

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

МИКОЛАЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

А. В. ЛИХАЧ

ПРОМИСЛОВА БІОТЕХНОЛОГІЯ

Курс лекцій

*для студентів денної форми навчання
напрямку підготовки 6.051401 – «Біотехнологія»*

**Миколаїв
2015**

УДК 631.147
ББК 30.16
Л 65

Автор: А. В. Лихач

Рекомендовано до друку рішенням науково-методичної комісії факультету технології виробництва і переробки продукції тваринництва, стандартизації та біотехнології від 29 квітня 2015р., протокол № 8

Рецензенти:

- І. Ю. Горбатенко — д-р біол. наук, професор, професор кафедри генетики, годівлі тварин та біотехнології Миколаївський національний аграрний університет;
- С. В. Купцов — начальник диспетчерської служби енергозабезпечення та контролю якості товарних форм лікарських препаратів, ТДВ «Інтерхім» Одеська область.

Лихач А. В.

Л65 Промислова біотехнологія : курс лекцій / А. В. Лихач – Миколаїв : МНАУ, 2015. – 214 с.

У курсі лекцій викладено основні терміни промислової біотехнології; історію, сутність, значення, проблеми і перспективи розвитку промислової біотехнології; типову схему біотехнологічного виробництва, способи культивування продуцентів; методи і умови культивування ізолюваних тканин і клітин рослин для отримання біологічно-активних речовин рослинного походження; принципи дії і конструкції біореакторів; принципи біосинтезу ферментних, бактеріальних препаратів для захисту рослин, бактеріальних добрив і антибіотиків.

УДК 631.147
ББК 30.16

© Миколаївський національний
аграрний університет, 2015

© Лихач А.В., 2015

З М І С Т

	стор.
Вступ	4
Лекція 1. Введення	5
Лекція 2. Технологічне обладнання промислового призначення	41
Лекція 3. Основні принципи промислового здійснення біотехнологічних виробництв	52
Лекція 4. Продукти промислової біотехнології та блок-схеми їх виробництв	72
Лекція 5. Продукти промислової біотехнології та блок-схеми їх виробництв	96
Лекція 6. Основні напрямки промислової біотехнології	130
Лекція 7. Технологія виробництва білку мікроорганізмів та мікробних ліпідів	162
Лекція 8. Технологія ферментних препаратів	177
Лекція 9. Імобілізовані ферменти	186
Лекція 10. Промислова біотехнологія у вирішенні екологічних проблем	200
Список використаної літератури	213

ВСТУП

Промислова біотехнологія є однією з основних розділів біотехнології, інтегральною областю науки і техніки, яка спирається на теоретичні та методичні положення молекулярної біології і генетики, мікробіології, біохімії, фізіології і цитології, а також використовує прогресивні хімічні технології.

Предметом промислової біотехнології та об'єктами є високопродуктивні штами мікроорганізмів – продуцентів (представники різних фізіологічних і таксономічних груп, які відрізняються як за типом метаболізму, так і за типом живлення), а також загальні принципи біотехнологічних процесів.

Незважаючи на велику різноманітність агентів, що здійснюють біотехнологічні маніпуляції, основними об'єктами біотехнології в наш час є мікроорганізми. Мікроорганізми використовуються для біосинтезу важливих метаболітів (амінокислот, органічних кислот, ферментів, екзополісахаридів, лектинів, поверхнево-активних речовин, вітамінів, стимуляторів росту, гормонів); одержання білкових продуктів, пробіотиків, добрив (препарати на основі біомаси); одержання біогазу; вилуговування металів із руд; трансформації речовин (синтез стероїдів, ефедрину, виробництво напівсинтетичних пеніцилінів).

Метою вивчення дисципліни є оволодіння студентами знанням та умінням про основні біотехнологічні процеси, що використовуються для отримання різних біологічно-активних сполук, про принципи та методи конструювання об'єктів біотехнології, культивування окремих штамів промислових мікроорганізмів, методами підбору біологічних агентів для отримання окремих продуктів, основ управління процесами культивування мікроорганізмів, контролю якості отриманого продукту, напрямків застосування продуктів біотехнології, визначення їх екологічної безпеки, особливо створених на основі генетично модифікованих мікроорганізмів.

В результаті вивчення дисципліни студент повинен знати: основні терміни промислової біотехнології; історію, сутність, значення, проблеми і перспективи розвитку промислової біотехнології; типову схему біотехнологічного виробництва, способи культивування продуцентів; методи і умови культивування ізольованих тканин і клітин рослин для отримання біологічно-активних речовин рослинного походження; принципи дії і конструкції біореакторів; принципи біосинтезу ферментних, бактеріальних препаратів для захисту рослин, бактеріальних добрив і антибіотиків.

ЛЕКЦІЯ № 1

В С Т У П

Питання:

1. Вступ. Історія виникнення промислової біотехнології як науки
 2. Об'єкти промислової біотехнології
 3. Перспективи розвитку промислової біотехнології
 4. Основні напрямки промислової біотехнології
 5. Основні методи та підходи, які використовуються у промисловій біотехнології.
-

1. Вступ. Історія виникнення промислової біотехнології як науки.

Термін «біотехнологія» було запропоновано у 1917 році угорським інженером Карлом Ереки для опису великомасштабного вирощування свиней з використанням для корму цукрових буряків. За визначенням К. Ереки, біотехнологія - це «всі види робіт, коли із сировини за допомогою живих організмів вироблюються ті чи інші продукти». Однак це цілком вірне визначення не дістало поширення. Лише у 1961 році, коли шведський мікробіолог Карл Гьорен Хеден запропонував нову назву журналу «Біотехнологія і біоінженерія», і біотехнологію пов'язали з дослідженнями у галузі «промислового виробництва товарів та послуг за участю живих організмів, біологічних систем і процесів».

Біотехнологія - це наука про використання культур клітин бактерій, дріжджів, тварин або рослин, метаболізм і біосинтетичні можливості яких забезпечують утворення специфічних речовин. За визначенням Європейської біотехнологічної федерації, створеної у 1978 році, біотехнологія на основі

застосування знань і методів біохімії, мікробіології, генетики і хімічної техніки використовує властивості мікроорганізмів і клітинних культур. Вона створює можливість отримання речовин і сполук, які необхідні для життя і добробуту людини, за допомогою легкодоступних ресурсів, що постійно поновлюються.

Перспективність та ефективність застосування біотехнологічних процесів у різних сферах людської діяльності від одержання їжі і напоїв до відтворення екологічно чистих енергоносіїв і нових матеріалів обумовлена їх компактністю і одночасно великомасштабністю, високим рівнем механізації й продуктивності праці. Ці процеси піддаються контролю, регулюванню й автоматизації. Біотехнологічні процеси, на відміну від хімічних, реалізуються в «м'яких» умовах, за нормального тиску, активної реакції й невисоких температур середовища. Ці процеси меншою мірою забруднюють навколишнє середовище відходами і побічними продуктами, мало залежать від кліматичних і погодних умов, не потребують великих земельних площ, застосування пестицидів, гербіцидів й інших чужорідних для навколишнього середовища агентів. Тому біотехнологія в цілому та її окремі розділи визначені серед найбільш пріоритетних напрямів науково-технічного прогресу і є яскравим прикладом «високих технологій», з якими пов'язують перспективи розвитку багатьох виробництв.

Біологічні технології перебувають нині у фазі бурхливого розвитку, але цей рівень багато в чому визначається науково-технічним потенціалом країни. Всі високорозвинені держави світу відносять біотехнологію до однієї з найважливіших сучасних галузей, вважаючи її ключовим методом реконструкції промисловості відповідно до потреб часу, і вживають заходів для стимулювання її розвитку. Біотехнологічні процеси численні за своїми історичними коріннями і за своєю структурою, вони поєднують елементи фундаментальних наук, а також ряд прикладних галузей. До них відноситься хімічна технологія, машинобудування, економіка, досягнення наук біологічного циклу, що вивчають надорганізмий рівень (екологія), біологічні організми (мікробіологія, мікологія), суборганізміві структури

(молекулярна біологія, генетика). Через біологію на біотехнологію впливають хімія, фізика, математика, кібернетика, механіка. Суспільні й економічні науки також мають великий вплив на розвиток біотехнології. оскільки практичні завдання, що вирішуються нею, мають соціально-економічне значення для будь-якого суспільства.

Біотехнологія як наука, що використовує біологічні принципи в практичній роботі, виникла наприкінці XIX ст., коли досягнення мікробіології почали впроваджувати в народне господарство. Але ще від зародження цивілізації людина виступала в ролі біотехнолога, використовуючи для одержання продуктів харчування результати діяльності мікроорганізмів. Проте цей процес відбувався стихійно. З історичної точки зору біотехнологія виникла тоді, коли дріжджі уперше були використані для виробництва пива, а бактерії - для виготовлення йогуртів.

Наука формується та еволюціонує відповідно до формування і розвитку людства. Це безпосередньо стосується і біотехнології. Питання про формування біотехнології трактується неоднозначно. На думку одних учених (Овчинников Ю.А., Баєв А.А., Скрябін Г.К.), правомірно віднести до сфери біотехнології класичні процеси бродіння, включаючи одержання спирту, силосування. На думку інших (Аїба С., Хемфрі А.Е., Милліс Н.Ф.), умовною датою появи біотехнології можна вважати присудження компанії «Мерк Кемикал Компані» премії Мак-Гро-Хілла за досягнення в області біохімічної технології в 1947 р. Також існує думка, що початок біотехнології варто віднести до 70-х років XX ст., з моменту зародження генетичної інженерії. Отже, правомірно віднести виникнення сучасної біотехнології, яка розпочала формуватися на базі існуючих галузей мікробіологічної промисловості, до початку 50-х років минулого століття, а весь попередній етап, що розпочався з найдавніших цивілізацій, називати передісторією формування біотехнології.

Передісторію формування біотехнології має ряд етапів. Це емпіричний, етіологічний (зародження природничих наук у XV—XVII

століттях; формування мікробіологічних виробництв і початок взаємодії науки й мікробіологічних виробництв наприкінці ХІХ – 10-х роках ХХ ст., що викликало революційне перетворення мікробіологічних виробництв). Наступний біотехнічний (створення науково-технічних передумов для виникнення сучасної біотехнології 10-50-і роки ХХ ст.), і геннотехнічний — ера новітніх біотехнологічних процесів.

Емпіричний (від грец. *empeirikos* - дослідний) або доісторичний період - найбільш тривалий, охоплює близько 8000 років, з яких більш ніж 6000 років - до нашої ери і біля 2000 років - наша ера. Стародавні народи того часу інтуїтивно використовували засоби і способи виготовлення хліба, пива та інших продуктів, які в наш час ми відносимо до розряду біотехнологічних.

Шумери - перші мешканці Месопотамії (на території сучасного Іраку) створили розвинену в ті часи цивілізацію. Вони випікали хліб з кислого тіста, володіли мистецтвом готувати пиво. В цьому їм наслідували асирійці і вавилоняни, які також мешкали в Месопотамії, єгиптяни і стародавні індуси. Протягом декількох тисячоліть відомим є оцет, який за давніх-давен готували в домашніх умовах, хоча про мікроби - індуктори цього процесу, світ узнав у 1868 році завдяки роботам Л. Пастера; перша дистиляція вина здійснена у ХІІ ст.; горілку з хлібних злаків виготовляли у ХVІ ст.; шампанське відоме з ХVІІІ ст. До того ж емпіричному періоду належить: одержання кисломолочних продуктів, квашеної капусти, медових алкогольних напоїв, силосування кормів, квашення луб'яноволоконних рослин.

З найдавніших часів людство стикалося з негативними наслідками діяльності мікроорганізмів (псування продуктів, інфекційні хвороби людей і домашньої худоби). На перших етапах це були неусвідомлені, емпіричні спроби розробки методів і засобів боротьби з цими явищами. Так стали виникати методи консервування продуктів.

Таким чином, народи з давніх-давен користувалися на практиці

мікробіологічними процесами, нічого не знаючи про мікроби. Емпіризм також був характерний і в практиці застосування корисних рослин і тварин.

Другий, *етиологічний* (від грец. *aitia* - причина) період формування біотехнології розпочався у другій половині XV ст. із розвитку сучасного природознавства. На становлення біології істотний вплив мали успіхи в хімії, яка із описової в цей період перетворюється на аналітичну. Відбулися зрушення у вивченні сутності процесів бродіння; виник термін ферментація, а процес бродіння стали пов'язувати з наявністю в середовищі дріжджів або ферментів. У XVI-XVII століттях спочатку в Франції, а потім повсюдно для розпушення тіста стали використовувати пивні дріжджі; пізніше зі зміною й удосконалюванням технології пивоваріння для цих цілей почали застосовувати дріжджі спиртового виробництва. У другій половині XVIII ст. було доведено здатність однієї речовини розкласти інші. Це стало початком експериментального вивчення унікальної здатності ферментів до каталізу специфічних хімічних реакцій.

Таким чином, розвиток описової мікробіології й вивчення хімічних перетворень стали важливою передумовою для становлення мікробіології й біохімії. В XIX ст. з розвитком хімічних наук було закладено основи органічної хімії. У цей період відкрили багато органічних кислот, гліцерин, холестерин, глюкозу, перші амінокислоти, здійснили синтез сечовини. Для зародження ензимології велике значення мало вивчення процесу гідролізу полісахаридів. Значний вплив на створення наукових основ мікробіологічних виробництв мали роботи Луї Пастера, який на прохання уряду Франції досліджував причини порушення технологічних процесів на виробництвах. Працюючи в галузі прикладної мікробіології, Л. Пастер зробив ряд найбільших фундаментальних відкриттів, що заклали основи сучасної технічної мікробіології. Л. Пастер довів, що хвороби, псування продуктів, бродіння й гниття викликаються мікроорганізмами, і створив теорію про екзогенність потрапляння цих організмів у середовище. Цим

було доведено неспроможність існуючої на той час теорії самозародження мікроорганізмів. Роботи Л. Пастера заклали наукові основи виноробства, пивоварства, виробництва спирту й оцту, боротьби з інфекційними хворобами. Великим досягненням даного періоду була розробка методу чистих культур, а також удосконалення середовищ для виділення й вирощування мікроорганізмів. Чисті культури стали застосовувати в сформованих мікробіологічних виробництвах.

Велике значення мали роботи з вивчення мікробного антагонізму й застосуванню його в медицині. І. І. Мечниковим було створено вчення про антагонізм мікробів і науково-обґрунтовані рекомендації для азотфіксації. Тоді ж блискучими роботами С. М. Виноградського, В. Л. Омелянського, Г. А. Надсона, Б. Л. Ісаченка було закладено основи геологічної мікробіології; розпочато вивчення ролі мікроорганізмів у перетвореннях сірки, заліза, кальцію. Почали закладатися наукові основи біологічної обробки й знешкодження стоків.

Очисні споруди, відомі із часів Стародавньої Індії та Римської імперії, прийшли в занепад у середні століття. З бурхливим розвитком промисловості на рубежі XIX-XX століть вони знов стали предметом пильних досліджень. У цей період почала закладатися ензимологія. Для вивчення й застосування ферментів необхідно було розробити спеціальні «м'які» методи виділення й очищення. Розпочалося практичне застосування ферментних препаратів для під солодження ряду речовин, з'явилися препарати для дубиння шкір.

У 70-80-х роках XIX ст. було закладено основи культивування рослинних клітин і тваринних тканин. Після робіт Т. Шванна й Р. Вирхова, які назвали клітину елементарним організмом, виник інтерес до вивчення живих клітин, і розпочалися експерименти по збереженню життєздатності клітин і шматочків тканин у специфічних умовах і середовищах. У 1865 р. Г. І. Мендель доповів Спільці дослідників природи свої спостереження про закономірності передачі спадкоємних ознак. На

початку ХХ ст, було уведено терміни «мутації», «ген», виникла гіпотеза Сеттона-Бовері про те, що хромосоми є матеріальними носіями спадкоємних ознак. Російський цитолог С. Г. Навашин розкрив особливості структури хромосом і заклав основи хромосомної теорії спадковості. Таким чином, у даний період впровадження наукових знань стало можливим розроблення науково-обґрунтованих біотехнологій багатьох виробничих процесів.

Третій період в розвитку біотехнології біотехнічний, останній період ери передісторії сучасних біотехнологій (10-50-ті роки ХХ ст.) умовно можна розділити на два етапи. На початку першого етапу, в основному, відбувалося вдосконалення технології існуючих виробництв, а потім, завдяки успіхам у мікробіології, біохімії й інших науках того періоду, внаслідок принципових удосконалень апаратури і технологій виникла основа для організації нових виробництв. У цей період почали випускати нові екологічно чисті біодобрива і біологічні препарати для боротьби зі шкідниками та хворобами сільськогосподарських рослин, створилися виробництва ряду цільових продуктів (органічних розчинників, спиртів), розпочалися промислові випробування біотехнологічних процесів переробки та використання рослинних відходів.

Другий етап даного періоду тісно пов'язаний із біотехнологічними методами одержання ряду складних речовин - антибіотиків, ферментів, вітамінів. Революційним моментом даного періоду була промислова реалізація технології виробництва антибіотиків. Відправною точкою при цьому стало відкриття О. Флемінгом, Х. Флорі й Е. Чейном хіміотерапевтичної дії пеніциліну. Практично одночасно в Радянському Союзі З.В. Єрмольєва, вивчаючи дію лізоциму, показала, що він є чинником природного Імунітету. Після другої світової війни в ході інтенсивного розвитку промислових біотехнологій було організовано виробництво амінокислот, білка одноклітинних, перетворення стероїдів, освоєно культивування клітин тварин і рослин. Інтактні клітини

мікроорганізмів почали широко використовувати для одержання лікарських речовин стероїдної природи, були організовані масштабні виробництва вакцин.

Накопичені наукові факти стали спонукальним мотивом для розробки способів великомасштабного культивування клітин різного походження. Це було необхідно для одержання клітинних продуктів і самих клітин для потреб людини, і, насамперед, як лікувальних або профілактичних засоби: пеніциліну, стрептоміцину, тетрациклінів, декстрину, ряду амінокислот і багатьох інших речовин. До 1950 р. Ж. Моно (Франція) розробив теоретичні основи безперервного керованого культивування мікробів.

У 50-ті роки після успішного використання вірусу поліомієліту для одержання вакцини, що був вирощений в культурі клітин ссавців, лінії культур клітин людини стали незамінними для виділення і культивування ряду інших вірусів, виробництва антитіл, інтерферону, протипухлинних хіміопрепаратів. Приблизно за 40 років третього періоду було вирішено основні завдання конструювання, створення і впровадження в практику необхідного обладнання, у тому числі головного з них - біореакторів. Це обладнання використовують і в наш час.

Четвертий період в біотехнології - *геннотехнічний* (від грец. *genesis* - походження, виникнення, народження) - ера новітніх біотехнологічних процесів, що розвивається протягом останніх 35-40 років, пов'язана з використанням іммобілізованих ферментів і клітинних органел, а також заснована на методах рекомбінантних ДНК. Наприкінці 60-х років іммобілізовані ферменти і клітини стали успішно застосовуватися не тільки для виробництва напівсинтетичних препаратів, а й для проведення нескладних біохімічних аналізів.

Бурхливо розвиваються в цей час генетична й клітинна інженерія, це сприяє тому, що біотехнологія поступово охоплює все нові й нові галузі

виробництва, які рішуче впроваджуються в багатьох сферах діяльності людини.

Виникнення генетичної інженерії умовно відносять до 1972 року, коли в США П. Бергом була створена перша рекомбінантна молекула ДНК. Однак, необхідно зазначити, що без фундаментальної роботи Ф. Крика і Дж. Уотсона (1953 р.) щодо встановлення структури ДНК було б неможливо досягнути сучасних результатів у галузі біотехнології. З'ясування механізмів функціонування і регулювання ДНК, виділення і дослідження специфічних ферментів створили умови для формування чіткого наукового підходу до розробки біотехнологічних процесів на основі генно-інженерних робіт. У цьому полягає сутність геннотехнічного періоду. Із середини 70-х років даною проблемою інтенсивно займаються тисячі наукових колективів і промислових компаній у всіх країнах світу. Поєднання слів «генетика» і «інженерія» свідчить про те, що настав час, коли можливим є конструювання рекомбінантних ДНК і цілеспрямоване створювання штучних генетичних програм. Знання будови апарату спадковості різних організмів дозволили маніпулювати не тільки нуклеїновими кислотами, а й цілими хромосомами (хромосомна інженерія) і клітинами (клітинна інженерія). Для геннотехнічного періоду властивим є розробка інтенсивних процесів на основі спрямованих фундаментальних досліджень (з продуцентами антибіотиків, ферментів, амінокислот, вітамінів), одержання суперпродуцентів, створення незвичайних організмів, які ніколи не існували раніше у природі, розробка і впровадження екологічно чистих і безвідходних технологій, а також автоматизація і комп'ютеризація біотехнологічних процесів.

Впровадження новітніх методів біотехнології наразі сприяють перевороту у різних напрямках біотехнології. Ці методи дозволяють інтенсифікувати екологічно чисті біотехнології відтворення їжі та кормових препаратів, вирішувати завдання забезпечення людства матеріальними і енергетичними ресурсами, а також природоохоронні

проблеми. Всі ці досягнення поставили біотехнологію на новий рівень, що якісно відрізняється від попереднього можливістю свідомо керувати клітинними процесами.

Отже, **промислова біотехнологія** – наука про одержання різних цільових продуктів на основі життєдіяльності мікроорганізмів. Її основою є робота з мікробними організмами. А тому, промислова мікробіологія (технічна мікробіологія) в даний час є самостійною і найбільш великотоннажною галуззю сучасної промислової біотехнології. У даний час в різних процесах промислової мікробіології одержують близько 200 сполук, що мають комерційну цінність. Найважливішими серед них є: амінокислоти, антибіотики, антиметаболіти, антиоксиданти, білки, вітаміни, гербіциди, інсектициди, коферменти, ліпіди, нуклеїнові кислоти, органічні кислоти, пігменти, полісахариди, протипухлинні агенти, ферменти, нуклеотиди, емульгатори.

Основними цілями промислової біотехнології слід вважати такі:

- створення мікроорганізмів, що продукують різні хімічні сполуки, антибіотики, полімери, амінокислоти, ферменти;
- збільшення врожайності сільськогосподарських культур шляхом створення гербіцидів та пестицидів;
- переробка викидів, що забруднюють навколишнє середовище.

2. Об'єкти промислової біотехнології.

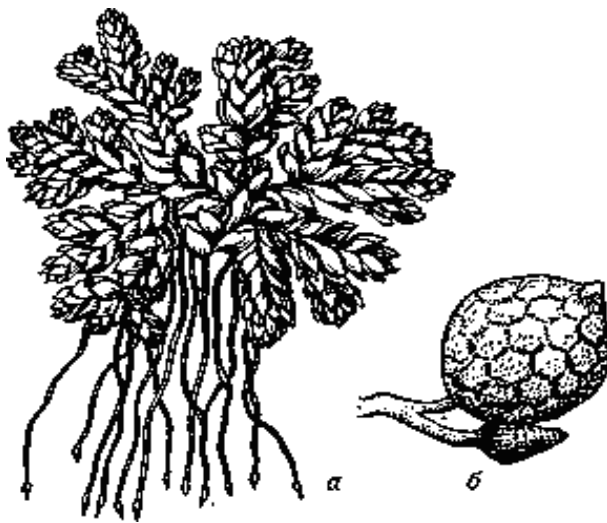
Біотехнологічні об'єкти знаходяться на різних щаблях організації:

- а) субклітинні структури (віруси, плазміди, ДНК мітохондрій і хлоропластів, ядерна ДНК);
- б) бактерії і ціанобактерії;
- в) гриби;
- г) водорості;
- д) найпростіші;

е) культури клітин рослин і тварин;

ж) рослини - нижчі (анабена-азола родина папоротьових) та вищі -

Ряска



A. ANDMAT, LEMNA MINOR L. B. KUPANDMAT, L. GIBBA L.
C. KORSANDMAT, L. TRISULCA L.
D. STORANDMAT, SPIRODELA POLYRRHIZA SCHLEID.

((Azolla), рід папоротей родина Азоллові (Azollaceae). Дрібні плаваючі рослини з розгалуженим кореневищами (до 25 см), зверху черепитчато покритими дволопатевиими листям довжиною 0,5-1 мм, а знизу - пучками придаткових коренів. 6 видів, в тропічних, субтропічних, рідше помірних поясах, 2- поширилися в Зах. і Центр. Європі. Швидко розростаються, А. іноді щільною масою закривають поверхню водойм. Для А. характерний симбіоз з синьозеленою азотфіксуючою водоростю анабеною (Anabaena azollae). На цьому ґрунтується використання А. в Японії та Індокитаї в якості зеленого добрива для рисових полів (на 1 га розвивається до 10 т А., що дають до 25 кг азоту). Деякі види А. розводять в акваріумах).

Ряска є однією із крайніх варіантів пристосування рослин до водного середовища проживання. Вони втратили або сильно спростили більшість органів, характерних для «нормальних» квіткових рослин. Ряска - багаторічна трав'яниста рослини, що плаває у воді (на поверхні або в товщі води), хоча і здатні існувати деякий час наземно - на дні пересохлих водойм. Ряска - дуже дрібні рослини, пагони яких не різко розчленовані на стебло і листя і представлені у вигляді невеликих подовжених або округлих пластинок, часто з'єднаних між собою у великі групи.

Ряска слугує кормом для диких і домашніх качок та інших водних тварин. У сільському господарстві їх розводять і використовують як цінний білковий корм (висушена зелена маса ряски містить до 45% білка). Загальновідома невибагливість ряски та її висока біологічна продуктивність. У багатьох тропічних регіонах Ряска (особливо різні види вольфії) вживаються в їжу. Останнім часом Ряску стали широко застосовувати в фізіологічних, біохімічних, генетичних дослідженнях як модельний об'єкт. Ряска дуже чутлива до вмісту в воді хлору і при його появі у воді сповільнює ріст і покривається дрібними коричневими крапками, а при значному перевищенні хлору у воді гине. Цей факт використовується для біоіндикації розчиненого у воді хлору.

Рис. 1. Порівняльний аналіз азолли та ряски

Бактерії і ціанобактерії

Мікроорганізмів, що синтезують продукти або здійснюють реакції, корисні для людини, кілька сотень видів. Біотехнологічні функції бактерій різноманітні. Бактерії використовуються при виробництві:

- харчових продуктів, наприклад, оцту (*Gluconobacter suboxidans*), молочнокислих напоїв (*Lactobacillus*, *Leuconostoc*) та ін .;
- Мікробних інсектицидів (*Bacillus thuringiensis*);
- Білка (*Methylomonas*);
- Вітамінів (*Clostridium* - рибофлавін);
- Розчинників та органічних кислот;
- Біогазу та фотоводню.

Корисні бактерії відносяться до еубактеріям. Оцтовокислі бактерії, представлені родами *Gluconobacter* і *Acetobacter*, - це грамнегативні бактерії, що перетворюють етанол в оцтову кислоту, а оцтову кислоту в вуглекислий газ і воду. Рід *Bacillus* відноситься до грампозитивних бактерій, які здатні утворювати ендоспори. *B.subtilis* - суворий аероб, а *B.thuringiensis* може жити і в анаеробних умовах. Анаеробні, що утворюють спори бактерії представлені родом *Clostridium*. *C.acetobutylicum* зброжує цукру в ацетон, етанол, ізопропанол і n-бутанол (ацетобутанолове бродіння), інші види можуть також зброжувати крохмаль, пектин і різні азотовмісні сполуки.

До молочнокислих бактерій відносяться представники родів *Lactobacillus*, *Leuconostoc* і *Streptococcus*, які не утворюють спор, грампозитивні та нечутливі до кисню. Гетероферментативні молочнокислі бактерії роду *Leuconostoc* перетворюють вуглеводи в молочну кислоту, етанол і вуглекислий газ. Гомоферментативні молочнокислі бактерії роду *Streptococcus* продукують тільки молочну кислоту, а бродіння, що здійснюється представниками роду *Lactobacillus*, дозволяє отримати поряд з молочною кислотою ряд різноманітних продуктів.

До бактерій роду *Corynebacterium*, нерухомі грампозитивні клітини, які не утворюють ендоспор, відносяться патогенні (*C.diphtheriae*, *C.tuberculosis*) і непатогенні ґрунтові види, що мають промислове значення. *C.glutamicum* служить джерелом лізину і поліпшують смак нуклеотидів. Коринебактерії хоча і вважаються факультативними анаеробами, краще ростуть аеробно. Бактерії використовуються для мікробного вилужування руд та утилізації гірничорудних відходів.

Широко використовується така властивість деяких бактерій, як діазотрофність, тобто здатність до фіксації атмосферного азоту. Виділяють 2 великі групи діазотрофів:

- Симбіонти: без корневих бульбочок (азобактер - лишайники, азоспіріллум - лишайники, анабенна, азолла), з корневим бульбами (бобові - ризобії, вільха, лох, обліпіха - актиноміцети);

- Вільноживучі: гетеротрофи (азобактер, клострідіум, метілобактер), автотрофи (хлоробіум, родоспіріллум і амебобактер). Мікробні клітини використовують для трансформації речовин.

Бактерії також широко використовуються в генноінженерних маніпуляціях при створенні геномних бібліотек, введенні генів у рослинні клітини (агробактерії). Виробничі штами мікроорганізмів повинні відповідати певним вимогам: здатність до зростання на дешевих поживних середовищах, висока швидкість росту і утворення цільового продукту, мінімальне утворення побічних продуктів, стабільність продуцента щодо виробничих властивостей, нешкідливість продуцента і цільового продукту для людини і навколишнього середовища.

У зв'язку з цим всі мікроорганізми, що використовуються у промисловості проходять тривалі випробування на нешкідливість для людей, тварин і навколишнього середовища. Важливою властивістю продуцента є стійкість до інфекції, що важливо для підтримки стерильності, і фагостійкості.

Всі ціанобактерії мають здатність до азотфіксації, що робить їх дуже перспективними продуцентами білку.

Анабаєнна (*Anabaena*) - нитчата синьо-зелена водорість. Нитки з більш-менш округлих клітин, містять гетеро цисти. У цитоплазмі клітин відкладається близький до глікогену запасний продукт - анабенін. Такі представники ціанобактерій, як носток, спіруліна, тріходесміум їстівні і безпосередньо вживаються в їжу.

Носток утворює на безплідних землях кірочки, які розбухають при зволоженні. У Японії місцеве населення використовує в їжу пласти ностока, що утворюються на схилах вулкана і називає їх ячмінним хлібом Тенгу (Тенгу - добрий гірський дух).



Рис. 2. Загальний вигляд пластин ностока

Своє зародження спіруліна (*Spirulina platensis*) почала з Африки - населення району озера Чад давно вживає її в їжу, називаючи цей продукт «діхе».

Інше місце, звідки почала поширюватися спіруліна, але іншого виду (*Spirulina maxima*) - води озера Тескоко в Мексиці. У 1964 році бельгійський ботанік Ж. Леонар звернув увагу на галети синьо-зеленого кольору, які місцеве населення виготовляло з водоростей, що ростуть в лужних ставках

навколо озера Чад. Ці галети представляли собою висушену масу спіруліни. Аналіз зразків *Spirulina* показав, що в ній міститься 65% білків (більше, ніж у соєвих бобах), 19% вуглеводів, 6% пігментів, 4% ліпідів, 3% волокон і 3% золи.



Рис. 3. Загальний вигляд водорості спіруліни

Для білків цієї водорості характерно збалансований вміст амінокислот. Клітинна стінка цієї водорості добре перетравлюється. Як озеро Тескоко, так і водойми району озера Чад мають у воді дуже високий вміст лугів. Характерно, що в таких озерах спіруліна повністю домінує і росте майже як монокультура - складає в окремих озерах до 99% загальної кількості водоростей. Зростає спіруліна в лужному середовищі при рН аж до 11. Її збирають також з озер біля м Мехіко, отримуючи до 2 т сухої ваги біомаси водорості на добу, і ця продукція розсилається в США, Японію, Канаду. В інших країнах спіруліну культивують звичайно в штучних водоймах або спеціальних ємностях. Спіруліну можна культивувати у відкритих ставках або, як в Італії, в замкнутій системі з поліетиленових труб. Урожайність дуже висока: отримують до 20 г сухої маси водорості з 1 м² в день, а розрахунки на рік показали, що вона перевищить вихід пшениці приблизно в 10 разів.

Переваги спіруліни в порівнянні з іншими їстівними водоростями не тільки в простоті культивування, але і в нескладності збору біомаси,

висушування її, наприклад, під сонцем. У ряді країн вирощують спіруліну виду *Spirulina platensis*. Нещодавно було показано, що в клітинах спіруліни, крім цінного білка, вуглеводів, ліпідів, вітамінів, в значних кількостях запасається, наприклад, така цінна речовина, як полі-*b*-оксибутират. Вітчизняна фармацевтична промисловість випускає препарат «Сплат» на основі ціанобактерії *Spirulina platensis*. Він містить комплекс вітамінів і мікроелементів і застосовується як загальнозміцнюючий і імуностимулюючий засіб.

Гриби

Біотехнологічні функції грибів різноманітні. Їх використовують для отримання таких продуктів, як: антибіотики (Пеніцил, цефалоспорини); гібереліни і цитокініни (фузаріум і ботрітіс); каротиноїди (астаксантин, що надає м'якоті лососевих риб червоно-помаранчевий відтінок виробляють *Rhaffia rhodozima*, яких додають у корм на рибозаводах); білок (*Candida*, *Saccharomyces lipolitica*); сири типу рокфор і камамбер (Пеніцил); соєвий соус (*Aspergillus oryzae*).

До грибів відносяться дріжджі і цвілі. З 500 відомих видів дріжджів першим люди навчилися використовувати *Saccharomyces cerevisiae*, цей вид найбільш інтенсивно культивується. До дріжджів, які зброджують лактозу, відноситься *Kluuveromyces fragilis*, який використовують для отримання спирту із сироватки. *Saccharomycopsis lipolytica* деградує вуглеводні і вживається для отримання білкової маси. Усі три види належать до класу аскоміцети. Інші корисні види відносяться до класу дейтеромицетів (недосконалих грибів), так як вони розмножуються не статевим шляхом, а брунькуванням. *Candida utilis* зростає в сульфідних стічних водах (відходи паперової промисловості). *Trichosporon cutaneum*, що окислює численні органічні сполуки, включаючи деякі токсичні (наприклад, фенол), відіграє важливу роль в системах аеробної переробки стоків. *Phaffia rhodozuma* синтезує атаксантин - каротиноид, який надає м'якоті форелі та лосося, вирощуваних на фермах, характерний помаранчевий або рожевий колір.

Промислові дріжджі зазвичай не розмножуються статевим шляхом, не утворюють спор і поліплоїдні. Останнім пояснюється їх сила і здатність адаптуватися до змін середовища культивування (в нормі ядро клітини *S.cerevisiae* містить 17 або 34 хромосоми, тобто клітини або гаплоїдні, або диплоїдні).

Цвілі викликають численні перетворення у твердих середовищах, які відбуваються перед бродінням. Їх наявністю пояснюється гідроліз рисового крохмалю при виробництві sake і гідроліз соєвих бобів, рису і солоду при отриманні їжі, що вживається в азіатських країнах. Харчові продукти на основі зброджених пліснявими грибами *Rhizopus oligosporus* соєвих бобів або пшениці містять в 5 - 7 разів більше таких вітамінів, як рибофлавін, нікотинова кислота і відрізняються підвищеним у кілька разів вмістом білка. Цвілі також продукують ферменти, що використовуються в промисловості (амілазу, пектиназу тощо), органічні кислоти і антибіотики. Їх застосовують і у виробництві сирів, наприклад, камамберу і рокфору.

Штучне вирощування грибів здатне внести й інший, не менш важливий внесок у справу забезпечення продовольством зростаючого населення земної кулі. Люди вживають гриби в їжу з глибокої давнини. Тому зробити гриби такою ж керованою сільськогосподарською культурою, як зернові злаки, овочі, фрукти, давно вже стало актуальним завданням.

Найбільш легко піддаються штучному вирощуванню дереворуйнуючі гриби. Це пов'язано з особливостями їх біології, які стали нам відомі та зрозумілі тільки зараз. Їх здатність легко рости і плодоносити використовували з найдавніших часів. Штучне розведення дереворуйнуючих грибів отримало досить широке поширення. Міцелій їстівних грибів можна вирощувати на рідких середовищах, наприклад на молочній сироватці тощо, у спеціальних ферментерах, у так званій глибинній культурі. Це повністю механізований і автоматизований процес.

Так, в Інституті мікробіології Академії наук УРСР розроблені та апробовані в дослідному виробництві способи отримання білкових грибних

препаратів *даедаліна* і *пантегріна* з міцелію дереворуйнуючих грибів *дедалеопсіса бугристого* і *пілолістника тигрового*, з високим вмістом білка і біологічно активних речовин. За вмістом білка 1 кг цих препаратів еквівалентний 2 кг м'яса. За біологічною цінністю білок цих препаратів не поступається рослинним і наближається до тваринного. Перетравність білків даних препаратів становить понад 80%. В основі цього способу отримання харчового білка лежать отримані мікологами дані про те, що плодові тіла грибів та їх грибниця близькі за своїм хімічним складом та харчовою цінністю. Грибні білкові препарати *даедалін* і *пантегрін* рекомендовані в якості харчових добавок після відповідного медичного контролю. Дослідження в цьому напрямку тривають

Найпростіші

Найпростіші відносяться до числа нетрадиційних об'єктів біотехнології. До недавнього часу вони використовувалися лише як компонент активного мулу при біологічному очищенні стічних вод. В даний час вони привернули увагу дослідників як продуценти біологічно активних речовин. У цій якості раціональніше використовувати вільноживучих найпростіших, що володіють різноманітними біосинтетичними можливостями і тому широко поширені в природі.

Особливу екологічну нішу займають найпростіші, що мешкають в рубці жуйних тварин. Вони володіють ферментом целюлазою, що сприяє розкладанню клітковини в шлунку жуйних. Найпростіші рубця можуть бути джерелом цього цінного ферменту. Збудник південноамериканського трипаносомозу - *Trypanosoma (Schizotrypanum cruzi)* стала першим продуцентом протипухлинного препарату *круцина* (СРСР) і його аналога-*тріпанози* (Франція). Вивчаючи механізм дії цих препаратів, радянські вчені (Г. І. Роськин, Н. Г. Ключєва та їх співробітники), а також їхні французькі колеги (Ж. Кудер, Ж. Мішель-Брен та ін.) прийшли до висновку, що ці препарати надають цитотоксичний ефект при прямому контакті з пухлиною

та інгібують її опосередковано, шляхом стимуляції ретикулоендотеліальної системи. З'ясувалося, що інгібування пов'язане з жирнокислотними фракціями. Характерною особливістю цих організмів є високий вміст ненасичених жирних кислот, що становить у тріпаносомід 70-80%, а у *Astasia longa* (вільноживучий джгутиконосець) - 60% від суми всіх жирних кислот. У джгутиконосців фосфоліпиди і поліненасичені жирні кислоти мають такий же склад і будову, як в організмі людини і тварин.

У світі мікробів поліненасичені жирні кислоти не синтезуються, а багатоклітинні тварини або рослини являють собою більш обмежену сировинну базу, ніж найпростіші, культури яких можна отримувати методами біотехнології незалежно від пори року або кліматичних умов. Оскільки ліпідний метаболізм найпростіших володіє відносною лабільністю, були вивчені шляхи його регуляції. Застосування до найпростіших загальноприйнятого в мікробіології прийому підвищення біосинтезу ліпідів за рахунок зниження вмісту в середовищі джерела азоту і збільшення вмісту джерела вуглецю призвело до різкого гальмування або зупинки росту культур. Для створення умов спрямованого біосинтезу ліпідів в середовища для культивування джгутиконосців додавали попередники та стимулятори біосинтезу ліпідів: малонат, цитрат, сукцинат, цитидинуклеотиди в поєднанні з певним режимом аерації.

Російські вчені отримали водорозчинний напівсинтетичний препарат - *астазілід*, що представляє собою комплекс ефірів сахарози і жирних кислот, попередньо виділених з вільноживучого джгутиконосця. Для вивчення активності і механізму дії цього препарату були застосовані різні моделі: бішарові ліпідні мембрани (БЛМ), моношарова культура нирки теляти і карциноми яєчника людини, імунокомпетентні клітини - перитонеальні макрофаги. Було встановлено, що астазілід викликає збільшення провідності, поверхневого натягу, а також зменшення електромеханічної стабільності БЛМ. Отримані дані дозволяють припускати, що в основі фізіологічних ефектів препарату лежить його значна мембранноактивна дія. Астазілід

проявляє м'які детергентні властивості. Можливо, що збільшення провідності і деяка дестабілізація клітинних мембран відкривають шлях для проникнення всередину клітини Ca^{2+} та інших іонів, що грають ключову роль в регуляції метаболізму. При вивченні дії астазіліду на культуру клітин нирки теляти було встановлено, що препарат збільшує мітотичний індекс клітин, знижує їх поліморфізм, покращує адгезивні властивості культури, забезпечує більш щільне зчеплення з субстратом і посилення міжклітинних контактів. Препарат не володів прямою цитотоксичною дією на культуру пухлинних клітин, а його протипухлинна дія, вивчена на 8 штаммах пухлин мишей і щурів, які реалізувалися через імунну систему. Астазілід діяв головним чином на клітинну ланку імунітету, викликаючи підвищення фагоцитарної активності перитонеальних макрофагів, збільшення здатності індукувати розвиток гіперчутливості уповільненого типу і деяких інших показників. Препарат попереджав загибель 60-80% тварин, заражених бактеріальними інфекціями (*E. coli*, *Ps. Aeruginosa*), а також лейшманіями.

Іншою групою біологічно активних речовин найпростіших є полісахариди. Різноманітність полісахаридів, синтезованих найпростішими, досить велика. Особливий інтерес представляє *парамілон*, характерний для євгленоїдних джгутикових. Представники роду *Astasia* і *Euglena* здатні до зверхсинтезу парамілона, що становить понад 50% сухого залишку клітин. Цей полісахарид вивчається як стимулятор імунної системи ссавців. У дослідах парамілон *A. longa* володів вираженим протипухлинним ефектом. Діючи опосередковано через імунну систему, парамілон гальмує зростання саркоми із 180 на 60% і знижує метастазування аденокарциноми Ерліха.

Аденокарцинома Ерліха взагалі не прищеплювалася у 50- 60% мишей, яким профілактично був введений парамілон в дозах 3 і 30 мг/кг ваги тварини. Парамілон, виділений з *A. longa*, практично нетоксичний.

Виражена імуномодулююча дія і низька токсичність цього препарату є передумовою для його поглибленого дослідження в поєднанні з препаратами прямої протипухлинної дії, радіотерапією та іншими ад'ювантами.

В даний час в світі надається велике значення виробництва глюканів не тільки для медичних цілей, а й для харчової та текстильної промисловості. До цих пір глюкани отримували з культур бактерій або морських водоростей. Євгленіди є одним з найбільш перспективних джерел цієї речовини. Структурні полісахариди, що входять до складу клітинних мембран найпростіших, - це гетерополісахариди, що містять глюкозу, манозу, ксилозу, арабінозу, рибозу, галактозу, рамнозу, фруктозу, глюкозамін. Найбільш характерними гетерополісахаридом є арабіногалактан, Д-галакто-Д-маннан, фосфаноглюкани та інші. Великий інтерес представляє з'ясування антигенного взаємозв'язку між непатогенними і патогенними для людини видами трипаносомід.

Встановлено, що при введенні мишам полісахаридів з культур непатогенних для людини найпростіших - *Herpetomonas* sp. і *Crithidia fasciculata* - підвищувалася резистентність тварин до *T. cruzi*, збудника хвороби Чагаса у людини. Наявність перехресних імунологічних реакцій між полісахаридами різних типів послугувало підставою для висновку про те, що антигенна спільність між цими речовинами обумовлена не структурою полімеру, а окремими мономерами або олігомерами однакової хімічної будови. Біомаса найпростіших містить до 50% білка. Його висока біологічна цінність полягає в тому, що він містить всі незамінні амінокислоти, причому кількість вільних амінокислот на порядок вища, ніж в біомасі мікроводоростей, бактерій чи у м'ясі. Це свідчить про широкі можливості застосування вільноживучих найпростіших в якості джерела кормового білку.

Водорості

Водорості використовуються, в основному, для отримання білка. Дуже перспективні в цьому відношенні і культури одноклітинних водоростей, зокрема високопродуктивних штамів роду *Chlorella* і *Scenedesmus*. Їх біомаса після відповідної обробки використовується в якості добавки в раціони худоби, а також у харчових цілях.

Одноклітинні водорості вирощують в умовах м'якого теплого клімату (Середня Азія, Крим) у відкритих басейнах зі спеціальним живильним середовищем. Наприклад, за теплий період року (6-8 місяців) можна отримати 50-60 т біомаси хлорели з 1 га, тоді як одна з найбільш високопродуктивних трав - люцерна дає з тієї ж площі тільки 15- 20 т врожаю. Хлорела містить близько 50% білка, а люцерна - лише 18%. В цілому в перерахунку на 1 га хлорела утворює 20-30 т чистого білка, а люцерна - 2-3,5 т. Крім того, хлорела містить 40% вуглеводів, 7-10% жирів, вітаміну А (в 20 разів більше), В2, К, РР і багато мікроелементів. Варіюючи склад живильного середовища, можна процеси біосинтезу в клітинах хлорели зрушити в бік накопичення або білків, або вуглеводів, а також активувати утворення тих чи інших вітамінів.

