяють або з культуральної (гібридоми вирощують *in vitro*), або з асцитної рідини (вирощування *in vivo*).

10.2.2. Виробництво вірусних вакцин

Однією з найдавніших галузей, пов'язаних із промисловим вирощуванням культур тканин, є виробництво вірусних вакцин. Культури тканини застосовуються з метою продукування вакцинних штамів вірусів.

Інтенсивний розвиток вірусології в області профілактики вірусних інфекцій почався після відкриття американським вірусологом Дж. Ф. Ендерсом можливості розмноження вірусу поліомієліту в екстраневральних тканинах людини.

Для виробництва вірусних вакцин придатні лише первинно трипсинізовані клітини та їх субкультури, а також лінії диплоїдних клітин. Усі культури вирощуються лише в моношарі.

Уведення в практику диплоїдних клітин людини ознаменувало нову еру у виробництві вірусних препаратів. Диплоїдні лінії клітин здатні тривалий час (до 30–60 пересівів) культивуватися, зберігаючи диплоїдний каріотип. Вони не контаміновані сторонніми мікроорганізмами та онкогенно безпечні.

Практично у виробництві вірусних вакцин використовуються такі групи культур тканин:

- первинні культури клітин нирок тварин. Культура клітин нирок мавп використовується для виробництва вакцини проти поліомієліту, кору, паргрипу, а раніше й проти віспи. Культури клітин нирок морських свинок і собак використовуються для виготовлення вакцин проти кору, краснухи й епідемічного паротиту;

— первинні культури пташиного походження. На культурах тканин перепелиних, курячих і качиних ембріонів виготовляють протигрипозні вакцини;

— диплоїдні клітини людини. Штам WI-38 використовується для виробництва вакцин проти поліомієліту, кору, краснухи, сказу, віспи.

Необхідною умовою в роботі з культурою тканини для виробництва противірусних вакцин є суворий попередній і наступний біологічний контроль для виявлення можливої випадкової контамінації сторонніми інфекційними агентами. Можливість контамінації тканин і культур клітин вірусами встановлена практично для всіх клітин тварин і людини. Так, у культурах клітин людини можуть бути виявлені аденовіруси, віруси герпесу, цитомегаловіруси та ін.

Сучасна біотехнологія, що базується на досягненнях імунології й молекулярної біології, передбачає в перспективі виготовлення нових противірусних вакцинних препаратів.

10.2.3. Трансплантація

Однією з областей, в якій успішно використовуються культури тканин, є трансплантація підшлункової залози. Останніми роками поряд із традиційними методами лікування хворих на цукровий діабет успішно застосовується пересадження острівкових клітин підшлункової залози. Використовують різні варіанти цього методу, такі як:

— органна трансплантація підшлункової залози за допомогою алотрансплантації;

— вільна трансплантація ендокринної тканини підшлункової залози в різні тканини й органи реципієнта.

Розвиток нового напрямку був зумовлений неможливістю традиційних методів лікування забезпечити запобігання ускладненням (розвиток ангіопатії, нефропатії, поліневропатії, ретинопатії).

Можливості цього методу не обмежуються лише пересадженням клітин підшлункової залози. Перші кроки у використанні культивованих клітин зроблено й у трансплантації шкіри. У цьому разі як посівний матеріал можуть бути використані шматочки тканини й отриманий органний експлантат шкірно-м'язової тканини.

Величезну потребу в матеріалі для трансплантації мають гематологи. У разі злоякісних захворювань систем крові (лейкози) гематологи пересаджують кістковий мозок. Проте одержання матеріалу — надзвичайно складний процес, оскільки донором кісткового мозку зазвичай можуть бути лише родичі хворого.

Культивування клітин поза організмом відкриває можливості накопичення найціннішого матеріалу *in vitro*.