При завоюванні племен майя місіонерами описувався випадок, коли іспанці близько півтора років облягали фортецю на вершині гори. Природно, що всі продукти давно повинні були скінчитися, проте фортеця не здавалася. Коли ж вона була нарешті взята, то іспанці з подивом побачили в ній невеликі ставки, де культивувалися одноклітинні водорості, з яких індіанці готували особливий сир. Іспанці спробували його і знайшли вельми приємним на смак. Однак це було вже після того, як іспанці знищили абсолютно всіх захисників і секрет племені був загублений. У наш час робилися спроби визначити цей вид водоростей, з яких готувався сир, але вони не увінчалися успіхом.

У їжу вживають не менше 100 видів макрофітних водоростей як у країнах Європи та Америки, так і особливо на Сході. З них готують багато різноманітних страв, у тому числі дієтичних, салатів, приправ. Їх подають у вигляді зацукрованих шматочків, своєрідних цукерок, з них варять варення, роблять желе. У магазині можна купити консерви з морської капусти - ламінарії далекосхідних або північних морів. Її консервують з м'ясом, рибою, овочами, рисом, вживають при приготуванні супів та ін.

Відомі й інші їстівні макрофітні водорості - ульва, з якої роблять різні зелені салати, а також аларія, порфіра, родіменія, хондрус, ундарія та ін.

В Японії продукти, які отримані з ламінарієвих, називають «комбу», і для того, щоб їх смачно приготувати, існує більше десятка способів. У цілому ряді країн водорості використовують як вельми корисну вітамінну добавку до кормів для сільськогосподарських тварин. Їх додають до сіна або дають як самостійний корм для корів, коней, овець, кіз, домашньої птиці у Франції, Шотландії, Швеції, Норвегії, Ісландії, Японії, Америці, Данії й на Півночі Росії. Тваринам згодуюють у вигляді добавки також біомасу вирощуваних мікрowodоростей (хлорела, сценедесмус, дуналієлла та ін.).

Гідролізати білка зеленої водорості *Scenedesmus* використовуються в медицині і косметичній промисловості. В Ізраїлі на досвідчених установках проводяться експерименти із зеленою одноклітинною водоростю *Dunaliella bardawil*, яка синтезує *гліцерол*. Ця водорість відноситься до класу рівноджгутикових і схожа на хламідомонаду. *Dunaliella* може рости і розмножуватися в середовищі з широким діапазоном вмісту солі: і в воді океанів, і в майже насичених сольових розчинах Мертвого моря. Вона накопичує вільний гліцерин, щоб протидіяти несприятливому впливу високих концентрацій солей в середовищі, де вона росте. За оптимальних умов і високому вмісту солі на частку гліцерола доводиться до 85% сухої маси клітин. Для росту цим водоростям необхідні: морська вода, вуглекислий газ і сонячне світло. Після переробки ці водорості можна використовувати як корм для тварин, так як у них немає неперетравної клітинної оболонки, властивої іншим водоростям. Вони також містять значну кількість β -каротину. Таким чином, культивуючи цю водорість, можна отримувати гліцерин, пігмент і білок, що досить перспективно з економічної точки зору. Поряд з кормами водорості давно застосовують у сільському господарстві в якості добрив. Біомаса збагачує ґрунт фосфором, калієм, йодом і значною кількістю мікроелементів, поповнює також її бактеріальну, в тому числі азотфіксуючу, мікрофлору. При цьому в ґрунті водорості розкладаються

швидше, ніж гнойові добрива, і не засмічують її насінням бур'янів, личинками шкідливих комах, спорами фітопатогенних грибів.

Одним з найцінніших продуктів, одержуваних з червоних водоростей, є агар - полісахарид, присутній в їх оболонках і складається з агарози і агаропектина. Кількість його доходить до 30-40% від ваги водоростей (водорості лауренція і грацилярія, гелідіум). Водорості - єдине джерело отримання агару, агароїда, карагініну, альгінатів.

У світі в 1980 р було отримано 7 тис. т агару, 222 тис. т альгінатів, 10 тис. т карагініну. У нашій країні основним джерелом агару служить червона водорість анфельція. Бурі водорості є єдиним джерелом отримання одних з найбільш цінних речовин водоростей - солей альгінової кислоти, альгінатів.

Альгінова кислота - лінійний гетерополісахарид, побудований з пов'язаних залишків (3 - Д-маннуринової і α - L-гіулуринової кислот). Альгінати виключно широко застосовуються в народному господарстві. Це виготовлення високоякісних мастил для тертьових деталей машин, медичні та парфумерні мазі і креми, синтетичні волокна і пластики, стійкі до будь-якої погоди лакофарбні покриття, що не вицвітають з часом тканини, виробництво шовку, що клеять речовин виключно сильної дії, будівельних матеріалів, харчові продукти відмінної якості - фруктові соки, консерви, морозиво, стабілізатори розчинів, брикетування палива, ливарне виробництво і багато іншого.

Альгінат натрію - найбільш використовувана сполука - здатна поглинати до 300 вагових одиниць води, утворюючи при цьому в'язкі розчини. Бурі водорості багаті також корисним сполуками - шестиатомним спиртом манітом, який з успіхом застосовують в харчовій промисловості, фармацевтиці, при виробництві паперу, фарб, вибухівки та ін. Бурі водорості найближчим часом планується використовувати для отримання біогазу. Калусні культури макрофітних водоростей можуть бути використані далі в різних напрямках. У випадку, якщо вони отримані від агарофітів, можна безпосередньо отримувати з них агар. Калусні культури харчових

макрофітних водоростей, наприклад ламінарієвих, можуть в перспективі використовуватися для отримання білка, безпосередньо що йде в їжу і в харчові добавки, а також до корму сільськогосподарських тварин.

Суспензійні культури макрофітних водоростей відкривають в перспективі можливості використання їх як трофічної ланки в марикультури (морській культурі). Вони могли б також виступати в якості партнера в штучно створюваних рослинних асоціаціях, учасники яких мають корисні властивості.

Необхідно відзначити, що за відсутності токсичної і антагоністичної дії сполуки, що виділяються у природних умовах мають різноманітні і численні природні асоціації, наприклад повсюдно зустрічаються комплекси водоростей і бактерій.

Рослини

Водяна папороть азолла цінується як органічне азотне добриво, так як росте в тісному симбіозі з синьо-зеленою водорістю Анабенна. Крихітні листя азолли (їх довжина рідко перевищує один міліметр) розташовані нахштат черепиці - одні листочки перекривають інші. Чудовою особливістю азолли є симбіоз цієї рослини з синьо-зеленою водорістю анабеною азолли (*Anabaena azollae*), із родини ностокових (*Nostocaceae*). Водорість окупує порожнину, що знаходиться на черевній стороні верхнього, повітряного сегмента, недалеко від його заснування. Порожнина оточена виростами з епідермальних клітин, які поступово обростають її, залишаючи лише крихітний центральний отвір, сполучається з зовнішнім середовищем. Вона цілком вистелена епідермальними клітинами, від яких відходять волоски, і наповнена слизом (можливо, продуктом виділення цих волосків). Анабенна виконує функції азотфіксації в цьому симбіозі.

Азолла швидко розмножується простим поділом: частина листя відділяється від материнської рослини і починає самостійне життя. При сприятливих умовах крихітка здатна подвоювати свою біомасу кожні три доби. У поєднанні з тим, що симбіоз з анабенною дозволяє накопичувати

багато азоту у вегетативній масі, такі темпи зростання приводять до швидкого заповнення всій поверхні води вегетативною масою цієї папороті.



Рис. 4. Загальний вигляд Азолли-анабени

Анабенну азоллу вирощують на рисових полях перед посівом рису, що дозволяє знижувати кількість внесених мінеральних добрив. Представники родини ряскових (Lemnaceae) - найдрібніші і прості за будовою квіткові рослини, величина яких рідко перевищує 1 см. Цвітуть вкрай рідко. Ряска - свільноживучі водні плаваючі рослини. Вегетативне тіло нагадує лист або слань нижчих рослин, тому до початку 18 століття ряску відносили до сланневих рослин. Тіло ряскових - представляє зелену пластинку, іноді опуклу з нижньої сторони.

Ряска (*Lemna minor*, *L. trisulca*, *Wolffia*, *Spirodela polyrrhiza*) служать кормом для тварин, для качок та інших водоплавних птахів, риб, ондатри. Їх використовують і в свіжому, і в сухому вигляді як цінний білковий корм для свиней і домашньої птиці.



Рис. 5. Загальний вигляд ряски

При всій мініатюрності рясок суперкарлик серед цих малюків флори справедливо вважають не їх, а представників роду Вольфія (Wolffia). Вони названі на честь німецького лікаря і ботаніка Дж. Ф. Вольфа (1778-1806), який вперше їх описав. Вольфії схожі на сплющену кульку. На відміну від багатьох родичів, у вольфії взагалі немає коренів. Мінеральні солі ці рослини поглинають з води всією поверхнею свого крихітного тільця - як одноклітинні організми. Ряска містить багато протеїну (до 45% від сухої маси), 45% вуглеводів, 5% жирів та інше - клітковина. Вони високо продуктивні, невибагливі в культурі, добре очищають воду і збагачують її киснем. Це робить Ряску цінним об'єктом для морфогенетичних, фізіологічних і біохімічних досліджень.

3. Перспективи розвитку промислової біотехнології

Центральна проблема промислової біотехнології - інтенсифікація біопроектів як за рахунок підвищення потенціалу біологічних агентів і їх систем, так і за рахунок удосконалення обладнання, застосування біокатализаторів (іммобілізованих ферментів і клітин) у промисловості, аналітичній хімії, медицині. В основі промислового використання досягнень біології лежить техніка створення рекомбінантних молекул ДНК. Конструювання потрібних генів дозволяє управляти спадковістю і життєдіяльністю тварин, рослин і мікроорганізмів і створювати організми з новими властивостями. Зокрема, можливе управління процесом фіксації атмосферного азоту і перенесення відповідних генів із клітин мікроорганізмів в геном рослинної клітини. В якості джерел сировини для біотехнології все більшого значення набуватимуть відтворювані ресурси не харчових рослинних матеріалів, відходів сільського господарства, які служать додатковим джерелом як кормових речовин, так і вторинного палива (біогазу), органічних добрив.

Однією з галузей біотехнології, що бурхливо розвивається вважається технологія мікробного синтезу цінних для людини речовин. За прогнозами, подальший розвиток цієї галузі спричинить перерозподіл ролей рослинництва і тваринництва з одного боку, і мікробного синтезу - з іншого, у формуванні продовольчої бази людства. Не менш важливим аспектом сучасної мікробіологічної технології є вивчення участі мікроорганізмів у біосферних процесах і спрямована регуляція їх життєдіяльності з метою вирішення проблеми охорони навколишнього середовища від техногенних, сільськогосподарських і побутових забруднень. З цією проблемою тісно пов'язані дослідження з виявлення ролі мікроорганізмів у родючості ґрунтів (гумусоутворення і поповнення запасів біологічного азоту), боротьбі зі шкідниками та хворобами сільськогосподарських культур, утилізації пестицидів, хімічних сполук у ґрунті. Наявні в цій галузі знання свідчать про те, що зміна стратегії господарської діяльності людини від хімізації до біологізації землеробства виправдовується як з економічної, так і з екологічної точок зору.

У даному напрямку перед промисловою біотехнологією може бути поставлена мета регенерації ландшафтів. Ведуться роботи щодо створення біополімерів, які будуть здатні замінити сучасні пластмаси. Ці біополімери мають істотну перевагу перед традиційними матеріалами, так як нетоксичні і схильні біодеградації, тобто легко розкладаються після їх використання, не забруднюючи навколишнє середовище. Біотехнології, засновані на досягненнях мікробіології, найбільш економічно ефективні при комплексному їх застосуванні і створенні безвідходних виробництв, що не порушують екологічної рівноваги. Їх розвиток дозволить замінити величезні заводи хімічної промисловості екологічно чистими компактними виробництвами.

Важливим і перспективним напрямком біотехнології є розробка способів одержання екологічно чистої енергії. Отримання біогазу та етанолу, але є й принципово нові експериментальні підходи в цьому напрямку. Одним

з них є отримання фотоводню. Якщо з хлоропластів виділити мембрани, що містять фотосистему 2, то на світлі відбувається фотоліз води - розкладання на кисень і водень. Моделювання процесів фотосинтезу, що відбуваються в хлоропластах, дозволило б запасати енергію Сонця в цінному паливі - водні. Переваги такого способу отримання енергії очевидні: наявність надлишку субстрату, води; нелімітоване джерело енергії - Сонце; продукт (водень) можна зберігати, не забруднюючи атмосферу; водень має високу теплотворну здатність (29 ккал /г) в порівнянні з вуглеводнями (3,5 ккал /г); процес йде при нормальній температурі без утворення токсичних проміжних продуктів; процес циклічний, так як при споживанні водню регенерується субстрат - вода.

Інший механізм перетворення енергії у галофітних бактерій *Halobacterium halobium*, які використовують енергію сонця, що поглинається пурпуровим пігментом бактеріородопсином, що знаходяться в мембрані клітини. Поглинання світла викликає хімічні та фізичні зміни в мембрані, що призводять до спрямованого транспорту протонів водню з одного боку мембрани на іншу і створенню електрохімічного градієнта. Наслідком цього є синтез аденозинтрифосфornoї кислоти. *H.halobium* можна культивувати в дрібних водойм з високим вмістом NaCl та інших мінеральних солей. З 10 літрів бактеріальної культури можна отримати 0,5 грама мембран, що містять до 100 тисяч молекул пігменту. Пігмент можна фіксувати на підкладках, що володіють фізичними і хімічними властивостями для транспорту протонів.

4. Основні напрямки промислової біотехнології.

Умовно можна виділити наступні основні напрямки промислової біотехнології: біотехнологія харчових продуктів, препаратів для сільського господарства, препаратів і продуктів для промислового і побутового використання, лікарських препаратів, засобів діагностики та реактивів, промислова біотехнологія також включає вилуговування і концентрування

металів, захист навколишнього середовища від забруднення, деградацію токсичних відходів і збільшення видобутку нафти.

5. Основні методи та підходи, які використовуються в промисловій біотехнології.

Як зазначалося раніше, *біотехнологія* – це цілеспрямоване отримання цінних продуктів за рахунок використання біохімічної діяльності мікроорганізмів, ізольованих клітин або їх компонентів.

Переваги біотехнологічних виробництв:

1. Можливість отримання специфічних і унікальних природних речовин, частина з яких (наприклад, білки, ДНК) ще не можливо отримувати іншим шляхом (наприклад, хімічним синтезом);
2. Проведення біотехнологічних процесів при відносно невисоких температурах і тиску;
3. Висока швидкість росту та накопичення біомаси;
4. Використання в якості сировини дешевих відходів сільського господарства і промисловості;
5. Біотехнологічні процеси зазвичай екологічні, дають менше шкідливих відходів і близькі до тих, що проходять у природі природними процесами;
6. Технологія і апаратура біотехнологічних виробництв прості, а також малокоштовні.

Продукти біотехнології отримують за індивідуальними технологіями, використовуючи для цього певні біологічні агенти, сировину, кількість стадій виробництва та їх технологічні режими, які можуть сильно варіювати. У той же час для всіх біотехнологічних виробництв існує типова схема.

До визначальних факторів біотехнологічного процесу відносять:

- Вид біотехнологічного процесу, що використовується;
- Субстрат з його біохімічними та біофізичними характеристиками;

- Апаратуру, включаючи систему контролю управління;
- Технологічний режим і відповідність вимогам ДСТУ.

Промисловий біотехнологічний процес, в якому для виробництва комерційних продуктів використовують клітинні системи або мікроорганізми, зазвичай включає **три ключові стадії**:

1. Підготовчу (обробка сировини, що використовується в якості джерела поживних речовин, і за необхідністю приготування поживних середовищ);

2. Біотехнологічну (ріст мікроорганізмів-мішеней у великому - зазвичай обсязі понад 100 л - біореакторі (ферментація) з подальшим утворенням потрібного метаболіта, наприклад антибіотика, амінокислоти або білка (біотрансформація));

3. Отримання готової продукції (очищення цільового продукту від компонентів культурального середовища або від клітинної маси).

Підготовча стадія необхідна для приготування сировини, що використовується в біотехнологічному процесі. Залежно від цільового продукту передбачається:

- Приготування середовища, що включає необхідні компоненти харчування для організмів, та його стерилізація (для асептичних біотехнологічних процесів, при яких небажане попадання сторонньої мікрофлори);

- Підготовка і стерилізація газів (зазвичай повітря) шляхом очищення від пилу, вологи і присутніх у повітрі мікроорганізмів, включаючи спори;

- Підготовка посівного матеріалу, в тому числі культивування мікроорганізмів, ізольованих клітин рослин або тварин;

- Підготовка біокатализатора - або ферменту у вільному або закріпленому на носії вигляді, або біомаси мікроорганізмів, вирощених до стану, в якому проявляється їх ферментативна активність;

- Попередня обробка сировини, якщо вона потрапляє у непридатному для безпосереднього використання у біотехнологічному процесі вигляді.

Наприклад, при отриманні спирту пшеницю спочатку дроблять, а потім піддають ферментативному процесу «оцукрювання». Інший приклад - використання деревини для отримання дріжджів: її спочатку подрібнюють, а потім піддають нагріванню до 200°C в кислому середовищі. В результаті кислотного гідролізу відбувається перетворення деревини на розчин глюкози і лігнін. Розчин глюкози (гідролізат) якраз і використовують в біотехнологічному процесі для отримання кормових дріжджів.

Біотехнологічна стадія - основна у біотехнологічному виробництві. Саме на цій стадії з використанням того чи іншого біологічного агента (мікроорганізмів, ізольованих клітин, ферментів або клітинних органел) відбувається перетворення сировини в той чи інший цільовий продукт.

Головною метою є отримання певної органічної речовини. Однак біотехнологічна стадія, як правило, включає не тільки синтез нових органічних сполук, але і ряд інших біотехнологічних процесів, таких, як:

- **Ферментація** - процес, що здійснюється за участю ферментів культивованих мікроорганізмів;
- **Біотрансформація** - процес зміни хімічної структури речовини під дією ферментативної активності клітин або готових ферментів;
- **Біокаталіз** - хімічні перетворення речовини, що протікають з використанням біокаталізаторів-ферментів;
- **Біоокислення** - окислення забруднюючих речовин за допомогою мікроорганізмів або асоціації мікроорганізмів в аеробних умовах;
- **Метанове бродіння** - переробка органічних відходів за допомогою асоціації метаногенних мікроорганізмів в анаеробних умовах;
- **Біокомпостування** - зниження вмісту шкідливих органічних речовин у твердих відходах;
- **Біосорбція** – сорбція (поглинання твердим тілом чи речовиною) шкідливих домішок з газів або рідин (зазвичай здійснюється закріпленими на спеціальних твердих носіях мікроорганізмами);
- **Бактеріальне вилужування** - процес переведення нерозчинних у воді

сполук металів в розчинений стан за допомогою спеціальних мікроорганізмів;

- **Біодеградація** - руйнування шкідливих сполук, що здійснюється мікроорганізмами-бідеструкторами.

Зазвичай біотехнологічна стадія завершується виходом одного рідинного і одного газового потоків, іноді - тільки одного рідинного або переробленого твердого продукту, наприклад при дозріванні сиру або біокомпостуванні відходів.

Отримання готової продукції - заключна стадія технологічного процесу біотехнологічного виробництва. Найчастіше цільовий продукт знаходиться або в самій біомасі, або в рідині. Залежно від властивостей біомаси та рідини, для їх поділу можуть бути використані різні методи:

- **Відстоювання** - поділ під дією гравітаційних сил (зазвичай при очищенні стічних вод);

- **Фільтрація** - пропускання суспензії через фільтруючий матеріал, на якому затримуються частинки твердої фази - біомаса. Такий спосіб застосовують при виробництві антибіотиків, особливо в тих випадках, коли мікроорганізм-продуцент має міцеліальних характер;

- **Сепарація, центрифугування** – поділ (розшарування) під дією відцентрових сил. Найбільш часто використовують для відділення дріжджів або бактерій у виробництві кормової біомаси;

- **Мікрофільтрація, ультрафільтрація** - пропускання суспензії через мембрани з дуже малим розміром пор, що забезпечує утримання клітин мікроорганізмів на мембрані та отримання чистого розчину. При ультрафільтрації відокремлюються не тільки клітини, але і великі молекули розчинених речовин;

- **Коагуляція** - додавання до суспензії реагентів, що сприяють утворенню і осадження більш великих клітинних частинок і відділення їх від рідини методом відстоювання;

- **Флотація** - захоплення мікроорганізмів бульбашками піни і виділення

їх з пінної фракції.

Цільові продукти біосинтезу можуть бути позаклітинними і внутрішньоклітинними.

Для внутрішньоклітинних продуктів спочатку необхідно зруйнувати оболонку клітин. Це можна здійснити дезінтеграцією клітин, зруйнувавши клітинну оболонку фізичними методами (за допомогою перемолу, шляхом заморожування і продавлювання, впливом ультразвуку, методом декомпресії - різкого скидання тиску) або хімічними та біотехнологічними методами. Використовують також *гідроліз* (руйнування клітинних оболонок під дією хімічних реагентів і температури), *ферментоліз* (руйнування клітинних оболонок під дією ферментів при підвищеній температурі) або *автоліз* (різновид ферментолізу, коли використовують власні ферменти клітини).

Після проведення будь-якої з перерахованих вище операцій подальше виділення цільового продукту забезпечується методами, спільними для позаклітинних і внутріклітинних продуктів. Основними з них є:

- **Екстракція** - перехід цільового продукту з водневої фази у не змішуючу з водою органічну рідину (екстрагент). Найбільш відомо виділення жироподібних речовин рідкими вуглеводнями (типу бензину). Застосовують і багато інших видів екстрагентів (хлороформ, ефір, бутилацетат). Іноді екстракцію здійснюють безпосередньо з біомаси мікроорганізмів;

- **Осадження** - виділення цільового продукту шляхом додавання до рідини реагенту, що взаємодіє з розчиненим продуктом і переводить його у тверду фазу;

- **Адсорбція** - перехід розчиненого в рідині продукту в тверду фазу шляхом його сорбції на спеціальних твердих носіях, (сорбентах);

- **Іонний обмін** - у тверду фазу переходять іони (катіони або аніони), а не молекула цільового продукту чи домішки;

- **Відгонка, ректифікація** - виділення розчинених у культуральній рідині легко кип'ячих продуктів, наприклад етилового спирту;

- **Ультрафільтрація, нанофільтрація і зворотний осмос** - виділення високомолекулярних сполук (білків, поліпептидів, полінуклеотидів). Зворотній осмос та нанофільтрація дозволяють відокремлювати навіть невеликі за розміром молекули;

- **Центрифугування, ультрацентрифугування** - виділення вірусів, клітинних органел, високомолекулярних сполук.

Очищення необхідне для отримання біопродуктів високого ступеня чистоти. Основною метою є видалення домішок, що досягається за допомогою екстракції, адсорбції, іонного обміну, ультрафільтрації, зворотнього осмосу, ректифікації та ферментоліза, які були розглянуті раніше. Крім перерахованих, використовують інші процеси, такі, як:

- **Хроматографія** - процес, що нагадує адсорбцію. На твердому сорбенті збираються розчинені речовини, часто близькі за структурою (наприклад, суміші білків, нуклеотидів, цукрів, антибіотиків). При адсорбції вони десорбуються разом, а ось при хроматографії вони виділяються з сорбенту як би по черзі, що дозволяє відділити їх один від одного;

- **Діаліз** - процес, в якому через напівпроникнену плівку можуть проходити низькомолекулярні речовини, а високомолекулярні залишаються. Шляхом діалізу здійснюють очистку вакцин і ферментів від солей і низькомолекулярних розчинних домішок;

- **Кристалізація** - процес, заснований на різній розчинності речовин при різних температурах. Повільне охолодження дозволяє формувати кристали з розчинів цільових продуктів, причому чистота їх зазвичай дуже висока. Таким чином, наприклад, отримують кристали пеніциліну. Можна навіть отримати ще більш чистий продукт, якщо кристали розчинити у воді або розчиннику, а потім знову кристалізувати тобто провести процес перекристалізації.

- **Концентрування** продукту підвищує його вихід. Відомо, що після біотехнологічної стадії вміст продукту зазвичай становить приблизно 0,1-1%, після стадії відділення біомаси - 0,1-2%, після стадії виділення - 1-10%, після

стадії очищення - 50-80% і, після стадії концентрування - 90-100%.

На стадії концентрування застосовують такі процеси, як випарювання, сушка, осадження, кристалізація, фільтрація, ультрафільтрація, гіперфільтрація або нанофільтрація, що забезпечують як би віджимання розчинника із розчину.

Отримання готової форми продукту завершує біотехнологічне виробництво. Продукт набуває товарної форми за рахунок проведення процесів гранулювання (формування гранул з порошку або прямо з розчину), дражеування, таблетування (формування драже, таблеток), розливу або фасування, ампулювання (затарювання в ампули).

Контрольні питання:

1. Надайте визначення поняттю «біотехнологія».
2. Яка перспективність та ефективність застосування біотехнологічних процесів?
3. Охарактеризуйте взаємозв'язок біотехнології із іншими науками.
4. Яким чином трактують різні вчені питання про формування біотехнології як науки.
5. Надайте характеристику 4 етапів формування біотехнології.
6. Надайте визначення поняттю «промислова біотехнологія».
7. Які основні цілі промислової біотехнології?
8. Вкажіть об'єкти промислової біотехнології і надайте їм характеристику.
9. Які перспективи розвитку промислової біотехнології?
10. Вкажіть основні напрямки промислової біотехнології.
11. Вкажіть переваги біотехнологічних виробництв.
12. Вкажіть фактори біотехнологічного процесу.
13. Вкажіть і охарактеризуйте три ключові стадії промислового біотехнологічного процесу.

ЛЕКЦІЯ № 2

ТЕХНОЛОГІЧНЕ ОБЛАДНАННЯ ПРОМИСЛОВОГО ПРИЗНАЧЕННЯ

Питання:

1. Обладнання лабораторного та промислового виробництва
 2. Групи біореакторів та їх характеристика
 3. Призначення та принцип роботи біореактора
 4. Режими періодичного і проточного культивування
 5. Переваги і недоліки періодичних і напівперіодичних процесів ферментації.
-

1. Обладнання лабораторного та промислового виробництва

Для культивування різних біологічних об'єктів, в тому числі мікроорганізмів і культур клітин, залежно від поставлених завдань використовують різне технологічне обладнання. Це можуть бути качалки і ролери - при лабораторних дослідженнях, біореактори і ферментери - при промислових виробництвах.

У лабораторних умовах часто використовують качалки і роллерні установки, обертання яких запобігає седиментації (осадження) клітин і забезпечує достатню концентрацію розчиненого кисню. У більшості випадків швидкість обертання становить 50-120 об/хв для кругових качалок і 1-20 об/хв - для роллерних установок. Незважаючи на різні способи перемішування клітинних культур, відмінності в продуктивності і збільшенні клітин незначні.

2. Групи біореакторів та їх характеристика

Промислове вирощування клітин рослин забезпечується в біореакторах або ферментерах. Їх поділяють на 3 групи: за конструкцією і за принципом перемішування культуральної рідини.

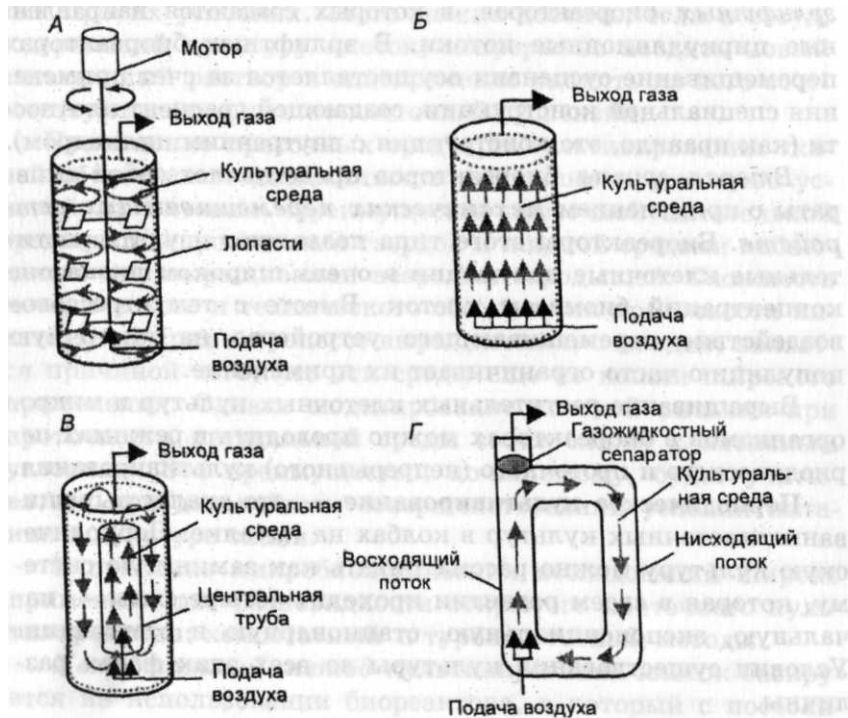


Рис. 6.2. Упрощенные схемы биореакторов различных типов (по Б. Глику и Дж. Пастернаку, 2002):

А — реактор с механическим перемешиванием; Б — барботажная колонна; В — эрлифтный реактор с внутренней циркуляцией; Г — эрлифтный реактор с внешней циркуляцией. Стрелки указывают направление потока культуральной среды

Із рисунка б слід зауважити, що біореактори поділяють на три основні групи (рис. 6):

- 1) реактори з механічним перемішуванням;
- 2) барботажні колони, через які для перемішування вмісту пропускають повітря;
- 3) ерліфтні ререактори з внутрішньою чи зовнішньою циркуляцією;

Перемішування і циркуляція культурального середовища в них забезпечується потоком повітря, за рахунок якого між верхнім і нижнім шарами культурального середовища виникає градієнт щільності.

Біореактори першого типу використовують найчастіше, оскільки вони дозволяють легко змінювати технологічні умови та ефективно доставляти до

клітин, що ростуть повітря, яке визначає характер розвитку мікроорганізмів і їх біосинтетичну активність. У таких реакторах повітря подають в культуральне середовище під тиском через розбризкувач - кільце з безліччю маленьких отворів. При цьому утворюються дрібні бульбашки повітря і за рахунок механічного перемішування забезпечується їх рівномірний розподіл. Для цієї ж мети використовують мішалки - одну або декілька.

Мішалки, розбиваючи великі бульбашки повітря, разносять їх по всьому реактору і збільшують час перебування в культуральному середовищі. Ефективність розподілу повітря залежить від типу мішалки, числа обертів, фізико-хімічних властивостей середовища.

При інтенсивному перемішуванні культурального середовища відбувається її вспінювання, тому робочий об'єм біореактора не перевищує 70% загального обсягу. Вільний простір над поверхнею розчину використовується як буферний, де накопичується піна, і таким чином запобігається втраті культуральної рідини. У пінястій рідині умови аерації кращі, ніж в щільних розчинах (за умови безперервного перемішування і циркуляції шару піни, тобто при виключенні знаходження мікроорганізмів поза культуральної рідини). Разом з тим вспінювання може призвести до перезволоження фільтрів в отворах, через які повітря виходить з біореактора, зменшенню потоку повітря і до потрапляння в ферментер сторонніх мікроорганізмів.

Конструктивні особливості барботажних колон і ерліфтних біореакторів дають цим типам ферментерів деякі переваги перед реакторами з механічним перемішуванням. Барботажні колони більш економічні, так як перемішування в них відбувається висхідними потоками повітря рівномірно по всьому об'єму. Відсутність механічної мішалки виключає один із шляхів проникнення в біореактор сторонніх мікроорганізмів. У барботажних біореакторах не виникає сильних гідродинамічних збурень (зрушень шарів рідини культурального середовища відносно один одного).

Зменшення зсувних факторів повинне бути з наступних причин:

1. клітини рекомбінантних мікроорганізмів менш міцніші, ніж нетрансформовані;

2. клітина відповідає на зовнішні вплив зменшенням кількості синтезованих білків, у тому числі рекомбінантних; під впливом зсувних ефектів можуть змінюватися фізичні і хімічні властивості клітин, що ускладнює подальшу роботу з ними (погіршуються умови виділення, очистка рекомбінантних білків).

У барботажних колонах повітря подають під високим тиском в нижню частину біореактора; в міру підйому дрібні бульбашки повітря об'єднуються і нерівно розподіляються. Крім того, подача повітря під високим тиском призводить до сильного піноутворення.

У ерліфтних біореакторах повітря подають в нижню частину вертикального каналу. Піднімаючись, повітря захоплює за собою рідину до верхньої частини каналу, де розташований газорідинний сепаратор (тут частково виходить повітря). Більш щільна деаерована рідина опускається по іншому вертикальному каналу до дна реактора і процес повторюється. Таким чином, в ерліфтному біореакторі культуральне середовище разом з клітинами безперервно циркулює в біореакторі.

Ерліфтні біореактори випускаються в двох конструктивних варіантах. У першому - реактор являє ємність з центральною трубою, яка забезпечує циркуляцію рідини (реактори з внутрішньою циркуляцією). У ерліфтного біореактора другого типу культуральне середовище проходить через окремі незалежні канали (реактор із зовнішньою системою циркуляції).

Ерліфтні біореактори більш ефективні, ніж барботажні колони, особливо в суспензіях мікроорганізмів з більшою щільністю або в'язкістю. Перемішування в ерліфтних ферментерах більш інтенсивне і ймовірність злипання бульбашок мінімальна.

Таким чином, у разі використання барботажних біореакторів отримують добрі ростові характеристики для великої кількості клітинних культур. Однак складність підтримки суспензії в гомогенному стані при

високих концентраціях біомаси клітин звужує сферу їх застосування.

Барботажні біореактори використовують при виробництві лікарських і ветеринарних препаратів, вакцин, продуктів харчової промисловості (ферменти, харчові добавки, глюкозні сиропи), а також при біоконверсії крохмалю, та при виробництві полісахаридів та нафтопродуктів.

3. Призначення та принцип роботи біореактора

Призначенням всякого біореактора є створення оптимальних умов для життєдіяльності культивованих в ньому клітин і мікроорганізмів, а саме забезпечувати дихання, підведення живлення і відведення метаболітів шляхом рівномірного перемішування газової і рідкої складових вмісту біореактора. При цьому небажано піддавати клітини тепловому або механічному впливу. У механічному біореакторі перемішування здійснюється механічною мішалкою, що призводить до недостатньо рівномірного перемішування з одного боку, і до загибелі мікроорганізмів з іншого. У аерліфтному біореакторі перемішування здійснюється за рахунок продувки газової фази через рідину (барботажное перемішування), що не завжди забезпечує досить інтенсивне перемішування і призводить до небажаного піноутворення. У біореакторі газо-вихрового типу перемішування здійснюється квазістаціонарним потоком з осьовою протитечією, яка створюється аеруючими газовим вихором за рахунок перепаду тиску над поверхнею і сили тертя повітряного потоку об поверхню суспензії. Піонером методології безперервного культивування мікроорганізмів в СРСР був М. Д. Утьонков.

Принцип роботи біореактора досить простий, а його пристрій і методики поєднання необхідних умов, навпаки, складні. До приміщення в ферментер вихідний робочий продукт - необхідну біологічну культуру - зберігають у спеціальних умовах, так би мовити, в неактивному стані - наприклад, заморожують. Для культивації невелику пробу мікроорганізмів

нарощують в лабораторних умовах до стану «робочої порції» - достатнього для динамічної культивуації кількості. Після даного асептичного етапу культуру поміщають в біореактор, попередньо його поверхню, повітря в камері і всі сполучні отвори стерилізують, використовуючи для цього водяну пара і вентиляцію. Після очищення починається етап інокуляції - коли поміщені всередину ферментера культури починають активно розмножуватися і рости, завдяки тому що для них створюють оптимальні умови і живильне середовище. Кінцевим продуктом подібних процесів є необхідна кількість біомаси або корисні метаболіти мікроорганізмів. Поводження з біореактором вимагає не тільки відповідного спеціалізованого навчання, а й певних практичних навичок, тренувань, досвіду. Далеко не кожен оператор і лабораторний працівник, що володіє тільки теоретичними знаннями, може впоратися з усіма обслуговуючими процесами. Саме з цієї причини сьогодні великою популярністю користується біореактор для навчання і досліджень. Подібні пристрої виробляються професійними компаніями, такими як Sartorius. Хоча профільна марка BIOSTAT® налічує безліч різних ферментеров для промислових і наукових цілей, навчальні біореактори даної компанії дуже затребувані. Це повноцінні невеликі апарати, оснащені засобами для створення всіх необхідних умов для будь-якої біологічної культури. Їх використовують в університетах, дослідницьких лабораторіях, на кафедрах і тощо. Невеликі ферментери відмінно підходять для використання в міських та регіональних медичних установах, в промислових лабораторіях. Так само як і великі камери для культивуації біомаси, навчальні ферментери виготовляються зі спеціальних матеріалів, обладнуються різними датчиками, повноцінною системою аерації, зручним інтерфейсом, електронним дисплеєм контролю процесів, спеціалізованим програмним забезпеченням. Біореактори BIOSTAT® від німецької компанії Sartorius Stedim Biotech GmbH вважаються одними з найбільш якісних і надійних в світі, їх повсюдно використовують у промисловості, фармакології, медицині та наукових дослідженнях у багатьох країнах.

Максимальні концентрації клітинної біомаси можна досягти при застосуванні ерліфтних біореакторів, в яких створюються направлені циркуляційні потоки. У ерліфтних біореакторах перемішування суспензії здійснюється за рахунок використання спеціальної конструкції, що створює градієнт щільності (як правило, це конструкція з внутрішнім циліндром).



Рис. 7. Автоклавуємий лабораторний ферментр, біореактор



Рис. 8. Біореактор промислового типу для дослідження целюлозного етанолу

4. Режими періодичного і проточного культивування

Вирощування рослинних клітинних культур і мікроорганізмів в біореакторах можна проводити в режимах періодичного і проточного (безперервного) культивування.

Періодичне культивування - це аналог вирощування клітинних культур в колбах на качалці. Періодичну культуру можна розглядати як замкнуту систему, яка у своєму розвитку проходить чотири фази - початкову,

експоненціальну, стаціонарну і відмирання. Умови існування культури в усіх цих фазах різні.

Проточное (безперервне) культивування характеризується постійним додаванням до біореактора свіжого поживного середовища і постійним відбором або суспензії (відкрите проточное культивування), або відпрацьованого середовища (закрите проточное культивування). **Безперервна культура** являє собою відкриту систему, стрімку до встановлення динамічної рівноваги. Для організмів створюються незмінні умови середовища. Проточне культивування конструктивно більш складніше і піддається автоматичному регулюванню, оскільки пов'язане з введенням в схему біореактора додаткових пристроїв (перистальтичних насосів, розділових пристроїв та ін.).

У **періодичній культурі** умови весь час змінюються: щільність культури зростає, а концентрація субстрату зменшується. Однак дуже часто потрібно, щоб клітини могли довгий час перебувати у фазі експоненціального зростання при постійній концентрації субстрату в незмінних умовах. Цього можна досягти, якщо в посудину, що містить культуру клітин, безперервно вводити новий живильний розчин і одночасно видаляти з нього відповідну кількість клітинної суспензії.

Застосування проточних середовищ при культивуванні тканин забезпечує динамічність і більшу постійність умов їх харчування. Перевага проточного живильного середовища над непроточними твердими і рідкими середовищами спостерігалася при вирощуванні незрілих зародків.

У практиці мікробіологічних досліджень широко застосовують два різновиди відкритого проточного культивування: хемостатного і турбідостатного методів.

Хемостатний метод культивування клітин базується на використанні біореактора, в який з постійною швидкістю подається живильне середовище і одночасно з тією ж швидкістю (наприклад, зливання за рівнем) відбирається клітинна суспензія. При цьому обсяг вирощуваної суспензії залишається

постійним. Хемостат складається із судини-культиватора, в який з особливого резервуара потрапляє з постійною швидкістю живильний розчин. Завдяки аерації і механічному перемішуванню, в культиваторі створюються оптимальні умови для постачання клітин киснем і більш швидкого і рівномірного розподілу поживних речовин, що надходять з новими порціями розчину. Зростання культури в хемостате контролюється концентрацією субстратів. На такому обмеженні швидкості росту концентрацією одного з необхідних субстратів заснована стабільність системи.

Турбідостатний метод передбачає вимірювання концентрації клітинної біомаси в біореакторі та її автоматичне підтримання на постійному рівні шляхом зміни швидкості протоки. Робота турбідостата заснована на підтримці постійної щільності суспензії, або постійної каламутності. Датчик каламутності регулює через управлінську систему надходження живильного розчину. У посудині для культивування всі поживні речовини містяться в надлишку, і швидкість росту культури наближається до максимальної. Турбідостат використовують при швидкостях протоку, близьких до максимальної питомої швидкості росту, тоді як хемостат іноді стає нестійким і може відбутися повне вимивання культури з біореактора. Робота з турбідостатами технічно складніша, ніж з хемостатом.

Хемостатний метод культивування дозволяє виділити фактор (найчастіше концентрацію ростолімітуючого компонента живильного середовища), що визначає фізіолого-біохімічний стан клітинної популяції. У той же час в умовах хемостатного вирощування не завжди вдається підтримувати протягом тривалого часу стаціонарний стан культур рослинних клітин. Наприклад, культура клітин тютюну, що виросла в умовах хемостатного методу на стандартному живильному середовищі для періодичного вирощування, після одного-двох тижнів темніла і лізувалася. Тільки після збільшенні концентрації всіх компонентів в середовищі вдалося отримати (в умовах хемостата) стабільний стан культури клітин протягом 73 доби.

Отже, для підтримки стабільно проліферуючої культури необхідно забезпечувати досить високу концентрацію компонентів живильного середовища.

Поряд з лімітуючою концентрацією субстрату, на розвиток суспензійної культури рослинних клітин, що росте в умовах хемостату, значний вплив має і швидкість потоку суспензії. Її збільшення вище максимальної питомої швидкості росту клітин призводить до вимивання культури з біореакторів. Тому даний метод непридатний для вивчення повільно зростаючих (повільно діляться) клітинних популяцій.

Нові можливості вивчення фізіолого-біохімічного стану клітинної популяції з'являються при використанні «закритої протоки», коли не відбувається видалення клітинної біомаси. При цьому живильне середовище додається в біореактор постійно, і з тією ж швидкістю з нього віддаляється безклітинна культуральна рідина. Даний режим вирощування рослинних клітин правильніше було б називати закритим по біомасі протоком, проте зазвичай вживають термін «закрита протока», незважаючи на його формальну нелогічність.

5. Переваги і недоліки періодичних і напівперіодичних процесів ферментації.

На закінчення відзначимо переваги і недоліки періодичних і напівперіодичних процесів ферментації.

Переваги:

- Низька вартість апарату та системи управління;
- Гнучкість, тобто можливість напрацювання в одному біореакторі різних продуктів;
- Час культивування можна доволно змінювати;
- Процес менш схильний інфікуванню, мутацій клітин внаслідок відсутності потоки і припливу через відносно малий час ферментації;

- Процес зручний для отримання малої кількості продукту;
- Умови культивування можна підтримувати в оптимумі як у фазі росту біомаси, так і у фазі біосинтезу продукту, причому оптимальні умови для біомаси та продукту можуть бути різними;
- Процес зручний для реалізації біосинтезу вторинних метаболітів.

Недоліки:

- Необхідність приготування посівного матеріалу;
- Великий непродуктивний час ферментації;
- У зв'язку з частою стерилізацією швидше зношуються вимірювальні прилади, особливо датчики величини рН;
- Продуктивність по біомасі та продукту часто нижча, ніж при безперервному процесі.

Контрольні питання:

1. Вкажіть види обладнання лабораторного і промислового виробництва.
2. Вкажіть групи промислових біореакторів або ферментерів.
3. Використання біореакторів механічного перемішування, його переваги та недоліки.
4. Використання барботажних колон, їх переваги та недоліки.
5. Використання ерліфтних біореакторів, їх переваги та недоліки.
6. Значення використання барботажних біореакторів.
7. Призначення та принцип роботи біореактора.
8. Хто вперше в колишньому СРСР був основоположником методології безперервного культивування мікроорганізмів.
9. Надайте характеристику періодичного культивування.
10. Надайте характеристику проточного культивування.
11. Що таке хемостатний метод культивування?
12. Що таке турбідостатний метод культивування?
13. Вкажіть основні переваги і недоліки періодичних і напівперіодичних процесів ферментації.

ЛЕКЦІЯ № 3

ОСНОВНІ ПРИНЦИПИ ПРОМИСЛОВОГО ЗДІЙСНЕННЯ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ПРОЦЕСІВ

Питання:

1. Стадії біотехнологічного виробництва
 2. Технологія приготування поживних середовищ для біосинтезу
 3. Підтримання чистої культури
 4. Ферментація, будова ферментера
 5. Загальні принципи розділення речовин.
-

1. Стадії біотехнологічного виробництва

Велика різноманітність біотехнологічних процесів, що знайшли промислове застосування, призводить до необхідності розглянути загальні, найбільш важливі проблеми, що виникають при створенні будь-якого біотехнологічного виробництва. Процеси промислової біотехнології поділяють на 2 великі групи: виробництво біомаси та отримання продуктів метаболізму. Однак така класифікація не відображає найбільш істотних з технологічної точки зору аспектів промислових біотехнологічних процесів. У цьому плані необхідно розглядати стадії біотехнологічного виробництва, їх схожість і відмінність в залежності від кінцевої мети біотехнологічного процесу. У загальному вигляді система біотехнологічного виробництва продуктів мікробного синтезу представлена на рис. 9.

Існує 5 стадій біотехнологічного виробництва.

Дві початкові стадії включають підготовку сировини і біологічно діючого початку. У процесах інженерної ензимології вони зазвичай складаються з приготування розчину субстрату із заданими властивостями

(рН, температура, концентрація) та підготовки партії ферментного препарату даного типу, ферментного або іммобілізованного.

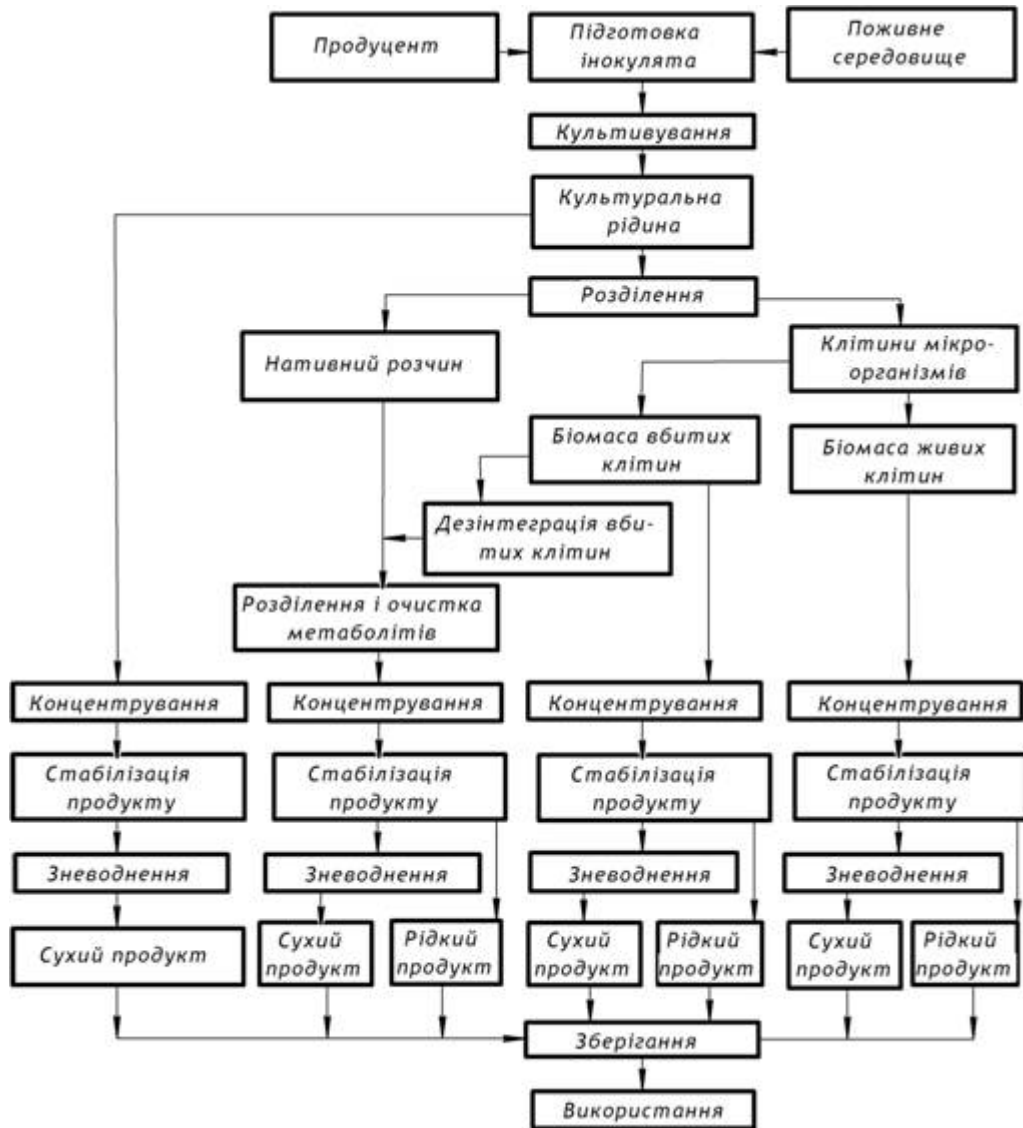


Рис. 9. Схема біотехнологічного виробництва

При здійсненні мікробіологічного синтезу необхідні стадії приготування живильного середовища і підтримки чистої культури, яка могла б постійно або в міру необхідності використовуватися в процесі.

Підтримка чистої культури штаму-продуцента - головне завдання будь-якого мікробіологічного виробництва, оскільки високоактивний, не зазнав небажаних змін штам може слугувати гарантією отримання цільового продукту із заданими властивостями.

Третя стадія - стадія ферментації, на якій відбувається утворення цільового продукту. На цій стадії йде мікробіологічне перетворення компонентів живильного середовища спочатку в біомасу, потім, якщо це необхідно, в цільовий метаболіт.

На четвертому етапі з культуральної рідини виділяють і очищають цільові продукти. Для промислових мікробіологічних процесів характерно, як правило, утворення дуже розбавлених розчинів і суспензій, що містять, крім цільового, велику кількість інших речовин. При цьому доводиться розділяти суміші речовин дуже близькою природи, що знаходяться в розчині в рівних концентраціях, дуже лабільних, легко піддаються термічній деструкції.

Заключна п'ята стадія біотехнологічного виробництва - приготування товарних форм продуктів. Загальною властивістю більшості продуктів мікробіологічного синтезу є їх недостатня стійкість до зберігання, оскільки вони схильні до розкладання і в такому вигляді представляють «чудове» середовище для розвитку сторонньої мікрофлори.

Це змушує технологів приймати спеціальні заходи для підвищення збереження препаратів промислової біотехнології. Крім того, препарати для медичних цілей вимагають спеціальних рішень на стадії фасування та пакування, так повинні бути стерильними.

2. Технологія приготування поживних середовищ для біосинтезу

Основу живильних середовищ для культивування мікроорганізмів становлять джерела вуглецю. Крім вуглецю клітини мікроорганізмів в процесі росту відчують потребу в азоті, фосфорі, макро- і мікроелементів. Всі речовини цього виду знаходяться в поживних середовищах у вигляді солей, виняток становлять середовища, де азот і фосфор можуть засвоюватися зростаючими культурами з органічних джерел, наприклад автолізат або гідролізат мікробного чи тваринного походження.

Відділення приготування живильного середовища являє собою цех, обладнаний ємностями для зберігання рідких і твердих речовин, засобами їх транспортування і апаратами з пристроями для приготування розчинів, суспензій або емульсій. При цьому поживні солі зберігаються зазвичай у твердому вигляді, а приготування їх суміші з заданим співвідношенням компонентів здійснюється в апараті з мішалкою, куди подаються тверді компоненти в необхідній кількості і далі відбувається їх розчинення. Іноді з'єднуються і перемішуються заздалегідь приготовлені розчини. Рідкі та тверді джерела вуглецю зазвичай вводять у вже готове поживне середовище безпосередньо перед ферментацією, так як це усуває небезпеку зараження сторонньою мікрофлорою, вірогідність якого зростає при зберіганні готової поживної суміші.

При безперервному культивуванні у виробництві мікробного білка вуглеводні і розчини солей вводять у ферментер окремо по індивідуальних лініях, а змішування і емульгування нерозчинних у воді n-алканів відбувається вже в самому біореакторі.

При культивуванні бактерій на метані останній постійно барботують в апарат через спеціальні пристрої.

При періодичній ферментації на початку процесу *інокулят* (посівна доза мікроорганізмів) вноситься у вже готове поживне середовище, що містить всі компоненти. Тому джерела вуглецю вводять безпосередньо перед засівом або окремі компоненти середовища вводять в міру споживання їх культурою, підтримуючи в ферментере деяку оптимальну їх концентрацію, яка на різних етапах ферментації може змінюватися за певним законом.

Найважливішим елементом приготування поживних середовищ є дотримання вимог асептики. Це або створення заданого значення рН, що забезпечує придушення сторонніх мікроорганізмів, або повна стерилізація всіх заданих потоків і самого біореактора.

Для стерилізації газових потоків (в першу чергу повітря) використовують процес фільтрації через спеціальні волокнисті фільтри з

послідовно розташованими елементами, що фільтрують. Фільтруючий матеріал періодично стерилізується подачею гострого пару у відключений фільтр через задані проміжки часу.

Рідинні потоки стерилізують різними методами, з яких практичний інтерес представляють термічний, радіаційний, фільтраційний і частково хімічний.

Термічний - найпоширеніший, при температурах порядку 120-150°C.

Радіаційний - γ -випромінювання, застосовується рідко через труднощі створення та експлуатації потужних джерел цього випромінювання. В окремих випадках застосовують хімічні стерилізуючі агенти (речовини з яскраво вираженою асептичною дією). Основна проблема в цьому випадку - необхідність усунення стерилізуючого агента з живильного середовища після загибелі мікрофлори до внесення інокулята. Хімічні антисептики повинні бути не тільки високоефективними, але й легко розпадатися при зміні умов після завершення стерилізації. До числа кращих відноситься пропіолактон, що володіє сильною бактерицидною дією і легко гідролізується в молочну кислоту.

Мало поширений і метод **фільтрації**, що пояснюється апаратними труднощами. Метод заснований на здатності напівпроникних мембран з великими порами пропускати рідку фазу і концентрувати клітини мікроорганізмів. В принципі цей метод є ідеальним для стерилізації термічно нестійких рідких і газових засобів, оскільки може здійснюватися при низькій температурі і вимагає лише градієнта тиску по різні сторони мембрани. Основна складність - наявність термостійких мембран, здатних витримувати їх багаторазову стерилізацію. В даний час ця проблема вирішується шляхом застосування термостійких полімерів у виробництві мембран. На закінчення зазначимо, що ряд субстратів не вимагає стерилізації, так як вони самі володіють асептичною дією; сюди відносять метанол, етанол, концентрована оцтова кислота та ін. У цьому випадку обмежуються стерилізацією інших елементів поживного середовища.

3. Підтримання чистої культури

Отримання посівної дози У технологічному процесі використовуються корисні властивості штаму, отже, необхідно зберігати і, якщо можливо, покращувати його виробничі якості. Тому в біотехнологічному виробництві є відділення чистої культури, в завдання якого є постійне і надійне відтворення корисних властивостей продуцента, знайдених або досягнутих у свій час в ході лабораторних досліджень. Таке відділення проводить лабораторні операції з контролю і збереженню чистої культури, а також маломасштабному культивуванню для постійної передачі штаму на стадію ферментації. Фактично це мікробіологічна лабораторія, з музеєм штамів-продуцентів. В ході контрольних висівів і маломасштабних ферментацій (в пробірках, колбах тощо.)

Контролюється стійкість всіх наявних або придбаних ознак, що стали підставою для рекомендації до промислового застосування цих культур. У міру необхідності з відділення чистої культури надходить задана маса інокулята, що йде у виробництво.

При періодичному процесі культивування (при виробництві метаболітів) у відділенні чистої культури готують посівну дозу клітин для кожної з операцій основного виробництва. При безперервному виробництві кормового білка цього не потрібно, однак для підвищення якості продукту воліють час від часу вводити клітини штаму-продуцента з відділення чистої культури. Для цього у відділенні є ферментаційна частина, де виробляється вирощування досить великих партій мікроорганізму продуцента. Посівні дози вирощуються послідовно в колбах і бутлях на 10-20 літрів, що знаходяться на гойдалках або просто в термостатному приміщенні, і далі в послідовності ферментерів обсягом (за потребою) 10, 100, 500 і 1000 літрів, в яких здійснюється перемішування, аерація і термостатування культуральної рідини з клітинами.

Відділення чистої культури повинно мати достатньо велику колекцію штамів продуцентів, так як можливі тимчасові переходи з одного штаму на інший, викликані різними причинами. Наприклад, сезонні зміни температури частково компенсуються підбором досить продуктивних термотолерантних штамів. Крім того, мікробіологічна промисловість часто змушена використовувати як компоненти поживних середовищ відходи сільського господарства та харчової промисловості (м'яса, кукурудзяний екстракт), що веде до сезонних змін сировини і передбачає адаптацію продуцента до особливостей середовища. Все це робить роль мікробіологічної служби виробництва досить високою.

4. Ферментація, будова ферментера

Стадія ферментації - центральна серед етапів промислового виробництва. Під ферментацією розуміють всю сукупність послідовних операцій від внесення в заздалегідь приготовлене і термостатне середовище інокулята до завершення процесів росту, біосинтезу або біотрансформації.

Ферментація проходить в спеціальних ємностях, які називаються ферментерами або біореакторами. Конструкція біореактора наведена на рис. 10.

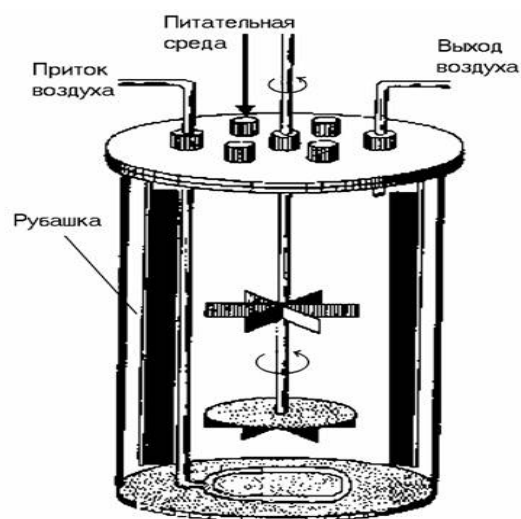


Рис. 10. Конструкція ферментера

Основними елементами ферментера є подвійні стінки, проміжок між якими заповнюється охолоджуючою або нагріваючою рідиною, вхідні отвори для газових і рідких потоків, система контролю за складом живильного середовища та умовами всередині реактора. Оскільки в промисловій біотехнології виділяють 2 типи процесів - накопичення біомаси та накопичення цінних речовин, що виникають в ході росту і подальшого розвитку культури, то змінюється і характер побудови виробництва в часі.

Біомаса одноклітинних вирощується безперервним способом в апаратах хемостатного типу, а всі процеси другої групи здійснюються періодично, коли в одному і тому ж апараті у виробничому циклі протікають всі необхідні фази розвитку клітин і біосинтезу. Процеси двох розглянутих типів відрізняються за вимогами до ступеня асептики, що пов'язано з їх обсягами - білок одноклітинних випускається мільйонами тонн сухої речовини, а випуск продуктів другого типу становить, як максимум, тисячі або десятки тисяч тонн. Тому у виробництві білкових речовин обмежуються досить високою, але не 100% ступенем асептики, забезпечуючи останню підбором режиму культивування, відповідного для продуцента, але несприятливого для можливих домішкових штамів.

Технологічне оформлення процесів промислової біотехнології значною мірою визначається ставленням мікроорганізму-продуцента до кисню. При використанні аеробних культур ферментаційне обладнання і норми технологічного режиму підбираються таким чином, щоб массообмін (перенесення кисню з газової в рідку фазу) забезпечував надходження кисню до клітин в кількостях, необхідних і оптимальних для даної культури в даній фазі росту. Промислове використання факультативних анаеробів не ставить завдання абсолютного виключення кисню із середовища, тому процеси цього типу (бродиння) технологічно простіші аеробних.

У початковій фазі цих процесів потрібно лише видалити кисень з газової фази над культуральною рідиною, що може бути досягнуто введенням інертного газу або просто витісненням повітря вуглекислотою, що

виділяється клітинами при метаболізмі. Технологічне оформлення строго анаеробних процесів складніше, ніж для процесів бродіння, так як в цьому випадку необхідно повністю виключити можливість потрапляння кисню в газове, а звідти і в рідке середовище.

Питання термостатування ферментаційного процесу (підведення або відведення тепла в ході ферментації) є дуже гострими в цілому ряді виробництв біотехнології.

В аеробних умовах мікробіологічний синтез протікає зі значним тепловиділенням, що викликає необхідність відводу тепла з апаратів великого обсягу (сотні і тисячі кубометрів). Технологічні вимоги до швидкості тепловідведення дуже жорсткі через вузький температурний оптимум росту культури. Найбільш оптимальний на практиці спосіб тепловідведення - охолодження водою через змійовики, сорочки та інші пристрої - ускладнюється незначною різницею температур між вмістом біореактора (32-34°C для дріжджів *Candida*) і охолоджуючої водою (20°C), температура якої в жарку пору року ще вища. Тому в реакторі створюється розвинена поверхня газообміну, збільшується швидкість руху рідин і т.д.

Важливо також підтримувати певний склад живильного середовища. У безперервних процесах біосинтезу завдання технолога зводиться до підтримки концентрації всіх поживних речовин (і кисню) і дозованому введенню кислоти або лугу для рН-статування системи на заданому рівні. Найпростішим варіантом управління стадією ферментації в періодичному режимі є зміна концентрацій компонентів середовища і її рН, а також введення необхідних добавок за заздалегідь розробленою програмою, яка реалізується технологом в кожному циклі ферментації. Цей спосіб відносно простий і легко піддається автоматизації. У багатьох випадках необхідно можливо повно вичерпувати компоненти живильного середовища, щоб вони не потрапляли на наступні стадії переробки. Ця необхідність може бути викликана низкою причин:

- Дорожнеча або дефіцитність субстрату;

- Шкідливий вплив субстрату на якість готового продукту (наприклад, при виробництві дріжджів на парафінах, коли виділення залишкових кількостей вуглеводнів з клітинної маси ускладнене, тому додають додаткові секції для дозрівання або утилізації запасених в цитоплазмі вуглеводнів);

- Труднощі, що виникають на стадії виділення й очищення метаболітів при одночасній присутності в культуральній рідині неутілізованих речовин.

5. Загальні принципи розділення речовин

Продукти мікробного синтезу надходять з біореактора у вигляді водних суспензій або розчинів, при цьому характерний невисокий вміст основного компонента і наявність багатьох домішкових речовин. У більшості промислових виробництв на першому етапі переробки культуральної рідини виробляють відділення маси продуцента від рідкої фази - *сепарацію*.

Рідина далі також піддається переробці, якщо містить метаболіти, що представляють практичну цінність. У виробництвах, де цільовим продуктом є клітини як джерело білка, культуральна рідина піддається лише очищенню, що дозволяє використовувати водну фазу багаторазово і знизити утворення стічних вод. Технологічні прийоми, що використовуються для відділення клітин від середовища залежать від природи продуцента. Наприклад, сахароміцети (хлібопекарські дріжджі) мають відносно великі клітини і здатні флотувати, тому після згущення біомаси шляхом флотації їх відділяють на звичайних барабанних вакуум-фільтрах. Надалі біомасу, зняту з фільтра, піддають пресуванню і отримують продукт з високим вмістом живих клітин, що мають високу хлібопекарську активність.

Дріжджі ж роду *Candida*, є джерелом кормового білка погано флотуються і фільтруються. Тому дріжджі, що ростуть на вуглеводнях, а також бактерії-продуценти білка на основі метану та метанолу, на першому етапі сепаруються, причому в декілька ступенів. Вода, яка залишається видаляється шляхом випарювання, а всі компоненти рідкої фази

залишаються в кінцевому продукті. До аналогічного прийому вдаються і при виробництві бактеріальних ентомопатогенних препаратів та добрив.

Кінцевий продукт вдається отримати в активній формі лише в принципі відмовившись від виділення його з культуральної рідини: вміст реактора випарюють і сушать в умовах, що забезпечують життєздатність кінцевого продукту. Неутилізовані компоненти культуральної рідини можуть відбитися на здатності продукту до зберігання. При виділенні і очищенні метаболітів біомаса, якщо вона не містить помітних кількостей цільового продукту, осідає з додаванням вапна або інших твердих компонентів, що захоплюють клітини або міцелій на дно - *фізичне осадження*.

Виділення твердої фази (дрібнодисперсний клітинний матеріал, внутрішньоклітинні біополімери) можливо і методом фільтрації. Так як фільтруєма суспензія схильна до гелеутворення, то продуктивність фільтрів швидко падає. Запобігти цьому можна додаванням в суміш або на фільтруючу тканину розмелених вулканічних порід, що містять оксиди кремнію і алюмінію, тоді осад набуває пористої структури.

Деякі види біомаси відокремлюють центрифугуванням. Осадження зважених часток відбувається під дією відцентрової сили. Після поділу утворюється 2 фракції: біомаса (тверда) і культуральна рідина. Культуральна рідина переробляється шляхом екстракції, іонообміну, кристалізації або за допомогою мікро- і ультрафільтрації через полімерні мембрани зі спеціально підібраним розміром пор. Для виділення і очищення продуктів, що знаходяться всередині клітин продуцента (наприклад інтерферонів, гормонів) вводиться стадія руйнування клітинних оболонок (дезінтеграція біомаси); зазвичай для цього застосовуються механічні, хімічні або комбіновані методи.

До фізичних методів дезінтеграції відносяться обробка ультразвуком, обертання лопаті або вібратора, струшування зі скляними намистом, продавлювання через вузький отвір під тиском, розчавлювання замороженої

клітинної маси, розтирання в ступці, осмотичний шок, заморожування-відтавання, декомпресії (стиснення з подальшим різким зниженням тиску) .

Хімічні та хіміко-ферментативні методи більш вибагливі. Клітини можуть бути зруйновані толуолом або бутанолом, антибіотиками, ферментами. Культуральну рідину звільняють від супутніх розчинних речовин і фракціонують. Звільнення від розчинних речовин виробляють кількома способами:

1. **Осадження** - фізичне (нагрівання, охолодження, розбавлення, концентрування) або хімічне (за допомогою органічних і неорганічних речовин). Осадження органічними розчинниками засноване на зниженні діелектричного постійного середовища. Стійкість білкових розчинів обумовлена наявністю гідратного шару у молекулі. Якщо його зруйнувати, білки осідають. Для цього молекули доданих речовин повинні бути більш гідрофільні, ніж молекули білків. В якості осаджувачів використовують етанол, метанол, ацетон, ізопропанол. При різних кількостях розчинника і різних значення рН осідають різні фракції. Приклад: 50% етанол осаджує 80% протеаз і 3-5% амілаз, 70% спирту осаджує 98% амілаз.

Висолювання - механізм такий же, що і при дії органічних речовин, гідратуються дисоційовані іони неорганічних солей. Як найбільш дешевий реагент використовують сульфат амонію. Також застосовують сульфати натрію, магнію і фосфат калію.

2. **Екстракція**. При твердорідкофазній екстракції речовина з твердої фази переходить в рідку, при рідиннорідкофазній - з однієї рідини в іншу (наприклад, хлорофіл з спиртової витяжки переходить в бензин). Для вилучення антибіотиків, вітамінів, каротиноїдів, ліпідів застосовують рідиннорідкофазну екстракцію, коли культуральну рідину змішують з органічними розчинниками.

3. **Адсорбція** - окремий випадок екстракції, коли екстрагують агент - тверде тіло. Адсорбція застосовується для речовин, що мають функціональні групи, заряджені позитивно чи негативно. В якості адсорбенту

використовують іоніти на основі целюлози: - катіоніт - карбоксиметилцелюлоза (КМЦ); - Аніоніт - діетіламіноетілцелюлоза (ДЕАЕ), а також сефадексе на основі декстрану. Адсорбція йде за іонообмінним механізмом.

Методи тонкої очисти і розподілу речовин.

Більш тонку очистку речовин здійснюють кількома способами.

Найбільшого поширення набула хроматографія. Краплю зразка наносять на спеціальний папір (хроматографія на папері) або пластинку скла або пластмаси, покриту тонким шаром інертного сорбенту, наприклад, целюлози або силікагелю (хроматографія в тонкому шарі або тонкошарова хроматографія). Потім таку пластинку одним кінцем поміщають в суміш розчинників (наприклад, води і спирту).

У міру руху розчинників по платівці, вони підхоплюють ті молекули зразка, які розчиняються в них. Розчинники вибирають таким чином, щоб вони зв'язувалися із сорбентом по-різному. В результаті молекули зразка, більш розчинні у зв'язаному розчиннику, рухаються повільніше, а інші, більш розчинні у слабо сорбованому розчиннику, рухаються швидше. Через кілька годин пластинку сушать, фарбують і визначають стан різних молекул.

Можна розділяти молекули методом хроматографії на колонках (колонковій хроматографії). У цьому випадку суміш молекул в розчині пропускають через колонку, що містить твердий пористий матрикс. В результаті взаємодії з матриксом різні молекули проходять через колонку з різною швидкістю. Після того як вони досягнуть в певній послідовності дна колонки, їх збирають окремими фракціями.

В даний час розроблено і застосовується безліч матриксів різних типів, використовуючи які можна ділити білки згідно їх:

- заряду (іонообмінна хроматографія),
- гідрофобності (гідрофобна хроматографія),
- розміром (хроматографія гель-фільтрацією)

- здатності зв'язуватися різними хімічними групами (афінна хроматографія).

При іонообмінній хроматографії нерозчинний матрикс містить іони, що затримують молекули з протилежним зарядом. Для поділу молекул використовуються наступні матрикси: діетіламіноетілцеллюлоза (ДЕАЕ-целюлоза) - заряджена позитивно; карбоксиметилцеллюлоза (КМ-целюлоза) і фосфоцеллюлоза - заряджені негативно. Сили взаємодії між молекулами в розчині і іонообмінником визначаються іонною силою і рН розчину.

Гідрофобні колонки наповнені кульками, з яких виступають гідрофобні ланцюги; в таких колонках затримуються білки з оголеними гідрофобними ділянками.

Колонки, призначені для *гель-фільтрації*, заповнені крихітними пористими інертними кульками; при використанні таких колонок відбувається поділ білків за розмірами. Молекули невеликого розміру в міру проходження через колонку проникають всередину кульок, а більші молекули залишаються в проміжках між кульками. В результаті вони швидше проходять через колонку і виходять з неї першими. В якості матриксу можна використовувати зерна поперечно-зшитого полісахариду (декстран або агароза).

Гель-фільтрація зазвичай використовується і для розділення молекул, і для визначення їх розмірів.

Набагато більш ефективний метод *афінної хроматографії* (хроматографія за спорідненістю). В основі цього методу лежать біологічно важливі взаємодії, що відбуваються на поверхні білкових молекул. При афінній хроматографії використовується нерозчинний матрикс, ковалентно пов'язаний зі специфічними лігандами (антитілами або субстратом ферментів), які приєднують певний білок.

Зв'язані іммобілізованим субстратом молекули ферменту можна елюїрувати (вилучати) концентрованими розчинами субстрату у вільній формі, а молекули, зв'язані з іммобілізованими антитілами, можна елюїрувати за рахунок дисоціації комплексу антитіло-антиген концентрованими розчинами солі або розчинами низького чи високого рН. Одноразова хроматографія на такій колонці дозволяє найчастіше досягти дуже високого ступеня очищення препарату.

Дозвіл звичайної колонної хроматографії обмежений негомогенністю матриксів (наприклад, целюлози), що викликає нерівномірне протікання розчинника через колонку. Розроблені недавно хроматографічні смоли (в основу яких зазвичай покладено кремній) мають форму найдрібніших кульок від 3 до 10 мкм в діаметрі, які упаковані в спеціальний чохол і утворюють гомогенну колонку. Такі колонки для високоефективної рідинної хроматографії (ВРХ) забезпечують високий рівень дозволу. Оскільки частинки носія в колонках для ВРХ упаковані дуже щільно, за відсутності високого тиску швидкість потоку через них незначна. З цієї причини такі колонки зазвичай поміщають в сталеві циліндри, з'єднані зі складною системою насосів і шлангів, які забезпечують необхідне для високої швидкості протоки тиск.

У традиційній колонної хроматографії швидкість протікання через колонку може бути досить низькою (приблизно один обсяг колонки на годину), таким чином, у розділених розчинах достатньо часу для врівноваження з внутрішнім вмістом великих часток матриксу. В умовах ВРХ відбувається швидке урівноваження розчинів з внутрішнім вмістом крихітних кульок, так що розчини, що володіють різною спорідненістю до матриксу, ефективно розділяються навіть при високій швидкості потоку. Таким чином, раніше для досягнення поганого поділу за допомогою колонкової хроматографії були потрібні годинник, а в даний час завдяки ВРХ якісне фракціонування займає хвилини. Ось чому саме цей метод надзвичайно популярний зараз для розділення і білків, і малих молекул.

Екстракти зруйнованих клітин можна фракціонувати, піддаючи їх високошвидкісному центрифугуванню. Така обробка ділить клітинні компоненти за їх розміром: більші частки при центрифугуванні рухаються швидше. Великі компоненти екстракту, в тому числі ядра або незруйновані клітини, швидко осідають (седиментують) при відносно низьких швидкостях і утворюють осад на дні центрифужної пробірки. Центрифугування є, як правило, першим етапом фракціонування, з його допомогою розділяються тільки значні за розміром компоненти. Щоб досягти більш високого ступеня поділу фракцій, необхідно гомогенат нашарувати тонким шаром поверх сольового розчину.

При ультрацентрифугуванні різні фракції седиментують з різною швидкістю і утворюють окремі смуги, які можна виділити. Щоб уникнути перемішування обложених компонентів сольовий розчин повинен містити інертний і добре розчинний матеріал (наприклад, сахарозу), щільність якого поступово збільшується зверху вниз, формуючи градієнт щільності. При седиментації крізь такі градієнти сахарози різні компоненти клітини збираються в окремі смуги, які можна виділити.

Швидкість седиментації кожного з компонентів визначається його розмірами і формою і зазвичай виражається за допомогою коефіцієнта седиментації, що позначається S . Швидкість обертання до 80000 об/хв, так що на колективні частинки діють сили, що перевершують силу тяжіння більш ніж в 500 тисяч разів. Під дією таких великих сил навіть порівняно невеликі макромолекули, такі, як тРНК або найпростіші ферменти, поділяються і розподіляються в суворій відповідності зі своїми розмірами. Вимірювання коефіцієнта седиментації макромолекулярних комплексів зазвичай використовують для визначення їх загальної маси і кількості складу субодиниць, що входять до них.

Ультрацентрифуга розділяє клітинні компоненти не тільки за масою, але і за щільністю. У цьому випадку зразок седиментують в крутому градієнті, утвореному висококонцентрованим розчином сахарози або

хлористого цезію. Компоненти клітин опускаються за градієнтом до тих пір, поки не досягнуть ділянки, щільність розчину в якому дорівнює власній щільності компонентів. Подальшої седиментації компонентів не відбувається і вони «застрягають» на цьому рівні. Таким чином, в центрифужній пробірці виникає набір різних смуг.

Метод центрифугування в градієнті хлористого цезію був розроблений в 1957 році для доказу напівконсервативної теорії реплікації ДНК.

Електрофорез - метод розділення білків і нуклеїнових кислот у вільному водному розчині і пористом матриксі, в якості якого можна використовувати полісахариди, наприклад, крохмаль або агарозу. Біомолекули зазвичай несуть сумарний позитивний або негативний заряд, обумовлений наявністю на їх поверхні позитивно чи негативно заряджених груп амінокислот.

Якщо білкові молекули помістити в електричне поле, вони починають переміщатися зі швидкістю, яка визначається їх сумарним зарядом, а також формою і розмірами. У середині 60-х років був розроблений модифікований метод електрофорезу - електрофорез в поліакриламідному гелі в присутності додецилсульфату натрію (ДСН-ПААГ). При використанні даного методу білки мігрують в інертному матриксі-поліакриламідному гелі з високим вмістом поперечних зшивок. Зазвичай гель готують полімеризацією мономерів безпосередньо перед використанням. Розміри пор гелю можуть бути підібрані довільно з тим, щоб гель міг уповільнити міграцію певних молекул. При цьому білки знаходяться в розчині, що містить потужний, негативно заряджений детергент - додецил-сульфат натрію або ДСН (SDS). Зв'язуючись з гідрофобними ділянками білкової молекули, цей детергент викликає розгортання білкових молекул в довгі витягнуті ланцюги. Кожна молекула білка пов'язує значну кількість молекул детергенту, набуваючи сумарний негативний заряд. З цієї причини білок після того, як буде докладена напруга, почне рухатися в напрямку позитивного електрода.

Білки одного розміру поводяться подібним чином, оскільки, по-перше, їх природна структура повністю порушена ДСН так, що їх форма ідентична, по-друге, вони пов'язують однакову кількість ДСН і набувають однаковий негативний заряд. Великі білки, що володіють великим зарядом, піддаються дії значних електричних сил, а також більш істотного гальмування. Суміш молекул ділиться на ряд смуг, розташованих відповідно до їх молекулярної маси.

Виявити ці смуги можна шляхом фарбування відповідним барвником. Наприклад, білки ідентифікуються барвником Кумассі синім. Відомо, що близько розташовані смуги в гелі можуть перекриватися. Цей ефект перешкоджає виявленню великої кількості білків (не більш 50) за допомогою одновимірних методів їх розділення.

Метод двовимірного гель-електрофорезу, в якому об'єднані дві різні процедури поділу, дозволяє ідентифікувати більше 1000 білків. Результати при цьому отримують у вигляді «двовимірної» білкової карти.

При роботі даним методом на першому етапі білки поділяють за їх зарядом. Для цього зразок поміщають в невеликий обсяг розчину, що містить неіонний (незаряджений) детергент-меркаптоетанол, і в якості денатуруючого агента-сечовину. У цьому розчині відбувається солюбілізація, денатурація і дисоціація всіх без винятку поліпептидних ланцюгів; при цьому зміни заряду ланцюгів не відбувається.

Диссоційовані поліпептидні ланцюги поділяють потім методом ізоелектричного фокусування, заснованому на зміні заряду білкової молекули при зміні рН навколишнього середовища. Кожен з білків може бути охарактеризований ізоелектричної точкою - значенням рН, при якому сумарний заряд білкової молекули дорівнює нулю, і, отже, білок не здатний переміщатися під дією електричного поля. При ізоелектричному фокусуванні білки піддаються електрофорезу в гелі, в якому за допомогою спеціальних буферів створюється градієнт рН. Під дією електричного поля кожен білок

переміщається в ту зону градієнта, яка відповідає його ізоелектричної точці і залишається в ній.

Так відбувається поділ білків в одному напрямку двовимірного гелелектрофорезу. На другому етапі гель, що містить розділені білки, знову піддається електрофорезу, цього разу в напрямку перпендикулярному того, що на першому етапі. У цьому випадку електрофорез ведуть у присутності ДСН і білки поділяють за їх молекулярною масою, як в одновимірному ДСН-ПААГ. Вихідний гель просочують додецил-сульфатом натрію і, помістивши його на блок ДСН-ПААГ-гелю, проводять електрофорез, в ході якого кожна з поліпептидних ланцюгів мігрує крізь блок гелю і утворює в ньому окрему смугу. Нерозділеними в результаті залишаються тільки ті білі, які невиразні як за ізоелектричною точкою, так і за молекулярною масою; таке поєднання зустрічається дуже рідко.

Отримання готових товарних форм препаратів.

Усі товарні форми біопрепаратів з точки зору технології їх отримання можна розділити на три основні групи.

1. Біопрепарати, які мають у товарному продукті в якості основного компонента життєздатні мікроорганізми. До цієї групи відносяться засоби захисту рослин, бактеріальні добрива, закваски для силосування кормів, біодеграданти, інші активні засоби біотрансформації.

2. Біопрепарати, до складу яких входить інактивована біомаса клітин і продукти її переробки. Це кормові дріжджі, грибний міцелій і т.д.

3. Біопрепарати на основі очищених продуктів метаболізму мікроорганізмів. До них відносяться вітаміни, амінокислоти, ферменти, антибіотики, біоліпіди, полісахариди, продукти комплексної переробки мікробних мас і метаболітів.

Залежно від прийнятих на попередній стадії вирішення товарні форми являють собою або складну суміш, яка містить деяку кількість основної речовини, або високоочищений препарат, який відповідає ряду спеціальних вимог. Продукт може випускатися в рідкому (наприклад рідкий концентрат

лізину) або сухому вигляді (білково-вітамінний концентрат, ентомопатогенні препарати, кормовий концентрат лізину).

Стадія фасування розглянутих комплексних препаратів полягає в приміщенні їх у тару (мішки, барабани тощо), розміри і тип якої визначаються потребами замовника і властивостями продукту (його злежуваність, гігроскопічністю, стійкістю до загнивання тощо). Інші вимоги пред'являються до медичних препаратів і біохімічним реактивам.

Контрольні питання:

1. Вкажіть та охарактеризуйте стадії біотехнологічного виробництва.
2. Охарактеризуйте технологію приготування поживного середовища для біосинтезу.
3. Яким чином відбувається підтримання чистоти культури?
4. Що таке ферментація?
5. Яка будова ферментера?
6. Вкажіть загальні принципи розділення речовин.
7. Охарактеризуйте методи тонкої очистки і розподілу речовин.
8. Які існують групи біопрепаратів? Надайте їм характеристику.
9. Які існують форми випуску біопрепаратів?
10. Вкажіть стадію фасування біопрепаратів.

ЛЕКЦІЯ № 4

ПРОДУКТИ ПРОМИСЛОВОЇ БІОТЕХНОЛОГІЇ ТА БЛОК-СХЕМИ ЇХ ВИРОБНИЦТВ

Питання:

1. Класифікація продуктів біотехнологічного виробництва
 2. Білкові продукти
 3. Амінокислоти
 4. Гормони
 5. Вітаміни
-

1. Класифікація продуктів біотехнологічного виробництва

Продукти, що отримані біотехнологічними способами, відрізня за тим, яке місце в типовій технологічній схемі вони займають.

Продуктами біотехнологічного виробництва можуть бути:

1. Гази - зі стадії ферментації (діоксид вуглецю - при спиртовому виробництві, біогаз - при переробці відходів шляхом метанового бродіння, водень - при культивуванні фототрофів).

2. Середовище ферментації - культуральна рідина разом з мікроорганізмами (наприклад, кефір, йогурт) або твердий субстрат (наприклад, сир або ферментована із заквасками ковбаса).

3. Рідина (освітлена, надосадова, нативний розчин, фільтрат, угат, пермеат або супернатант), отримана після відділення біомаси, або її концентрат. Готові продукти на цій основі - пиво, вино, квас. Концентрат культуральної рідини зазвичай отримують випаровуванням або висушуванням (наприклад, кормовий лізин або кормові антибіотики).

4. Біомаса інактивована (наприклад, кормові дріжджі, які на завершальних стадіях піддають тепловій стерилізації).

5. Біопрепарат - життєздатна біомаса мікроорганізмів в рідкому або висушеному вигляді (пекарські дріжджі, бактеріальні засоби захисту рослин, деструктори нафтових забруднень, бактеріальні добрива, силосні закваски тощо).

6. Ослаблена біомаса мікроорганізмів (наприклад, живі вакцини, отримані при обробці клітин патогенних мікроорганізмів тепловими впливами або хімічними реагентами для зниження їх патогенності).

7. Позаклітинні та внутрішньоклітинні біопродукти. Різноманітні за своєю структурою, можуть бути легко кип'ячою рідиною (наприклад, етанол, що виділяється з середовища відгонкою або ректифікацією) або твердою речовиною (багато медичних антибіотиків, чисті харчові або медичні амінокислоти, лимонна кислота).

8. Перероблена біомаса мікроорганізмів - гідролізати і ферментолізати, що використовуються як джерела годівлі для тварин або як смакові добавки; клітинні оболонки, що отримані після руйнування мікроорганізмів і використовуються як сорбент для очищення соків, вина, харчових рідин.

9. Очищена від забруднень рідина (наприклад, при очищенні стічних вод) або тверде середовище (наприклад, ґрунт при мікробіологічному очищенню його від нафтових забруднень).

10. Рідке середовище (культуральна рідина) з екстрагованих (вилуженими) з твердої фази компонентами (наприклад, бактеріальне вилуговування металів з руд, мікробіологічне знесірчення вугілля та нафти).

Всі ці продукти отримують за технологічними схемами, або блок-схемами, що містить кілька стадій. У кожному конкретному випадку це визначається цільовою задачею, а також властивостями мікроорганізмів, сировини і самого готового продукту.

Блок-схема - це послідовність технологічних стадій біотехнологічного виробництва, необхідних для отримання продукту. Розглянемо кілька

прикладів блок-схем виробництва різних продуктів.

Блок-схема виробництва біогазу (рис. 11) значно коротша загальної типової схеми і включає підготовчі стадії, стадію метанового бродіння і сушку як стадію концентрування. Компримування (стиснення) біогазу можна розглядати як створення його готової форми.



Рис. 6.3. Блок-схема производства биогаза (по В.В. Бирюкову, 2004)

Рис. 11. Блок-схема виробництва біогазу (за В.В. Бірюковим, 2004)

У виробництві йогурту (рис. 12) передбачені дві підготовчі стадії, одна біотехнологічна і стадія розливу, що представляє собою приведення продукту до готової форми.

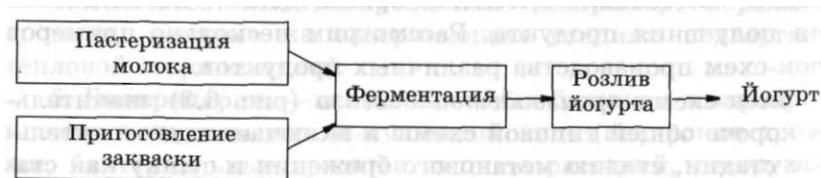


Рис. 6.4. Блок-схема производства йогурта (по В.В. Бирюкову, 2004)

Рис. 12. Блок-схема виробництва йогурту (за В.В. Бірюковим, 2004)

Процес виробництва хліба схематично представлений на рис. 13. Приготування опари (суспензії борошна у воді) аналогічне приготуванню середовища в біотехнологічних виробництвах.



Рис. 6.5. Блок-схема производства хлеба (по В.В. Бирюкову, 2004)

Рис. 13. Блок схема виробництва хліба (за В.В. Бірюковим, 2004)

В опару додають дріжджі для бродіння, потім знову муку (заміс тіста) і проводять анаеробний біологічний процес бродіння. Далі тісто ділять на заготовки, і вони вже втретє піддаються впливу дріжджів в процесі вистоювання. При цьому діоксид вуглецю, що утворюється при бродінні, збільшує об'єм хліба і створює його пористість. Стадія випічки закріплює отриманий результат і перетворює, по суті, рідкий напівпродукт у тверде тіло - хліб і хлібобулочні вироби.

Наведені приклади показують, що біотехнологічні виробництва включають в себе як специфічні для біотехнології стадії (ферментація, біоокислення, біотрансформація, бродіння, бактеріальне вилужування, біокомпостування, ферментоліз, стерилізація середовища повітря, дезінтеграція мікроорганізмів), так і більшість стадій, що зустрічаються в хімічній технології (фільтрація, сепарація, відстоювання, екстракція, сушка, випарювання, ультрафільтрація і зворотний осмос, кристалізація, ректифікація, коагуляція та ін.). Ці стадії, звичайно, мають свою специфіку в біотехнологічних виробництвах у зв'язку з фізичними та фізико-хімічними властивостями біологічного об'єкта, його лабільністю і варіабельністю.

2. Білкові продукти

Біотехнологічні методи застосовують для отримання різноманітних сполук, що мають комерційну цінність і є продуктами життєдіяльності

мікроорганізмів, а також клітинних культур рослин і тварин. В першу чергу це сполуки первинного метаболізму, що широко використовуються в народному господарстві (білки, амінокислоти, вітаміни та інші сполуки).

Найважливішими речовинами всіх живих організмів є білки - азотвмісні речовини, різні за своєю будовою та молекулярною масою. У складі білків міститься приблизно 16% азоту, а також вуглець, водень, кисень і - часто - інші елементи, такі, як сірка, фосфор, залізо (молекула гемоглобіну, наприклад, містить чотири атома заліза) і мідь.

Структуроутворюючі білки тіла тварин і людини називають фібрилярні або волокнистими білками. Вони мають витягнуту ниткоподібну форму. Найважливіші фібрилярні білки - це кератин (входить до складу волосся, нігтів, м'язів, рогів, голок і пір'я тварин) і колаген (структурний компонент сухожиль, шкіри, кісток, сполучної тканини). При кип'ятінні колаген гідролізується і утворює розчинний у воді білок - желатин.

Білок тваринного походження - найбільш дефіцитний компонент їжі. Світова потреба в ньому в теперішній час задовольняється лише на 40%. У зв'язку з цим необхідний пошук (в тому числі і методами промислової біотехнології) ресурсів білка для харчових цілей.

Одним із сучасних способів отримання білкових речовин є мікробіологічний синтез, оскільки за швидкістю зростання мікроорганізми перевершують сільськогосподарські культури в сотні, а тварин - в тисячі разів. Крім того, для мікробіологічного синтезу не потрібно великих земельних площ, він не залежить від погодних і кліматичних умов і не забруднює навколишнє середовище отрутохімікатами.

Мікробні білки близькі за складом до білків тваринного походження, та їх застосування у кормовиробництві покращує якість і засвоюваність традиційних рослинних кормів. Наприклад, 1 т кормових дріжджів забезпечує економію 5 т зерна і збільшує продуктивність у тваринництві на 15-30%. Сучасний середній завод з виробництва мікробного білка потужністю 50 т/рік, займає площу 0,2 га, може забезпечити потребу в білку

до 10 млн осіб. Сільськогосподарські технології для таких масштабів виробництва вимагають наявності до 16 тис. га земельних угідь, засіяних пшеницею, або утримання ферми, що виробляє 400 порослят за день.

У 1960-і роки з'явився термін «білок одноклітинних організмів» (зазвичай вживають його скорочену назва - аббревіатуру БОО, від single cell protein - SCP), яким позначають цілі неживі висушені клітини водоростей, дріжджів, бактерій або грибів, які використовуються в якості білкового продукту для кормових і харчових цілей. У вітчизняній літературі цей білок називають білково-вітамінним концентратом або БВК. Всі ці назви умовні, оскільки в біомасу, крім білків, суттєву частку займають інші компоненти - цукри, ліпіди, нуклеїнові кислоти.

Білок одноклітинних організмів повинен задовольняти ряд спеціальних вимог, головні з яких - поживність, перетравність, економічна ефективність. Поживність цього білка, що визначається за хімічним складом, близька поживності традиційних білкових продуктів.