Одним із напрямів, що розвиваються останніми роками, є створення банку клітин. Накопичення матеріалу для пересадження може бути здійснено двома шляхами. Один з них полягає у тому, що клітини, поступово розмножуючись, накопичуються в культурі й створюють так званий «динамічний банк». Інший шлях передбачає накопичення живих клітин у культурі з по-

дальшим їх консервуванням глибоким заморожуванням у рідкому азоті при температурі -196°C за присутності кріопротекторів — диметилсульфоксиду (ДМСО) або гліцерину. Клітини зберігаються роками.

КОНТРОЛЬНІ ЗАПИТАННЯ
ДО РОЗДІЛУ 10

1. На чому базується клітинна інженерія рослин?
2. Що означає термін «тотипотентність»?
3. Назвіть напрями використання культури ізольованих клітин і тканин.
4. Охарактеризуйте етапи історії розвитку культивування ізольованих клітин і тканин рослин.
5. Які умови роботи з культурами ізольованих клітин і тканин рослин?
6. Які середовища використовують для культивування ізольованих клітин і тканин рослин?
7. Які відомі фітогормони? Охарактеризуйте їх властивості.
8. Як фізичні фактори впливають на розвиток рослинних тканин *in vitro*?
9. Як одержують калусні культури?
10. Що таке дедиференціювання?
11. Які фізіолого-біохімічні властивості притаманні калусним клітинам?
12. Охарактеризуйте ріст клітинної популяції у процесі періодичного культивування.
13. Які особливості методів одержання та злиття протопластів рослин?
14. Які переваги має клональне мікророзмноження рослин?
15. Які розробки сприяли розвитку біотехнології клітин тварин і людини?
16. На які групи поділяють культури тканин?
17. Для чого використовуються культури тканин людини і тварин?
18. Які середовища використовуються для культивування клітин людини і тварин?
19. Назвіть особливості суспензійного методу культивування клітин людини і тварин.
20. Що таке ролерне культивування?
21. Які носії використовують для культивування клітин людини і тварин?
22. Що таке моноклональні антитіла?
23. Як одержують моноклональні антитіла?
24. Які групи культур тканин використовуються у виробництві вірусних вакцин?
25. Яке значення мають культури тканин для трансплантології?
26. Як зберігають культури клітин?

ЛІТЕРАТУРА

1. Безбородов А. М. Биохимические основы микробиологического синтеза. — М.: Лег. и пищ. пром-сть, 1984. — 394 с.
2. Безбородов А.М., Астапович Н.И. Секреция ферментов у микроорганизмов. — М.: Наука, 1984. — 70 с.
3. Бейли Дж.Э., Оллис Д.Ф. Основы биохимической инженерии. — М.: Мир, 1989. — 1282 с.
4. Березин И. В., Клесов А.А., Швядас В.К. Инженерная энзимология. — М.: Высш. шк., 1987. — 144 с.
5. Биотехнология / Под ред. А. А. Баева. — М.: Наука, 1988. — 309 с.
6. Биотехнология растений: культура клеток / Под ред. Р. Г. Бутенко. — М.: Агропромиздат, 1989. — 280 с.
7. Биотехнология: Учеб. пособие для вузов: В 8 кн. / Под ред. Н. С. Егорова, В. Д. Самуилова. — М.: Высш. шк., 1987.
8. Бирюков В. В., Кантере В. М. Оптимизация периодических процессов микробиологического синтеза. — М.: Наука, 1985. — 292 с.
9. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. — М.: ФБК-Пресс, 1999. — 159 с.
10. Варфоломеев С. Д., Калюжный С. В. Биотехнология: Кинетические основы микробиологических процессов. — М.: Высш. шк., 1990. — 296 с.
11. Виестур У.Е., Шмите И.А., Жилевич А.В. Биотехнология. Биологические агенты, технология, аппаратура. — Рига: Зинатне, 1987. — 264 с.
12. Валиханова Г., Рахимбаев И. Культура клеток и биотехнология растений. — Алма-Ата: КазГУ, 1989. — 80 с.
13. Воробьев А.А., Быков А.С., Пашков Е.П., Рыбакова А.М. Микробиология. — М.: Медицина. — 1998. — 336 с.
14. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. — М.: Мир, 2002. — 589 с.
15. Готтшалк Г. Метаболизм бактерий. — М.: Мир, 1982. — 310 с.
16. Грачева И. М., Кривова А.Ю. Технология ферментных препаратов. — М.: Элевар, 2000. — 512 с.
17. Грачева И. М., Иванова Л. А., Кантере В. М. Технология микробных белковых препаратов, аминокислот и биоэнергия. — М.: Колос, 1992. — 383 с.
18. Гринберг Т.А., Пирог Т.П., Малащенко Ю.Р., Пинчук Г.Э. Микробный синтез экзополисахаридов на C_1-C_2 -соединениях. — К.: Наук. думка, 1992. — 212 с.
19. Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках. — М.: Наука, 2004. — 525 с.
20. Егорова Т.А., Клунова С.М., Живухина Е.А. Основы биотехнологии. — М.: Изд. центр «Академия», 2003. — 208 с.
21. Елинов Н. П. Основы биотехнологии. — СПб.: Наука, 1995. — 600 с.