Найважливішою умовою при розробці нових технологій отримання білка одноклітинних є доступність сировини. Це передбачає наявність різних резервних варіантів, що дозволяють оперативно замінити і використовувати різні джерела сировини без істотної зміни якості одержуваного продукту. У сучасних промислових процесах використовують як «чисту» сировину постійного хімічного складу, так і комплексні сполуки, включаючи відходи різних виробництв. Останнє найбільш вигідно економічно і має величезне значення для охорони навколишнього середовища.

Для синтезу білка мікроорганізми здатні використовувати різні вуглецьмісні субстрати:

- Вуглеводи;
- Рідкі вуглеводні;
- Газоподібні вуглеводні;
- Оксидат вуглеводнів;
- Вуглекислий газ, включаючи суміші з воднем.

Незалежно від виду використовуваної сировини, типова схема мікробіологічного виробництва білка включає отримання та підготовку сировини, отримання посівного матеріалу, ферментацію, виділення, інактивацію, згущення мікробної біомаси, подальше висушування і стандартизацію готового продукту.

Максимальна швидкість синтезу білкових речовин мікробними клітинами реалізується при оптимальних умовах середовища, коли питома швидкість росту близька до максимальної. Тому для отримання білка одноклітинних біотехнологічні процеси реалізують в проточному режимі, який дозволяє стабілізувати практично всі параметри стадії ферментації на рівнях, оптимальних для розмноження клітин зі швидкостями росту, близькими до максимальної, тобто в режимі білкової спрямованості біосинтеза.

Мікробна біомаса поживна, якщо її компоненти перетравлюються ферментами травного тракту вищих тварин або людини. Перешкодою цьому можуть бути клітинні стінки окремих продуцентів, які попередньо доводиться руйнувати, а також високий рівень нуклеїнових кислот. Останні не небезпечні для вищих тварин, оскільки вони метаболізуються в їх організмі і виводяться з уриною. Для людини ж такий рівень нуклеїнових кислот неприйнятний, оскільки в ході їх засвоєння можливе порушення обміну речовин і виникнення патологічних станів. Тому для харчових цілей мікробну біомасу попередньо обробляють, використовуючи різні методи руйнування і денуклеотизації.

Технологія отримання мікробного білка в теперішній час є самою великотоннажною галуззю біотехнології, що виробляє найважливіші кормові препарати, білкові добавки для тваринництва, звірівництва, птахівництва, риборівництва, а також білок харчового призначення з використанням різноманітної сировини і субстратів.

Мікроорганізми, що використовуються в харчовій промисловості, часто входять до складу кінцевого продукту (хоча частка їх там зазвичай

невелика). Особливість білка одноклітинних організмів полягає в тому, що він практично цілком складається з мікробної біомаси і в його виробництві нерідко беруть участь мікроби, які раніше в їжі були відсутні. З цієї причини до білка одноклітинних організмів пред'являються підвищені вимоги (в тому числі вимога біобезпеки) установами, які контролюють якість харчових продуктів. Тому виробництво БОО спрямоване переважно на вироблення кормів для тварин, а не білків, безпосередньо йдуть в їжу. Корми для тварин повинні містити деяку кількість білка (до 15-20% - залежно від їх виду і способу утримання). Для їх виробництва можна використовувати більш широке коло субстратів, в тому числі і органічні речовини відходів, що економічно вигідно.

До БОО-продуктам, виробленим промисловістю на корм тваринам, відносяться прутін (*Pruteen*) фірми ICI (біомаса бактерій, вирощених на метанолі), топріна (*Toprina*) фірми BP (дріжджі, вирощені на алканах) і грибна маса, що отримується за технологією фірми Finnish Pekilo. При її виробництві як субстрат використовують сульфитний луг - відхід паперової промисловості. Всі ці БОО являють собою слабкозафарбовані порошки.

Кількість БОО-продуктів, що використовуються в їжі, незначна. Це дріжджовий екстракт (гідролізат пекарських дріжджів), використовується у невеликій кількості як смакова і вітамінна приправа. Під час Другої світової війни в харчових цілях у Німеччині вирощували дріжджі *Candida*, але це виробництво не набуло подальшого розвитку. Фірма Hoechst випускає на основі бактерій, що ростуть на метанолі, продукт, який містить 90% білка. Цей продукт отримують при фракціонуванні клітин вирощених бактерій, він володіє певними функціональними властивостями і може використовуватися в їжі. Єдиний новий офіційно дозволений вид білкової їжі мікробного походження - це мікопротеїн, виробництво якого налагоджено в Англії фірмою Ranks Novis Me Dougal.

Грибний білок мікопротеїн - це харчовий продукт, що складається в основному з міцелію гриба. Його виробляють методом безперервного

виращування виділеного з ґрунту штаму *Fusarium graminearum*. Субстратом для нього є глюкоза та інші поживні речовини, а джерелами азоту - аміак і амонійні солі. Після завершення стадії ферментації культуру піддають термообробці (для зменшення вмісту рибонуклеїнової кислоти), а потім вже відокремлюють міцелій методом вакуумного фільтрування (рис. 14).

Текстура маси міцелію гриба близька до натуральних продуктів і має волокнисту будову, тому продукту можна надати текстуру м'яса, а за рахунок добавок - м'ясний смак і колір. Для зберігання грибний білок зазвичай заморожують, але іноді і висушують шляхом розпилення до порошкоподібного стану. Отримання мікопротеїна має ряд переваг, порівняно з процесом синтезу білка тваринами: висока швидкість росту (що характерна для виробництва всіх БОО-продуктів) і більш ефективно перетворення субстрату в білок.



Рис. 6.6. Блок-схема производства микопроотеина (по И. Хиггинсу и др., 1988)

Рис. 14. Блок-схема виробництва мікопротеїна (за І. Хіггінсом та ін., 1988)

3. Амінокислоти

Амінокислоти є основними структурними елементами, з яких

побудовані білки і які визначають ряд важливих їх властивостей. Першу амінокислоту - гліцин - виділив із желатину в 1820 р А. Браконно, останню - треонін - виділив з гідролізату фібрину в 1935 р А. Роуз.

Амінокислоти знаходять широке застосування в якості кормових і харчових добавок, приправ, сировини для фармацевтичної і парфумерної промисловості. При цьому із 20 амінокислот, необхідних для побудови білка, незамінними для людини є вісім - лейцин, ізолейцин, лізин, метіонін, треонін, триптофан, валін, фенілаланін. Для сільськогосподарських тварин цей список доповнюють гістидин і аргінін, а для молодняка птиці - ще й пролін. У зв'язку з цим амінокислоти добавляють к корм, що скорочує витрату дефіцитних білків тваринного походження.

За останні роки кількість амінокислот, які використовуються у кормовиробництві, зросла в 15 разів, що становить біля 70% від обсягу їх виробництва. Близько 30% вироблених амінокислот застосовують у харчовій промисловості. Наприклад, цистеїн запобігає пригоранню їжі в процесі приготування, покращує якість хліба при випічці і підсилює запах їжі. Гліцин, що володіє освіжаючим, солодкуватим смаком, використовують при виробництві напоїв. Глутамінова кислота сприяє посиленню смаку і консервації їжі. Деякі амінокислоти (аргінін, метіонін, цистеїн, фенілаланін та ін.) використовують в медицині. Широко застосовують амінокислоти в хімічній і фармацевтичній промисловості як попередники при виробництві детергентів, поліамінокислот, а також поліуретану та препаратів для сільського господарства.

Щорічно в світі виробляється близько 800 тис. т амінокислот вартістю понад 5 млрд доларів. Більше половини від загального обсягу виробництва припадає на частку глутамінової кислоти, яку використовують для отримання глутамату натрію (натрієва сіль глутамінової кислоти) - широко відомого підсилювача смаку та аромату.

Отримання амінокислот можливо шляхом хімічного синтезу, гідролізу природної білкової сировини та біотехнологічним способом.

При хімічному синтезі утворюється продукт рацемат, що містить різні форми амінокислот. Ізмери цих сполук в більшості випадків токсичні (за винятком гліцину і метіоніну).

Отримання оптично активних ізомерів амінокислот з гідролізатів природних матеріалів рослинного і тваринного походження пов'язане з багатоступеневим і дорогим очищенням.

Процес біотехнологічного виробництва амінокислот включає пряму мікробну ферментацію, мікробіологічний або ферментативний синтез із попередників. В даний час найбільш поширений мікробіологічний метод. Він заснований на здатності мікроорганізмів синтезувати всі β -амінокислоти, а в певних умовах - здійснювати їх надсинтез.

Утворення кожної амінокислоти в мікробних клітинах суворо визначено і знаходиться під чітким генетичним контролем (рис. 15).



Рис. 15. Блок-схема отримання лізину, ізолейцину, метіоніну

Він забезпечується за принципом зворотнього зв'язку на рівні генів, відповідальних за синтез відповідних ферментів (репресія), і на рівні самих ферментів, які в результаті надлишку утворюють амінокислоти, що можуть змінювати свою активність (ретроінгібування). Даний механізм контролю виключає перевиробництво амінокислот, а також запобігає їх виділенню з клітин у навколишнє середовище.

Щоб домогтися зверхсинтезу окремих амінокислот, потрібно «обійти» або змінити механізм їх синтезу. Для цього можна використовувати природні «дикі» штами, оптимізувати умови ферментації, можна також домогтися дисбалансу в метаболізмі амінокисло за рахунок зміни деяких факторів середовища (концентрації основного субстрату, рН, співвідношення макро-і мікроелементів тощо).

У промислових масштабах амінокислоти отримують або екстракцією з білкових гідролізатів, або очищенням продуктів метаболізму двох грам-позитивних ґрунтових бактерій, наприклад *Corynebacterium* або *Brevibacterium spp.* Зазвичай для підвищення їх продуктивності використовують мутагенез з подальшим відбором штамів - зверхпродуцентів певних амінокислот. Однак такий спосіб їх отримання вимагає багато часу, а ефективність його незначна.

Серед продуцентів амінокислот - різні мікроорганізми, представники родів *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Bacillus*, *Aerobacter*, *Microbacterium*, *Eschirichia*. Для отримання таких амінокислот, як L-глутамат, L-валін, L-аланін, L-глутамін і L-пролін, можливе застосування природних штамів і посилення у них продукції амінокислот умовами ферментації. Наприклад, високий вихід глутамату (до 30 г/л) можливий при повному або частковому придушенні активності а-кетоглутаратдегідрогенази, при додаванні в середовище корисно активних речовин та антибіотиків (пеніциліну, цефалоспорина).

4. Гормони

З давніх часів серед людей нормальні тілобудови народжуються і карлики (приблизно 10 чоловік на 1 млн населення). Доведено, що в період, коли тіло росте, у карликів відсутній спеціальний гормон - соматотропний, або гормон росту; таке порушення фізіології існує у генотипі цих людей. Але якщо в період росту в організм вводити цей гормон, то людина, яка здавалася б приречена стати ліліпутом, ростиме і досягне нормального росту.

Соматотропний гормон (соматотропін, соматропін) є одним з гормонів передньої частки гіпофіза. За будовою соматотропін є пептидним гормоном, складається з 121 амінокислотного залишку, його молекулярна маса дорівнює 20 кДа.

Соматотропін відіграє істотну роль в постнатальному розвитку організму, контролюючи багато сторін вуглеводного, ліпідного і мінерального обміну. Гормоном росту його називають тому, що у дітей та підлітків, а також у молодих людей в кістках він викликає виражене прискорення лінійного (у довжину) росту, в основному за рахунок довгих трубчастих кісток кінцівок. Дефіцит гормону призводить до карликовості, лікування якої проводиться за допомогою соматотропінотера. Секреція соматотропіну максимальна у підлітків в період інтенсивного лінійного росту і статевого дозрівання. З віком вона поступово знижується і мінімальна у людей похилого віку.

Соматотропін надає потужну анаболічну і антикатаболічну дію, підсилює синтез білка і гальмує його розпад, а також сприяє зниженню відкладення підшкірного жиру, посилення його згорання і збільшенню співвідношення м'язової маси до жирової. Крім того, соматотропін бере участь у регуляції вуглеводного обміну: він викликає виражене підвищення рівня глюкози в крові і є одним з гормонів-антагоністів інсуліна за дією на вуглеводний обмін. При гіпоглікемії рівень соматотропіну в крові різко підвищується - це один з природних фізіологічних механізмів швидкої

корекції гіпоглікемії.

Соматотропний гормон можна добувати коштовним і неприємним способом - з гіпофіза мозку померлих людей.

Використання біотехнологічних методів дозволило «сконструювати» мікроорганізм, здатний синтезувати соматотропний гормон, і організувати його виробництво, яке може задовольнити всі потреби людства.

Отримання соматотропіну з використанням генно-інженерних методів проводилося з урахуванням того, що просо-матотропін не береться під процесинг в бактеріальній клітині. Спочатку з клітин гіпофіза виділили відповідну мРНК (рис. 16).

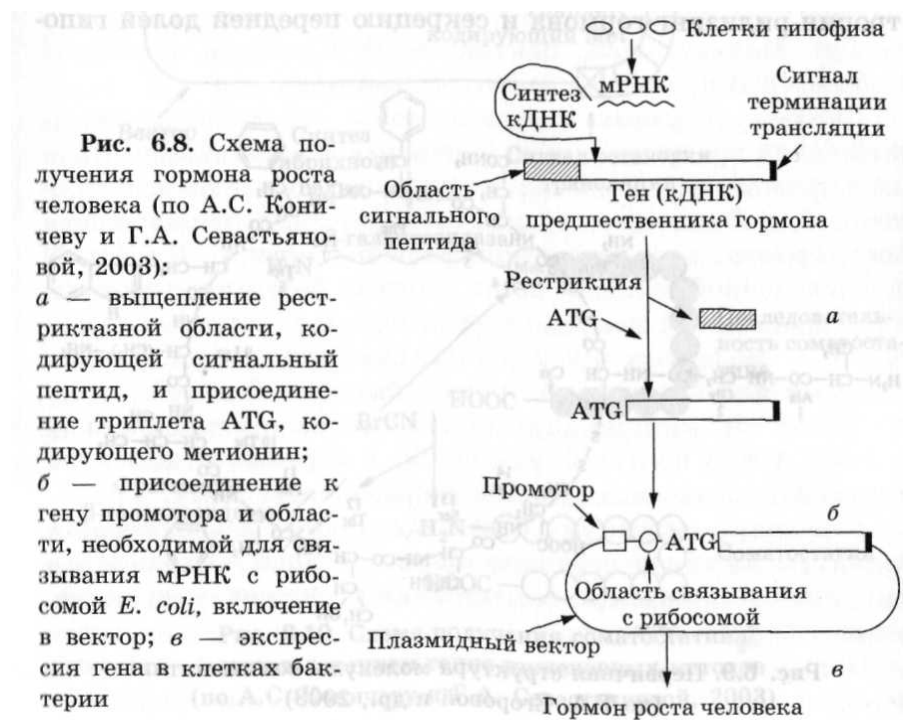


Рис. 16. Схема отримання гормону росту людини

Фрагмент ДНК, що кодує перші 23 амінокислотних залишка був отриманий методом хіміко-ферментативного синтезу, а олігопептид, що кодує інші амінокислотні залишки гормону, являє собою кДНК (компліментарну ДНК), отриману за допомогою зворотної транскриптази на матриці мРНК. Потім обидва фрагмента об'єднували в одній плазміді і переносили в *E. coli*. Така трансформація і клонування цього вектора в

бактеріальних клітинах, де здійснюються інтенсивна реплікація, транскрипція і трансляція, дозволили отримати необхідну кількість гормону. Він володів біологічною активністю, у порівнянні з гіпофізарним соматотропіном.

Отримання генно-інженерного соматотропіну стало вирішенням проблеми забезпечення медицини цим препаратом. Крім того, він використовується і в практичному тваринництві, підвищуючи інтенсивність росту тварин.

Соматостатин - це один з гормонів гіпоталамуса, а також гормон 5-клітин острівців Лангерганса підшлункової залози. За хімічною будовою це пептидний гормон, що містить 14 амінокислот. Соматостатин існує у двох біологічно активних формах, що походять від одного попередника і розрізняються довжиною N-кінця (рис. 17).

Соматостатин пригнічує секрецію гіпоталамусом соматотропін-рилізинг-гормону і секрецію передньою часткою гіпофіза соматотропного гормону, а також секрецію різних гормонально активних пептидів і серотоніну, що синтезується в шлунку, кишечнику, печінки та підшлунковій залозі.

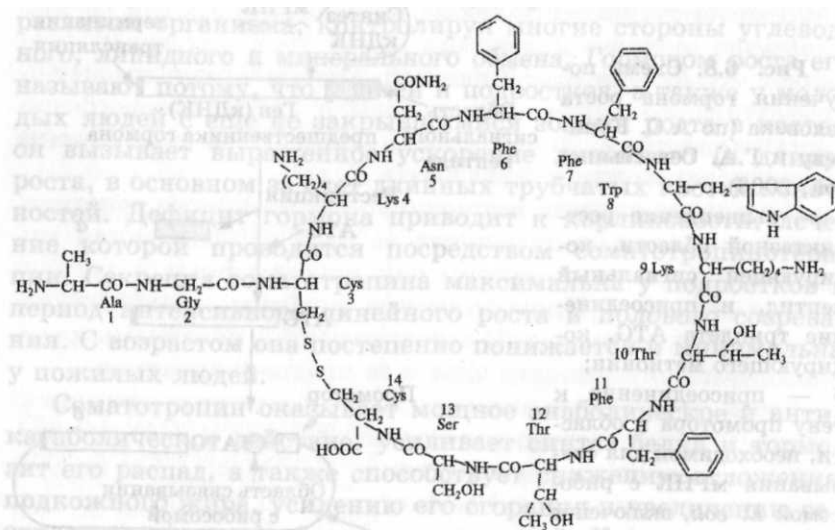


Рис. 6.9. Первичная структура молекулы соматостатина
(по Т.А. Егоровой и др., 2003)

Рис. 17. Первинна структура молекули соматостатина
(за Т.А. Єгоровой та ін., 2003)

Найбільш поширену фармакологічну дію на соматостатинергічну систему має викид гормону росту, що робить дану систему досить перспективною при лікуванні пухлинних захворювань.

Отримання соматостатина з використанням генно-інженерних методів, являє собою цікавий приклад цілеспрямованого конструювання білків (рис. 18).

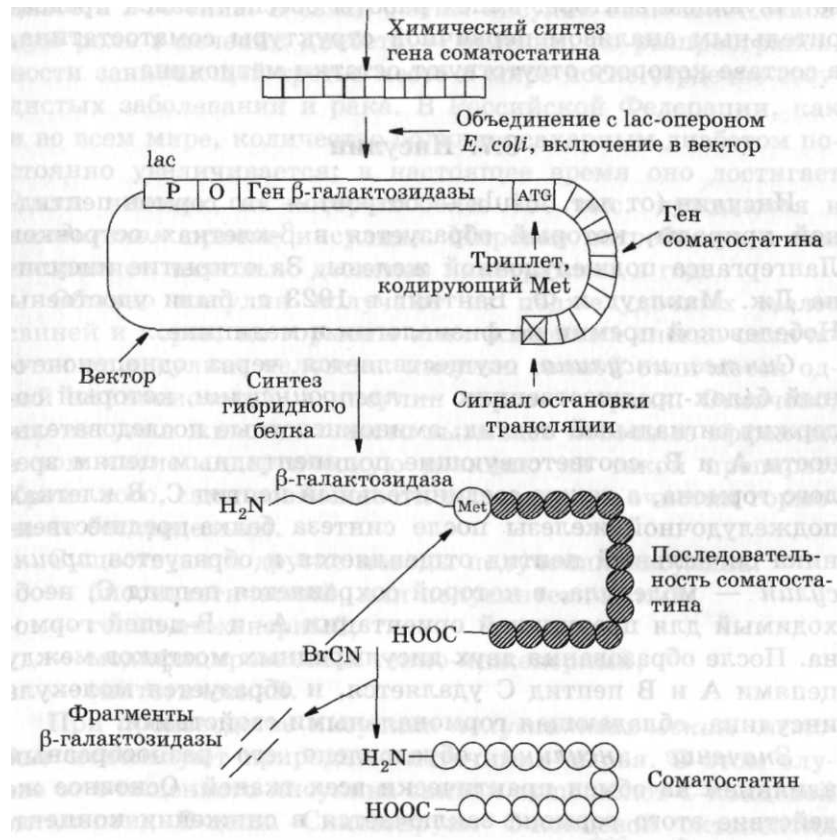


Рис. 6.10. Схема получения соматостатина с использованием генно-инженерных методов (по А.С. Коничеву и Г.А. Севастьяновой, 2003)

Рис. 18. Схема отримання соматостатина з використанням генно-інженерних методів

Отримати соматостатин в клітинах бактерій в значних кількостях перший час не вдавалося, так як він швидко руйнувався протеолітичними ферментами. Щоб «перехитрити» внутрішньоклітинні бактеріальні протеази, довелося сконструювати химерний білок - штучний попередник соматостатина. У цьому білку в якості N-кінцевої ділянки використовували

легко синтезуючий білок бактерії, а до нього через амінокислоту метіонін приєднували сам соматостатин. Все це зроблено на рівні генетичного матеріалу ДНК, який потім клонували у відповідному векторі. Успіх роботи забезпечувався попереднім аналізом первинної структури соматостатина, у складі якого відсутні залишки метіоніну.

Інсулін (від лат. *Insula* - острів) - це гормон пептидної природи, який утворюється в клітинах острівців Лангерганса підшлункової залози. За відкриття інсуліна Дж. Маклауд і Ф. Бантінг у 1923 р. були удостоєні Нобелівської премії з фізіології і медицини.

Синтез інсуліну здійснюється через одноланцюговий білок-попередник - препроінсулін, який містить сигнальний пептид, амінокислотні послідовності А і В, відповідні поліпептидним ланцюгам зрілого гормону, а також з'єднувальний пептид С. У клітинах підшлункової залози після синтезу білка-попередника сигнальний пептид відщеплюється і утворюється проінсулін - молекула, в якій зберігається пептид С, необхідний для правильної орієнтації А- і В-ланцюгів гормону. Після утворення двох дисульфідних містків між ланцюгами А і В пептид С видаляється, і утворюється молекула інсуліну, що володіє гормональними властивостями.

Значення інсуліну обумовлено його різноманітним впливом на обмін практично всіх тканин. Основна дія цього гормону полягає у зниженні концентрації глюкози в крові.

Інсулін збільшує проникність плазматичних мембран для глюкози, активує ключові ферменти гліколізу, стимулює утворення в печінці і м'язах з глюкози глікогену, підсилює синтез жирів і білків. Крім того, він пригнічує активність ферментів, що розщеплюють глікоген і жири. Тобто, крім анаболічної дії, інсулін володіє також і антикатаболічним ефектом.

Порушення секреції інсуліну внаслідок деструкції (альфа -клітин (Абсолютна недостатність інсуліну) є ключовою ланкою патогенезу цукрового діабету 1-го типу. Порушення дії інсуліну на тканини (відносна інсулінова недостатність) призводить до розвитку цукрового діабету 2-го

типу. У зв'язку з цим інсулін виконує основну роль у лікуванні діабету - хвороби, за поширеністю займає третє місце в світі після серцево-судинних захворювань і раку.

В Україні, як і в усьому світі, кількість хворих на цукровий діабет постійно збільшується; у 2012 році було зареєстровано 1 млн 311 тисяч 355 хворих цукровим діабетом, 8 тисяч із яких діти. При цьому за останні 9 років кількість дітей в Україні віком до 6 років хворих на цукровий діабет збільшилося вдвічі. Щорічно цукровий діабет I типу обстежується у 19 тис. осіб. У 2012 році зареєстровано більше 212 тис. хворих, котрі потребують інсулінотерапії. Світова потреба в ньому становить кілька десятків кілограмів на рік.

Зазвичай інсулін отримують з підшлункової залози свиней і корів, але гормони цих тварин дещо відрізняються від інсуліну людини: інсулін свиней відрізняється однією амінокислотою, а інсулін корів - трьома. Відзначено, що інсулін тварин часто викликає побічні ефекти, в тому числі алергічну реакцію на такий препарат. Крім того, самі можливості виділення і очищення гормону не безмежні.

Існують інші методи отримання інсуліну:

- Біосинтетичний, або напівсинтетичний;
- Генно-інженерний;
- Модифікований генно-інженерний;
- Синтетичний.

При виробництві інсуліну напівсинтетичним методом використовують природні джерела сировини. У цьому випадку від очищеного інсуліну свині відщеплюють С-кінцевий октапептид В-ланцюга. Синтезують С-кінцевий октапептид людського інсуліну і приєднують його хімічним способом. Потім видаляють захисні групи і очищають отриманий інсулін.

В даний час інсулін людини отримують в основному двома способами. Перший пов'язаний з модифікацією свинячого інсуліну синтетико-ферментативним методом. Він заснований на тому, що свинячий інсулін

відрізняється від інсуліна людини однією заміною на С-кінці В-ланцюга Ala30Thr. Заміну аланіна на треонін здійснюють шляхом каталіза ферментом відщеплення аланіна і приєднання замість нього захищеного по карбоксильній групі залишку треоніна, присутнього в реакційній суміші у великому надлишку. Після відщеплення захисної групи отримують інсулін людини.

Другий спосіб отримання інсуліну людини - генно-інженерний, тобто біотехнологічний метод отримання інсуліна. Воно було здійснене в 1980-і рр., що мало велике значення для практичної медицини. В якості компетентних клітин використовували *E. coli*, а гени обох ланцюгів молекули людського інсуліну були отримані методом хімічного синтезу. Ці гени приєднували до того кінця гена, що кодує білок галактозидазу, і вводили у векторну плазмиду. Трансформовані клітини *E. coli* синтезували химерні білки, що складаються з А- або В-ланцюга інсуліну, приєднані через метіонін до галактозидази.

Тому був розроблений метод отримання проінсуліна людини з подальшим його дозріванням (рис. 19).

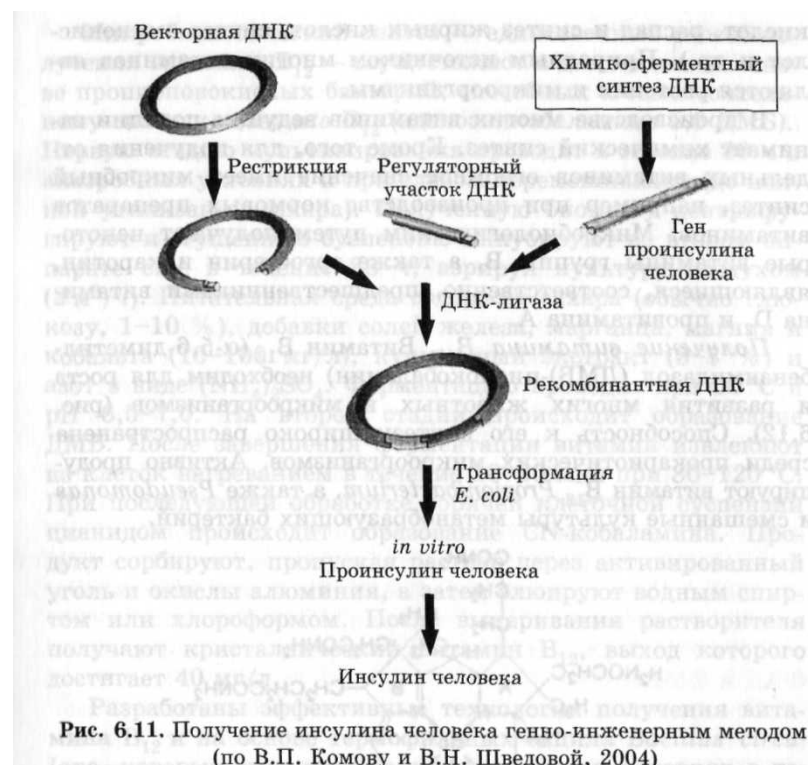


Рис. 19. Отримання інсуліна людини генно-інженерним методом

Були отримані дволанцюжкові фрагменти ДНК, відповідного гену, що кодує людський інсулін. Вони були вбудовані в плазмиду і перенесені в *E. coli*. Отримані рекомбінантні клітини синтезували про-інсулін, який потім *in vitro* перетворювали на зрілий інсулін.

Інсулін став першим препаратом, створеним за допомогою технології рекомбінантних ДНК. В даний час саме такий інсулін широко застосовується в медичній практиці.

5. Вітаміни

Вітаміни - це низькомолекулярні органічні речовини, здатні в дуже низьких концентраціях впливати на живі організми. Вони беруть активну участь у метаболізмі людини і вищих тварин, впливаючи на різні фізіологічні процеси (цикл трикарбонових кислот, розпад і синтез жирних кислот, синтез амінокислот та ін.). Природним джерелом багатьох вітамінів є рослини і мікроорганізми.

У виробництві багатьох вітамінів провідні позиції займає хімічний синтез. Крім того, для отримання окремих вітамінів величезне значення має мікробний синтез, наприклад при виробництві кормових препаратів вітамінів. Мікробіологічними шляхом отримують деякі вітаміни групи В, а також ергостерин і каротин, що є, відповідно, попередниками вітаміну D₂ і провітаміну А.

Отримання вітаміну B₁₂. Вітамін B₁₂ (ціанокобаламін) необхідний для росту і розвитку багатьох тварин і мікроорганізмів. Здатність до його синтезу широко поширена серед прокаріотичних мікроорганізмів. Активно продукують вітамін B₁₂ *Propionibacterium*, а також *Pseudomonas* і змішані культури метаноутворюючих бактерій.

Мікробіологічний синтез - єдиний спосіб отримання вітаміну B₁₂ - здійснюють у дві стадії на основі пропіоновокислих бактерій, здатних до самостійного синтезу коензиму B₁₂. Першу стадію культивування проводять протягом 80 год в анаеробних умовах і при слабкому перемішуванні (до

повної утилізації цукру). Отриману біомасу центрифугують і згущену суспензію інкубують в іншому апараті ще протягом 88 год, аеруючи культуру повітрям. Живильне середовище містить цукор (зазвичай глюкозу, 1-10%), добавки солей заліза, марганцю, магнію і кобальту (10-100 мг/л), кукурудзяний екстракт (3-7%) і азот у вигляді. Ферментацію проводять при 30°C і рН 6,5-7,0. Після завершення ферментації вітамін витягують з клітин нагріванням протягом 10-30 хв при температурі 80-120°C. При подальшій обробці гарячої клітинної суспензії ціанідом відбувається утворення CN-кобаламіна. Продукт сорбують, пропускаючи розчин через активоване вугілля і оксиди алюмінію, а потім вилучають водневим спиртом або хлороформом. Після випарювання розчинника отримують кристалічний вітамін B₁₂, вихід якого досягає 40 мг/л.

Розроблено ефективні технології отримання вітаміну B₁₂ і на основі термофільних бацил *Bacillus circulans*, які вирощують в нестерильних умовах протягом 18 год при температурі 65-75°C на поживних середовищах, приготовлених із соєвого і рибного борошна, м'ясного і кукурудзяного екстракту. Вихід вітаміну становить від 2,0 до 6,0 мг/л.

Для потреб тваринництва вітамін B₁₂ отримують на основі змішаної асоціації, що складається з чотирьох культур - вуглеводородильних, аммоніфіцируючих, сульфатвідновлюючих і власне метаноутворюючих бактерій, які взаємопов'язано розщеплюють органічний субстрат до CO₂ і CH₄. Як субстрат використовують барду, яка містить 2,0-2,5% сухих речовин. Бродіння проходить при температурі 55-57°C в нестерильній культурі у дві фази: на першій утворюються жирні кислоти і метан, на другій - метан, вуглекислота і вітамін B₁₂. Тривалість процесу в одному апараті складає 2,5-3,5 доби, у двох (послідовно) - 2-2,5 діб. Концентрація вітаміну в барді досягає 850 мкг/л. Паралельно в значних кількостях утворюється газ (65% метану і 30% вуглекислоти). Барда має слаболужну реакцію. Для стабілізації вітаміну її підкисляють соляною або фосфорною кислотою, потім у випарному апараті згущують до 20% вмісту сухих речовин і висушують в

розпилювальній сушарці. Вміст B_{12} в сухому препараті становить до 100 мкг/г.

Отримання вітаміну B_2 . Назва вітаміну B_2 - рибофлавін - походить від цукру рибози, що входить до складу молекули вітаміну у вигляді багатоатомного спирту. Він широко поширений в природі і в значних кількостях синтезується рослинами, дріжджами, грибами, бактеріями.

Тварини, що не синтезують цей вітамін, повинні отримувати його в складі комбікормів, оскільки при його дефіциті в організмі порушуються процеси білкового обміну, сповільнюється ріст. Препарати рибофлавіну використовують в медицині для лікування ряду захворювань, а у тваринництві - в якості добавки до кормів. Мікроорганізми синтезують рибофлавін і дві його коферментні.

Продуцентами вітаміну B_2 є бактерії (*Brevi-bacterium ammoniagenes*, *Micrococcus glutamaticus*), дріжджі (*Candida guilliermondii*, *C. flaveri*), мікроскопічні (*Ashbya gossypii*, *Eremothecium ashbyii*) і цвілеві (*Aspergillus niger*) гриби.

Промислове отримання рибофлавіну здійснюють хімічним, мікробіологічним та комбінованим синтезом. В останньому випадку синтезована мікроорганізмами рибоза хімічно трансформується у B_2 .

Для медичних цілей мікробіологічний рибофлавін отримують на основі гриба *Aspergillus*. Для високого виходу вітаміну (до 7 г/л) використовують удосконалені штами і оптимізовані середовища, що містять (у%): кукурудзяний екстракт - 2,25; пептон - 3,5; соєва олія - 4,5 та стимулятори (пептони, гліцин). Використовують активний інокулят, яким засівають стерильне середовище. Ферментацію проводять протягом семи діб при температурі 28°C. Вихідний рН становить близько 7,0, в ході ферментації у зв'язку з виділенням кислот середовище підкисляється до рН 4,0-4,5. Після використання вуглецевого субстрату продуцент починає утилізувати кислоти, рН підвищується, і потім починається утворення вітаміну B_2 . При цьому кристали рибофлавіну накопичуються поза міцелія. На

постферментаційній стадії для виділення вітаміну міцелій нагрівають протягом 1 год при 120°C.

У ряді країн для отримання кормових препаратів вітаміну B₂ використовують досить простий спосіб, заснований на вирощуванні мікроскопічного гриба *Eremothecium ashbyii* в глибинній культурі протягом 80-84 год при температурі 28-30°C на середовищі з глюкозою або мальтозою (2,5%) , джерелом азоту у вигляді NH₄N₃ і карбонатом кальцію (0,5%). Вихід рибофлавіну становить 1250 мкг/мл. Культуральна рідина концентрується у вакуумному випарнику до вмісту сухих речовин 30-40% і висушується в сушарці. Товарна форма продукту - порошок з вмістом рибофлавіну не менше 10 мг/г і 20% сирого протеїну. У препараті присутні також нікотинова кислота і вітаміни B₃, B₆ і B₁₂. При використанні штаму *Bacillus subtilis*, отриманого генно-інженерним методом, вихід рибофлавіну становив 4 г/л за 35 діб ферментації.

Отримання ергостерину. Ергостерин є вихідним продуктом при виробництві вітаміну D₂ і кормових препаратів дріжджів, збагачених цим вітаміном. Вітамін D₂ (ергокальциферол) утворюється при опромінюванні ультрафіолетом ергостерину, який у значних кількостях синтезують бурі водорості, дріжджі, цвілеві гриби. Найбільш активні продуценти ергостерину - *Saccharomyces, Rhodotoryla, Candida*.

У промислових масштабах ергостерин утворюється при культивуванні дріжджів і міцеліальних грибів на середовищах, що містять надлишок цукрів і нестачу азоту, при високій температурі і добрій аерації. Більш інтенсивно ергостерин утворюють дріжджі роду *Candida* на середовищах з вуглеводами. Кристалічний препарат вітаміну D₂ отримують при культивуванні цвілевих грибів (*Penicillium, Aspergillus*).

Для отримання кормових препаратів проводять опромінення суспензії або сухих дріжджів (*Candida*). Так, тонкий шар 5% -ої суспензії дріжджів опромінюють ультрафіолетовими лампами з довжиною хвилі 280-300 нм.

Для отримання кристалічного препарату вітаміну дріжджі або грибний

міцелій піддають кислотному гідролізу при 110°C. Вітамін В₂ екстрагують спиртом, фільтрують, фільтрат упарюють і кілька разів промивають спиртом. Спиртовий екстракт згущують до 50%-ої концентрації сухих речовин, обмилюють лугом. Утворені кристали вітаміну очищають перекристалізацією і сушать в ефірі, відганяючи останній. Кристалічний осад розчиняють в олії. Препарат використовують у медичних цілях. Ергостерин слугує також вихідним продуктом для отримання ряду стероїдних гормонів, харчових і лікарських препаратів.

Контрольні питання:

1. Класифікація продуктів біотехнологічного виробництва.
2. Що таке блок-схема?
3. Охарактеризуйте блок-схему виробництва йогурту.
4. Охарактеризуйте блок-схему виробництва біогазу.
5. Охарактеризуйте блок-схему виробництва хліба.
6. Білкові продукти, методи їх отримання.
7. Охарактеризуйте блок-схему виробництва мікопротеїна.
8. Амінокислоти, методи їх отримання.
9. Охарактеризуйте блок-схему виробництва лізину, ізолейцину, метіоніну.
10. Гормони, методи їх отримання.
11. Характеристика гормону соматотропну, методи та схема отримання гормону росту людини.
12. Характеристика гормону соматостатину, методи та схема отримання соматостатину.
13. Характеристика гормону інсуліну, методи та схема отримання інсуліну.
14. Вітаміни та методи їх отримання.
15. Характеристика вітаміну В₁₂, методика отримання.
16. Характеристика вітаміну В₂, методика отримання.
18. Характеристика ергостерину, методика отримання.

ЛЕКЦІЯ № 5

ПРОДУКТИ ПРОМИСЛОВОЇ БІОТЕХНОЛОГІЇ ТА БЛОК-СХЕМИ ЇХ ВИРОБНИЦТВ

Питання:

6. Інтерферони
 7. Вакцини
 8. Антибіотики
 9. Моноклоальні антитіла
 10. Вторинні сполуки
-

6. Інтерферони

Інтерферони являють собою особливу групу білків, які продукуються клітинами імунної системи у більшості тварин і людини. Вперше вони були виявлені як продукти метаболічної активності інфікованих вірусами клітин. Отже, інтерферони є «зброєю», за допомогою якої можливо протистояти хвороботворним бактеріям, паразитам і навіть раковим клітинам.

Інтерферони - це низькомолекулярні білки зі схожими властивостями, що складаються з 146-166 амінокислотних залишків і виділяються клітинами організму у відповідь на вторгнення вірусу. Загальною їх властивістю є порушення реплікації вірусів, тобто завдяки інтерферонам клітини стають стійкими до вірусної інфекції. За це вони і отримали свою назву, що походить від англійського терміна *interfere with* - заважати вірусам забезпечувати синтез своєї РНК та білків.

При зараженні клітин вірусом він починає розмножуватися і одночасно клітина-господар «запускає» синтез інтерферонів. Вони виходять з клітини, вступають в контакт із сусідніми клітинами і роблять їх несприйнятливими

до вірусу. Інтерферони діють, запускаючи ланцюг подій, що призводять до придушення синтезу вірусних білків і - в деяких випадках - збірки і виходу вірусних частинок (шляхом активації олігоаденилатсинтетази) (рис. 20).

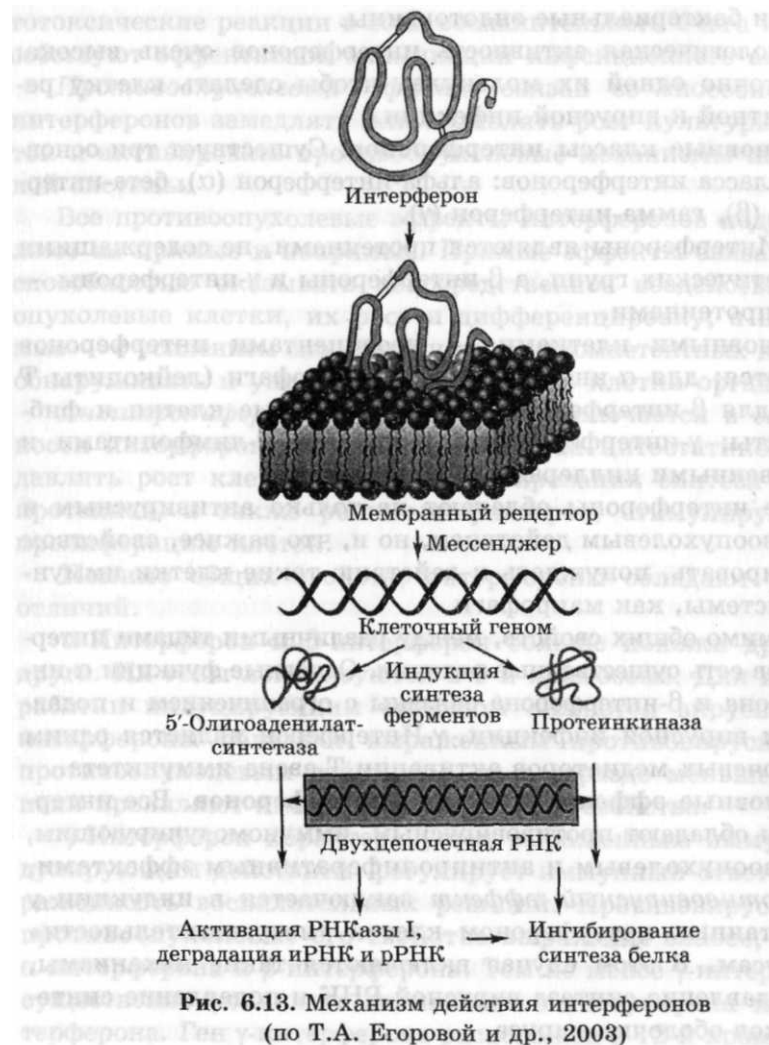


Рис. 20. Механізм дії інтерферонів

Таким чином, інтерферони не володіють прямою противірусною дією, але викликають такі зміни в клітині, які перешкоджають розмноженню вірусу.

Утворення інтерферонів можуть стимулювати не тільки інтактні віруси, але і різні інші агенти, наприклад деякі інактивовані віруси, двохланцюгові РНК, синтетичні дволанцюжкові олігонуклеотиди та бактеріальні ендотоксини.

Біологічна активність інтерферонів дуже висока: достатньо однієї їх

молекули, щоб зробити клітину резистентною до вірусної інфекції.

Основні класи інтерферонів. Існує три основні класи інтерферонів: альфа-інтерферон (α), бета-інтерферон (β), гамма-інтерферон (γ).

α -Інтерферони є протеїнами, що не містять простетичної груп, а β - інтерферони та γ -інтерферони - глікопротеїнами.

Основними клітинами - продуцентами інтерферонів є: для α -інтерферону - макрофаги (лейкоцити Т і В); для β -інтерферону - епітеліальні клітини і фібробластах; γ -інтерферон продукується Т-лімфоцитами і природними кілерами (Т-клітинами).

Всі інтерферони володіють не тільки антивірусною і протипухлинною дією, а й, що важливіше, властивістю активувати, примушувати до дії такі клітини імунної системи, як макрофаги.

Крім загальних властивостей, між різними типами інтерферонів є істотні відмінності. Основні функції α -інтерферона і β -інтерферону пов'язані з обмеженням і придушенням вірусної інфекції, γ -інтерферон є одним з ключових медіаторів активації Т-ланки імунітету.

Основні ефекти дії інтерферонів. Всі інтерферони володіють противірусною, імуномодулюючою, протипухлинною та антипроліферативною дією.

Противірусний ефект полягає в індукції у оброблених інтерфероном клітин «нечутливості» до вірусів. У цьому випадку включаються такі механізми, як придушення синтезу вірусної РНК і придушення синтезу білків оболонки вірусу.

Імуномодулюючий ефект пов'язаний зі здатністю інтерферонів регулювати взаємодію клітин, які беруть участь в імунній відповіді. Ця функція здійснюється за допомогою регуляції експресії на мембранах клітин молекул головного комплексу гістосумісності І типу або шляхом безпосередньої активації імунокомпетентних клітин. Всі ці фактори підсилюють фагоцитарні і цитотоксичні реакції в зоні запального вогнища і сприяють ефективній елімінації інфекційного агента.

Протипухлинний ефект пов'язаний зі здатністю інтерферонів уповільнювати або пригнічувати ріст культури клітин і активувати протипухлинні механізми імунної системи.

Всі протипухлинні ефекти інтерферонів поділяють на прямі і непрямі. Прямі ефекти пов'язані зі здатністю надавати безпосередній вплив на пухлинні клітини, їх ріст і диференціювання, а непрямі - з посиленням здатності імунокомпетентних клітин виявляти і знищувати атипові клітини організму.

Антипроліферативний ефект полягає у здатності інтерферонів проявляти властивості цитостатиків: придушувати ріст клітин за рахунок інгібування синтезу РНК, протеїнів, а також ростових факторів, що стимулюють проліферацію клітин.

Крім загальних властивостей, інтерферони володіють рядом відмінностей.

а-Інтерферон і β -інтерферон більше схожі один на одного. Їх гени локалізуються в 9-й хромосомі. Для їх вироблення індукуючим сигналом є віруси. Ці інтерферони володіють вираженою противірусною і протипухлинною дією, але в набагато меншому ступені проявляють імуномодулюючі властивості.

λ -Інтерферон характеризується вираженою імуномодулюючою дією, регулює імунну відповідь і вираженість запальних реакцій. Противірусні та протипухлинні його властивості виражені слабше, ніж у а-інтерфероні і β -інтерфероні. Проте λ -інтерферон істотно посилює активність а-інтерферону і β -інтерферону. Ген λ -інтерферону розташований у 12-й хромосомі.

Отримання інтерферонів. Інтерферони слугують одним з найбільш ефективних засобів лікування вірусних інфекцій, але вони видоспецифічні і можуть бути отримані тільки з клітин людини. Технологія виділення та очищення інтерферонів малоефективна, насамперед через вкрай малий вихід кінцевого продукту. Тому отримання генно-інженерного продукту є перспективною альтернативою традиційним методам виділення

інтерферонів.

Ген інтерферону отримали хіміко-ферментативним методом. Однією з труднощів, яку довелося подолати було те, що інтерферон синтезується у вигляді попередників з додатковою (сигнальною) послідовністю амінокислотних залишків. Бактеріальні клітини не мають протеїназ, що перетворюють попередники в зрілі білки, тому треба було синтезувати ген, що кодує тільки зрілий інтерферон. Такий ген був отриманий і введений в клітину *E. coli*. Фізико-хімічні властивості α -інтерферону, виділеного з бактерій, виявилися близькі до властивостей інтерферону, виділеного з крові донорів.

Значною подією стала вдала спроба введення генів інтерферонів в дріжджові клітини. Заміна бактеріальної клітини в якості реципієнта на дріжджову зіграла величезну роль для всієї генно-інженерної техніки взагалі і для отримання інтерферонів в цілому. Справа в тому, що β -інтерферон і λ -інтерферон являють собою глікозилізовані білки, а процес глікозилування неможливий в *E. coli*, але цілком здійснюється в дріжджовій клітині для точного відтворення структури β -інтерферону і λ -інтерферону. Рекомбінантні штами дріжджів синтезували у великих кількостях інтерферони, що володіють вираженою біологічною активністю.

Застосування інтерферонів. Розробка методів отримання лейкоцитарних і рекомбінантних інтерферонів у препаративних кількостях, а також вискоєфективних методів їх очищення відкрила можливість застосування цих препаратів для лікування вірусних і онкологічних захворювань.

Інтерферони представляють високу цінність при лікуванні цілого ряду захворювань: вірусного та хронічного гепатитів, герпетичної інфекції, гострих респіраторних захворювань, розсіяного склерозу, мієломи, остеосаркоми. Є дані про позитивний ефект застосування інтерферонів для лікування раку легенів, сечового міхура, яєчників, мозку і гортані.

Інтерферони випускають в якості лікарських препаратів у вигляді

крапель в ніс, мазей або розчинів для ін'єкцій. Існують натуральні інтерферони, отримані з лімфоцитів донорської крові, і штучно синтезовані із застосуванням генно-інженерних технологій (рекомбінантні).

В даний час як у нас в країні, так і за кордоном випускають комерційні препарати - людський лейкоцитарний, лімфобластний (Велферон (Росія), Лаферон (Україна), Борофор (Венгрія), Егіферон) і фібробластний (Ферон), а також інтерферони, отримані генно-інженерними методами: рекомбінантні інтерферони (Роферон, Реальдерон), β -інтерферон і λ -інтерферон (Гаммаферон).

7. Вакцини

Один з важливих напрямків біотехнології - створення і розробка вакцин, що сприяють розвитку імунітету до патогенних вірусів і мікроорганізмів.

Формуванню у реципієнта імунітету до патогенних мікроорганізмів сприяє вакцинація. Ефект вакцинації був відкритий біля 220 років тому, в 1796р., лікарем Е. Дженнером, який довів, що людина, яка перенесла коров'ячу віспу (не дуже важку хворобу великої рогатої худоби), стає несприйнятливою до віспи натуральної - дуже небезпечного інфекційного захворювання, з високою смертністю. Навіть якщо хворий не гине, у нього нерідко виникають різні каліцтва, психічні розлади і сліпота.

Е. Дженнер публічно провів щеплення коров'ячої віспи восьмирічному хлопчику Джеймсу Фіппсу, використавши для цього ексудат з пустули хворої віспою корови, а потім, через певний час, двічі інфікував дитину гноєм з пустули хворого натуральною віспою. Всі прояви захворювання обмежилися почервонінням в місці щеплення, які зникли через кілька днів. Це пов'язано з тим, що у відповідь на введення вакцини організм запускає імунну відповідь - виробляються антитіла, які при подальшій інфекції блокують проліферацію патогенного мікроорганізму і не дозволяють хворобі

розвиватися.

Починаючи з першої вакцини, створеної Е. Дженнером, ведуться великі наукові дослідження в цьому напрямку. Більшість людських противірусних вакцин створено на основі убитих (інактивованих) патогенних мікроорганізмів або живих, але не вірулентних (атенуйованих – штучне послаблення) штамів. Такий підхід досить ефективний і запобігає поширенню багатьох вірусних інфекцій, проте його застосування має ряд обмежень, пов'язаних з:

- Неможливістю культивування всіх патогенних мікроорганізмів;
- Потенційною небезпекою при роботі з патогенними мікроорганізмами і вірусами;
- Можливістю ревертувати (повертатися до вихідного вірулентного штаму);
- Високою вартістю виробництва традиційних вакцин (титр вірусів тварин і людини в культурі та швидкість їх розмноження, як правило, невисокі).

В останні роки все більшого значення в отриманні вакцин набувають біотехнологічні підходи, в тому числі технологія рекомбінантних ДНК. Вона дозволяє створювати нові препарати, більш безпечні та ефективніші, менш дорогі, які не мають обмежень у застосуванні. Для цих цілей використовують такі підходи:

1. Патогенний мікроорганізм модифікують, делетуючи чи (прибираючи) гени, відповідальні за вірулентність, при цьому зберігається здатність штаму викликати імунну відповідь. Отримують живі вакцини, що містять непатогенні мікроорганізми, які не можуть ревертувати і ставати патогенними.

2. Гени або їх сегменти, що кодуєть основні антигенні детермінанти (білки) патогенних мікроорганізмів, експресують в альтернативному господарі, наприклад *E. coli*. Одержують потрібний продукт у великій кількості і використовують його як вакцину. Такі вакцини, що містять лише

окремі компоненти патогенного мікроорганізма, називають субодиничними вакцинами.

Переваги субодиничних вакцин полягають у тому, що препарат, який містить очищений імуногенний білок, стабільний і безпечний. Його хімічні властивості відомі, у ньому відсутні додаткові білки і нуклеїнові кислоти, які можуть бути причиною небажаних побічних ефектів в організмі-господаря.

Недоліками субодиничних вакцин є висока вартість очищення специфічного білка і зміна його конформації після виділення, що може спричинити і зміну його антигенних властивостей.

Клоновані гени, що кодують основні антигенні детермінанти патогенного організму, вбудовують у геном непатогенного носія (зазвичай вірусу) і отримують живу безпечну вакцину, яка не містить хвороботворних мікроорганізмів. Живі вакцини, як правило, більш ефективні, ніж неживі або субодиничні.

У числі нових напрямів створення рекомбінантних вакцин - розробка ДНК-вакцин (так званих генних, полінуклеотидних вакцин, вакцин з нуклеїнових кислот). Принцип застосування ДНК-вакцин полягає в тому, що в організм пацієнта вводять молекулу ДНК, яка містить гени, що кодують імуногенні білки патогенного організму і генетичні елементи, які необхідні для експресії цього гена в клітинах еукаріот (людини). Як продуцентів таких генів використовують бактеріальні клітини, що містять рекомбінантні плазмиди з відповідними генами. Після отримання достатньої біомаси (кількості копій) плазмідну ДНК виділяють з бактерій, очищують від інших молекул ДНК і домішок. Отриману ДНК-вакцину вводять парентерально, при цьому більша її частина надходить у міжклітинний простір, після чого включається в клітини.

Протигерпетичні вакцини. Вірус простого герпеса (HSV - Herpes simplex virus) викликає інфекційне захворювання генералізованого або місцевого характеру (переважно ураження шкіри, очей, слизових оболонок, нервової системи, енцефаліт тощо). Крім того, він є онкогенним, тому

вакцинація убитим чи аттенуєваним вірусом пов'язана з певним ризиком розвитку раку. Для захисту від HSV-інфекції застосовують неонкогенетичну субодиничну вакцину.

Для створення будь-якої субодиничної вакцини насамперед ідентифікують ті компоненти патогенного мікроорганізма, які індукують вироблення антитіл. У випадку HSV-типу таким компонентом є глікопротеїн. У відповідь на введення цього глікопротеїну мишам у них виробляються антитіла, що нейтралізують інтактний HSV. Ген HSV-1 був ізольований, клонований в одному з експресуючих векторів в клітинах ссавців і введений в яйцеклітини китайського хом'ячка, в яких, на відміну від *E. coli*, відбувається глікозилювання (порушення структури) чужерідних білків. Повнорозмірний ген кодує білок, в нормі зв'язується з мембраною клітини ссавця. Потім модифікованим геном трансформували яйцеклітини китайського хом'ячка, які глікозилювали білковий продукт і секретувати його під зовнішнє середовище, так як він не міг вбудовуватися в клітинну мембрану. Антитіла, що виробляються у відповідь на введення модифікованого білка, ефективні відносно вірусу простого герпесу.

Противосальмонельозні вакцини. Різні штами *Salmonella* викликають гострі кишкові інфекції, постнатальну (післяпологову) інфекцію, черевний тиф, харчову токсикоінфекцію. Для профілактики всіх цих захворювань у овець, курчат і людини ефективні пероральні вакцини створені методом подвійної делеції.

Такий спосіб отримання непатогенних штамів, придатних для створення на їх основі живих вакцин, полягає у видаленні з генома патогенних бактерій ділянок хромосом, що відповідають за незалежні життєво важливі функції. Краще делетувати, принаймні, дві такі області, тому що ймовірність їх одночасного відновлення дуже мала. Штам з подвійною делецією володіє обмеженою проліферативною здатністю і зниженою патогенністю, але забезпечує вироблення імунної відповіді. Штами *Salmonella* з подвійною делецією викликають легку форму інфекції і

володіють в 100 тис. разів меншою вірулентністю.

8. Антибіотики

Антибіотики (від *anti* - проти, *bios* - життя) - самий великий клас фармацевтичних сполук природного або напівсинтетичного походження, які подавляють ріст живих клітин, найчастіше прокаріотичних або найпростіших. До цього ж класу відносяться протигрибкові агенти, протипухлинні ліки і алкалоїди.

Сучасне визначення терміну «антибіотик» дано в 1961р. М. М. Шемякіним і А. С. Хохловим, які запропонували вважати антибіотичними речовинами всі продукти обміну будь-яких організмів, які здатні вибірково знищувати або пригнічувати ріст і розвиток мікроорганізмів.

Антибіотики не просто речовини, що діють проти хвороботворних мікроорганізмів; це ще й речовини, які отримані за допомогою мікроорганізмів-продуцентів. Найчастіше вони синтезуються актиноміцетами, рідше - бактеріями. Серед актиноміцетів найбільший внесок вносить рід *Streptomyces* (зокрема, тільки один вид *Streptomyces griseus* синтезує більше 50 антибіотиків).

Найбільш поширеними з комерційної точки зору антибіотиками виявилися пеніциліни, цефалоспорини і тетрациклін.

Пеніцилін, історично перший антибіотик, вперше виділив англійський учений А. Флемінг із цвілевих грибів *Penicillium notatum*. У 1928р. він виявив, що на агарі в одній із чашок Петрі з бактеріями *Staphylococcus aureus* виросла колонія цвілевих грибів. Колонії бактерій навколо них стали прозорими через руйнування клітин. Флемінгу вдалося виділити активну речовину - пеніцилін, який руйнував бактеріальні клітини. Ця робота була опублікована у 1929р. Флемінг недооцінив своє відкриття, вважаючи, що отримати ліки буде дуже важко. Роботу Флемінга продовжили Г. Флорі і

Е. Чейн, які запропонували методи очищення пеніциліну. Його масове виробництво було налагоджено під час Другої світової війни. У 1945р. А. Флемінг, Г. Флорі і Е. Чейн були нагороджені Нобелівською премією в галузі фізіології та медицини.

Ефект від застосування пеніциліну перевершив всі очікування. За деякими даними, тільки в 1940-1950-і рр. з його допомогою було врятовано від смерті більше 15 млн чоловік. Дійсно, часто поранений гине не від самої рани, а від гнійного запалення. Так, рана, отримана О.С. Пушкіним на дуелі, сама по собі не була небезпечною, але розвинулося запалення - перитоніт, що і призвело до смерті письменника. При нинішньому стані медицини Пушкіна можна було бвилікувати за допомогою антибіотиків.

Відразу ж після відкриття пеніциліну почалися пошуки інших антибіотиків. Зараз їх існує вже більше 3 тис., але багато вчених у різних країнах світу весь час шукають більш продуктивні мікроорганізми для їх біосинтезу, досягаючи при цьому вражаючих успіхів. Наприклад, цвіль Флемінга у воєнні роки давала активність за пеніциліном не більше 10 од/мл. Сучасні штами мікроорганізмів дають 50 тис. од/мл того ж пеніциліну.

Цікаво, що в США в післявоєнні роки пошуками мікроорганізмів займалися не тільки вчені. Інститути давали оголошення в газети з проханням приносити їм різні зразки плісняви за винагороду. Розповідають, що в одному з міст цим займалася якась літня жінка на ім'я Мері. Вона по всьому місту шукала плісняву в гнилих фруктах, овочах, зіпсованому хлібі. Їй навіть дали прізвисько Запліснявіла Мері. Так от, саме вона знайшла родоначальника сучасних високоактивних штамів біосинтезу пеніциліну в запліснявілій гнилій дині. Цей мікроорганізм був названий *Penicillium chrysogenum*.

За оцінками ВООЗ, щороку вчені виявляють від 100 до 200 нових антибіотиків, насамперед у рамках загальних дослідницьких програм з пошуку серед тисячі різних мікроорганізмів таких, які б синтезували унікальні антибіотики. Отримання, лабораторні та клінічні випробування

нових лікарських засобів обходяться дорого, тому до застосування доходять тільки ті з них, які мають велику терапевтичну цінність і представляють економічний інтерес. Це всього лише 1-2% від усіх виявлених антибіотиків.

Зазвичай антибіотик діє не на всі мікроорганізми поспіль, та це й небажано: адже поряд з хвороботворними будуть знищуватися корисні мікроби, які завжди є в людському організмі. Тому повинен бути набір різних антибіотиків, придатних для лікування різних хвороб.

Але є й інша сторона: хвороботворні мікроорганізми поступово «звикають» до дії антибіотиків. Виникають види, які викликають захворювання, але вони нечутливі до «старого» антибіотика. Таке звикання відбувається не швидко, а протягом 10-15 років. Але раз це все-таки відбувається, ученим необхідно шукати всі нові і нові антибіотики і продукувати їх мікроорганізмами.

Утворення антибіотиків - це спадково закріплена особливість метаболізму мікроорганізмів, яка проявляється в тому, що кожен вид (або навіть штам) здатний продукувати один або кілька суворо специфічних для нього антибіотичних речовин, що є результатом еволюції даного мікроорганізму.

Специфічність дії антибіотиків пояснюється:

- Їх високою біологічною активністю щодо чутливих до них організмів, тобто здатністю проявляти ефект навіть у дуже низьких концентраціях;
- Вибірковістю дії, тобто здатністю конкретного антибіотика проявляти свою дію лише у відношенні певних організмів або груп організмів, не надаючи помітного ефекту на інші форми живих істот.

Величину біологічної активності антибіотиків виражають в умовних одиницях, які у 1 мл (од/мл) або в 1 мг (од/мг) препарату. За одиницю антибіотичної активності прийнято мінімальну кількість антибіотика, здатну придушити розвиток чи затримати ріст певної кількості клітин стандартного штаму тест-мікроба в одиниці об'єму живильного середовища. Так, за одиницю активності пеніциліну прийнято мінімальну кількість препарату,

здатну затримувати ріст золотистого стафілокока (штам 209) в 50 мл живильного бульйону; для стрептоміцину одиниця активності - мінімальна кількість антибіотика, що затримує ріст *E. coli* в 1 мл поживного бульйону.

Синтез мікроорганізмами антибіотиків - одна з форм прояву антагонізму, який пов'язаний з певним характером обміну речовин, що виникли і закріпилися в ході еволюції. Впливаючи на сторонню мікробну клітину, ця сполука викликає порушення її розвитку. Антибіотики здатні пригнічувати синтез оболонки бактеріальної клітини в період розмноження, змінювати проникність цитоплазматичної мембрани або інгібувати реакції обміну речовин.

Класифікація антибіотиків може бути здійснена:

- За принципом їх біологічного походження (краща для біологів, вивчаючих організми-продуценти антибіотичних речовин);
- За хімічною будовою (зручна для хіміків, що займаються вивченням будови молекул антибіотиків і шляхів їх синтезу);
- За типом і механізмом біологічної дії (прийнята в медичній практиці).

У цьому випадку тип дії антибіотиків буває «цидними» (бактерицидна, фунгіцидна, вірицидна, протозоацидна), де розуміють необоротне порушення життєдіяльності (загибель) інфекційного агента, і «статичним» (бактеріостатична, фунгістатична, віростатична, протозоостатична), де припиняється або призупиняється розмноження збудника. Така градація має основне практичне значення при лікуванні важких інфекцій, особливо у пацієнтів з порушеннями імунітету, коли обов'язкове призначення «цидних» препаратів.

Залежно від механізму біологічної дії, антибіотики поділяють на:

- Специфічні інгібітори біосинтезу клітинної стінки (пеніциліни, цефалоспорини, цефаміцини та ін.);
- Препарати, що порушують молекулярну організацію і функції клітинних мембран (поліміксини, полієни);
- Препарати, що пригнічують синтез білка на рівні рибосом (макроліди,

тетрациклін, левоміцетин, фузидин);

- Інгібітори синтезу РНК на рівні РНК-полімерази та інгібітори, що діють на метаболізм фолієвої кислоти (рифампіцин);

- Інгібітори синтезу РНК на рівні ДНК-матриці (Актіноміцини та ін.);

- Інгібітори синтезу ДНК на рівні ДНК-матриці (антрацикліни, мітоміцин С, нітрофурани, налідіксова кислота).

При виділеному збуднику призначають антибіотики з максимально вузьким спектром активності, так як «надлишкова» широта спектра не дає переваг і небезпечна з точки зору придушення нормальної мікрофлори.

В даний час встановлена повна хімічна структура тільки для третини антибіотиків, продукованих мікроорганізмами, а хімічним шляхом може бути отримана лише половина з них. У зв'язку із підвищеною складністю виділення ефективних антибіотиків і поширенням стійкості до найбільш широко використовуваних сполук у великій кількості патогенних бактерій існує потреба в нових сполуках. Для цього дослідники перейшли від пошуку нових антибіотиків до модифікації структури вже наявних. Вони прагнуть підвищити ефективність антибіотиків, знайти захист від інактивації ферментами стійких бактерій та покращити фармакологічні властивості препаратів. У деяких випадках природні мікробні антибіотичні продукти хімічним або ензиматичними шляхами можуть бути перетворені у так звані напівсинтетичні антибіотики, що володіють більш високими терапевтичними властивостями.

Сучасне промислове отримання антибіотиків - це складна багатоступенева біотехнологічна схема, що складається з ряду послідовних стадій (рис. 21):

1) стадія біосинтезу (утворення) антибіотика - основна біологічна стадія процесу отримання антибіотика. Необхідне створення оптимальних умов для розвитку продуцента і максимально можливого біосинтезу антибіотика;

2) стадія попередньої обробки культуральної рідини, клітин (міцелію)

мікроорганізму і фільтрації (відділення культуральної рідини від біомаси продуцента). Визначається складом середовища, характером росту продуцента, місцем накопичення біологічно активної сполуки (в культуральній рідині або внутрішньоклітинно);

3) стадія виділення і очищення антибіотика. В якості основних методів застосовують екстракцію, осадження, сорбцію на іонообмінних матеріалах, випарювання, сушку;

4) стадія отримання готової продукції, виготовлення лікарських форм, розфасовки.

Для максимального виходу антибіотика при культивуванні продуцента необхідний комплекс заходів, що включає підбір поживних середовищ, високопродуктивних штамів мікроорганізмів і режимів їх культивування.

Мікроорганізми, що виробляють різні метаболіти, в тому числі і антибіотики, спочатку проходять стадію швидкого росту (тропофазу), під час якої синтез цих речовин незначний. У міру уповільнення росту через виснаження одного або декількох необхідних поживних речовин в культуральному середовищі мікроорганізм переходять в ідіофазу.

Ці особливості культурального росту слід враховувати у виробничому процесі. Наприклад, у випадку антибіотиків більшість мікроорганізмів у стадії тропофази чутливі до власних антибіотиків, а за час ідіофази стають стійкими до них. Щоб уберегти мікроорганізми, які продукують антибіотики, від самознищення, важливо швидко досягти ідіофази, а потім культивувати мікроорганізми в цій фазі. Це досягається шляхом варіювання режимів культивування та складу живильного середовища на стадіях швидкого і повільного росту.

Нові антибіотики з унікальними властивостями і специфічністю можна отримати шляхом генно-інженерних маніпуляцій з генами, які беруть участь у біосинтезі вже відомих антибіотиків. Великий ефект тут може дати технологія рекомбінантних ДНК: з її допомогою можливо створювати нові антибіотики з унікальною структурою, які надають більш сильний вплив на

певні мікроорганізми і володіють мінімальними побічними ефектами. Генно-інженерні підходи можна використовувати для збільшення виходу антибіотиків і зниження вартості їх виробництва.

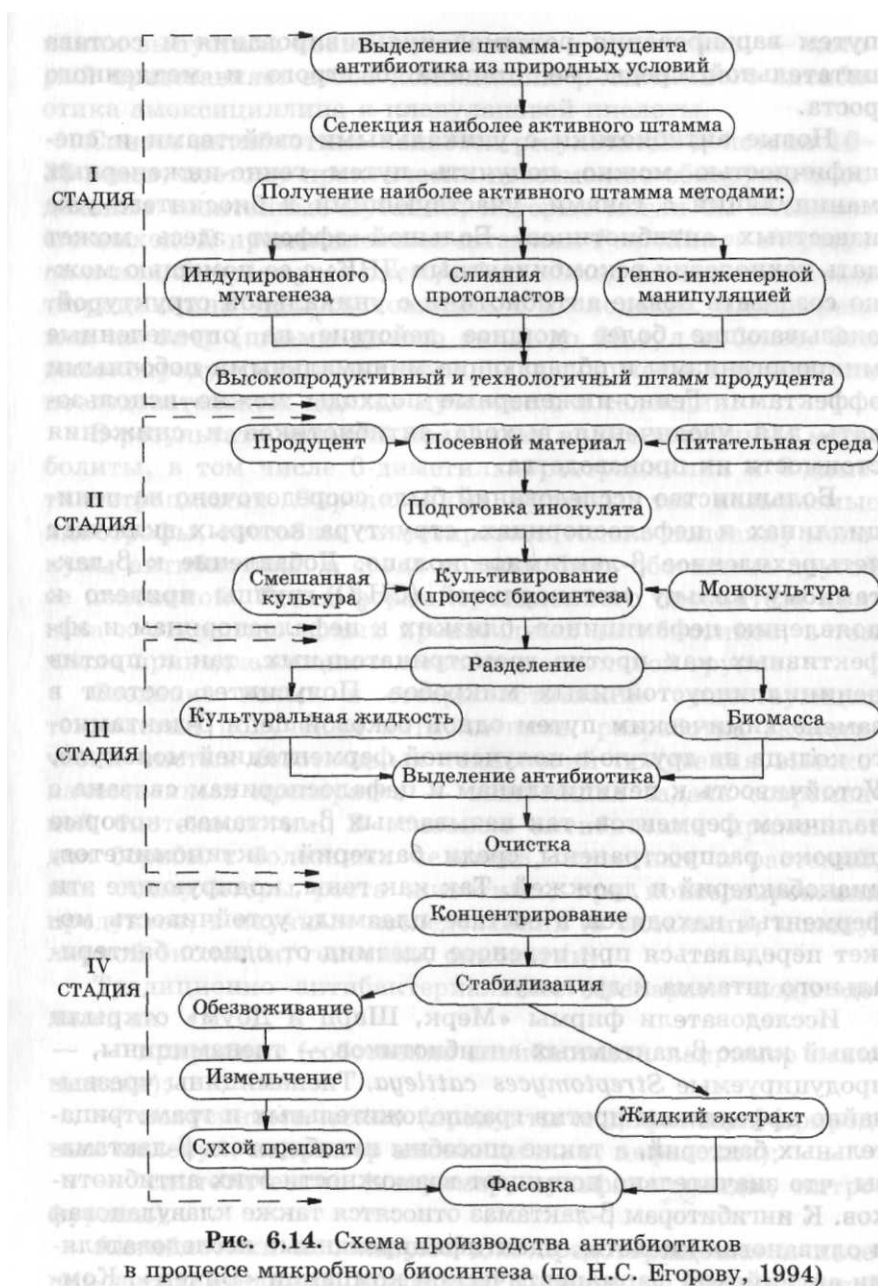


Рис. 21. Схема виробництва антибіотиків в процесі мікробного синтезу

Створення нових і вдосконалення існуючих технологій отримання антибіотиків, розробка екологічно чистих безвідходних технологій отримання високоякісних препаратів - найважливіше завдання сучасної

біотехнології. В основному антибіотики застосовують для боротьби з хворобами людини, тварин і рослин, як стимулятори росту тварин, при консервуванні продуктів, у наукових дослідженнях (у біохімії, молекулярній біології, генетиці, онкології).

Традиційно антибактеріальні препарати поділяють на:

- Природні (власне антибіотики, наприклад пеніцилін);
- Напівсинтетичні (продукти модифікації природних молекул, наприклад амоксицилін, цефазолін);
- Синтетичні (наприклад, сульфаніламід, нітрофуран).

Антибіотики використовують для запобігання та лікування запальних процесів, викликаних бактеріальною мікрофлорою. Вони вибірково пригнічують життєдіяльність мікроорганізмів. Під виборчою дією розуміють активність тільки відносно певних родів і видів мікроорганізмів при збереженні життєздатності клітин господаря.

Антибіотики являють собою саму багаточисельну групу лікарських засобів. Щорічно в усьому світі виробляється 100 тис. т антибіотиків на суму приблизно 5 млрд доларів, причому більше 100 млрд доларів припадає на частку антибіотиків, що додаються в корм худобі в якості добавок або прискорювачів росту.

Всі антибіотики, незважаючи на відмінності хімічної структури і механізму дії, об'єднує ряд **унікальних якостей**.

По-перше, унікальність антибіотиків полягає в тому, що, на відміну від більшості інших лікарських засобів, їх мета-рецептор знаходиться не в тканинах людини, а в клітині мікроорганізму.

По-друге, активність антибіотиків не є постійною, а знижується з часом, що зумовлено формуванням лікарської стійкості (резистентності). Антибіотикорезистентність - неминуче біологічне явище, і запобігти її практично неможливо.

По-третє, антибіотикорезистентні мікроорганізми становлять небезпеку не тільки для пацієнта, у якого вони були виділені, але й для багатьох інших

людей, навіть розділених часом і простором. Тому боротьба з антибіотикорезистентністю в даний час набула глобальних масштабів.

Протягом багатьох років антибіотики використовують як стимулятори росту сільськогосподарських тварин і птахів, як засіб боротьби із захворюваннями рослин і по сторонньої мікрофлори в ряді бродильних виробництв, як консерванти харчових продуктів. Механізм стимулюючої дії антибіотиків також не до кінця з'ясований. Вважають, що стимулюючий ефект низьких концентрацій антибіотиків на організм тварини пов'язаний з двома факторами:

- Впливом на мікрофлору кишечника;
- Безпосереднім впливом на організм тварини. У першому випадку антибіотики знижують кількість шкідливих і збільшують кількість корисних для організму мікроорганізмів, у другому - знижують рН вмісту кишечника, зменшують поверхневий натяг клітин організму, що сприяє прискоренню їх поділу. Крім того, антибіотики збільшують кількість ростових гормонів, покращують пристосованість організму до несприятливих умов.

Кормові антибіотики застосовують у вигляді неочищених препаратів, що представляють собою висушену масу продуцента, що містить, крім антибіотика, амінокислоти, ферменти, вітаміни групи В та інші біологічно активні речовини. Всі вироблені кормові антибіотики:

- Не використовуються в терапевтичних цілях і не викликають перехресної резистентності бактерій до антибіотиків, що застосовуються в медицині;
- Практично не всмоктуються в кров з травного тракту;
- Не змінюють своєї структури в організмі;
- Не володіють антигенною природою, що сприяє виникненню алергії.

В даний час виробляється декілька видів кормових антибіотиків: препарати на основі хлортетрацікліну (біовіт, кормовий біоміцин), бацитрацин, гризін, гігроміцин Б та ін. З цих препаратів тільки бацитрацин являє собою висушену культуральну рідину, отриману в результаті

глибинного вирощування *Bacillus licheniformis*. Решта антибіотиків є продуктами життєдіяльності різних видів *Actinomyces*.

Антибіотики використовують і як засіб боротьби з різними фітопатогенами. Дія антибіотика зводиться до уповільнення росту і загибелі фітопатогенних мікроорганізмів, що містяться в насінні і вегетативних органах рослин. До таких антибіотиків відносяться фітобактеріоміцин, трихотецин, поліміцін.

Застосування антибіотиків в харчовій промисловості дозволяє знизити тривалість термообробки продуктів харчування при їх консервуванні. Найбільш ефективним визнаний низин, який практично не токсичний для людини і дозволяє вдвічі знизити час термообробки.

9. Моноклональні антитіла

Моноклональні антитіла (МА) - це антитіла, що виробляються імунними клітинами, що належать до одного клітинного клону, тобто утворилися з однієї клітини-попередниці. Вони можуть бути вироблені практично на будь-яку речовину. Їх можна далі використовувати для знаходження цієї речовини або очищення.

Моноклональні антитіла широко застосовують в біохімії, молекулярній біології та медицині. Якщо їх використовують як ліки, то назва останнього закінчується на -Mab (від англ. Monoclonal antibody).

Вперше методика отримання моноклональних антитіл за допомогою гібридомної технології була опублікована в 1975р. Ж. Келером і С. Мілінтейном, які в 1984р. отримали за її створення Нобелівську премію. Саме вони, попередньо ввівши в організм антиген і викликавши таким чином імунну відповідь, витягли лімфоїдну клітину, що продукує відповідні антитіла, і об'єднали її з клітиною пухлини (мієломи) (рис. 22). В результаті отримали клітинний гібрид, який безперервно ділиться (Гібридома), здатний синтезувати антитіла із заданою специфічністю. Гібридома успадкувала від

нормальної клітини здатність до синтезу антитіл, а від пухлинної - безсмерття і здатність до необмеженого і неконтрольованого росту.

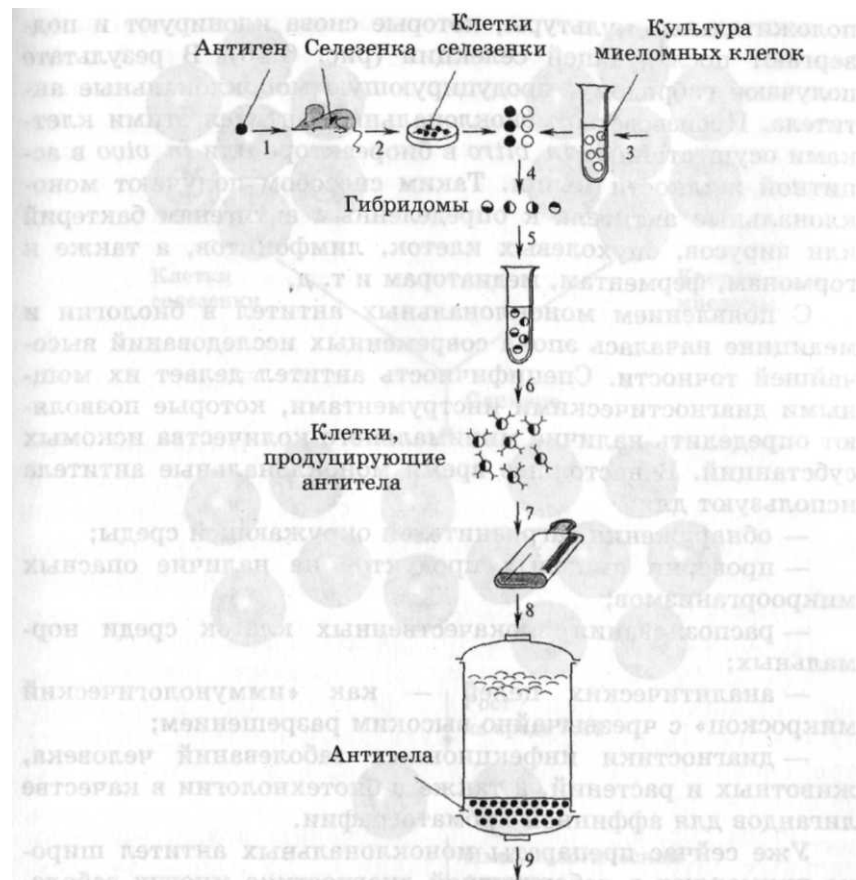


Рис. 6.15. Схема получения моноклональных антител

(по В.П. Комову и В.Н. Шведовой, 2004):

- 1 — иммунизация;
- 2 — выделение клеток селезенки;
- 3 — получение культуры миеломных клеток;
- 4 — гибридизация (слияние);
- 5 — селекция гибридом;
- 6 — отбор положительных клонов;
- 7 — культивирование;
- 8 — производство моноклональных тел *in vitro* в биореакторе;
- 9 — получение моноклональных антител

Рис. 22. Схема отримання моноклоальних антитіл

Насправді продукувати антитіла здатні лише поодинокі гібридомні клітини. Їх необхідно виділяти і розмножувати клонуванням. Після тестування клонів на здатність утворювати антитіла відбирають позитивні культури, які знову клонують і піддіють подальшої селекції (рис. 23).

В результаті отримують гібриди, які продукують моноклональні антитіла. Виробництво моноклональних антитіл цими клітинами здійснюють *in vitro* в біореакторі або *in vivo* в асцитній рідині миші. Таким способом одержують моноклональні антитіла до певних антигенів бактерій або вірусів,

пухлинних клітин, лімфоцитів, а також до гормонів, ферментів, медіаторів тощо.

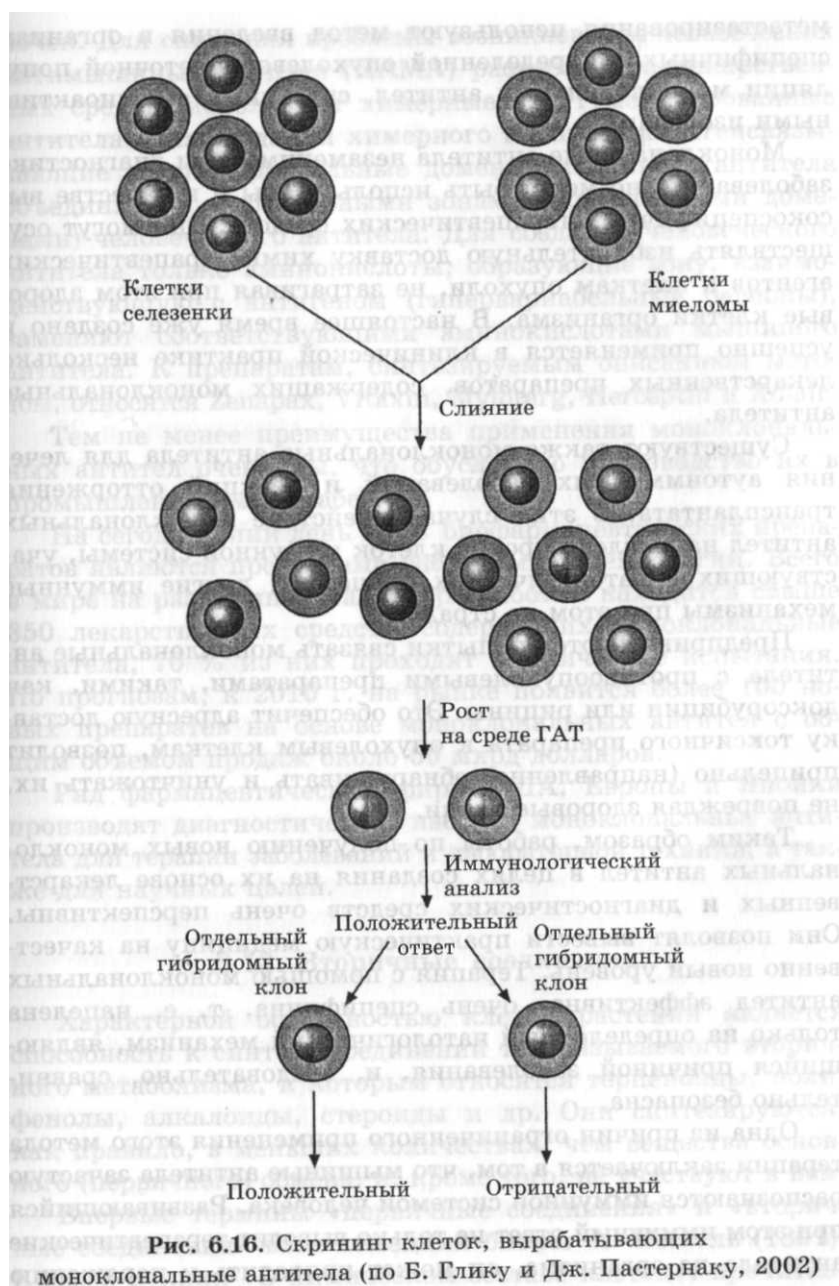


Рис. 23. Скринінг клітин, що виробляють моноклональні антитіла

З появою моноклональних антитіл в біології та медицині почалася епоха сучасних досліджень високої точності. Специфічність антитіл робить їх міцним діагностичним інструментом, який дозволяє визначити наявність мінімальної кількості субстанцій. В даний час моноклональні антитіла використовують для:

- Виявлення забруднювачів навколишнього середовища;
- Перевірки харчових продуктів на наявність небезпечних мікроорганізмів;
- Розпізнавання злоякісних клітин серед нормальних;
- Аналітичних цілей - як «імунологічний мікроскоп» з надзвичайно високою роздільною здатністю;
- Діагностики інфекційних захворювань людини, тварин і рослин, а також в біотехнології в якості лігандів для афінної хроматографії.

Вже зараз препарати моноклональних антитіл широко застосовують в лабораторній діагностиці багатьох захворювань як діагностичні тест-системи.

Сучасна діагностика злоякісних новоутворень крові немислима без моноклональних антитіл. Їх використовують для визначення імунного статусу пацієнтів, діагностики та контролю ефективності лікування онкологічних захворювань, діагностики бактеріальних і вірусних інфекцій (гепатити А і С, простий герпес, кліщовий енцефаліт, цитомегаловірусна інфекція, ВІЛ), для визначення біологічно активних речовин - білків крові, гормонів, ростових факторів, клітинних рецепторів, медіаторів запалення та ін. Для дослідження локалізації злоякісного новоутворення та ступеня метастазування використовують метод введення в організм специфічних до певної пухлинної клітинної популяції моноклональних антитіл, пов'язаних з радіоактивними ізотопами.

Моноклональні антитіла незамінні при діагностиці захворювань, але можуть бути використані і в якості високоспецифічних терапевтичних засобів. Вони можуть забезпечувати виборчу доставку хіміотерапевтичних агентів до клітин пухлини, не зачіпаючи при цьому здорові клітини організму. В даний час вже створено і успішно застосовується в клінічній практиці кілька лікарських препаратів, що містять моноклональні антитіла.

Існують також моноклональні антитіла для лікування аутоімунних захворювань і реакцій відторження трансплантата. У цих випадках дія

моноклональних антитіл спрямована проти клітин імунної системи, що приймають участь в патологічних процесах; інші імунні механізми при цьому не страждають.

Робляться спроби пов'язати моноклональні антитіла з протипухлинними препаратами, такими, як доксорубіцин або рицини. Це забезпечить адресну доставку токсичного препарату до пухлинних клітин, дозволить прицільно (направлено) виявляти і знищувати їх, не пошкоджуючи здорові тканини.

Таким чином, роботи по отриманню нових моноклональних антитіл з метою створення на їх основі лікарських і діагностичних засобів дуже перспективні. Вони дозволять вивести практичну медицину на якісно новий рівень. Терапія за допомогою моноклональних антитіл ефективна, дуже специфічна, тобто націлена тільки на певний патологічний механізм, який є причиною захворювання, і, отже, порівняно безпечна.

Одна з причин обмеженого застосування цього методу терапії полягає в тому, що мишачі антитіла часто розпізнаються імунною системою людини. Розвивається при цьому імунна відповідь, яка не тільки виводить терапевтичні антитіла з організму, а й може призводити до ураження нирок. Для зниження проблеми виникнення людських антимишинних антитіл (НАМА) розробники лікарських засобів використовують химерні або гуманізовані антитіла. Для створення химерного антитіла антигенів'язуючі зони (варіабельні домени) мишачого антитіла об'єднують з ефекторними зонами (константними доменами) людського антитіла. Для створення людського антитіла тільки амінокислоти, що утворюють зону, яка взаємодіє з антигеном (гіперваріабельні регіони), замінюють відповідними амінокислотами мишачого антитіла. До препаратів, що відносяться до гуманізованих антитіл належать: кемпас (проти лейкозу), амевів (трансплантація нирок, псоріаз), сімулект, даклізумаб (профілактика відторження трансплантанта), авастін (рак прямої кишки, рак легень), мілотарг (гострий мієлолейкоз), завалін (лімфома), ремікейд (ревматоїдний

артрит, аутоімунні захворювання), кленоліксімаб (ревматоїдний артрит), ксолар (атопічний риніт), вектібікс (рак прямої кишки), герцептін (рак молочної залози), ербітукс (рак прямої кишки, голови та шиї), ранібізумаб (пухлини, дегенерація сітківки).

Проте переваги застосування моноклональних антитіл очевидні, що зумовило виробництво їх в промисловому масштабі.

На сьогоднішній день 20% біофармацевтичних препаратів є продуктами гібридомної технології. Всього в світі на різних стадіях розробки знаходиться понад 350 лікарських засобів, що містять моноклональні антитіла, 70% з них проходять клінічні випробування. За прогнозами, до 2010р. на ринку з'явиться більше 100 нових препаратів на основі моноклональних антитіл із загальним обсягом продажів близько 50 млрд доларів.

Ряд фармацевтичних фірм США, Європи і Японії виробляють діагностичні набори, моноклональні антитіла для терапії захворювань та лабораторної техніки, а також для наукових цілей.

10. Вторинні сполуки

Характерною особливістю клітин рослин є здатність до синтезу сполук так званого вторинного метаболізму, до яких відносяться терпеноїди, поліфеноли, алкалоїди, стероїди тощо. Вони синтезуються, як правило, в менших кількостях, ніж речовини основного (первинного) обміну, і, крім того, не беруть участі в ньому.

Вперше терміни «первинні сполуки» і «вторинні сполуки» ввів німецький біолог А. Коссель (1891). У своїй лекції «Про хімічний склад клітин», прочитаною для Берлінського товариства фізіологів, він говорив: «Пропоную називати сполуки, що мають важливість для кожної клітини, первинними, а сполуки, що не присутні в будь-якій рослинній клітині, - вторинними».

Довгий час вважалося, що вторинні метаболіти відрізняються від первинних тим, що вони:

- Поширені в обмеженому числі видів рослин;
- Є «кінцевими» продуктами первинного обміну.

В даний час встановлена важлива роль вторинних метаболітів в житті рослин. Вони виявлені у 20-30 тис. їх видів, тобто у 10-15% усієї флори Землі. Встановлена структура вже близько 100 тис. індивідуальних речовин. З'ясована участь 15-25% генів рослинних організмів в їх вторинному метаболізмі. Все це свідчить про те, що вважати ці сполуки синтезованими «випадково» - неправильно.

Вчені-біологи досить довго не приділяли належної уваги вторинним сполукам. Набагато більше знали про них провізори, фармацевти і криміналісти, оскільки лікарські й отруйні властивості рослин найчастіше обумовлені цими сполуками.

Вторинні сполуки надають також смак і аромат рослинам. Від їх присутності залежать забарвлення квіток і різноманіття «забарвлення» оточуючого нас світу. Багато з вторинних сполук використовуються як лікарські препарати, смакові та ароматичні добавки для харчової та парфумерної промисловості.

Все це свідчить про важливе народногосподарське значення вторинних сполук, вони можуть знайти широке застосування в біотехнологічному виробництві. Розглянемо основні класи вторинних сполук, які синтезуються в клітинах вищих рослин.

Терпени (стара назва - ізопреноїди) - одні з найбільш поширених в рослинах вторинних речовини. Свою назву отримали від німецького слова *terpen* (скипидар), що означає суміш цих речовин.

До теперішнього часу відомо більше 30 тис. сполук даної групи вторинних метаболітів. Всі терпени підрозділяють за єдиним структурною ознакою - числу ізопренових одиниць, що входять до складу їх молекули.

Більшість терпенів має назву, що відображає те рослинне джерело,

звідки вони були виділені вперше. Так, наприклад, ментол вперше отримали з рослин м'яти (*Menta*), бетулапrenoли - з листя берези (*Betula*), авенастерін - із зерен вівса (*Avena*).

Функції, терпенів в клітинах рослин, надзвичайно різноманітні. Так, важливу фізіологічну активність проявляють такі їх представники, як цитокиніни, гібереліни і абсцизова кислота. Стероли, локалізовані в клітинних мембранах рослин, виконують таку ж функцію, як холестерол в мембранах тваринних клітин. Існує припущення, що стероли стабілізують мембрани і контролюють їх проникність. Каротиноїди захищають клітини від фотодинамічного пошкодження і, крім того, беруть участь у поглинанні світла при фотосинтезі. Змішані терпеноїди також грають ключову роль в обміні речовин у рослин: хлорофіл, пластохінон, убіхінон, поліпренілпірофосфати.