22. Калунянц К. А., Голгер Л. И., Балашов В. Е. Оборудование микробиологических производств. — М.: Агропромиздат, 1987. — 398 с.
23. Кантере В. М. Теоретические основы технологии микробиологических производств. — М.: Агропромиздат, 1990. — 271 с.
24. Квеситадзе Г.И., Безбородов А.Н. Введение в биотехнологию. — М.: Наука, 2002. — 284 с.
25. Кефели В. И., Дмитриева Г. А. Биотехнология: курс лекций. — Пущино, 1989. — 96 с.
26. Ланчини Д., Паренти Ф. Антибиотики. — М.: Мир, 1985. — 272 с.
27. Леонов Н. Р. Микробиология. — М.: Агропромиздат, 1997. — 352 с.
28. Манаков М. Н., Победимский Д. Г. Теоретические основы технологии микробиологических производств. — М.: Агропромиздат, 1990. — 272 с.
29. Медуницын Н.В. Вакцинология. — М.: Триада-Х, 1999. — 272 с.
30. Микробиологическое производство биологически активных веществ и препаратов / В.А. Быков, И.А. Крылов, М.Н. Манаков и др. — М.: Высш. шк., 1987. — 144 с.
31. Микробные ферменты и биотехнология / М. Фогарти и др. — М.: Агропромиздат, 1986. — 318 с.
32. Молекулярная биология клетки / Б. Албертс, Д. Брэй, Дж. Льюис. — М.: Мир, 1994. — Т. 1. — 515 с.
33. Мосичев М.С., Складнев А.Л., Котов Б.Г. Общая технология микробиологических производств. — М.: Лег и пищ. пром-сть, 1982. — 264 с.
34. Основы сельскохозяйственной биотехнологии / Г. С. Муромцев и др. — М.: Агропромиздат, 1990. — 384 с.
35. Перспективы и пути развития производства биотехнологических лекарственных препаратов в Украине / Л.С. Стрельников, О.П. Стрилец, Е.В. Щербак и др. // Annals of Mechnicov Institute. — 2006. — № 4. — С. 3–8.
36. Пирог Т.П. Загальна мікробіологія. — К.: НУХТ, 2004. — 471 с.
37. Производство белковых веществ. Биотехнология: Учеб. пособие для вузов / В. А. Быков и др. — М.: Высш. шк., 1987. — Кн. 5. — 142 с.
38. Промышленная микробиология / Под ред. Н.С.Егорова. — М.: Высш. шк., 1989. — 688 с.
39. Промышленная микробиология и успехи генетической инженерии / Пер. под ред. Г.К. Скрыбина. — М.: Мир, 1984. — 172 с.
40. Рыбальский Н. Г., Скуратовская О. Д. Белковая инженерия. — М.: ВНИИПИ, 1990. — 131 с.
41. Сазыкин Ю. О., Орехов С.Н., Чакалева И.И. Биотехнология. — М.: Изд. центр «Академия», 2006. — 256 с.
42. Сассон А. Биотехнология: Свершения и надежды. — М.: Мир, 1987. — 410 с.
43. Сельскохозяйственная биотехнология / Под ред. В.С. Шевелухи. — М.: Высш. шк., 1998. — 416 с.
44. Скрыбин Г., Головлева Л. Биотехнология защиты окружающей среды от ксенобиотиков // Изв. АН СССР. Сер. Биология. — 1986. — № 6. — С. 805–813.
45. Современная микробиология. Прокариоты / Под ред. Й. Ленгелера, Г. Дрекса, Г. Шлегеля. — М.: Мир, 2005. — Т. 1. — 654 с.
46. Спирин А. С. Биосинтез белка и перспективы бесклеточной биотехнологии // Вестн. АН СССР. — 1989. — № 11. — С. 30–38.