Фенольні сполуки, або поліфеноли, є другими за поширеністю в рослинному світі представниками вторинних сполук. Ці речовини, так само як і терпени, виявлені не тільки у всіх рослинах, але навіть у кожній рослинній клітині. В даний час число відомих фенольних структур перевищує дев'ять тисяч.

В особливі групи виділяють димерні і полімерні фенольні сполуки. Це дубильні речовини (таніни) і лігнін. Термін «таніни» був вперше використаний для опису речовин, які перетворювали сирі тваринні шкури в шкіру в процесі дублення (tannin). Зв'язуючись з білками колагену шкіри тварин, таніни підвищують стійкість одержуваної шкіри до спеки, води та мікроорганізмам.

Найбільш поширеним полімером фенольних сполук в рослинах є лігнін.

Фенольні сполуки відіграють важливу роль в самих різних фізіологічних процесах - фотосинтезі, диханні, росту і захисних реакціях рослинного організму. Крім того, вони виконують механічні та структурні функції (лігнін), а також є аттрактантами для комах-запилювачів і тварин -

поширювачів насіння. Багато представників фенольних сполук обумовлюють смакові якості рослин. Особливо часто це відзначається для флавоноїдів. Наприклад, флавоноїд нарінгенін надає гіркий смак шкірці грейпфрута, тоді як інший флавоноїд - гесперидин, виявлений у шкірі апельсина і мандарина, таких властивостей не виявляв. У багатьох плодах (яблука, груші, вишня, айва, персики, абрикоси) і ягодах (ожина, суниця, брусниця, смородина, малина, виноград) містяться катехіни. Катехіни широко застосовують у виробництві какао, виноробстві і особливо в чайній промисловості. Це пов'язано з тим, що продукти окислення катехінів володіють характерним забарвленням і приємним слабоз'яжучим смаком. Крім того, вони проявляють вітамінну активність. Часто в рослинах зустрічається рамноглюкозид кверцетину - рутин, який використовується в медицині як капіляророзміцнюючий засіб.

У 200 природних флавоноїдних речовин виявлено 40 видів біологічної дії. В основному вона пов'язана з їх антиоксидантною та мембрано стабілізуючою дією, а також впливом на ферментні системи. Завдяки такій різноманітній активності флавоноїдовмісні рослини служать сировиною для виробництва препаратів жовчогінної, противовиразкової, капіляророзміцнюючої, гіпотомічної дії. Флавоноїди застосовують як антимулагени, протипухлинні і антиалергічні препарати. Так, препарат *Ревенол*, що одержується з кори приморської сосни, виноградних зерен і куркуми, має антиоксидантну активність, в 50 разів перевищує таку у а-токоферола. Розроблений на основі екстракту виноградних кісточок французький препарат *ендотелон* використовують для лікування онкологічних захворювань.

Алкалоїди являють собою велику групу азотвмісних вторинних речовин, знайдених у 20% видів судинних рослин.

Термін «алкалоїд» увів в 1819 році німецький фармаколог В. Майсснер. Назва походить від арабського слова *alcali* - луг і грецького *eidos* - подібний.

Згідно хімічної класифікації, алкалоїди - це сполуки, що містять один або декілька атомів азоту, що і надає їм лужні властивості. Біохімічна класифікація алкалоїдів заснована на їх метаболізмі.

Різні органи і тканини рослини можуть містити різні алкалоїди. Зазвичай їх концентрація невелика і складає десяті й соті частки відсотка. При вмісті алкалоїдів близько 1-3% рослина вважається багатою цими сполуками. Тільки деякі рослини, наприклад культивуємі форми хінного дерева, можуть накопичувати до 15-20% алкалоїдів.

Алкалоїди можуть надавати токсичну дію на людину. Проте їх малі дози використовують як ефективні фармакологічні препарати (морфін, кодеїн, ефедрин, атропін). Деякі алкалоїди (нікотин, кофеїн) застосовують як стимулятори або седативні засоби.

Ціаногенні глікозиди і глюкозинолати також є азотвмісними речовинами. Їх іноді називають прототоксинами або фітоантисипінами. Вони беруть безпосередню участь у захисті рослин від травоядних тварин. При гідролізі ціаногенних глікозидів специфічною глікозидази виділяється синильна кислота.

Ціаногенні глікозиди широко поширені в рослинному царстві і часто зустрічаються у представників бобових, розоцвітих і деяких злаків. Їх багато також в крохмалистих бульбах маніока *Manihot esculenta*. Це важливий харчовий продукт в ряді тропічних країн. Клубні і борошно маніока - звичайна їжа для аборигенів, які навчилися в процесі приготування позбавлятися від токсичних сполук.

Друга важлива група рослинних прототоксинів - глюкозинолати - вперше була виявлена у рослин родини хрестоцвітих *Cruciferae*. У рослині глюкозинолати, так само як і ціаногенні глікозиди, просторово відокремлені від їх ферментів. При пошкодженні рослинних тканин відбувається змішування глюкозинолатів з відповідними ферментами і перетворення їх в летючі токсичні речовини з гірчичним запахом - ізотіоціанати і нітрили. Утворені речовини функціонують як токсини і репеленти для травоядних

тварин.

Таким чином, в рослинах синтезуються різні сполуки вторинного метаболізму. Їх групи знаходяться в рослині в динамічному стані, а кількість змінюється від органу до органу в ході онтогенезу. Тому, з одного боку, при проведенні скринінгу бажано зібрати якомога більше зразків різних частин рослин на різних фазах розвитку, а з іншого - при інтерпретації отриманих даних необхідно порівнювати дані про вміст досліджуваної сполуки в східних частинах рослин, відібраних на одній і тій же фазі розвитку.

Отримання фізіологічно активних речовин методами клітинної біотехнології має ряд переваг, так як:

- Процес отримання біомаси клітин автоматизований і не залежить від сезону, кліматичних і ґрунтових умов;
- Можна оптимізувати умови культивування суспензії клітин, що дозволяють синтезувати в необхідній кількості потрібні речовини.

Використання клітинних культур рослин для отримання вторинних метаболітів важливо і в тих випадках, коли:

- Неможливо вирощувати рослини в природі;
- Є труднощі в його зборі;
- Кількість вторинних сполук у культурах *in vitro* висока або висока його ціна на світовому ринку;
- Можливий добрий ріст клітинних культур рослин на порівняно простих за складом поживних середовищах;
- Вторинні сполуки виділяються клітинами у живильне середовище;
- Можна отримати високопродуктивні рослинні культури.

Основною умовою культивування ізольованих клітин і тканин в умовах *in vitro* є той факт, що вони, так само як інтактні рослини, синтезують вторинні метаболіти.

Перші дані, що стосуються синтезу вторинних сполук в клітинних культурах рослин, з'явилися в літературі в 1940р., коли Дж. Боннер повідомив про утворення каучуку клітинами гваюлу. Першими лікарськими

рослинами, дослідженими в культурі тканини, були барвінок рожевий і блекота чорна. Дослідження В. Телле і Ф. Готра довели здатність культури тканини блекоти до синтезу алкалоїдів. Пізніше з'явилися й інші повідомлення про отримання культур тканин різних лікарських рослин, здатних синтезувати багато унікальних сполук вторинного метаболізму. Це культури тканини табаку, які накопичують великі кількості нікотину (0,7%), Діоскорейя - диосгеніна (1,6%) та ін.

У відділі біології клітини та біотехнології Інституту фізіології рослин РАН зібрана велика колекція використовуваних в промисловості клітинних культур рослин, що синтезують вторинні метаболіти. Це культури женьшеню далекосхідного (джерело алкалоїду), Діоскора дельтоподібна (джерело стероїдних глікозидів) та ін. В останні роки велика увага в світі приділяється культивуванню клітин тису ягідного, який синтезує унікальну речовину терпеноїдної природи - *таксол*, який є протираковим препаратом.

Використання культур *in vitro* для отримання вторинних сполук пов'язане з їх високою продуктивністю. Експериментально доведено, що приріст клітинної біомаси в умовах *in vitro* та *in vivo* проходить з різною швидкістю. Наприклад, за рік приріст кореня женьшеню в тайзі становить 1 г, на плантації - 3 г, а при вирощуванні клітин кореневого походження на агарі (*in vitro*) можна отримувати 0,4 г сухої маси на літр середовища за добу. Біомаса клітин женьшеню в суспензії при вирощуванні в 50-літровому ферментері збільшується до 2 г в літрі середовища за добу, що в тисячу разів більше, ніж при вирощуванні на плантації. Враховуючи високу вартість женьшеню (кілограмм плантаційного кореня коштує 100-150 доларів), ціна дикорослого кореня може доходити до декількох тисяч доларів. Тому з економічної точки зору біотехнологічний спосіб отримання біомаси культури клітин женьшеню вельми перспективний.

Речовини вторинного синтезу, як правило, отримують із суспензійної культури, яку вирощують в біореакторах або ферментерах. Важливою характеристикою клітин популяції є її стабільність у відношенні синтезу

метаболітів. Вона може зберігатися протягом всього часу існування популяції, поступово знижуватися за рахунок повільного збільшення числа клітин з низьким синтезом метаболітів або бути нестабільною в разі швидкої втрати здатності клітин синтезувати вторинні метаболіти.

Технологія вирощування культур клітин в біореакторах являє собою масштабний процес. Фахівці німецької фірми DIVERSA (нині - FYTON) здійснили вирощування ряду культур в біореакторах об'ємом до 75 тис. л. У Росії на Омутнинському біохімічному заводі в біореакторах об'ємом до 2,5 м³ в промисловому масштабі отримали біомасу женьшеню. У ТОВ «Гембр» (м Ярославль) здійснено проточне культивування клітин женьшеню в промислових біореакторах об'ємом 7,5 м³. В Інституті фізіології рослин РАН оптимізовані режими культивування цілого ряду різних культур клітин вищих рослин (женьшеню справжнього, полісціас та інших аралієвих, діоскорею дельтоподібну) в біореакторах об'ємом 630 л.

Російські вчені розробили технологію, життєво важливу для десятків тисяч пацієнтів. Вона дозволяє отримати практично будь-яку необхідну кількість *паклітаксела* - основи одного з найбільш ефективних, але і самих дорогих препаратів для лікування деяких видів онкологічних захворювань, у тому числі раку легень, яєчників і молочної залози. Субстанція, отримана за новою технологією, за структурою нічим не відрізняється від звичайної, але коштувати буде, на думку авторів, істотно дешевше. Справа в тому, що висока ціна паклітакселу - це не примха фармацевтів, а наслідок величезних витрат на його виробництво. У природі він є тільки в корі дуже рідкісного і дуже повільно зростаючого дерева - тихоокеанського тиса. Щоб виділити кількість, необхідну для лікування тільки одного пацієнта, потрібно зібрати кору з 10- 12 дорослих дерев. Зрозуміло, що такі ліки дешевими просто не можуть бути. Зрозуміло, що, виявивши дивовижні властивості паклітакселу, вчені шукали способи більш дешевого його отримання. Були розроблені і методи хімічного синтезу, і спосіб отримання напівпродукту з хвої тиса з подальшою його переробкою в паклітаксел. Але виявилось, що синтетичний

аналог суттєво дорожчий речовини, виділеного з природної сировини.

Метод же, який пропонують використовувати спеціалісти ВАТ «Біохіммаш», відноситься до області біотехнології. Ці цінні ліки вчені навчилися виділяти з природної сировини. Але не з дерев, а з культури клітин тису, вирощених в ферментері і здатних ефективніше інших виробляти необхідну субстанцію.

Продуктивність клітинних культур вищих рослин відносно синтезу вторинних речовин залежить також від складу живильного середовища, що використовується для їх вирощування.

Обов'язковими компонентами поживних середовищ є вуглеводи. Клітинні культури можуть рости на різних вуглеводах (випробувано більше 30 різних сполук), але в більшості випадків їх кращий ріст відзначається при додаванні в живильне середовище двох цукрів - глюкози або сахарози. У той же час високий рівень синтезу властивий культурам, зростаючим на сахарозе, а на поживних середовищах з глюкозою синтез часто сильно ослаблений. Причини цього явища поки не зрозумілі. Підвищенні концентрації сахарози (5%) в середовищі ефективні для росту культури Діоскореї, а знижені (1,5%) - для продуктивності діосгеніна.

Мінеральний склад поживних середовищ також має великий вплив на синтез вторинних сполук; при цьому найбільш важливо вміст фосфору, калію і різних форм азоту. Високі концентрації фосфору в більшості випадків призводять до поліпшення росту культури і ослабленню синтезу вторинних метаболітів. Це зазначено для синтезу нікотину в культурі клітин тютюну, антоціанів - в культивованих клітинах моркви, катехінів - в каллусах чаю. Накопичення вторинних речовин в культурах *in vitro* зазвичай починається після вичерпання фосфору з середовища.

Є дані про те, що підвищення концентрації фосфору в живильному середовищі збільшувало вміст алкалоїдів в культурі барвінку рожевого і антрахінонів.

Показано, що як для росту, так і для синтезу вторинних сполук

необхідні мінеральні форми азоту. При цьому органічні форми (пептон, дріжджовий екстракт та ін.) гальмують і ріст, і синтез. Дуже важливо відношення амонійного і нітратного азоту. Можна простежити певну тенденцію: підвищення частки нітратного азоту сприяє збільшенню синтезу вторинних речовин, зокрема диосгеніна, в культурі клітин Діоскорей.

Фітогормони як компоненти поживних середовищ привертають найбільшу увагу дослідників. Проте вплив гормонів на синтез вторинних сполук у культурі клітин неоднозначний і може змінюватися, залежно від класу вторинних сполук, фізіологічного стану культури, умов культивування та ін.

Найбільш інтенсивно вивчалися *ауксини і цитокініни*, оскільки вони є необхідними компонентами поживних середовищ. Є безліч прикладів, коли ауксини стимулювали або придушували синтез вторинних сполук. Ауксини стимулювали синтез антоціанів в культурах моркви і тополі, сапогенін - в трігонеллі; зменшували і виключали синтез антрахінонів і шиконіну у воробійнику, скополаміна - в гіосціамусе, хлорогенової кислоти - в тютюні.

Вивченню впливу попередників синтезу вторинних метаболітів на продуктивність клітинних культур присвячена значна кількість робіт. У більшості випадків додавання їх до живильного середовища не приводило до суттєвого збільшення продуктивності клітин. Напевно, концентрація попередників не є визначальним фактором для синтезу вторинних сполук у культурі.

Все це свідчить про те, що, використовуючи різні комбінації поживних середовищ, можна підвищити продуктивність клітинних культур вищих рослин і ефективність синтезу вторинних речовин.

Контрольні питання:

1. Що таке моноклональні антитіла і де вони застосовуються?
2. Перерахуйте переваги використання моноклональних антитіл, порівняно з поліклональними антитілами.

3. До яких сполук відносяться інтерферони і які їхні властивості?
4. Перерахуйте основні класи інтерферонів.
5. Яке дію виконують інтерферони на організм людини?
6. Розкажіть про способи отримання інтерферонів.
7. Перерахуйте біотехнологічні способи отримання вакцин.
8. Які речовини називають антибіотиками?
9. На чому заснована класифікація антибіотиків?
10. Розкажіть про біотехнології промислового отримання антибіотика.
11. Які сполуки відносяться до первинних і вторинних метаболітів?
12. Які сполуки відносять до вторинних метаболітів?
13. Розкажіть про терпіни, їх структуру та функції.
14. Перерахуйте основні класи фенольних сполук.
15. Які сполуки є алкалоїдами?
16. Перерахуйте основні групи алкалоїдів.
17. Розкажіть про ціаногенні глікозиди.
18. Які переваги при отриманні вторинних метаболітів мають клітинні культури у порівнянні з рослинами?
19. Які компоненти поживних середовищ сприяють підвищенню утворення вторинних метаболітів в клітинних культурах рослин?
20. Що відомо про дію попередників на синтез вторинних метаболітів?

ЛЕКЦІЯ № 6

ОСНОВНІ НАПРЯМКИ ПРОМИСЛОВОЇ БІОТЕХНОЛОГІЇ

Питання:

1. Біоенергетика
 2. Біотехнологія обробки стоків та контроль забрудненості води важкими металами
 3. Сільськогосподарська біотехнологія
 4. Біогеотехнологія
 5. Біоелектроніка
 6. Біотехнологія у медицині
 7. Біотехнологія у харчовій промисловості
 8. Біотехнологія молочних продуктів
-

1. Біоенергетика

Рослинний покрив Землі становить понад 1800 млрд. т сухої речовини, що енергетично еквівалентна відомим запасам енергії корисних копалин. Ліси складають близько 68% біомаси суші, трав'яні екосистеми - приблизно 16%, а оброблювані землі - лише 8%. Для сухої речовини найпростіший спосіб перетворення біомаси в енергію полягає в згоранні - воно забезпечує тепло, яке, в свою чергу, перетворюється в механічну або електричну енергію. Що ж стосується сирої речовини, то в цьому випадку найдавнішим і найбільш ефективним методом перетворення біомаси в енергію є отримання біогазу (метану).

Метанове «бродіння», або *біометаногенез*, - давно відомий процес перетворення біомаси в енергію. Він був відкритий в 1776р. Вольтою, який встановив наявність метану в болотному газі. Біогаз, що виходить в ході цього процесу, являє собою суміш з 65% метану, 30% вуглекислого газу, 1%

сірководню (H_2S) і незначних кількостей азоту, кисню, водню і окису вуглецю. Болотний газ дає полум'я синього кольору і не має запаху. Його бездимне горіння завдає набагато менше незручностей людям у порівнянні зі згоранням дров, гною жуйних тварин або кухонних відходів. Енергія, що включена в 28 м^3 біогазу, еквівалентна енергії $16,8\text{ м}^3$ природного газу, $20,8$ л нафти або $18,4$ л дизельного палива.

Біометаногенез здійснюється в три етапи: розчинення і гідроліз органічних сполук, ацидогенез і метаногенез. У енергоконверсію входить тільки половина органічного матеріалу- 1800 ккал/кг сухої речовини в порівнянні з 4000 ккал при термохімічних процесах, але залишки, або шлаки, метанового «бродіння» використовуються в сільському господарстві як добрива. У процесі біометаногенезу беруть участь три групи бактерій. Перші перетворюють складні органічні субстрати в масляну, пропіонову і молочну кислоти; другі – перетворюють ці органічні кислоти в оцтову кислоту, водень і вуглекислий газ, а потім метаноутворюючих бактерії перетворюють вуглекислий газ в метан з поглинанням водню, який в іншому випадку може інгібувати оцтовокислі бактерії.

У 1967р. Брайант та ін. встановили, що оцтовокислі та метаноутворюючі мікроорганізми утворюють симбіоз, який раніше вважався одним мікробом і називався *Methanobacillus omelianskii*. Для всіх метанобактерій характерна здатність до росту в присутності водню і вуглекислого газу, а також висока чутливість до кисню та інгібіторів виробництва метану. У природних умовах метанобактерії тісно пов'язані з воднеутворюючими бактеріями: ця трофічна асоціація вигідна для обох типів бактерій. Перші використовують газоподібний водень, що продукується останніми; в результаті його концентрація знижується і стає безпечною для водоутворюючих бактерій.

Метанове «бродіння» відбувається в водонепроникних циліндричних цистернах (дайджестерах) з боковим отвором, через який вводиться ферментуємий матеріал. Над дайджестером знаходиться сталевий

циліндричний контейнер, який використовується для збору газу; нависаючи над сумішшю, яка бродить у вигляді купола, контейнер перешкоджає проникненню всередину повітря, так як весь процес повинен відбуватися в строго анаеробних умовах. Як правило, в газовому куполі є трубка для відведення біогазу. Дайджестери виготовляють з глиняних цеглин, бетону або сталі. Купол для збору газу може бути виготовлений з нейлону; в цьому випадку його легко прикріплювати до дайджестеру, виготовленому з твердого пластичного матеріалу. Газ надуває нейлоновий мішок, який зазвичай з'єднаний з компресором для підвищення тиску газу. У тих випадках, коли використовуються відходи домашнього господарства або рідкий гній, співвідношення між твердими компонентами і водою має становити 1: 1 (100 кг відходів на 100 кг води), що відповідає загальній концентрації твердих речовин, що становить 8-11% за масою.

Суміш зброджуваних матеріалів зазвичай засівають ацетогенними і метаногенними бактеріями або відстоєм з іншого дайджестера. Низька рН пригнічує ріст метаногенних бактерій і знижує вихід біогазу; такий же ефект викликає перевантаження дайджестера. Проти закислення використовують вапно. Оптимальне «перетравлення» відбувається в умовах, близьких до нейтральних (рН 6,0-8,0). Максимальна температура процесу залежить від мезофільних або термофільних мікроорганізмів (30-40°C або 50-60°C); різкі зміни температури небажані. Зазвичай дайджестери завантажують в землю, щоб використовувати ізоляційні властивості ґрунту. У країнах з холодним кліматом їх нагрівають за допомогою пристроїв, які застосовують при компостуванні сільськогосподарських відходів. З точки зору поживних потреб бактерій надлишок азоту (наприклад у випадку рідкого гною) сприяє накопиченню аміаку, який пригнічує ріст бактерій. Для оптимальної переробки співвідношення C/N повинне бути близько 30:1 (за масою). Це співвідношення можна змінювати, змішуючи субстрати, багаті азотом, з субстратами, багатими вуглецем. Так, C / N гною можна змінити додаванням соломи або жому цукрового очерету. Відходи харчової промисловості і

сільськогосподарського виробництва характеризуються високим вмістом вуглецю (у разі перегонки буряків на 1 літр відходів припадає до 50 грамів вуглецю), тому вони найкраще підходять для метанового «бродіння», тим більше, що деякі з них виходять при температурі, найбільш сприятливою для цього процесу. Бажано перемішувати суспензію бродильних речовин, щоб перешкодити розшаруванню, яка пригнічує бродіння. Твердий матеріал необхідно роздрібнити, так як наявність великих грудок перешкоджає утворенню метану. Звичайно тривалість переробки гною великої рогатої худоби складає два-чотири тижні. Двотижневої переробки при температурі 35°C досить, щоб убити всі патогенні ентеробактерії та ентеровіруси, а також 90% популяції *Ascaris lumbricoides* і *Ancylostoma*.

Ще в 1979 році конференція ООН з науки і техніки для країн, що розвиваються та експерти «Економічної і соціальної комісії по країнах Азії і Тихого океану» підкреслювали переваги інтегрованих сільськогосподарських програм, що використовують біогаз. Такі програми спрямовані на розробку харчових культур, а також на виробництво білку культурами водоростей, створення рибних ферм, переробку відходів і перетворення різних відходів у добрива та енергію у вигляді метану. Треба відзначити, що 38% від 95-мільйонного поголів'я великої рогатої худоби в світі, 72% залишків цукрового очерету і 95% відходів бананів, кава і цитрусових припадають на частку країн Африки, Латинської Америки, Азії та Близького Сходу. Не дивно, що в цих регіонах зосереджені величезні кількості сировини для метанового «бродіння». Наслідком цього з'явився поворот деяких країн з сільськогосподарсько орієнтованою економікою на біоенергетику. Наприклад, одним з основних принципів енергетичної політики Індії є виробництво біогазу в сільських районах. Наприкінці 1979 в Індії працювало менше 100 000 установок. У Китаї в цей же період налічувалося 10 млн. установок. Сировиною для завантаження установок в цих країнах є відходи тваринницьких ферм і птахофабрик. У Центральній Америці побудовані установки, що працюють на відходах виробництва кави. У Масатенанго

(Місто у Гватемалі, Центральна Америка) була побудована фабрика, що випускає 90 м^3 біогазу на добу і 900 т органічних добрив за рік з відходів кави. Біогаз забезпечує роботу двигуна потужністю 35 л/с., що є частиною пристрою, який лущить каву зі швидкістю 3 т/год, виробляє 1500 Ватт електроенергії та забезпечує роботу компресора.

В Ізраїлі з 1974р. виробництвом біогазу займається «Асоціація киббуц індастріз» (КІА). Проведені фундаментальні дослідження процесу метаногенезу за активної участі декількох університетів і промислових дослідницьких інститутів під егідою міністерства енергетики. Анаеробне бродіння відбувається при температурі 55°C . Дослідникам вдалося домогтися підвищення виходу біогазу до $4\text{-}6,5 \text{ м}^3$ за добу на кожен кубометр об'єму цистерни дайджестера (що в десять разів перевищує звичайний вихід).

У Росії зараз виробництвом і впровадженням установок для отримання біогазу займається НТЦ «Агроферммашпроект», який пропонує запатентовані в Росії сучасні енергозберігаючі технології та обладнання для переробки органічних відходів тваринництва, рільництва в ефективне екологічно чисте добриво і енергію. Біогаз складається з 62% метану і 38% вуглекислого газу; останній пропонують використовувати в теплицях для прискорення фотосинтезу культивованих рослин. Відходи переробки, що містять тільки 12% твердої речовини, згодують риbam. Це допомогло заощадити половину гранульованих кормів зі злаків, які зазвичай вживають при розведенні риb. Як показали експерименти, багаті білками, мінеральними солями і вітамінами відходи великої рогатої худоби та овець можна використовувати як корм для худоби, замінюючи ними до 25% сухої речовини їжі, що поглинається.

Виробництво біогазу шляхом метанового «бродіння» відходів - одне з можливих рішень енергетичної проблеми в більшості сільських районів країн. І хоча при використанні коров'ячого гною тільки чверть органічного матеріалу перетворюється на біогаз, останній виділяє тепла на 20% більше, ніж його можна отримати при повному згоранні гною. Виробництво біогазу

має такі переваги: це джерело енергії; відходи процесу слугують високоякісними добривами і на довершення сам процес сприяє підтримці чистоти довкілля. Щоб забезпечити великомасштабний розвиток і економічну вигоду підприємств з виробництва біогазу, необхідно вирішити цілий ряд біохімічних, мікробіологічних і соціальних проблем. Удосконалення стосуються наступних областей: скорочення числа сталевих елементів у обладнанні, що використовується; створення устаткування з оптимальною конструкцією; розробки ефективних нагрівачів; нагріву дайджестерів за рахунок сонячної енергії; об'єднання систем виробництва біогазу з іншими нетрадиційними джерелами енергії; конструювання великомасштабних виробничих одиниць для сільських або міських громад; оптимального використання перероблених відходів і, нарешті, удосконалення процесів бродіння і початкової деградації відходів.

Біотехнологія в змозі внести великий внесок у вирішення проблем енергетики за допомогою виробництва досить дешевого біосинтетического етанолу, який крім того є і важливою сировиною для мікробіологічної промисловості при отриманні харчових і кормових білків, а також білково-ліпідних кормових препаратів.

Найбільші світові виробники спирту (за даними на 2000р.): Бразилія - 10,6 млрд.л; США - 6,5 млрд.л; Китай - 3 млрд.л; Індія - 1,7 млрд.л; Росія - 1,3 млрд.л. Стратегічну роль в бразильській економіці спирт придбав в середині 70-х років з введенням програми Proalcool, запущеної в 1975 році після світової нафтової кризи на початку 70-х. У Бразилії проводиться два види етилового спирту: негідрований - використовується в якості добавки до бензину в пропорції 20-24% і не вимагає змін в двигуні; гідрований - використовується як паливо і вимагає спеціального двигуна, що працює на спирті. Бразилія є першою країною, що почала використовувати негідрований спирт в якості добавки до палива. Джерелом вуглеводнів також можуть слугувати водорості. У широко поширеної зеленої водорості *Botryococcus braunii* (мешкає в прісній і солонуватій воді помірних і

тропічних зон) вуглеводні залежно від умов росту і різновидів можуть становити до 75% сухої маси. Вони накопичуються всередині клітин, і водорості, в яких їх багато, плавають на поверхні. Після збору водоростей ці вуглеводні легко відокремити екстракцією будь-яким розчинником або методом деструктивного відгону. Таким шляхом можливо отримати речовину, аналогічну дизельному паливу і газу. Зустрічається кілька різновидів *B.braunii*, що відрізняються пігментацією і структурою синтезованих вуглеводнів. Вихід вуглеводнів при створенні оптимальних умов культивування може досягати 60 т/га за рік для культури водоростей, вирощуваної в товщі води у природних або штучних умовах.

Для визначення перспективності використання *B.braunii* необхідно провести наступні дослідження:

- Визначити умови, що забезпечують максимальну швидкість росту і утворення вуглеводів в лабораторних і польових умовах;
- З'ясувати, чи можна домогтися швидкості росту *B.braunii*, у порівнянні з відомою для інших водоростей;
- Розробити відповідні методи вирощування, збору і переробки;
- Оцінити придатність одержуваного продукту як альтернативного джерела палива і мастильних речовин.

2. Біотехнологія обробки стоків та контроль забрудненості води тяжкими металами

Розвиток промисловості веде до утворення великої кількості відходів, у тому числі відходів, що містять нові антропогенні компоненти. Методами біотехнології ці відходи можуть бути перероблені в корисні або нешкідливі продукти.

Побутові відходи діляться на 2 групи: тверді відходи і стічні води. Тверді побутові відходи складаються з целюлозовмісних матеріалів (до 40% паперу, 2,5% дерева, 8% текстилю) і харчових відходів (40%). Найбільш

економічна і радикальна переробка їх метановим бродінням, в результаті утворюється пальне – метан, який легко транспортується. Стічні води зазвичай містять складну суміш нерозчинних і розчинних компонентів різної природи і концентрації. Побутові відходи, як правило, містять ґрунтову і кишкову мікрофлору, включаючи патогенні мікроорганізми. Стічні води цукрових, крохмальних, пивних і дріжджових заводів, м'ясокомбінатів містять у великих кількостях вуглеводи, білки і жири, які є джерелами поживних речовин і енергії. Стоки хімічних і металургійних виробництв можуть містити значну кількість токсичних і навіть вибухових речовин. Серйозне забруднення виникає при попаданні в навколишнє середовище сполук важких металів, таких як залізо, мідь, олово тощо.

Мета очищення стічних вод - видалення розчинних і нерозчинних компонентів, елімінація патогенних мікроорганізмів і проведення детоксикації таким чином, щоб компоненти стоків не шкодили людині, і не забруднювали водойми. Бактерії роду *Pseudomonas* практично всеїдні. Наприклад, *P. putida* можуть утилізувати нафталін, толуол, алкани, камфору та інші сполуки. Виділено чисті культури мікроорганізмів, здатні розкласти специфічні фенольні сполуки, компоненти нафти в забруднених водах і т.д. Мікроорганізми роду *Pseudomonas* можуть утилізувати і незвичайні хімічні сполуки - інсектициди, гербіциди та інші ксенобіотики. Генетично сконструйовані штами мікроорганізмів в майбутньому зможуть вирішити проблему очищення стічних вод і ґрунтів, забруднених пестицидами та іншими антропогенними речовинами. Пестициди надходять у навколишнє середовище після обробки сільськогосподарських культур. Більшість з них розщеплюються бактеріями і грибами. Найкраща біодеградація пестицидів вдається, якщо мікроорганізми діють спільно, в хімічних реакціях сполученого метаболізму.

При цьому вже на першій стадії мікробної трансформації токсичність більшості пестицидів втрачається, що дозволяє розробляти відносно прості біотехнологічні методи боротьби з ними. Первинний гідроліз пестицидів

можна проводити і за допомогою ферментів, таких як гідролази, естерази, фосфоестерази, ациламідази. Пестициди зі стічних вод можна видаляти, використовуючи імобілізовані форми цих ферментів.

Біологічні методи також застосовуються для очищення стічних вод нафтової промисловості. Для цього застосовують аеруємі системи біоочищення з активним мулом, що містить адаптоване до компонентів нафти мікробне співтовариство. Швидкість деградації залежить від якісного складу і концентрації вуглеводнів, а також температури і ступеня аерації середовища. Найбільш ефективно біодеградація здійснюється, коли нафта емульгована у воді.

В інституті прикладної біохімії та машинобудування розроблений вітчизняний препарат - *біодеградант* нафти і нафтопродуктів. Він дозволяє утилізувати як сиру нафту, так і різні нафтопродукти: мазут, дизельне паливо, бензин, газ, ароматичні вуглеводні. Мікроорганізми спільноти здатні ефективно окисляти широкий спектр вуглеводнів нафти, в тому числі і ароматичні вуглеводні, в широкому діапазоні температур (8-35°C) і кислотності середовища (рН 3,5-10,0) з оптимумом 6,5-7,5. Біопрепарат працює при високому рівні забруднення до 20%, з високим вмістом важких аліфатичних і ароматичних вуглеводнів. Перевагою даного препарату є те, що в сухій формі його отримують за новою технологією розпилювальної сушки, що забезпечує його низьку собівартість при збереженні високої активності (концентрація клітин в препараті 1010 кл/г). Виробництво і застосування біопрепарату вигідно відрізняється порівняно низькими собівартістю і енерговитратами, легким транспортуванням, відсутністю вторинних відходів, екологічною безпекою, пов'язаної зі здатністю розкладати вуглеводні нафти на екологічно нейтральні сполуки. Азотовмісні сполуки (білки, амінокислоти, сечовина) можуть бути видалені в біологічному процесі денітрифікації-нітрифікації. Біологічне видалення азоту і фосфору, що є причинами евтрофікації (заростання озер мікроводоростями, які бурхливо розмножуються, потім відмирають, даючи їжу аеробним

бактеріям, що споживають кисень, а це призводить до замору риби) озер і каналів, знаходиться в стадії експериментів. Важкі метали ускладнюють біологічні процеси очищення стоків і негативно впливають на флору і фауну. Природні штами мікроорганізмів не можуть бути використані для накопичення цих металів в силу їх високої токсичності. Однак, є білок вищих організмів - металотіонеїн, який активно зв'язує різні важкі метали. Ген, що кодує синтез мишачого металотіонеїну, клонований в бактеріях. Це відкриває можливість отримання білка у великих кількостях з використання іммобілізованих бактерій і його використання для зв'язування та екстракції важких металів.

3. Сільськогосподарська біотехнологія

Біологічна азотфіксація - процес переведення азоту, що міститься в атмосфері у вигляді хімічно інертного N_2 , в доступну для рослин форму нітратів і амонію. Азот становить 78% від загального обсягу атмосферного повітря і абсолютно недоступний для рослин в такому вигляді. Саме тому люди змушені вносити азотні добрива для підвищення продуктивності сільськогосподарських культур.

Фіксація атмосферного азоту здійснюється бактеріями, що живуть у симбіозі з представниками родини бобових (бульбочкові бактерії роду *Rhizobium*) або вільноживучими азотфіксаторами, наприклад, *Azotobacter*. Для прискорення заселення ризосфери зазвичай використовують бактеріальні добрива, що містять культури азотфіксуючих мікроорганізмів. Бактеріальні добрива на основі бульбочкових бактерій вносять під бобові культури, симбіонтами яких вони є. Методами генної інженерії виведені мутанти бульбочкових бактерій з підвищеною здатністю до азотфіксації. Ведуться роботи щодо створення азотфіксуючих рослин, здатних до симбіозу із злаковими. Є й бактеріальні препарати, що покращують фосфорне живлення рослин.

Мікробні інсектициди. Останнім часом все частіше з'являються дані про мутагенну та канцерогенну дію хімічних пестицидів, які погано руйнуються і накопичуються у навколишньому середовищі. Для отримання мікробних інсектицидів використовуються віруси, гриби, найпростіші, найбільш зручні - спороутворюючі бактерії. Мікробні інсектициди високо специфічні і діють тільки на певні шкідливі комахи, залишаючи неушкодженими корисні. Патогенність мікроорганізмів викликана дією певних токсинів, тому вироблення стійкості до біопрепаратів у комах не відбувається. Мікробні пестициди (ентомопатогенні препарати на основі бактерій, грибів або вірусів) схильні біодеградації. Мікроорганізми можуть регулювати ріст рослин і тварин, придушувати захворювання. Деякі бактерії змінюють кислотність і солоність ґрунту, інші продукують сполуки, що зв'язують залізо, треті - виробляють регулятори росту.

У тваринництві біотехнологія також знаходить застосування. Це діагностика, профілактика, лікування захворювань з використанням техніки моноклональних антитіл, генетичне поліпшення порід тварин. Широко використовуються біотехнологічні методи для штучного осіменіння. Біотехнологія застосовується для силосування кормів, дозволяючи підвищувати засвоєння рослинної біомаси, для утилізації відходів тваринницьких ферм і одержання екологічно чистих органічних добрив на основі переробки відходів рослинництва і тваринництва. Деякі речовини, отримані за допомогою мікроорганізмів можуть використовуватися у вигляді кормових добавок, інші - пригнічують шкідливу мікрофлору в шлунково-кишковому тракті або стимулюють утворення специфічних мікробних метаболітів (кормові антибіотики, які використовуються все ширше).

4. Біогеотехнологія

Деякі мікроорганізми можуть каталізувати певні окислювально-відновні реакції - окислення Fe і Mn у воді, окислення сірковмісних сполук,

окислення-відновлення азотовмісних сполук. Аеробні бактерії можуть виділяти залізо, мідь, сульфати.

Біогеотехнологія - використання геохімічної діяльності мікроорганізмів в гірничодобувній промисловості. Це екстракція і концентрування металів при біологічному очищенні стічних вод підприємств гірничодобувної промисловості та флотаційних процесах: вилужування бідних і відпрацьованих руд, десульфатування кам'яного вугілля, окислення піритів і піритвмісних порід. Своім корінням біогеотехнологія йде в геологічну мікробіологію. Мікроорганізми брали і беруть активну участь в геологічних процесах. Біологічні властивості різних груп мікроорганізмів та особливості їх життєдіяльності в родовищах корисних копалин становлять наукові основи біогеотехнології.

Біогеотехнологія стихійно зародилася ще в XVI ст. до нашого часу дійшли відомості про те, що в ті далекі часи в Угорщині для отримання міді купи видобутої руди зрошували водою. Цей нехитрий технологічний прийом виявився прообразом сучасного бактеріально-хімічного методу купчастого вилужування металів з руд. Звичайно, тоді ще не знали, що використовуваний процес отримання міді за своєю природою є мікробіологічними. Це стало відомо тільки в 1922р. завдяки роботам німецьких вчених Рудольфа і Хельброннера. Мабуть, 1922 слід вважати офіційною датою народження біогеотехнології. Надалі біогеотехнологія розвивалася нерівно і свого повноліття досягла до початку 80-х років нашого століття. До цього часу поряд з бактеріальним вилужуванням металів сформувалися й інші розділи біогеотехнології - видалення сірки з вугілля, боротьба з метаном у вугільних шахтах, підвищення нафтовіддачі пластів.

Біогеотехнологія вилужування металів – використання, головним чином, тіонових (окислюють сірку і сірковмісні сполуки) бактерій для вилучення металів з руд, рудних концентратів і гірських порід. При переробці бідних і складних руд тисячі і навіть мільйони тонн цінних металів губляться у вигляді відходів, шлаків, «хвостів». Відбуваються також викиди

шкідливих газів в атмосферу. Бактеріально-хімічне вилузування металів зменшує ці втрати. Основу цього процесу складає окислення, яке відбувається в рудах сульфідних мінералів тіоновими бактеріями. Окислюються сульфіди міді, заліза, цинку, олова, кадмію тощо. При цьому метали з нерозчинної сульфідної форми переходять у сульфати, добре розчинні у воді. З сульфатних розчинів метали витягуються шляхом осадження, екстракції, сорбції. Одним з можливих шляхів вилучення металів з розчинів є адсорбція металів клітинами живих мікроорганізмів, так звана біосорбція металів. Метали включаються до складу специфічних білків - металотіонеїнів.

Корисними для біогеотехнології видобутку металів властивостями володіє цілий ряд мікроорганізмів. Але основним з них, безумовно, є відкритий в 1947 р Колмера і Кінкеля вид тіонових бактерій, названий *Thiobacillus ferrooxidans*. Необхідну для росту енергію ці бактерії отримують при окислюванні відновлених сполук сірки і двовалентного заліза в присутності вільного кисню. Вони окислюють практично всі відомі в даний час сульфіди металів. Джерелом вуглецю для росту бактерій слугує при цьому вуглекислий газ. Характерною особливістю їх фізіології є потреба дуже кислого середовища. Вони розвиваються при рН від 1 до 4,8 з оптимумом при 2-3. Інтервал температур, в якому можуть розвиватися бактерії цього виду, становить від 3 до 40°C з оптимумом при 28°C.

Тіонові бактерії широко поширені в природі. Вони мешкають у водоймах, ґрунтах, вугільних і золоторудних родовищах. У значних кількостях зустрічаються вони в родовищах сірчаних і сульфідних руд. Але в умовах природного залягання таких руд активність тіонових бактерій стримується відсутністю кисню. При розробці сульфідних родовищ руди вступають в контакт з повітрям, і в них розвиваються мікробіологічні процеси, що призводять до вилузування металів. Застосовуючи певні біотехнологічні заходи, цей природний процес можна прискорити. Основною технологічною операцією цього способу є зрошення відвалів

видобутої руди розчинами, що містять сірчану кислоту, іони двох- і тривалентного заліза, а також життєздатні клітини тіонових бактерій. Іноді для посилення процесів вилужування всередину відвалу подають повітря. В таких умовах розчин фільтрується через товщу руди і в результаті мікробіологічних і хімічних процесів збагачується видобуваються з руди металів. Потім цей розчин збирають за допомогою системи колекторів, і з нього витягують метали одним з фізико-хімічних методів.

Щорічно у світі таким способом видобувають сотні тисяч тонн міді, або приблизно 5% від її загального видобутку. У ряді країн цим способом отримують також значні кількості урану.

Біогеотехнологія знесірчення вугілля - використання тіонових бактерій для видалення сірковмісних сполук з вугілля. Як буре, так і кам'яне вугілля нерідко містить значні кількості сірки. Загальний вміст сірки у вугіллі може досягати 10-12%. При спалюванні вугілля сірка, що в них міститься перетворюється на сірчистий газ, який надходить в атмосферу, де з нього утворюється сірчана кислота. З атмосфери сірчана кислота випадає на поверхню землі у вигляді сірчаноокислих дощів.

За наявними даними, в деяких країнах Західної Європи в рік на 1 га землі з дощами випадає до 300 кг сірчаної кислоти. Неважко собі уявити, яких збитків завдають кислотні дощі здоров'ю людини, її господарської діяльності та навколишньої природи. Крім цього, високосірчисте вугілля погано коксуються і тому не можуть бути використані в кольоровій металургії. Мікробне видалення сірки з вугілля, на думку фахівців, є економічно вигідним, і з ним пов'язують надії на вирішення проблеми сірчаноокислих дощів.

Перші досліді по спрямованому видаленню сірки з вугілля з використанням мікроорганізмів були виконані в 1959р. в нашій країні З. М. Зарубіною, Н. Н. Ляліковою і Є. І. Шмуком. В результаті цих дослідів за 30 діб за участю бактерій *Th. ferrooxidans* з вугілля було видалено 23-30% сірки. Пізніше кілька робіт по мікробіологічному знесірченню вугілля було

опубліковано американськими дослідниками. Їм вдалося за допомогою тіонових бактерій знизити вміст піритної сірки в кам'яному вугіллі за чотири доби майже на 50%. Цей метод буде супроводжуватися попутним вилужуванням різних металів. Відомо, що в помітних кількостях міститься у вугіллі германій, нікель, берилій, ванадій, золото, мідь, кадмій, свинець, цинк, марганець. Попутне отримання цінних металів при десульфуризації вугілля має дати додатковий економічний ефект. Роботи з видалення піритної сірки з вугілля мікробіологічними шляхом проводяться зараз у багатьох країнах світу.

За останніми повідомленнями в лабораторних умовах вдається знизити вміст сірки у вугіллі шляхом мікробіологічного вилужування за 5 діб майже на 100%. Мікробіологічний спосіб десульфуризації вугілля розглядається як дуже перспективний.

Біогеотехнологія і боротьба з метаном у вугільних шахтах - використання метаноокисних бактерій для зниження концентрації метану у вугільних пластах і вироблених просторах. У пластах кам'яного вугілля міститься величезна кількість метану, що досягає сотні кубометрів на 1 т вугілля. При цьому чим глибше залягає вугілля в надрах землі, тим більше метану він містить. При підземному видобутку вугілля метан з вугільних пластів надходить в атмосферу шахт. Скупчення цього вибухонебезпечного газу в гірничих виробках створюють постійну загрозу для життя шахтарів. Відомі випадки великих вибухів метану у вугільних шахтах світу та України, що забрали тисячі людських життів. Традиційні засоби боротьби з метаном у вугільних шахтах (вентиляція, вакуумна дегазація, зволоження пластів водою) в умовах постійної інтенсифікації гірничих робіт та переходу на все більш глибокі вугленосні горизонти часто вже не можуть забезпечити одночасно високий рівень вуглевидобутку та безпечні умови праці.

В основі біогеотехнологічних способів боротьби з метаном лежить процес поглинання цього газу метаноокисними бактеріями у вугільних пластах і вироблених просторах.

Ідея про використання метаноокисних бактерій для боротьби з метаном у вугільних шахтах належить радянським ученим. У 1939р. А. З. Юровський, Г. П. Капілаш і Б. В. Мангубі запропонували застосовувати ці бактерії для зниження виділення метану з вироблених просторів. Незважаючи на широке поширення метаноокисних бактерій в природі, у вугільних пластах і прилеглих породах вони відсутні. Тому необхідна кількість активних метаноокисних бактерій вирощують в ферментерах і у вигляді суспензії в живильному середовищі. Робоча суспензія готується безпосередньо в шахті. У рудничну воду додають задану кількість біомаси метаноокисних бактерій і необхідної мінеральні солі. Зазвичай це мінеральні сполуки азоту і фосфору. У вугільний пласт робоча суспензія нагнітається насосами через свердловини, пробурені по вугіллю або з підземних виробок, чи з поверхні землі: 1 т вугілля може прийняти 20-40 л робочої суспензії. У вугіллі мікроорганізми розподіляються по тріщинах і порах. Таким шляхом здійснюється насичення вугілля метаноокисними бактеріями. Але для розвитку цих бактерій необхідний вільний кисень, якого немає у вугільних пластах. Тому в насичену метаноокисними бактеріями ділянку вугільного пласта через ті ж свердловини компресором постійно прокачується повітря. В таких умовах бактерії споживають з вугілля метан, і за рахунок цього відбувається зменшення вихідної газоносності вугільного пласта.