47. Хиггинс И., Бест Д., Джойс Дж. Биотехнология: Принципы и применение. — М.: Мир, 1998. — 485 с.
48. Шабарова З.А., Богданов А. А., Золотухин А. С. Химические основы генетической инженерии. — М.: Изд-во МГУ, 1994. — 224 с.
49. Шлегель Г. Общая микробиология. — М.: Мир, 1987. — 566 с.
50. Lang S., Philp J.C. Surface-active lipids in rhodococci // Antonie van Leeuwenhoek. — 1998. — 74. — P. 59-70.
51. Rosenberg E., Ron E.Z. High- and low-molecular-mass microbial surfactants // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 1999. — 52. — P. 154—162.
52. www.genome.jp/kegg/ KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. Pathway Database.
53. Yazdani S.S., Gonzales R. Anaerobic fermentation on glycerol a path to economic viability for the biofuels industry // Curr. Opin. Biotechnol. — 2007. — Vol. 18. — P. 213—219.

ЗМІСТ

Вступ	3
Список скорочень	7
1. СТАНОВЛЕННЯ ТА РОЗВИТОК БІОТЕХНОЛОГІЇ	9
1.1. Історична довідка	9
1.2. Біотехнологія — пріоритетний напрям розвитку людства у ХХІ ст.	12
1.3. Характеристика світового ринку біотехнологічної продукції	13
1.4. Перспективи розвитку біотехнології у світі	13
1.5. Шляхи розвитку біотехнології в Україні та Росії	16
<i>Контрольні запитання до розділу 1</i>	19
2. ОСНОВНІ СКЛАДОВІ БІОТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ	20
2.1. Біологічні агенти	20
2.1.1. Загальна характеристика мікроорганізмів-продуцентів	20
2.1.2. Принципи селекції мікроорганізмів	21
2.2. Субстрати (сировина)	23
2.2.1. Відходи виробництва як субстрати	25
2.2.2. Характеристика деяких комплексних середовищ	26
2.3. Продукти біотехнології	29
<i>Контрольні запитання до розділу 2</i>	29
3. ЕТАПИ БІОТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ	30
3.1. Передферментаційні процеси	30
3.1.1. Підготовка поживного середовища	30
3.1.2. Підготовка стерильного стисненого повітря	36
3.1.3. Підготовка біологічного агента	40
3.1.4. Підготовка апаратури та комунікацій	45
3.2. Процес ферментації (виробничий біосинтез)	46
3.2.1. Основні варіанти культивування біологічних агентів	47
3.2.2. Імобілізація	48
3.2.3. Піногасники	49
3.2.4. Флокулянти	49
3.2.5. Ріст і розвиток клітинних популяцій	50
3.2.6. Вплив умов культивування на ріст мікроорганізмів	62
3.2.7. Оцінювання процесу ферментації	64