Мікробіологічні способи боротьби з метаном були неодноразово випробувані у вугільних шахтах. Надходження метану як з вугільних пластів, так і з вироблених просторів в ході цих випробувань було знижено в середньому в 2 рази. За інших рівних умов це дозволяє підвищувати видобуток вугілля приблизно в 1,5 рази.

Біогеотехнологія і підвищення нафтовіддачі пластів - використання різних груп мікроорганізмів для збільшення вторинного видобутку нафти. Нафта, як відомо, є в даний час основною енергетичною і хімічною сировиною. Однак за деякими прогнозами світові запаси нафти можуть бути вичерпані вже протягом найближчих 50 років. Разом з тим існуюча

технологія дозволяє витягувати тільки половину нафти, що міститься в родовищах. Це обумовлено міцним зв'язком нафти з її породами. Підвищення нафтовіддачі пластів на 10-15% було б рівнозначно відкриттю нових родовищ. У зв'язку з цим в даний час помітно зріс інтерес до пошуку шляхів і засобів підвищення вторинного видобутку нафти. Один із способів припускає використання комплексу вуглеводоокисних і метаноутворюючих бактерій для збільшення нафтовіддачі пластів засноване на активації геохімічної діяльності цих мікробів в нафтовому покладі, куди вони потрапляють разом із поверхневими водами. Активація названих мікробіологічних процесів досягається шляхом аерації закачуваних вод і додавання в них мінеральних солей азоту і фосфору. Недолік цих хімічних елементів найчастіше лімітує активність мікрофлори в природних умовах. Нагнітання в нафтовий поклад збагаченої киснем і мінеральними солями води призводить до утворення аеробної зони в нафтоносному пласті навколо нагнітальної свердловини. Тут починають інтенсивно йти процеси руйнування нафти аеробними вуглеводоокисними мікробами. Це супроводжується накопиченням вуглекислого газу, водню і низькомолекулярних органічних кислот, які надходять в анаеробну зону нафтового покладу. Тут вони перетворюються метаноутворюючими бактеріями в метан. Руйнування нафти і утворення газів призводять до розрідження нафти і підвищенню газового тиску в нафтоносному пласті, що й повинно супроводжуватися збільшенням видобутку нафти з видобувних свердловин.

5. Біоелектроніка

В галузі електроніки біотехнологія може бути використана для створення покращених типів біосенсорів і нових привідних пристроїв, які називаються біочіпами.

Біотехнологія робить можливим створення пристроїв, в яких білки є

основою молекул, що діють як напівпровідники. Для індикації забруднень різного походження останнім часом стали використовувати не хімічні реагенти, а біосенсори - ферментні електроди, а також іммобілізовані клітини мікроорганізмів. Ферменти володіють високою чутливістю.

Біоселективні датчики створюють також шляхом нанесення на поверхню іоноселективних електродів цілих клітин мікроорганізмів або тканин. Наприклад, *Neurospora europea* - для визначення NH_3 , *Trichosporon brassicae* - для визначення оцтової кислоти. В якості сенсорів використовують також моноклональні антитіла, що володіють виключно високою вибірковістю.

Лідерами у виробництві біодатчиків і біочипів є японські компанії, такі як *Hitachi, Sharp*. Наприклад, компанія Hitachi на початку 90-х років створює проектну групу чисельністю в 200 чоловік виключно для робіт в області біоелектроніки. Компанія Sharp проводить дослідження з розробки комп'ютерів з біокомпонентами. З'являється новий тип напівпровідників, провідну функцію в яких здійснюють молекули білків. Такі ферментні системи працюють з більшою швидкістю, ніж кремнієві напівпровідники. Біочіпи мають невеликі розміри, надійні і здатні до самозбірки. Ще одна японська компанія, Sony, запатентувала спосіб виробництва високоякісних акустичних систем з целюлози, утвореною бактеріями. Гелеподібна целюлоза висушується. Отриманий матеріал має структуру сот і використовується як плоска діафрагма акустичних систем.

6. Біотехнологія у медицині

Антибіотики - найбільший клас фармацевтичних сполук, синтез яких здійснюється мікробними клітинами. До цього ж класу відносяться протигрибкові агенти, протипухлинні ліки і алкалоїди. У 1980р. світове виробництво антибіотиків становило приблизно 25000 т, з них 17000 т - пеніциліни, 5000 т - тетрациклін, 1200 т - цефалоспорини та 800 т -

еритроміцин. У 1945р. Бротзу з Інституту гігієни в Кальарі (Сардинія) виділив з проби морської води цвіль *Cephalosporium acremonium*, що синтезує кілька антибіотиків; один з них, *цефалоспорин С*, виявився особливо ефективний проти стійких до пеніциліну грампозитивних бактерій.

З декількох тисяч відкритих антибіотиків лєвова частка належить актиноміцетам. Серед актиноміцетів найбільший внесок вносить рід *Streptomyces*, включаючи тетрацикліни (один тільки вид *Streptomyces griseus* синтезує більше п'ятдесяти антибіотиків). Найбільш поширеними з комерційної точки зору виявилися пеніциліни, цефалоспорини та тетрацикліни.

Починаючи з середини 1960-х рр. у зв'язку із збільшеною складністю виділення ефективних антибіотиків і поширенням стійкості до найбільш широко застосовуваної сполуки у великій кількості патогенних бактерій дослідники перейшли від пошуку нових антибіотиків до модифікації структури вже наявних. Вони прагнули підвищити ефективність антибіотиків, знайти захист від інактивації ферментами стійких бактерій і поліпшити фармакологічні властивості препаратів. Більшість досліджень було зосереджено на пеніциліні і цефалоспорині.

Дослідники фірми «Мерк, Шарп і Доум» відкрили новий клас β -лактамних антибіотиків, *тієнаміцин*, що продукуються *Streptomyces cattleya*. Тієнаміцин надзвичайно ефективний проти грампозитивних і грамнегативних бактерій, а також здатний пригнічувати β -лактамази, що підвищує можливості цих антибіотиків. До інгібіторів β -лактамаз відносяться також клавуланова і оліванова кислоти, ідентифіковані дослідниками англійської фармацевтичної компанії «Бічем». Компанія випустила новий антибіотик, *аугментин*, який являє собою комбінацію β -лактами амоксициліну та клавуланової кислоти.

Антибіотики виробляються в результаті спільної дії продуктів 10-30 генів, тому практично неможливо виявити окремі спонтанні мутації, які могли б підвищити вихід антибіотика з кількох міліграмів на літр в штамі

дикого типу до 20 г/л і більше пеніциліну або тетрацикліну в промислових штаммах *Penicillium chrysogenum* або *Streptomyces auerofaclens*. Ці високопродуктивні штами були отримані в результаті послідовних циклів мутагенезу та селекції. В результаті мутацій з'явилися нові вторинні метаболіти, у тому числі 6-деметілхлортетраціклін і 6-деметілтетраціклін. Певні мутанти, так звані ідіотрофи, здатні синтезувати тільки половину молекули антибіотика, а середовище має бути збагачене іншою її половиною. Така форма мутаційного біосинтезу привела до відкриття нових похідних антибіотиків, серед них належать до аміноциклітольної групи.

Кількість протипухлинних речовин мікробного походження досить обмежена. Блеоміцин, виділений Умезавой із співр. в Токійському інституті мікробної хімії з культур *Streptomyces verticilliis*, являє собою глікопептид, який діє, розриваючи ДНК пухлинних клітин і порушуючи реплікацію ДНК і РНК. Інша група протипухлинних агентів створена на основі комбінації аміноглікозидної одиниці і молекули антрацикліну. Недоліком обох сполук є їх потенційна небезпека для серця.

У медицині застосовують також амінокислоти, наприклад, аргінін. У поєднанні з аспаратом або глутамат він допомагає при захворюванні печінки. К-Na-аспарат знімає втому і полегшує болі в серці, його рекомендують при захворюванні печінки і діабеті. Цистеїн захищає SH-ферменти в печінці та інших тканинах від окислення і надає детоксикуючу дію. Він проявляє також захисну дію від пошкодження, що викликаються опроміненням. Дигідроксифенілаланін і D-фенілаланін ефективні при хворобі Паркінсона. З поліамінокислот отримують хороший матеріал для хірургії.

У медицині також використовують зелену водорість *Scenedesmus*. Її культивують в рідкому поживному середовищі (установки дають до 80 тонн водоростей на рік), витягують і проводять екстракцію етиловим спиртом. Біомасу відокремлюють і піддають ферментативному гідролізу лужною протеазою. Близько 50% білків при цьому розпадається до пептидів.

Гідролізат містить майже всі незамінні амінокислоти, являє собою порошок жовтувато-зеленого кольору з приємним запахом і смаком. Використовується цей продукт для швидкого відновлення організму, а також як компонент косметичних засобів. Якщо замість обробки етанолом провести дворазову екстракцію дистильованою водою, а потім висушити, то виходить порошок світло-жовтого кольору. Його використовують як біостимулятор і готують з нього препарати для лікування відкритих ран.

Ще на початку 90-х років з'явилися статті, в яких розглядалися перспективи використання сапротрофної мікрофлори як продуцента біологічно активних речовин (БАР). Передбачається вводити в організм сапрофітні мікроорганізми, які могли б жити в умовах симбіозу з нормальною мікрофлорою організму. Речовини, що виробляються бактеріальними штамами включаються в систему біохімічних процесів організму. У разі порушення нормального біохімічного статусу організму вони коригують його, а при патологічному процесі - затримують його або сприяють припинення. Таке введення отримало назву «мікробіологічна підсадка». До 1992 року було описано вже понад 50 таких штамів і проаналізований діапазон біологічних ефектів секретованих БАР.

Для лікування широкого спектру захворювань (бактеріальні інфекції кишечника, дихальних шляхів, гнійних інфекцій, алергій) успішно застосовуються штами *Bacillus subtilis* (препарат «Бактисубтил», наприклад, використовують при лікуванні діареї). Штамами *E. coli* лікують ряд кишкових захворювань. БАР, секретуються сапротрофами, можуть регулювати ферментативні процеси в організмі і вступати у взаємодію з ксенобіотиками. Штами можна отримувати безпосередньо від людини, тоді вони будуть представляти його природну мікрофлору.

Можна цілеспрямовано виводити лабораторні мутантні штами, в тому числі методами генної інженерії і вводити їх в організм. Способи введення можуть бути різні: капсули, розчинні в кишковому соку, культури штамів-продуцентів на плівковій основі, у вигляді свічок, а при легеневих

захворюваннях - у вигляді аерозолів.

Новим напрямком у медицині є використання ферментних препаратів типу «контейнер», виготовлення яких стало можливим появі та удосконаленню методів іммобілізації речовин. Ці препарати є мікросфери з більш-менш твердою і проникною оболонкою. Призначення цих лікарських препаратів різне. Першим типом «штучних клітин» слід назвати мікрокапсули. Фермент, що знаходиться всередині оболонки, не контактує з рідинами і тканинами організму, не руйнується протеїназами, що не інгібується, не викликає імунної відповіді організму. Основна перевага мікрокапсул полягає в тому, що їх можна імплантувати в потрібне місце, наприклад в безпосередній близькості від пухлини. При цьому мікрокапсула з відповідним змістом перероблятиме метаболіти, необхідні для росту пухлинної тканини, і ця тканина не буде розвиватися. Капсули можуть містити мікроскопічні ділянки тканин. Наприклад, є експериментальні дані по створенню депо інсуліну шляхом імплантації мікрокапсул, що містять острівці Лангерганса, які синтезують в підшлунковій залозі інсулін. Відомо, що терапії діабетичних захворювань приділяється багато уваги. Імплантація лікарського початку позбавила б пацієнтів від щоденних ін'єкцій інсуліну. Слід враховувати, що мікрокапсули, які вводяться в кров, можуть забивати кровоносні судини і, отже, бути причиною утворення тромбів. Проте ефективність мікрокапсул при використанні їх у вигляді колонок для діалізу в апараті «штучна нирка» безсумнівна. При цьому обсяг апаратів і, відповідно, кількість необхідних і дуже дорогих розчинів різко скорочується.

Наприклад, для мікрокапсульованої «штучної нирки» потрібна колонка об'ємом всього 30 мл, яка працює майже в 100 разів швидше звичайного апарату. Розвиток такої техніки стримується поки високою вартістю, а також необхідністю використовувати вже існуючу теж дуже дорогу техніку. Ймовірно, ферментні реактори на мікрокапсулах будуть застосовуватися для деградації недіалізуємих матеріалів.

Всередину мікрокапсул можуть бути включені магнітні частинки. У цьому випадку ззовні підводять магнітне поле і препарат утримують поблизу органа-мішені.

У ряді випадків використовуються високомолекулярні сполуки, розчинні в певних умовах і зберігають високу міцність оболонок в інших. Так поводить ся ацетилфталілцелюлоза, мікрокапсули з якої інтактні в шлунковому соку і розчиняються в кишечнику, звільняючи вміст. Зараз інтенсивно досліджуються властивості мікрокапсул, стінка яких складається з оболонок еритроцитів. Вміст еритроцитів видаляється, а «тінь» заповнюється ферментом. Серйозні успіхи досягнуті при лікуванні аспарагін-залежних пухлин препаратами аспарагінази в оболонках еритроцитів.

Так, описані лікарські препарати, включені в оболонки макрофагів. Останні мають тенденцію накопичуватися в осередках запалень, а отже, можуть транспортувати туди як низько-, так і високомолекулярний лікарський препарат. Суттєвою позитивною стороною «тіней» клітин в якості носія є їх повна сумісність з організмом пацієнта, оскільки цей носій готують на основі клітин, виділених з крові пацієнта, і повертають їх йому ж з новим вмістом. Завдання введення лікарського препарату в клітини може бути вирішена шляхом створення контейнерів-переносників типу ліпосом або міцел. Оболонка ліпосоми являє собою одношарову або багатшарову поверхню, утворену, в свою чергу, бішаровою структурою, створеною сполуками, що мають дві гідрофобні, досить протяжні ділянки і гідрофільну групу. Гідрофобні кінці злипаються між собою і утворюють плівку, обидві сторони якої гідрофільні. Ліпосома, специфічна або неспецифічна адсорбуватися на клітині, може бути поглинена нею шляхом фагоцитозу, і фермент всередині вивільняється.

Добре відомо, що протеїнази, розщеплюючи денатуровані білки, сприяють очищенню ран, і отже, їх загоєнню. У цьому напрямку в клінічній практиці за допомогою іммобілізованих протеїназ зроблено багато. В якості носіїв для іммобілізації протеолітичних ферментів найбільш поширені

волокнисті матеріали на основі целюлози, полівінілового спирту, солей альгінової кислоти, поліамідні і колагенові волокна. Готують нитки, в які при формуванні включають фермент і використовують їх як шовний матеріал. Порівняльний аналіз дії нативних та іммобілізованих протеїназ (в основному хімотрипсину, трипсину, колагенази) показав, що вже на 2-4-й день рана очищається від некротичних мас і принаймні вдвічі швидше настає грануляція. Переконливі результати отримані при лікуванні трофічних виразок, променевиких виразок шкіри. Особливо ефективні іммобілізовані протеїнази при передопераційній підготовці та після пластичних операцій. Іммобілізовані протеолітичні ферменти з великим успіхом застосовуються в лікуванні гнійних захворювань легень і плеври.

7. Біотехнологія у харчовій промисловості

Статистичні дані ООН з питань продовольства і сільського господарства свідчать про те, що проблема забезпечення населення нашої планети продуктами харчування вселяє серйозні побоювання. За цими даними, більше половини населення Землі не забезпечено достатньою кількістю продуктів харчування, приблизно 500 млн. людей голодують, а близько 2 млрд. харчуються недостатньо або неправильно.

На кінець ХХ ст. населення нашої планети з урахуванням контролю народжуваності склало 7,5 млрд. чоловік. Отже, важке вже зараз становище з продуктами харчування може прийняти в недалекому майбутньому для деяких народів загрозливих масштабів. Їжа повинна бути різноманітною і містити білки, жири, вуглеводи і вітаміни. Джерела енергії - жири і вуглеводи в певних межах взаємозамінні, причому їх можна замінити і білками, але білки не можна замінити нічим. Проблема харчування людей в кінцевому рахунку полягає в дефіциті білка. Там, де сьогодні люди голодують, не вистачає насамперед білка. Встановлено, що щорічний дефіцит білка в світі, за найскромнішими підрахунками, оцінюється в 15 млн. т. Найбільшу

популярність як джерела білка придбали насіння олійних культур - сої, насіння соняшнику, арахісу та інших, які містять до 30 відсотків високоякісного білку. За змістом деяких незамінних амінокислот він наближається до білка риби та курячих яєць і перебиває білок пшениці. Білок з сої широко вже використовується в США, Англії та інших країнах як цінний харчовий матеріал. Ефективним джерелом білка можуть служити водорості. Збільшити кількість харчового білка можна і за рахунок мікробіологічного синтезу, який в останні роки привертає до себе особливу увагу.

Мікроорганізми надзвичайно багаті білком - він становить 70-80 відсотків їх маси. Швидкість його синтезу величезна. Мікроорганізми приблизно в 10-100 тисяч разів швидше синтезують білок, ніж тварини. Тут доречно навести класичний приклад: 400-кілограмова корова виробляє в день 400 грамів білка, а 400 кілограмів бактерій - 40 тисяч тонн. Зрозуміло, що на отримання 1 кг білка мікробіологічними синтезом при відповідній промислової технології потрібно коштів менше, ніж на одержання 1 кг тваринного білку. Та до того ж технологічний процес куди менш трудомісткий, ніж сільськогосподарське виробництво, не кажучи вже про виключення сезонних впливів погоди - заморозків, дощів, суховіїв, посух, освітленості, сонячної радіації тощо.

Застосовуючи звичайні технологічні лінії з виробництва синтетичних волокон, можна отримувати з штучних білків довгі нитки, які після просочення їх формують речовинами, надання їм відповідного смаку, кольору і запаху можуть імітувати будь-який білковий продукт. Таким способом вже отримані штучне м'ясо (яловичина, свинина, різні види птахів), молоко, сири та інші продукти. Вони вже пройшли широку біологічну апробацію на тваринах і людях і вийшли з лабораторій на прилавки магазинів США, Англії, Індії, країн Азії та Африки. Тільки в одній Англії їх виробництво досягає приблизно 1500 тонн за рік. Цікаво, що білкову частину шкільних обідів в США вже дозволено на 30 відсотків замінювати штучним

м'ясом, створеним на основі соєвого білка.

Штучне м'ясо, яке використовується у харчуванні хворих Ричмондського госпіталю (США) отримало високу оцінку головного дієтолога. Правда, коли хворим давали антрекот зі штучного м'яса, вони скаржилися на його набряковість, хоча і не знали і навіть не здогадувалися про те, що отримували не природний продукт. А коли м'ясо подавалося у вигляді дрібно нарізаних шматочків, нарікань не було. Обслуговуючий персонал також вживав штучне м'ясо, не здогадуючись про підробку. Вони сприймали його як натуральну яловичину. Лікарі госпіталю відзначали також позитивний вплив раціону на здоров'я пацієнтів і особливо хворих на атеросклероз. До складу такого м'яса обов'язково включають спеціально оброблений штучний білок, невелика кількість яєчного альбуміну, жири, вітаміни, мінеральні солі, природні барвники, ароматизатори та інше, що дає можливість «ліпити» виріб із заданими властивостями, враховуючи при цьому фізіологічні особливості організму, для якого продукт призначений. Це особливо важливо в дієті дітей і людей похилого віку, хворих і видужуючих, коли необхідно лімітувати харчування за цілим рядом харчових компонентів, що дуже важко зробити, використовуючи традиційні продукти. Таке м'ясо можна різати, заморожувати, консервувати, сушити або прямо використовувати для приготування різних страв.

З 20 амінокислот, що входять до складу білків, 8 амінокислот люди не можуть синтезувати, і їх відносять до незамінних. Це ізолейцин, лейцин, лізин, метіонін, треонін, триптофан, валін, фенілаланін. Амінокислоти - це не тільки поживні речовини, але також ароматичні та смакові агенти, і тому вони широко використовуються в харчовій промисловості. Як харчову добавку в їжу найчастіше вносять лізин і метіонін. Глутамат натрію і гліцин вживають як ароматичні речовини для посилення і поліпшення смаку їжі. У гліцині освіжаючий, солодкий смак. Його вводять в солодкі напої, і крім того, він проявляє там бактеріостатичну дію. Цистеїн запобігає подгоранню їжі, покращує пекарські процеси і якість хліба. Завдяки деяким бактеріям

вдається отримувати близько 100 г/л глютамінової амінокислоти. Щорічно в світі виробляють мікробіологічними способом 270 000 т цієї амінокислоти, основна частина якої йде в харчову промисловість. За обсягом продукції друге місце після глютамінової кислоти займає лізин - 180 000 т за рік. Інші амінокислоти виробляють в набагато менших кількостях. Амінокислоти у великій кількості застосовують як добавку до рослинних кормів, які дефіцитні за метіоніном, треоніном, триптофаном і особливо за лізином. Якщо в тваринних білках міститься 7-9% лізину, то в білках пшениці - тільки близько 3%. Внесення до корму лізину у кількості 0,3% дозволяє скоротити його витрату більше ніж на 20%. За останні 8 років кількість амінокислот, що додаються до корму, зросла в 14 разів. У багатьох країнах метіонін додають до соєвого борошна - білкової добавки кормів. Головна область практичного застосування амінокислот - збагачення кормів. Близько 66% загальної кількості амінокислот, одержуваних у промисловості, використовують у кормах, 31% - в їжі і 4% - в медицині, косметиці і як хімічні реактиви. На основі амінокислот готують штучний підсолоджувач - метиловий ефір L-аспартил-L-фенілаланіну, який в 150 разів солодший, ніж глюкоза.

8. Біотехнологія молочних продуктів

Спектр продуктів харчування, які отримані за допомогою мікроорганізмів, широкий. Це продукти, які одержані в результаті бродіння - хліб, сир, вино, пиво, творог тощо. До недавнього часу біотехнологія використовувалася в харчовій промисловості з метою удосконалення освоєних процесів і більш вмілого використання мікроорганізмів, але майбутнє тут належить генетичним дослідженням щодо створення більш продуктивних штамів для конкретних потреб, впровадження нових методів у технології бродіння.

Отримання молочних продуктів в харчовій промисловості побудоване на процесах ферментації. Основою біотехнології молочних продуктів є

молоко.

Молоко (секрет молочних залоз) - унікальне природне живильне середовище. Воно містить 82-88% води і 12-18% сухого залишку. До складу сухого молочного залишку входять білки (3,0-3,2%), жири (3,3-6,0%), вуглеводи (молочний цукор лактоза - 4,7%), солі (0,9-1%), міnorні компоненти (0,01%): ферменти, імуноглобуліни, лізоцим і т.д. Молочні жири дуже різноманітні за своїм складом. Основні білки молока - альбумін, казеїн. Завдяки такому складу молоко являє собою прекрасний субстрат для розвитку мікроорганізмів. У сквашуванні молока зазвичай беруть участь стрептококи та молочнокислі бактерії. Шляхом використання реакцій, які супроводжують головному процесу зброджування лактози отримують і інші продукти переробки молока: сметану, йогурт, сир і т.д. Властивості кінцевого продукту залежать від характеру та інтенсивності реакцій ферментації. Ті реакції, які супроводжують утворення молочної кислоти, визначають зазвичай особливі властивості продуктів. Наприклад, вторинні реакції ферментації, що йдуть при дозріванні сирів, визначають смак окремих їх сортів. У таких реакціях беруть участь пептиди, амінокислоти і жирні кислоти, що знаходяться в молоці.

Всі технологічні процеси виробництва продуктів з молока діляться на дві частини: 1) первинна переробка - знищення побічної мікрофлори; 2) вторинна переробка.

Первинна переробка молока включає в себе кілька етапів. Спочатку молоко очищається від механічних домішок і охолоджується, щоб уповільнити розвиток природної мікрофлори. Потім молоко сепарується (при виробництві вершків) або гомогенізується. Після цього проводять пастеризацію молока, при цьому температура піднімається до 80°C, і воно закачується в танки або ферментери.

Вторинна переробка молока може йти двома шляхами: з використанням мікроорганізмів і з використанням ферментів. З використанням мікроорганізмів випускають кефір, сметану, сир, кисляк,

казеїн, біофруктолакт, біолакт, з використанням ферментів - харчовий гідролізат казеїну, суху молочну суміш для коктейлів тощо. При внесенні мікроорганізмів в молоко лактоза гідролізується до глюкози і галактози, глюкоза перетворюється в молочну кислоту, кислотність молока підвищується, і при рН 4-6 казеїн коагулює. Молочнокисле бродіння буває гомоферментативним і гетероферментативним.

При гомоферментативному бродінні основним продуктом є молочна кислота. При гетероферментативному бродінні утворюються діацетил (що додає смак вершковому маслу), спирти, ефіри, леткі жирні кислоти. Одночасно йдуть протеолітичні і ліполітичні процеси, що робить білки молока більш доступними і збагачує додатковими смаковими речовинами. Для процесів ферментації молока використовуються чисті культури мікроорганізмів, так звані закваски. Виняток становлять закваски для кефірів, які представляють природний симбіоз декількох видів молочнокислих грибків і молочнокислих бактерій. Цей симбіоз в лабораторних умовах відтворити не вдалося, тому підтримується культура, виділена з природних джерел.

При підборі культур для заквасок дотримуються наступних вимог:

- Склад заквасок залежить від кінцевого продукту (наприклад, для отримання ацидофіліну використовується ацидофільна паличка, для виробництва кисляку - молочнокислі стрептококи);
- Штами повинні відповідати певним смаковим вимогам;
- Продукти повинні мати відповідну консистенцію, від крупинчастої до в'язкої, сметаноподібної;
- Певна активність кислотоутворення;
- Фагорезистентних штамів (стійкість до бактеріофагів);
- Здатність до синерезису (властивості згустку віддавати вологу);
- Утворення ароматичних речовин;
- Сполучуваність штамів (без антагонізму між культурами);
- Наявність антибіотичних властивостей, тобто бактеріостатична дія по

відношенню до патогенних мікроорганізмів;

- Стійкість до висушування.

Культури для заквасок виділяються з природних джерел, після чого проводиться спрямований мутагенез та відбір штамів, які відповідають перерахованим вище вимогам.

Біотехнології на основі молока включають, як правило, всі основні стадії біотехнологічного виробництва, які можна розглянути на прикладі сироваріння. Виробництво сиру, або сироваріння (сироваріння) - один з найдавніших процесів, заснованих на ферментації. Сири бувають найрізноманітніші - від м'яких до твердих. М'які сири містять багато води, 50-60%, а тверді - мало, 13-34%. На першому етапі йде підготовка молока (первинна обробка). На другому - готується культура молочнокислих бактерій. Мікроорганізми підбираються в певній пропорції, що забезпечує найкращу якість. Набір бактерій також залежить від температури термообробки. Третя стадія - стадія ферментації, - в сироварінні в деяких випадках відбувається в 2 етапи, до і після стадії виділення. Спочатку молоко інокують певними штамми мікроорганізмів, що приводить до утворення молочної кислоти, а також додають сичужний фермент ренін. Ренін прискорює перетворення рідкого молока в згусток (створожування) в кілька разів. Ця реакція активується молочною кислотою, що виробляється бактеріями. Функції реніну можуть виконувати й інші протеїнази, але ренін також бере участь у процесах протеолізу, що відбуваються в сирі при дозріванні.

Після утворення згустку сироватку відокремлюють, а отриману сирнисту масу піддають термообробці і пресують у формах. Далі згусток солять і ставлять на дозрівання. Іноді отримана маса піддіється додатковій обробці, яка полягає в наступному: зараження спорами блакитних цвілевих грибів при виробництві рокфору; нанесення на поверхню білих цвілевих грибів при виробництві камамберу і брі; нанесення бактерій, необхідних для дозрівання деяких сирів. Деякі сири після виділення повинні піддатися

подальшої ферментації (стадія дозрівання). Мікроорганізми і ферменти в ході цього процесу гідролізують жири, білки і деякі інші речовини молодого сиру. В результаті їх розпаду утворюються речовини, що додають сирам характерний смак.

Процеси ферментації при виробництві багатьох молочних продуктів, таких як сметана, сир йдуть в ферментерах відкритого типу. Як правило, вони займають небагато часу. До одних з найпростіших відносять виробництво кефіру, кислого молока, сметани і масла. Наприклад, при виробництві сметани до вершків додають 0,5-1% закваски, яка використовується при виробництві масла. Далі продукт витримують, поки концентрація кислоти не досягне 0,6%.

На закінчення хотілося б додати, що процеси отримання молочнокислих продуктів дуже прості та доступні для відтворення в домашніх умовах. Вони не вимагають суворих умов дотримання стерильності, протікають, як правило, при кімнатній або трохи підвищеній температурі. Власне, спочатку вони були одними з перших "домашніх" біотехнологій, які були пізніше поставлені на промислову основу.

Контрольні питання:

1. Що таке біометаногенез? Коли і ким він був відкритий?
2. Опишіть три етапи метаногенезу.
3. Яким чином відбувається «метанове бродіння»? Вкажіть умови «метанового бродіння».
4. Поширеність біогазових установок у світі та ефективність їх виробництва.
5. Вкажіть ефективність виробництва біогазу із відходів його переваги.
6. Вкажіть найбільших країн-виробників спирту.
7. Вкажіть групи побутових відходів.
8. Охарактеризуйте мету очищення стічних вод. За рахунок яких бактерій цю мету можливо реалізувати?

9. Перерахуйте методи очищення стічних вод.
10. Що таке біологічна азотфіксація? За рахунок яких бактерій вона здійснюється?
11. Що таке мікробні інсектициди?
12. Яке значення біотехнології у тваринництві?
13. Що таке біогеотехнологія? Яка історія її розвитку, видатні вчені?
14. В чому полягає суть біогеотехнології вилужування металів?
15. Що таке біогеотехнологія дефульсуризації вугілля? Яка її суть, значення?
16. Яка суть біотехнології і боротьби з метаногенезом у вугільних шахтах?
17. Яка суть біотехнології і підвищення нафтовіддачі пластів?
18. Яке значення біоелектроніки? Її продукція.
19. Що таке антибіотики, їх значення та виробництво?
20. Значення виробництва амінокислот в медицині.
21. Значення використання зеленої водорості у медицині.
22. Значення використання ферментних препаратів у медицині.
23. Значення використання мутантних штамів у медицині.
24. Яка ситуація у світі із забезпеченням людства продуктами харчування? Прогнози на майбутнє.
25. Мікробіальний синтез білку, його перспективи.
26. Значення використання амінокислот у харчовій промисловості.
27. Вкажіть продукти біотехнологічних процесів молока.
28. Які відомі частини технологічного процесу виробництва молока?
29. Вкажіть вимоги при підборі культур для заквасок.
30. Опишіть стадії процесу виробництва сирів.

ЛЕКЦІЯ № 7

ТЕХНОЛОГІЯ ВИРОБНИЦТВА БІЛКУ МІКРООРГАНІЗМІВ ТА МІКРОБНИХ ЛІПІДІВ

Питання:

1. Продуценти білку
 2. Субстрати для культивування мікроорганізмів з метою отримання білку
 3. Технологія отримання мікробних ліпідів
-

1. Продуценти білку

Виробництво мікробної біомаси - найбільше мікробіологічне виробництво. Мікробна біомаса може бути доброю білковою добавкою для домашніх тварин, птахів і риб. Виробництво мікробної біомаси особливо важливо для країн, що не культивують у великих масштабах сою (соєве борошно використовують як традиційну білкову добавку до кормів). При виборі мікроорганізму враховують питому швидкість росту і вихід біомаси на даному субстраті, стабільність при потоковому культивуванні, величину клітин. Клітини дріжджів крупніші, ніж бактерій, і легше відокремлюються від рідини при центрифугуванні. Можна вирощувати поліплоїдні мутанти дріжджів з великими клітинами.

В даний час відомі тільки дві групи мікроорганізмів, яким притаманні властивості, необхідні для великомасштабного промислового виробництва: це дріжджі роду *Candida* на n-алканах (нормальних вуглеводнях) і бактерії *Methylophilus methylotrophus* на метанолі. Мікроорганізми можна вирощувати і на інших поживних середовищах: на газах, нафті, відходах вугільної, хімічної, харчової, винно-горілчаної, деревообробної промисловості. Економічні переваги їх використання очевидні.

Так, кілограм переробленої мікроорганізмами нафти дає кілограм білку, а, скажімо, кілограм цукру - всього 500 грамів білку. Амінокислотний склад білка дріжджів практично не відрізняється від такого, отриманого з мікроорганізмів, вирощених на звичайних вуглеводних середовищах. Біологічні випробування препаратів з дріжджів, вирощених на вуглеводнях, які проведені і у нас в країні і за кордоном, виявили повну відсутність у них будь-якого шкідливого впливу на організм піддослідних тварин. Досліди були проведені на багатьох поколіннях десятків тисяч лабораторних і сільськогосподарських тварин. У непереробленому вигляді дріжджі містять неспецифічні ліпіди та амінокислоти, біогенні аміни, полісахариди і нуклеїнові кислоти, а їх вплив на організм поки ще погано вивчений. Тому і пропонується виділяти з дріжджів білок в хімічно чистому вигляді. Звільнення його від нуклеїнових кислот також вже стало нескладним. У сучасних біотехнологічних процесах, заснованих на використанні мікроорганізмів, продуцентами білка служать дріжджі, інші гриби, бактерії і мікроскопічні водорості. З технологічної точки зору найкращими з них є дріжджі. Їх перевага полягає насамперед у "технологічності": дріжджі легко вирощувати в умовах виробництва. Вони характеризуються високою швидкістю росту, стійкістю до сторонньої мікрофлори, здатні засвоювати будь-які джерела живлення, легко відділяються, не забруднюють повітря спорами. Клітини дріжджів містять до 25% сухих речовин.

Найбільш цінний компонент дріжджової біомаси - білок, який за складом амінокислот перевершує білок зерна злакових культур і лише трохи поступається білкам молока і рибного борошна. Біологічна цінність дріжджового білка визначається наявністю значної кількості незамінних амінокислот. За вмістом вітамінів дріжджі перевершують всі білкові корми, в тому числі і рибне борошно. Крім того, дріжджові клітини містять мікроелементи і значну кількість жиру, в якому переважають ненасичені жирні кислоти. При згодовуванні кормових дріжджів коровам підвищуються надої і вміст жиру в молоці, а у хутрових звірів поліпшується якість хутра.

Інтерес представляють і дріжджі, що володіють гідролітичними ферментами і здатні рости на полісахаридах без їх попереднього гідролізу. Використання таких дріжджів дозволить уникнути дорогої стадії гідролізу поліцукровмісних відходів. Відомо більше 100 видів дріжджів, які добре ростуть на крохмалі як на єдиному джерелі вуглецю. Серед них особливо виділяються два види, які утворюють як глюкоамілази, так і β -амілази, ростуть на крохмалі з високим економічним коефіцієнтом і можуть не тільки асимілювати, але і зброджувати крохмаль: *Schwanniomyces occidentalis* і *Saccharomycopsis fibuliger*. Обидва види - перспективні продуценти білку і амілолітичних ферментів на крохмальовмісних відходах. Ведуться пошуки і таких дріжджів, які могли б розщеплювати нативну целюлозу. Целюлази виявлені у кількох видів, наприклад у *Trichosporon pullulans*, однак активність цих ферментів низька і про промислове використання таких дріжджів говорити поки не доводиться.

Дріжджі з роду *Kluyveromyces* добре ростуть на інуліні - основній запасній речовині в бульбах топінамбура - важливої кормової культури, яка також може бути використана для отримання дріжджового білку.

Останнім часом в якості продуцентів білку стали використовувати бактерії, які відрізняються високою швидкістю росту і містять в біомасі до 80% білку. Бактерії добре піддаються селекції, що дозволяє отримувати високопродуктивні штами. Їх недоліками є важка осаджуваність, обумовлена малими розмірами клітин, значна чутливість до фагів інфекцій і високий вміст в біомасі нуклеїнових кислот. Остання обставина несприятлива тільки в тому випадку, якщо передбачається харчове використання продукту. Знижувати вміст нуклеїнових кислот в біомасі, що вживається як корм тваринам, немає необхідності, тому що сечова кислота і її солі, що утворюються при руйнуванні азотистих основ, перетворюються в організмі тварин в *алантоїн*, який легко виділяється з сечею. У людини надлишок солей сечової кислоти може сприяти розвитку ряду захворювань.

Наступну групу продуцентів білка складають гриби. Вони привертають увагу дослідників завдяки здатності утилізувати найрізноманітніші за складом органічну сировину: мелясу, молочну сироватку, сік рослин і коренеплодів, лігнін- і целюлозовмісні тверді відходи харчової, деревообробної, гідролісної промисловості. Грибний міцелій багатий білковими речовинами, які за вмістом незамінних амінокислот найближчі до білків сої. Разом з тим білок грибів багатий на лізин, основною амінокислотою, відсутньої в білку зернових культур. Це дозволяє на основі зерна і грибної біомаси складати збалансовані харчові та кормові суміші. Грибні білки мають досить високу біологічну цінність і добре засвоюються організмом. Позитивним фактором є і волокниста будова вирощеної культури. Це дозволяє імітувати текстуру м'яса, а за допомогою різних добавок - його колір і запах. Зберігають грибний міцелій зазвичай в замороженому вигляді. Як субстрат грибам використовуються глюкозу та інші поживні речовини, а спільним джерелом азоту слугує аміак і амонійні солі. Після завершення стадії ферментації культуру піддають термообробці для зменшення вмісту рибонуклеїнової кислоти, а потім відділяють міцелій методом вакуумного фільтрування.

Джерелами білкових речовин можуть служити і водорості. При фототрофному способі харчування та утворення біомаси вони використовують вуглекислий газ атмосфери. Вирощують водорості, як правило, в поверхневому шарі ставків, де з площі 0,1 га можна отримати стільки ж білка, скільки з 14 га посівів квасолі. Білок водоростей придатний не тільки для кормових, але і харчових цілей. Нарешті, добрими продуцентами білка є Ряска, яка накопичує протеїну до 45% від сухої маси, а також до 45% вуглеводів. Однак, незважаючи на свої малі розміри, вони не належать до перерахованих вище виробникам білку (мікроорганізмам), так як не тільки є багатоклітинними організмами, але і відносяться до вищих рослин.

2. Субстрати для культивування мікроорганізмів з метою отримання білку

В якості джерел речовини і енергії мікроорганізми використовують найрізноманітніші субстрати - нормальні парафіни і дистиляти нафти, природний газ, спирти, рослинні гідролізати і відходи промислових підприємств. Для вирощування мікроорганізмів з метою отримання білку добре б мати багатий вуглецем, але дешевий субстрат. Цій вимозі цілком відповідають нормальні (нерозгалужені) парафіни нафти. Вихід біомаси може досягати при їх використанні до 100% від маси субстрату. Якість продукту залежить від ступеня чистоти парафінів. При використанні парафінів достатнього ступеня очищення, отримана дріжджова маса може успішно застосовуватися в якості додаткового джерела білка в раціонах тварин. Перший у світі великий завод кормових дріжджів потужністю 70 000 т. за рік. був запущений в 1973 р в СРСР. В якості сировини на ньому використовували виділені з нафти алкани і кілька видів дріжджів, здатних до швидкого росту на вуглеводнях: *Candida maltosa*, *Candida guilliermondii*, *Candida lipolytica*.

Надалі саме відходи від переробки нафти служили головною сировиною для виробництва дріжджового білку, яке швидко зростало і до середини 80-х рр. перевищило 1 млн. т. за рік, причому в СРСР кормового білка отримували вдвічі більше, ніж у всіх інших країнах світу, разом узятих. Проте в подальшому масштаби виробництва дріжджового білка на вуглеводнях нафти різко скоротилися. Це відбулося як внаслідок економічної кризи 90-х рр., так і з-за цілого ряду специфічних проблем, з якими пов'язане це виробництво. Одна з них - необхідність очищення готового кормового продукту від залишків нафти, що мають канцерогенні властивості. У нашій країні мало районів, придатних для вирощування сої, що є основним джерелом білкових добавок. Тому налагоджено великотоннажне

виробництво кормових дріжджів на n-парафіну. Діє кілька заводів потужністю від 70 до 240 тис. тонн за рік.

Сировиною служать рідкі очищені парафіни. Одним з перспективних джерел вуглецю для культивування продуцентів білка високої якості вважається *метиловий спирт*. Його можна отримувати методом мікробного синтезу на таких субстратах, як деревина, солома, міські відходи. Використання метанолу в якості субстрату ускладнене через його хімічну структуру: молекула метанолу містить один атом вуглецю, тоді як синтез більшості органічних сполук здійснюється через двовуглецеву молекулу. На метанолі як на єдиному джерелі вуглецю та енергії здатні рости близько 25 видів дріжджів, в тому числі *Pichia polymorpha*, *Pichia anomala*, *Yarrowia lipolytica*.

Найкращими продуцентами на цьому субстраті вважаються *бактерії*, тому що вони можуть рости на метанолі з додаванням мінеральних солей. Процеси отримання білка на метанолі досить економічні. За даними концерну Ай-Сі-Ай (Великобританія), собівартість продукту, виробленого на метанолі, на 10-15% нижча, ніж при аналогічному виробництві, що базується на основі високоочищених n-парафінів. Високобілкові продукти з метанолу одержують фірми ряду розвинених країн світу: Великобританії, Швеції, Німеччини, США, Італії. Продуцентами білка слугують бактерії роду *Methylomonas*. Вирощування на метанолі метилотрофних бактерій, таких як *Methylophilus methylotrophus*, вигідне, так як вони використовують одно вуглецеві сполуки більш ефективно. При зрості на метанолі бактерії дають більше біомаси, ніж дріжджі. Перша реакція окислення метанолу у дріжджів каталізується оксидазою, а у метилотрофних прокариот - дегідрогеназою. Ведуться генно-інженерні роботи щодо перенесення гена метанолдегідрогеназою з бактерій в дріжджі. Це дозволить об'єднати технологічні переваги дріжджів з ефективністю росту бактерій. Використання етанолу як субстрату знімає проблему очищення біомаси від аномальних продуктів обміну з непарним числом вуглецевих атомів. Вартість

такого виробництва трохи вища. Біомасу на основі етанолу виробляють в Чехословаччині, Іспанії, Німеччині, Японії, США.

У США, Японії, Канаді, ФРН, Великобританії розроблені технологічні процеси отримання білка на природному газі. Вихід біомаси в цьому випадку може становити 66% від маси субстрату. В розробленому у Великобританії процесі використовується змішана культура: бактерії *Methylobionas*, що засвоюють метан, *Hypomicrobium i Pseudomonas*, що засвоюють метанол, і два види неметилотрофних бактерій. Культура характеризується високою швидкістю росту і продуктивністю. Головні переваги метану (до речі сказати, основного компонента природного газу) - доступність, відносно низька вартість, висока ефективність перетворення в біомасу метанооисними мікроорганізмами, значний вміст в біомасі білку, збалансованого за амінокислотним складом. Бактерії, що ростуть на метані добре переносять кисле середовище і високі температури, у зв'язку з чим стійкі до інфекцій. Субстратом для мікробного синтезу може бути і мінеральний вуглець - вуглекислий газ. Окислений вуглець в даному випадку з успіхом відновлюється мікрободоростями за допомогою сонячної енергії та воднеокислюючими бактеріями за допомогою водню.

На корм худобі використовують суспензію водоростей. Для роботи установок з вирощування водоростей необхідні стабільні кліматичні умови - постійні температури повітря та інтенсивність сонячного світла. Найбільш перспективне отримання білку за допомогою воднеокислюючих бактерій, які розвиваються за рахунок окислення водню киснем повітря. Енергія, що вивільняється в цьому процесі, йде на засвоєння вуглекислого газу. Для отримання біомаси використовуються, як правило, бактерії роду *Hydrogenomonas*. Спочатку інтерес до них виник при розробці замкнених систем життєзабезпечення, а потім їх стали вивчати з точки зору використання в якості продуцентів високоякісного білку.

В інституті мікробіології Геттінгенського університету (Німеччина) розроблений спосіб культивування воднеокислюючих бактерій, при якому

можна отримувати 20 г сухої речовини на 1 літр суспензії клітин. Можливо, в майбутньому ці бактерії стануть основним джерелом харчових мікробних білків.

Виключно доступним і досить дешевим джерелом вуглеводів для виробництва мікробного білка є рослинна біомаса. Будь-яка рослина містить різноманітні цукри. Целюлоза - полісахарид, що складається з молекул глюкози. Геміцелюлоза складається із залишків арабінози, галактози, манози, фруктози. Проблема в тому, що полісахариди деревини пов'язані жорсткими оксіфенілпропановими ланками лігніну - полімеру, який майже не піддається руйнуванню. Тому гідроліз деревини відбувається тільки в присутності каталізатора - мінеральної кислоти і при високих температурах. При цьому утворюються моноцукри - гексози і пентози. На рідкій, що містить цукор, фракції гідролізату вирощують дріжджі. При кислотному гідролізі деревини утворюється ряд побічних продуктів (фурфурол, меланіни), а через високі температури може відбутися карамелізація цукрів. Ці речовини перешкоджають нормальному росту дріжджів, їх відділяють від гідролізату і за можливостю використовують. Як продуцентів використовують штами *Candida scotti* і *C.tropicalis*.