3.2.8. Основні технологічні прийоми регуляції процесів мікробіологічного синтезу	65
3.3. Виділення продуктів мікробного синтезу	76
3.3.1. Виділення біомаси	76
3.3.2. Виділення цільового продукту	78
Контрольні запитання до розділу 3	83
4. ЗНЕШКОДЖЕННЯ ВІДХОДІВ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ВИРОБНИЦТВ	85
Контрольні запитання до розділу 4	89
5. БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ МІКРОБІОЛОГІЧНОГО СИНТЕЗУ	90
5.1. Особливості та закономірності мікробного синтезу	90
5.1.1. Класифікація продуктів мікробного синтезу	90
Контрольні запитання до підрозділу 5.1	98
5.2. Біосинтез препаратів на основі біомаси.	
Синтез компонентів мікробної клітини	99
5.2.1. Потреби в АТФ для утворення бактеріальних клітин із глюкози	99
5.2.2. Біосинтез амінокислот	100
5.2.3. Біосинтез нуклеотидів	103
5.2.4. Біосинтез жирних кислот	104
5.2.5. Утворення вуглеводів — компонентів клітинної стінки прокариот і еукариот	105
Контрольні запитання до підрозділу 5.2	107
5.3. Біосинтез первинних метаболітів	108
5.3.1. Первинні і вторинні метаболіти	108
5.3.2. Біосинтез органічних кислот	109
5.3.3. Біосинтез амінокислот	113
5.3.4. Біосинтез вітамінів	127
Контрольні запитання до підрозділу 5.3	155
5.4. Біосинтез вторинних метаболітів	157
5.4.1. Шляхи синтезу мікробних екзополісахаридів	157
5.4.2. Біосинтез гіберелінів	168
5.4.3. Біосинтез поверхнево-активних речовин	170
Контрольні запитання до підрозділу 5.4	177
5.5. Біосинтез вторинних метаболітів. Антибіотики	178
5.5.1. Загальна характеристика антибіотиків. Особливості мікробного синтезу антибіотиків	178
5.5.2. Шляхи біосинтезу антибіотиків	187
Контрольні запитання до підрозділу 5.5	222
5.6. Біосинтез продуктів бродіння	224
5.6.1. Загальна характеристика процесу бродіння	224
5.6.2. Утворення етанолу	226
5.6.3. Утворення молочної кислоти	227
5.6.4. Продукти маслянокислого та ацетоно-бутилового бродіння	229
Контрольні запитання до підрозділу 5.6	230

5.7. Синтез ферментів	231
5.7.1. Синтез білка	231
<i>Контрольні запитання до підрозділу 5.7</i>	233
6. БІОТЕХНОЛОГІЯ ПРОДУКТІВ МІКРОБНОГО СИНТЕЗУ	234
6.1. Біотехнологія амінокислот	234
6.1.1. Технологія одержання лізину	235
6.2. Біотехнологія ферментних препаратів	236
6.2.1. Особливості культивування мікроорганізмів — продуцентів ферментів	237
6.2.2. Виділення та стабілізація ферментів	238
6.2.3. Імобілізовані ферменти	240
6.3. Виробництво органічних кислот	246
6.3.1. Оцтова кислота	246
6.3.2. Молочна кислота	247
6.3.3. Лимонна кислота	248
6.3.4. Глюконова кислота	250
6.3.5. Ітаконова кислота	251
6.4. Виробництво вітамінів	252
6.4.1. Вітамін B ₁₂	252
6.4.2. Одержання вітаміну B ₁₂ з допомогою метаногенних бактерій	253
6.4.3. Вітамін B ₂	253
6.4.4. Ергостерин	254
6.4.5. Промислове одержання каротиноїдів	256
6.4.6. Вітамін C	257
6.5. Біотехнологія полісахаридів	257
6.5.1. Вплив умов культивування на синтез мікробних полісахаридів	257
6.5.2. Вплив умов культивування на фізико-хімічні властивості полісахаридів	259
6.5.3. Промислове виробництво ксантану	259
6.6. Ключові проблеми промислового виробництва мікробних поверхнево-активних речовин	260
6.6.1. Альтернативні субстрати для одержання мікробних поверхнево-активних речовин	260
6.6.2. Ефективні й економічно обґрунтовані методи виділення та очищення поверхнево-активних речовин	262
6.6.3. Мутантні і рекомбінантні штами — надсинтетики поверхнево-активних речовин	263
6.7. Виробництво антибіотиків	264
6.7.1. Основні стадії промислового одержання антибіотиків	264
6.7.2. Біологічний і фармакологічний контроль	267
6.8. Одержання промислово важливих стероїдів	267
6.9. Одержання мікробних імунобіологічних препаратів	268
6.9.1. Вакцини	268
6.9.2. Діагностикуми	272

6.9.3. Алергени	273
6.9.4. Бактеріофаги	273
6.9.5. Пробіотики	274
Контрольні запитання до розділу 6	278
7. ХАРЧОВА БІОТЕХНОЛОГІЯ	281
7.1. Виробництво молочних продуктів	281
7.1.1. Сири	281
7.1.2. Кисломолочні напої	282
7.2. Консервування плодів і овочів	283
7.3. Ферментовані продукти, збагачені білком. Білок одноклітинних	283
7.4. Хлібопекарство	286
7.5. Виробництво спиртних напоїв	287
7.5.1. Пиво	287
7.5.2. Технологія виробництва вина	288
7.5.3. Виробництво напоїв на основі ректифікованого спирту	289
Контрольні запитання до розділу 7	289
8. ЕКОЛОГІЧНА БІОТЕХНОЛОГІЯ	291
8.1. Біотрансформація ксенобіотиків	291
8.2. Одержання екологічно чистої енергії. Біогаз	292
8.3. Виробництво етанолу	293
8.4. Біотехнологія перетворення сонячної енергії	294
8.5. Фотовиробництво водню	295
8.6. Очищення стічних вод	296
8.6.1. Методи очищення стічних вод	297
8.6.2. Осади міських стічних вод та їх використання	298
Контрольні запитання до розділу 8	299
9. ОСНОВНІ ПОНЯТТЯ ГЕНЕТИЧНОЇ ІНЖЕНЕРІЇ	300
9.1. Методи створення трансгенних рослин	301
9.2. Використання трансгенних рослин	302
9.3. Методи створення трансгенних тварин	303
9.4. Використання трансгенних тварин	305
9.5. Одержання інсуліну	306
9.6. Синтез соматотропіну	308
9.7. Одержання інтерферонів	309
Контрольні запитання до розділу 9	312
10. ОСНОВИ КЛІТИННОЇ ІНЖЕНЕРІЇ	314
10.1. Клітинна інженерія рослин	314
10.1.1. Етапи розвитку культивування ізольованих клітин і тканин рослин	315
10.1.2. Умови та методи культивування ізольованих клітин і тканин рослин	316
10.1.3. Культура калусних тканин	317
10.1.4. Суспензійна культура	319

10.1.5. Культура протопластів-----	319
10.1.6. Метод мікроклонального розмноження рослин -----	320
10.2. Біотехнологія клітин тварин і людини -----	321
10.2.1. Одержання моноклональних антитіл -----	324
10.2.2. Виробництво вірусних вакцин-----	325
10.2.3. Трансплантація -----	326
<i>Контрольні запитання до розділу 10 -----</i>	<i>327</i>
Література -----	328

Навчальне видання

Пирог Тетяна Павлівна
Ігнатова Олена Андріївна

ЗАГАЛЬНА БІОТЕХНОЛОГІЯ

Редактор Т. П. Хоменко
Художнє оформлення Є. В. Чурія
Комп'ютерна верстка Н. М. Мініної

Підп. до друку 12.03.09. Обл. вид. арк. 22,3. Наклад 1500 прим.
Вид. № 10/08. Зам. № 1590. ТОВ «ДиПиАй»

РВЦ НУХТ. 01033 Київ-33, вул. Володимирська, 68
www.book.nuft.edu.ua
Свідоцтво про реєстрацію серія ДК № 1786 від 18.05.04 р.

| ISBN 966-612-083-6



9 789666 120833