Найбільш великим виробником сировини для гідролізної промисловості є деревообробні підприємства, відходи яких досягають щорічно десятки мільйонів тонн. На жаль, нерационально або не використовуються взагалі відходи виробництва луб'яних волокон (з льону та коноплі), картопельнокрахмального виробництва, пивоварної, плодоовочевої, консервної промисловості, буряковий жом. Особливої уваги заслуговують способи прямої біоконверсії продуктів фотосинтезу та їх похідних в білок за допомогою грибів. Ці організми завдяки наявності потужних ферментних систем здатні утилізувати складні рослинні субстрати без попередньої обробки. Дослідження умов біоконверсії рослинних субстратів в мікробний білок активно ведуться в США, Канаді, Індії, Фінляндії, Швеції, Великобританії, в нашій країні та інших країнах світу. Однак в літературі

відомості про широкомасштабне виробництво білків мікробного походження нечисленні.

Найбільш відомим і доведеним до стадії промислової реалізації є процес "Ватерлоо", розроблений в університеті Ватерлоо в Канаді. Цей процес, заснований на вирощуванні целюлозоруйнуючих грибів *Chaetomium cellulolyticum*, можна здійснювати як у глибинній культурі, так і поверхневим методом. Вміст білка в кінцевому продукті (висушеному грибному міцелії) становить 45%.

Фінська фірма "Тампелла" розробила технологію і організувала виробництво білкового кормового продукту "Пекіло" на відходах целюлозно-паперового виробництва. Продукт містить до 60% протеїну з добрим амінокислотним профілем і значна кількість вітамінів групи В.

У більшості країн - виробників молока традиційним способом утилізації сироватки є згодовування її тваринам. Ступінь конверсії білку сироватки в білок тваринного походження дуже невисока (для вироблення 1 кг тваринного білка необхідно 1700 кг сироватки). В останні 10-15 років із сироватки методом ультрафільтрації виділяють білки високої якості, на основі яких роблять замінники сухого знежиреного молока та інші продукти. Концентрати можна використовувати як харчові добавки і компоненти дитячого харчування. З сироватки виробляється і молочний цукор - лактоза, яка застосовується в харчовій і медичній промисловості. При всьому при цьому обсяг промислової переробки сироватки становить 50-60% від її загального виробництва. Отже, в наявності великі втрати найціннішого молочного білку і лактози. Більш того, виникає проблема утилізації відходів, так як процес природного розкладання сироватки відбувається вкрай повільно. Лактоза молочної сироватки може слугувати джерелом енергії для багатьох видів мікроорганізмів, сировиною для виробництва продуктів мікробного синтезу (органічних кислот, ферментів, спиртів, вітамінів) і білкової біомаси.

З усіх відомих мікроорганізмів найвищим коефіцієнтом конверсії білку сироватки в мікробний білок володіють дріжджі. Здатність до асиміляції лактози є приблизно у 20% всіх відомих видів дріжджів. Набагато рідше зустрічаються дріжджі, які зброджують лактозу. Активний катаболізм лактози особливо характерний для дріжджів з роду *Kluyveromyces*. Ці дріжджі можна використовувати для отримання на молочній сироватці кормового білка, етанолу, препаратів β -глюкозидази. Вперше дріжджі на молочній сироватці стали вирощувати в Німеччині. Як продуцентів застосовували різні штами цукроміцетів. Розроблено способи одержання мікробних продуктів, засновані на використанні лактози як монокультури, так і сумішшю дріжджів і бактерій. В даний час в якості продуцентів використовують дріжджі родів *Candida*, *Trichosporon*, *Torulopsis*. Молочна сироватка з дріжджами, які в ній виростили за біологічної цінністю значно перевершує вихідну сировину і її можна використовувати як замітник молока. Наведений перелік мікроорганізмів і процесів одержання білка одноклітинних не є вичерпним. Однак потенціал цієї нової галузі виробництва використовується далеко не повністю. Крім того, ми ще не знаємо всіх можливостей діяльності мікроорганізмів в якості продуцентів білка, але в міру поглиблення наших знань, вони будуть розширені.

3. Технологія отримання мікробних ліпідів

Під ліпідами маються розуміють всі розчинні в неполярних розчинниках клітинні компоненти мікроорганізмів. В даний час ведуться пошуки нових джерел отримання жирів, у тому числі і на технічні потреби. Цим джерелом можуть стати мікроорганізми, ліпіди яких після відповідної обробки придатні для використання в різних галузях промисловості: медичній, хіміко-фармакоцевтичній, лакофарбовій, шинній та інших, що дозволить вивільнити значні кількості масел тваринного і рослинного походження. Технологічний процес отримання мікробних ліпідів, на відміну

від отримання білкових речовин, обов'язково включає стадію виділення ліпідів з клітинної маси методом екстракції в неполярному розчиннику (бензині або ефірі). При цьому отримують одночасно два готових продукти: мікробний жир (біожір) і знежирений білковий препарат (біошрот). Сировиною для цього процесу є ті ж середовища, що і для виробництва кормової біомаси. У процесі культивування мікроорганізмів на різних середовищах виходять три класи ліпідів: прості, складні ліпіди та їх похідні.

Прості ліпіди - нейтральні жири і воски. Нейтральні жири (основні запасні компоненти клітини) - ефіри гліцерину і жирних кислот, основна маса яких триацилгліцериди (є, втім ще й моно- і дигліцериди). Воски - ефіри жирних кислот або монооксікислот і аліфатичних спиртів з довгим вуглецевим ланцюгом. За структурою і властивостями близькі до нейтральних ліпідів. Найбільша кількість нейтральних ліпідів синтезують дріжджі і міцеліальні гриби. Прості ліпіди знаходять застосування як технологічні мастила в процесах холодної та теплової обробки металів.

Продуктами складних ліпідів є в основному бактерії. Складні ліпіди діляться на дві групи: фосфоліпіди і гліколіпіди. Фосфоліпіди (фосфогліцеридов і сфінголіпіди) входять до складу різних клітинних мембран і беруть участь у перенесенні електронів. Їх молекули полярні і при рН 7,0 фосфатна група несе негативний заряд. Концентрат фосфоліпідів знаходить застосування в якості антикорозійної присадки до масел і як добавка при флотації різних мінералів. Гліколіпіди на відміну від фосфоліпідів не містять молекули фосфорної кислоти, але також є сильно полярними сполуками за рахунок наявності в молекулі гідрофільних вуглеводних груп (залишків глюкози, манози, галактози та ін.). До похідних ліпідів відносять жирні кислоти, спирти, вуглеводні, вітаміни Д, Е та К. Жирні кислоти представлені насиченими і ненасиченими з одним подвійним зв'язком кислотами нормальної будови і парним числом вуглецевих атомів (пальмітинова, стеаринова, олеїнова). Серед дієнових жирних кислот можна виділити лінолеву. Подвійні зв'язки в ненасичених жирних кислотах

мікробних ліпідів часто розташовуються так, що ділять їх на частини, число вуглецевих атомів в яких кратне трьом. Очищені монокарбонові кислоти з числом вуглецевих атомів 14-18 знаходять широке застосування в миловарній, шинній, хімічній, лакофарбовій та інших галузях промисловості. Спирти, присутні в ліпідах, діляться на три групи: спирти з прямим ланцюгом, спирти з β -іонним кільцем, що включають вітамін А і каротиноїди, а також стерини - компоненти неоміляємій частини ліпідів (наприклад, ергостерин, опромінення якого ультрафіолетовим світлом дозволяє отримувати вітамін D_2).

Мікроорганізми - продуценти ліпідів.

Для промислового використання важливе значення має здатність посилено накопичувати ліпіди. Цією здатністю володіють деякі мікроорганізми, в першу чергу дріжджі. *Процес утворення ліпідів у більшості дріжджів складається з двох чітко розмежованих стадій:*

- Перша характеризується швидким утворенням білка в умовах посиленого постачання культури азотом і супроводжується повільним накопиченням ліпідів (в основному гліцерофосфатів і нейтральних жирів);

- Друга - припиненням зростання дріжджів і посиленням накопиченням ліпідів (в основному нейтральних). Типовими утворювачами ліпідів є дріжджі *Cryptococcus terricolus*. Вони можуть синтезувати велику кількість ліпідів (до 60% від сухої маси) в будь-яких умовах, навіть найбільш сприятливих для синтезу білку. З інших утворювачів ліпідів - промисловий інтерес представляють дріжджі *C.guilliermondii*, що утилізують алкани. Вони синтезують в основному фосфоліпіди. Накопичують великі кількості ліпідів і активно розвиваються на вуглеводних субстратах (на мелясі, гідролізатах торфу і деревини) також дріжджі видів *Lipomyces lipoferus* і *Rhodotorula gracilis*. У цих видів дріжджів ліпогенез сильно залежить від умов культивування. Ці продуценти накопичують значні кількості (до 70%) триацилгліцеридів. Мікроскопічні гриби поки не набули великого поширення

в отриманні ліпідів, хоча жир грибів за своїм складом близький до рослинного. Вихід жирів у *Asp.terreus*, наприклад, на вуглеводних середовищах досягає 51% від абсолютно сухої ваги (АСВ). Ліпідний склад грибів представлений в основному нейтральними жирами і фосфоліпідами.

Ліпіди, синтезовані бактеріями, своєрідні за своїм складом, тому що включають в основному складні ліпіди, тоді як нейтральні жири становлять незначну частину біомаси. При цьому бактерії виробляють різноманітні жирні кислоти (що містять від 10 до 20 атомів вуглецю), що важливо для промислового отримання специфічних жирних кислот.

Водорості перспективні для культивування в якості ліпідуютьовачів, так як не потребують органічного джерела вуглецю. Хімічний склад (співвідношення білків і жирів) водоростей також сильно варіює залежно від вмісту в середовищі азоту. Недоліки - мала швидкість росту і накопичення токсичних сполук у клітинах, - обмежують промислове застосування.

Поживні середовища для отримання ліпідів.

Отже, основну роль в процесі біосинтезу ліпідів грають різні штами дріжджів. Вони використовують ті ж джерела сировини, що і для одержання кормового білку, причому від цінності вуглецевого живлення залежать вихід біомаси, кількість і склад синтезованих ліпідів. Для забезпечення спрямованого біосинтезу ліпідів в живильному середовищі вживаються легкоасимілюючі джерела азоту. На зрушення біосинтезу в бік утворення ліпідів або білка впливає співвідношення вуглецю та азоту в середовищі.

Так, підвищення концентрації азоту викликає зниження ліпідуютьоврення, а недолік азоту при забезпеченості вуглецем веде до зниження виходу білкових речовин і високому процентному вмісту жиру. Встановлено, що для вуглеводневої сировини співвідношення N: C = 1:30, 1:40. Накопичення ліпідів можливе лише за наявності в середовищі фосфору. При його недоліку джерела вуглецю використовуються не повністю, при

надлишку - накопичуються неліпідні продукти. На фракційний склад ліпідів зміна вмісту фосфору впливу не робить.

Вплив інших елементів середовища (мікро- і макроелементів) позначається на інтенсивності росту дріжджів і швидкості утилізації джерела вуглецю, що впливає і на кількість накопичених ліпідів, але не на їх якість.

Умови культивування.

На фракційний склад синтезованих ліпідів впливають інші умови культивування: аерація, рН і температура. Від інтенсивності аерації залежить синтез фосфогліцеридів, жирних кислот і триацилгліцеридів. При недостатній аерації ліпіди містять в 4 рази менше триацилгліцеридів, в 2 рази більше фосфогліцеридів і в 8 разів більше жирних кислот, ніж при нормальній. При інтенсифікації аерації зростає ступінь ненасиченості ліпідів і збільшується відносна кількість усіх груп ненасичених кислот. Підвищення рН середовища веде до збільшення вмісту фосфогліцеридів і жирних кислот при одночасному зниженні кількості триацилгліцеридів.

Оптимальні температури росту і ліпідоутворення для клітин збігаються, причому вміст ліпідів не залежить від температури культивування. Однак, регулюючи температуру, можна створювати різні співвідношення насичених і ненасичених жирних кислот у складі фосфоліпідних мембран. Для вуглеводних субстратів найбільш відпрацьована технологія отримання ліпідів на гідролізатах торфу і деревини. Як показали дослідження, співвідношення гідролізатів торфу і деревини 1: 4 забезпечує найбільший вихід біомаси в стадії культивування (до 10 г/л) при максимальному вмісті ліпідів (до 51% від АСВ) і високому коефіцієнті засвоєння субстрату (до 0,54). З 1 тонни абсолютно сухого торфу після його гідролізу і ферментації можна отримати 50-70 кг мікробного жиру з переважним вмістом триацилгліцеридів.

Контрольні питання:

1. Галузі використання білкової біомаси.
2. Вкажіть групи мікроорганізмів, яким притаманні властивості промислового виробництва.
3. Перевага використання дріжджів у біотехнологічних процесах.
4. Вкажіть біологічну цінність дріжджового білку.
5. Вкажіть переваги і недоліки бактерій як продуцентів білку.
6. Вкажіть переваги і недоліки грибів як продуцентів білку.
7. Вкажіть переваги і недоліки водоростей як продуцентів білку.
8. Перерахуйте види субстратів для культивування з метою отримання білку.
9. Використання метилового спирту як перспективного джерела вуглеводів для культивування продуцентів білку.
10. Вкажіть головні переваги метану.
11. Характер рослинної біомаси як джерела вуглеводів для виробництва мікробного білку.
12. На чому заснований процес «Ватерлоо»?
13. Характеристика кормового продукту «Пекіло».
14. Використання виворотки як субстрата отримання білку високої якості.
15. Галузі використання ліпідів мікроорганізмів.
16. Стадії та продукти біотехнологічного процесу утворення ліпідів.
17. Характеристика простих ліпідів.
18. Характеристика складних ліпідів.
19. Стадії процесу утворення ліпідів дріжджів.
20. Поживні середовища для отримання ліпідів.
21. Умови культивування.

ЛЕКЦІЯ № 8

ТЕХНОЛОГІЯ ФЕРМЕНТНИХ ПРЕПАРАТІВ

Питання:

1. Класифікація ферментів
 2. Глибинний метод культивування продуцентів ферментів
 3. Поверхневий метод культивування продуцентів ферментів
-

1. Класифікація ферментів

Класифікація ферментів заснована на механізмі їх дії і включає 6 класів. Ферменти як біокаталізатори мають ряд унікальних властивостей, наприклад, таких як висока каталітична активність і вибірковість дії. У ряді випадків ферменти мають абсолютну специфічність, каталізують перетворення тільки однієї речовини. Для кожного ферменту існує свій оптимум рН, при якому його каталітична дію максимальна. При різкій зміні рН ферменти інактивуються через незворотню денатурацію. Прискорення реакції при підвищенні температури також лімітовано певними межами, оскільки вже при температурі 40-50°C багато ферментів денатурують. Ці властивості ферментів доводиться враховувати при розробці технології нового препарату.

Оскільки ферменти - речовини білкової природи, в суміші з іншими білками їх кількість визначити практично неможливо. Наявність ферменту у препараті може бути встановлена лише за протіканням тієї реакції, яку каталізує фермент. При цьому кількісну оцінку вмісту ферменту можна дати, визначивши або кількість продуктів реакції, які утворилися, або кількість витраченого субстрату.

За одиницю активності ферменту приймають ту його кількість, яка каталізує перетворення одного мікромоля субстрату за 1 хвилину при

заданих стандартних умовах - стандартна одиниця активності. За рішенням Міжнародного біохімічного союзу активність вирішено визначати при $t = 30^{\circ}\text{C}$ за початковою швидкістю реакції, коли концентрація насичення ферменту і тимчасова залежність близька до кінетики реакції нульового порядку. Інші параметри реакції індивідуальні для кожного ферменту. Активність ферментного препарату виражається в мікромолях субстрату, який прореагував під дією 1 мл ферментного розчину або 1 грама препарату в оптимальних умовах за 1 хвилину. Якщо ферментний препарат не містить баласту, то його активність виражається в тих же стандартних одиницях на 1 мг ферменту. Якщо ж є баласт, то активність вважається на 1 мг білка в ферментні препарати.

Активність препарату - найважливіший нормований показник якості. Основну частину ферментів, що отримують промисловим способом, складають гідролази. До них відносяться, в першу чергу амілолітичні ферменти: α -амілаза, β -амілаза, глюкоамілаза. Їх основна функція - гідроліз крохмалю і глікогену. Крохмаль при гідролізі розщеплюється на декстрини, а потім до глюкози. Ці ферменти застосовуються в спиртовій промисловості, хлібопеченні.

Протеолітичні ферменти утворюють клас пептидгідролаз. Їх дія полягає у прискоренні гідролізу пептидних зв'язків в білках і пептидах. Важлива їх особливість - селективний характер дії на пептидні зв'язки в білковій молекулі. Наприклад, пепсин діє тільки на зв'язок з ароматичними амінокислотами, трипсин - на зв'язок між аргініном і лізином. У промисловості протеолітичні ферменти класифікують за здатністю проявляти активність у певній галузі рН: рН 1,5 – 3,7 - кислі протеази; рН 6,5 – 7,5 - протеази; рН > 8,0 - лужні протеази. Протеази знаходять найширше застосування в різних галузях промисловості: м'ясна - для пом'якшення м'яса; шкіряна - пом'якшення шкір; кіновиробництво - розчинення желатинового шару при регенерації плівок; парфумерна - добавки до зубної пасти, кремів, лосьйонів; виробництво миючих засобів - добавки для видалення забруднень

білкової природи; медицина - при лікуванні запальних процесів, тромбозів і т.д.

Пектолітичні ферменти зменшують молекулярну масу і знижують в'язкість пектинових речовин. Пектиназу поділяють на дві групи - гідролази і транселімінази. Гідралази відщеплюють метильні залишки або розривають глікозидні зв'язки. Транселімінази прискорюють негідролітичне розщеплення пектинових речовин з утворенням подвійних зв'язків. Застосовуються в текстильній промисловості (вимочування льону перед переробкою), у виноробстві - освітлення вин, а також при консервуванні фруктових соків. Целюлозолітичні ферменти дуже специфічні, їх дія проявляється в деполімеризації молекул целюлози. Зазвичай використовуються у вигляді комплексу, що призводить гідроліз целюлози до глюкози (в гідролізній промисловості). У медичній промисловості їх використовують для виділення стероїдів з рослин, у харчовій - для поліпшення якості рослинних олій, в сільському господарстві - як добавки до комбікормів для жуйних тварин.

Існує ряд факторів, які впливають на біосинтез ферментів. В першу чергу, до них відноситься генетичний. Склад і кількість синтезованих ферментів спадково детерміновані. Застосовуючи мутагени можна змінити генетичні властивості мікроорганізмів і отримати штами з цінними для промисловості властивостями. До мутагенних факторів належать іонізуюче випромінювання, ізотопи, антибіотики, інші хімічні сполуки, що перетворюють спадкові елементи клітини.

Незважаючи на визначальну роль генетичного фактора в біосинтезі ферментів, продуктивність біотехнологічних процесів залежить і від складу поживного середовища. При цьому важлива не тільки наявність джерел основних поживних речовин, але і речовин, що грають роль індукторів або репресорів біосинтезу даного конкретного ферменту або їх груп. Механізм цього явища ще цілком не вивчений, але сам факт повинен враховуватися при виборі технології. Розглянемо кілька прикладів. Фермент ліпаза майже не синтезується грибом ***Aspergillus awamori*** на середовищі без індуктора,

додавання жиру кашалота підсилює біосинтез ферменту в сотні разів. При додаванні ж у середовище крохмалю і при повному виключенні мінерального фосфору інтенсивно синтезується фосфатаза. Не тільки наявність індуктора здатна збільшувати вихід ферменту. Важливу роль відіграє склад поживного середовища та умови культивування. При розробці процесу біосинтезу α -амілази культурою *Aspergillus oryzae* заміна сахарози (як джерело вуглецю) на крохмаль збільшила активність ферменту в 3 рази, додавання солодового екстракту (з пророслого насіння злакових) ще в 10 разів, а підвищення концентрації основних елементів поживного середовища на 50% - ще в 2 рази. Для інтенсифікації процесу росту і синтезу ферментів додають різні фактори росту, наприклад, амінокислоти, пуринові основи та їх похідні, РНК та продукти її гідролізу. Як джерело вуглецю використовують крохмаль, кукурудзяний екстракт, соєве борошно, гідролізати біомаси дріжджів. Мікроорганізми можуть утилізувати і мінеральні джерела азоту. До складу поживних середовищ входять іони Mg, Mn, Zn, Fe, Cu та ін. металів. Механізм дії більшості з них невідомий. Деякі входять до складу ферменту. Іони Ca підвищують стійкість α -амілази, іони Fe і Mg активізують і стабілізують протеолітичні ферменти.

Оптимальний склад живильного середовища для кожного продуцента може бути визначений двома способами: емпіричний і побудова математичної моделі з використанням комп'ютера. Останній, безумовно, кращий. За характером культивування всі технологічні процеси виробництва ферментних препаратів діляться на дві великі групи: глибинний і поверхневий методи.

2. Глибинний метод культивування продуцентів ферментів

У цьому випадку мікроорганізми вирощуються в рідкому поживному середовищі. Технічно більш досконалий, ніж поверхневий, так як легко піддається автоматизації та механізації. Концентрація ферменту в середовищі

при глибинному культивуванні звичайно значно нижча, ніж у водних екстрактах поверхневої культури. Це викликає необхідність попереднього концентрування фільтрату перед його виділенням. При глибинному культивуванні продуцентів ферментів виділяють, як і в будь-якому біотехнологічному процесі, 5 етапів.

1. Приготування поживних середовищ залежить від складу компонентів. Деякі попередньо подрібнюють, відварюють або гідролітично розщеплюють. Готові до розчинення компоненти подають при постійному помішуванні в ємність для приготування середовища в певній послідовності. Стерилізацію середовища проводять або шляхом мікрофільтрації за допомогою напівпроникних мембран, або за допомогою високих температур. Час обробки в цьому випадку залежить як від інтенсивності фактора, так і від рівня обсіменіння об'єкта. Стерилізуються також всі комунікації та апарати. Повітря очищається до і після аерації. До - тому що містить частинки пилу органічної та неорганічної природи, після - тому що несе клітини продуцента.

2. Отримання засівного матеріалу. Для засіву поживного середовища матеріал готують також глибинним методом. Вид його залежить від продуцента: для грибів – це міцеліальна вегетативна маса, для бактерій - молода ростуча культура на початковій стадії спороутворення. Отримання посівного матеріалу полягає в збільшенні маси продуцента в 3-4 стадії. Обсяг посівного матеріалу залежить від фізіологічних особливостей продуцента. Якщо продуцент розмножується тільки вегетативно, він різко зростає (до 5-20%). Якщо ж відбувається рясне спороутворення - скорочується до 1%.

3. Виробниче культивування. Біосинтез ферментів в глибинній культурі протікає протягом 2-4 діб при безперервній подачі повітря і перемішуванні. Висока концентрація поживних речовин на перших етапах можуть гальмувати зростання біомаси продуцента, тому часто свіже середовище або деякі її компоненти вводяться в ферментер на стадії активного росту. Температурний оптимум знаходиться в інтервалі 22-32°C. У

сучасних технологічних процесах ведеться безперервне автоматичне визначення вмісту в середовищі вуглеводів, кількості утворених метаболітів і концентрації клітин. Дані надходять до комп'ютеру, який визначає стратегію корекції процесу і автоматично регулює його. Цим досягається максимальна продуктивність і найкраща якість продуктів.

4. Виділення. У міцелії тридобової культури зазвичай залишається не більше 15% ферментів. Решта виділяються в навколишнє рідке середовище клітини. У цьому випадку препарати ферментів виділяють з фільтратів після відділення біомаси.

5. Отримання товарної форми.

3. Поверхневий метод культивування продуцентів ферментів

При поверхневому методі культура росте на поверхні твердого зволоженого поживного середовища. Міцелій повністю обволікає і досить міцно скріплює тверді частинки субстрату, з якого отримують поживні речовини. Оскільки для дихання клітини використовують кисень, то середовище повинне бути пухким, а шар культури-продуцента невеликим. Вирощування виробничої культури відбувається зазвичай в асептичних умовах, але середовище та кювети необхідно простерилізувати. Перед кожним новим завантаженням також необхідна стерилізація устаткування. *Переваги поверхневої культури:* значно більш висока кінцева концентрація ферменту на одиницю маси середовища (при цукруванні крохмалю 5 кг поверхневої культури замінюють 100 кг культуральної рідини), поверхнева культура відносно легко висушується, легко переводиться в товарну форму.

Посівний матеріал може бути трьох видів:

- Культура, що виросла на твердому поживному середовищі;
- Споривий матеріал;
- Міцеліальна культура, вирощена глибинним способом.

У три етапи отримують і посівну культуру. Спочатку музейну культуру продуцента пересівають на 1 - 1.5 г зволожених стерильних пшеничних висівок в пробірку і вирощують в термостаті до рясного спороутворення. Другий етап - аналогічно, але в колбах, третій - у посудинах з 500 г середовища. Основу живильного середовища становлять пшеничні висівки, як джерело необхідних поживних і ростових речовин. Крім того, вони створюють необхідну структуру середовища. Для підвищення активності ферментів до висівок можна додавати буряковий жом, соєвий шрот, крохмаль, рослинні відходи. Стерилізують середовище гострим паром при помішуванні (температура - 105-140⁰С, час 60-90 хвилин). Після цього середовище засівають і розкладають рівним шаром у стерильних кюветах. Кювети поміщають в ростучі камери. Культивують протягом 36-48 годин.

Ріст ділиться на три періоди, приблизно рівних за часом. Спочатку відбувається набухання конідій (нерухомі спори у грибів) та їх проростання (температура не нижче 28⁰ С), потім ріст міцелію сірувато-білого кольору і утворення конідій. Для створення сприятливих умов росту і розвитку продуцента необхідна аерація і підтримання оптимальної вологості (55-70%).

Зріла в нерухомому шарі при поверхневому культивуванні культура представляє корж з набряклих часток середовища, щільно пов'язаних зрощеним міцелієм. Масу роздрібнюють до гранул 5,5 мм. Культуру висушують до 10-12% вологості при температурах не вище 40⁰С, не довше 30 хвилин. Іноді препарат застосовують прямо в неочищеному вигляді - у шкіряній та спиртовій промисловості. У харчовій і особливо медичній промисловості використовуються ферменти тільки високого ступеня очищення.

Схема очищення зводиться до наступного:

- Звільнення від нерозчинних речовин;
- Звільнення від супутніх розчинних речовин;
- Фракціонування (як правило, хроматографічними методами).

Для виділення ферменту з поверхневої культури необхідна екстракція. Як правило, екстрагент - вода. При цьому в розчин переходять цукри, продукти гідролізу пектинові речовини і целюлоза. Стадію виділення і очищення завершує сушка. Після сушіння препарат повинен містити не більше 6-8% вологи, тоді він може в герметичній упаковці зберігатися до року без втрати активності.

Стандартизація ферментного препарату - доведення активності ферменту до стандартної, що відповідає вимогам ДСТУ. Для цього використовуються різні нейтральні наповнювачі - крохмаль, лактоза та ін. Враховуючи величезні перспективи застосування ферментних препаратів в різних галузях промисловості і сільського господарства, медицині, можна зробити висновок про необхідність розширення досліджень у цій області для оптимізації технології та гарантійного отримання високоактивних і стабільних препаратів мікробних ферментів.

Контрольні питання:

1. Охарактеризуйте принципи класифікації ферментів.
2. Що таке одиниця активності ферменту?
3. Що таке активність препаратів?
4. Охарактеризуйте протеолітичні ферменти.
5. Охарактеризуйте пектолітичні ферменти.
6. Вкажіть фактори, які впливають на біосинтез ферментів.
7. Надайте характеристику глибинному методу культивування продуцентів ферментів.
8. Охарактеризуйте 5 етапів біотехнологічного процесу при глибинному культивуванні.
9. Охарактеризуйте поверхневий метод культивування продуцентів ферментів.
10. Вкажіть переваги поверхневого культивування.

11. Перерахуйте види посівного матеріалу.
12. Вкажіть етапи отримання посівної культури.
13. Охарактеризуйте стадії схеми очищення ферментів.
14. Що таке стандартизація ферментних препаратів?

ЛЕКЦІЯ № 9

ІММОБІЛІЗОВАНІ ФЕРМЕНТИ

Питання:

1. Загальна характеристика іммобілізованих ферментів
 2. Класифікація носіїв для іммобілізації
 3. Методи іммобілізації ферментів
 4. Застосування іммобілізованих ферментів
 5. Іммобілізація клітин
-

1. Загальна характеристика іммобілізованих ферментів

У сучасній біотехнології одне з важливих місць належить ферментам. Ферменти і ферментні системи широко використовуються в різних галузях промисловості, медицині, сільському господарстві, хімічному аналізі тощо.

Ферменти - речовини білкової природи і тому нестійкі при зберіганні, а також чутливі до теплових впливів. Крім того, ферменти не можуть бути використані багаторазово через труднощі у відділенні їх від реагентів і продуктів реакції. Вирішити ці проблеми допомагає створення іммобілізованих ферментів.

Початок цьому методу було покладено в 1916 році, коли Дж.Нельсон і Е.Гріффін адсорбували на вугіллі інвертазу і показали, що вона зберігає в такому вигляді каталітичну активність. Сам термін «іммобілізовані ферменти» узаконений в 1971 році, і означає будь-яке обмеження свободи пересування білкових молекул в просторі.

Сутність іммобілізації ферментів - прикріплення їх в активній формі до нерозчинної основи або ув'язнення в напівпроникну мембранну систему. Прикріплення ферменту до носія здійснюється адсорбційно, хімічним зв'язком або шляхом механічного включення ферменту в органічний або неорганічний гель (в капсулу і т. п.). При цьому допускається прикріплення

ферменту тільки за рахунок функціональних груп, що не входять в активний центр ферменту і не беруть участі в утворенні фермент-субстратного комплексу. Носій ферменту або матриця може мати вигляд зернистого матеріалу, волокнистої структури, пластинчастої поверхні, плівок або тканин, порожнистих волокон, трубочок, капсул і т. д. Має значення розмір часток носія. Важливо мати велику поверхню, тому рекомендуються невеликі частинки діаметром 0,1-0,2 мм. Носій ферменту може бути як природна речовина, так і синтетичний полімер.

Переваги іммобілізованих ферментів перед нативними попередниками:

1. Гетерогенний каталізатор легко відділити від реакційного середовища, що дає можливість зупинити реакцію в будь-який момент, використовувати фермент повторно, а також отримувати чистий від ферменту продукт.

2. Ферментативний процес з використанням іммобілізованих ферментів можна проводити безперервно, регулюючи швидкість каталізу реакції і вихід продукту.

3. Модифікація ферменту цілеспрямовано змінює його властивості, такі як специфічність (особливо щодо макромолекулярного субстрату), залежність каталітичної активності від рН, іонного складу та інших параметрів середовища, стабільність до денатуруючих впливів.

4. Можна регулювати каталітичну активність іммобілізованих ферментів шляхом зміни властивостей носія дією фізичних факторів, таких як світло і звук. Іммобілізувати ферменти можна як шляхом зв'язування на нерозчинних носіях, так і шляхом внутрішньомолекулярного або міжмолекулярного зшивання білкових молекул низькомолекулярними біфункціональними сполуками, а також шляхом приєднання до розчинного полімеру.

2. Класифікація носіїв для іммобілізації

Для отримання іммобілізованих ферментів використовується обмежене

число як органічних, так і неорганічних носіїв. До носіїв ставляться такі вимоги (Дж. Порат, 1974):

- висока хімічна та біологічна стійкість;
- висока хімічна міцність;
- достатня проникність для ферменту і субстратів, пористість, велика питома поверхня;
- можливість отримання у вигляді зручних в технологічному відношенні форм (гранул, мембран);
- легка активація;
- висока гідрофільність;
- невисока вартість.

Класифікація носіїв схематично представлена на рис. 24

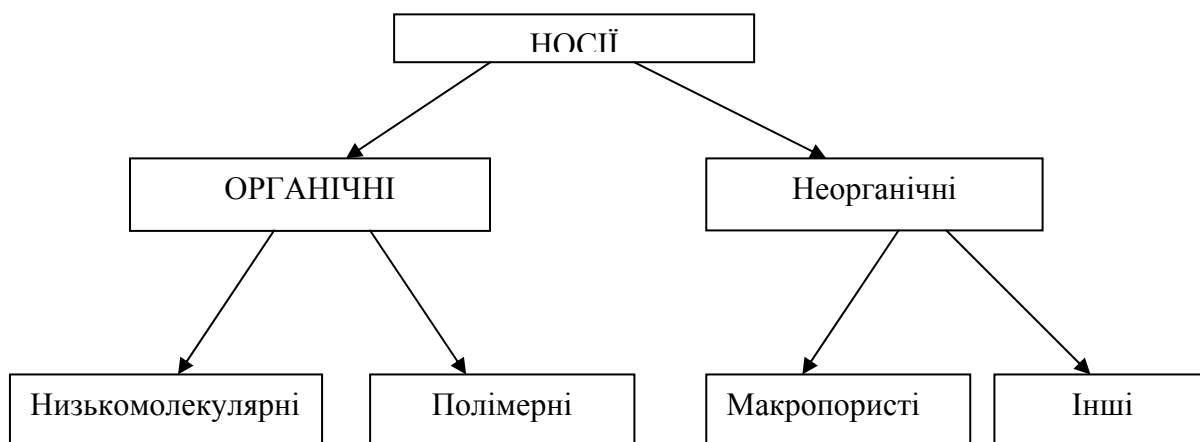


Рис. 24. Схематичне зображення класифікації носіїв для іммобілізованих ферментів

Слід зазначити, що органічні носії (як низько-, так і високомолекулярні) можуть бути природного або синтетичного походження. Природні полімерні органічні носії ділять відповідно до їх біохімічної класифікації на 3 групи: полісахаридні, білкові і ліпідні.

Синтетичні полімери також можна розділити на групи у зв'язку з

хімічною будовою основного ланцюга макромолекул: поліметіленові, поліамідні, поліефірні.

Для іммобілізації ферментів найбільш широко використовуються природні полісахариди і синтетичні носії поліметильного типу, решта застосовуються значно рідше. Велике значення природних полімерів в якості носіїв для іммобілізації пояснюється їх доступністю і наявністю реакційно-здатних функціональних груп, легко вступають в хімічні реакції. Характерною особливістю цієї групи носіїв також є їх висока гідрофільність. Нестача природних полімерів - нестійкість до впливу мікроорганізмів і досить висока вартість.

Найбільш часто для іммобілізації використовуються такі полісахариди, як целюлоза, декстран, агароза та їх похідні. Целюлоза гідрофільна, має багато гідроксильних груп, що дозволяє модифікувати її, заміщаючи ці групи. Для збільшення механічної міцності целюлозу гранулюють шляхом часткового гідролізу, в результаті якого руйнуються аморфні ділянки. На їх місце для збереження пористості між кристалічними ділянками вводять хімічні зшивання. Гранульовану целюлозу досить легко перетворити на різні іонообмінні похідні, такі як ДЕАЕ-целюлоза, КМЦ і т.д.

Широко поширені носії на основі декстрану, що випускаються під назвою «сефадексе». При висушуванні вони легко стискаються, у водному розчині сильно набухають. У цих носіях розмір пор в гелі регулюється ступенем зшитості. До групи декстранів відносять і крохмаль. Хімічно модифікований крохмаль зшивається агентами, такими як формальдегід. Таким способом було отримано губчастий крохмаль, що володіє підвищеною стійкістю по відношенню до ферментів, гідролізу. Водорозчинні препарати на основі декстрану часто застосовуються як носії лікарських засобів в медицині.

Хорошим носієм вважається агар. Його властивості поліпшуються після хімічного зшивання, наприклад, діпоксидними сполуками. Такий агар стає стійким до нагрівання, міцний, легко модифікується.

Білки в якості носіїв мають ряд переваг: місткі, здатні до біодеградації, можуть застосовуватися в якості тонкої (товщиною 80 мкм) мембрани. Імобілізацію ферментів на білкових носіях можна проводити як у відсутності, так і в присутності зшиваючих агентів. Білки використовуються і в фундаментальних біологічних дослідженнях, і в медицині. До недоліків білків в якості носіїв відносять їх високу імуногенність (за винятком колагену і фібрину). Найбільш для іммобілізації використовуються структурні (кератин, фібрин, колаген), рухові (міозин) і транспортні (альбумін) білки.

Синтетичні полімерні носії застосовуються для ковалентної і сорбційної іммобілізації ферментів, для отримання гелів, мікрокапсул. Полімери на основі стиролу застосовуються у сорбційній іммобілізації. Вони можуть мати макропористу, ізопористу структуру, а також гетеропористу структуру. Для отримання полімерних гідрофільних носіїв широко використовується акриламід - похідний акрилової кислоти.

Широке поширення отримав метод включення ферментів і клітин в поліакриламідний гель, що має жорстку просторову сітчасту структуру. Поліакриламідний гель стійкий до хімічних впливів. Дуже цікаву групу представляють поліамідні носії. Це групи різних гетероланцюгових полімерів з повторюючою амидною групою $-C(O)-NH-$. Наприклад, полімери на основі N-вінілпіролідону використовуються для отримання іммобілізованих ферментів, здатних повільно розпадатися в організмі. Крім того, вони біологічно інертні, що особливо важливо при використанні в медичних цілях. Істотним недоліком більшості полімерних носіїв є їх здатність накопичуватися в організмі. У цьому відношенні перевага віддається природним полімерам, які гідролізуються ферментами. Тому до складу лікарських препаратів часто входить декстран, а з синтетичних носіїв - полімери на основі N-вінілпіролідону. В даний час ведуться експерименти по створенню синтетичних полімерів, що розщеплюються з утворенням нетоксичних продуктів обміну.

3. Методи іммобілізації ферментів

Існує два основні методи іммобілізації ферментів: фізичний та хімічний.

Фізична іммобілізація ферментів являє собою включення ферменту в таке середовище, в якому для нього доступною є лише обмежена частина загального обсягу. При фізичній іммобілізації фермент не пов'язаний з носієм ковалентними зв'язками. Існує чотири типи зв'язування ферментів:

- Адсорбція на нерозчинних носіях;
- Включення в пори гелю;
- Просторове відділення ферменту від решти обсягу реакційної системи за допомогою напівпроникної перегородки (мембрани);
- Включення в двофазне середовище, де фермент розчинний і може знаходитися тільки в одній із фаз.

Перераховані підходи проілюстровані на рисунці 25.

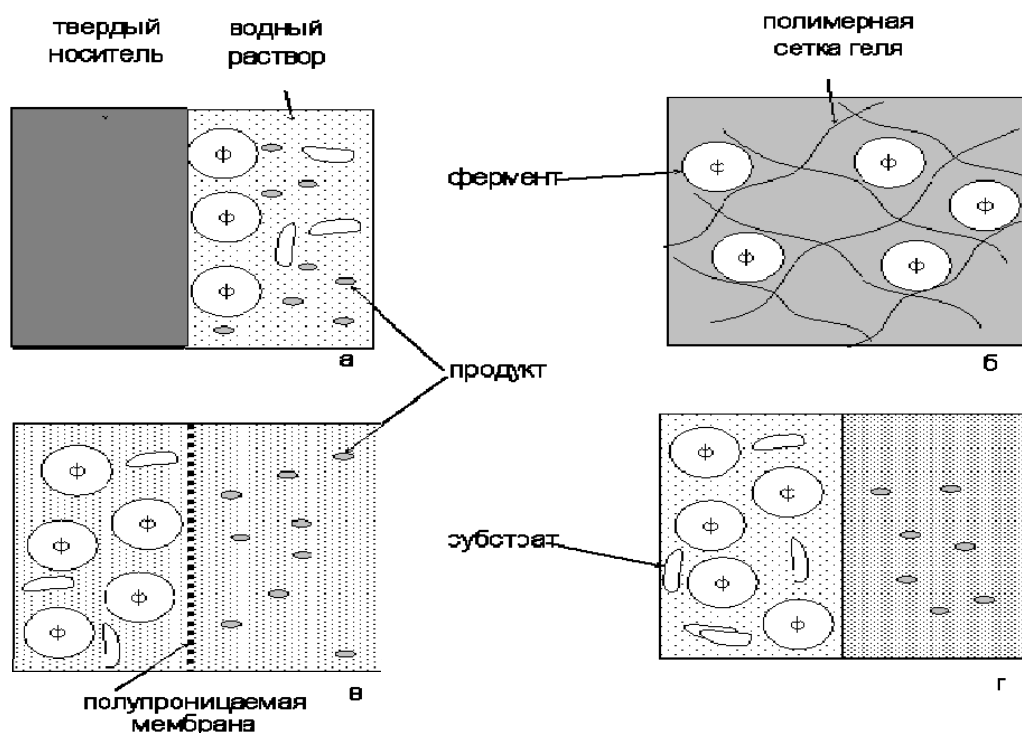


Рис. 25. Способи іммобілізації ферментів:

а - адсорбція на нерозчинних носіях, б - включення в пори гелю, в - відділення ферменту за допомогою напівпроникної мембрани, г - використання двофазного реакційного середовища.

Адсорбційна іммобілізація є найбільш старим з існуючих способів іммобілізації ферментів, початок її було покладено ще в 1916 р. Цей спосіб досить простий і досягається при контакті водного розчину ферменту з носієм. Після відмивання неадсорбованими білками іммобілізований фермент готовий до використання. Утримання адсорбованої молекули ферменту на поверхні носія може забезпечуватися за рахунок неспецифічних вандерваальсових взаємодій, водневих зв'язків, електростатичних і гідрофобних взаємодій між носієм і поверхневими групами білка. Внесок кожного з типів зв'язування залежить від хімічної природи носія і функціональних груп на поверхні молекули ферменту. Взаємодії з носієм можуть виявитися настільки сильними, що сорбція біокатализатора може супроводжуватися руйнуванням його структури. Наприклад, при адсорбції деяких рослинних клітин на гранулах цітодекса клітинна стінка деформується, повторюючи рельєф поверхні частинок носія. Перевагою методу адсорбційної іммобілізації є доступність і дешевизна сорбентів, що виступають у ролі носіїв. Їм також можна надати будь-яку конфігурацію і забезпечити необхідну пористість. Важливим фактором є - простота застосовуваних методик. При адсорбційному зв'язуванні можна вирішити і проблему очищення ферменту, так як зв'язування білка з носієм у багатьох випадках достатньо специфічне. На жаль, міцність зв'язування ферменту з носієм не завжди достатньо висока, що обмежує застосування методу. До недоліків адсорбційної іммобілізації слід віднести відсутність загальних рекомендацій, що дозволяють зробити правильний вибір носія та оптимальних умов іммобілізації конкретного ферменту.

Деяких з перерахованих труднощів можна уникнути при іммобілізації ферментів шляхом включення в гелі. Суть цього методу іммобілізації полягає в тому, що молекули ферменту включаються в тривимірну сітку з тісно переплетених полімерних ланцюгів, що утворюють гель. Середня відстань між сусідніми ланцюгами в гелі менша розміру молекули включеного ферменту, тому він не може покинути полімерну матрицю і вийти в

навколишній розчин, тобто знаходиться в іммобілізованому стані. Додатковий внесок в утримуванні ферменту в сітці гелю можуть вносити також іонні та водневі зв'язки між молекулою ферменту і оточуючими її полімерними ланцюгами. Простір між полімерними ланцюгами в гелі заповнений водою, на частку якої зазвичай припадає значна частина всього обсягу гелю. Наприклад, широко застосовуються гелі полімерів акрилової кислоти залежно від концентрації полімеру і його природи містять від 50 до 90% води.

Для іммобілізації ферментів в гелі існує два основних способи. При одному з них фермент поміщають у водний розчин мономера, а потім проводять полімеризацію, в результаті чого утворюється полімерний гель з включеними в нього молекулами ферменту. В реакційну суміш часто додають також біфункціональні (містять в молекулі два подвійні зв'язки) зшивні агенти, які надають полімеру, що утворився структуру тривимірної сітки. В іншому випадку фермент вносять в розчин готового полімеру, який потім якимось чином переводять в гелевидний стан. Спосіб іммобілізації ферментів шляхом включення в полімерний гель дозволяє створювати препарати будь-якої геометричної конфігурації, забезпечуючи при цьому рівномірний розподіл біокатализатора в обсязі носія. Метод універсальний, застосовується для іммобілізації практично будь-яких ферментів, поліферментних систем, клітинних фрагментів і клітин. Фермент, включений в гель, стабільний, надійно захищений від інактивації внаслідок бактеріального зараження, так як великі клітини бактерій не можуть проникнути в дрібнопористу полімерну матрицю. В той же час, ця матриця може створювати значні перешкоди для дифузії субстрату до ферменту, знижуючи каталітичну ефективність іммобілізованого препарату, тому для високомолекулярних субстратів даний метод іммобілізації не застосовується взагалі.

Загальний принцип іммобілізації ферментів з використанням мембран полягає в тому, що водний розчин ферменту відділяється від водного

розчину субстрату напівпроникною перегородкою. Напівпроникна мембрана легко пропускає невеликі молекули субстрату, але нездоланна для великих молекул ферменту. Існуючі модифікації цього методу розрізняються лише способами отримання напівпроникною мембрани і її природою. Водний розчин ферменту можна включати всередину мікрокапсул, що представляють собою замкнуті сферичні пухирці з тонкою полімерною стінкою (мікрокапсулювання). При подвійному емульгуванні виходить водна емульсія з крапель органічного розчину полімеру, що містять, в свою чергу, ще більш дрібні краплі водного розчину ферменту. Через деякий час розчинник твердішає, утворюючи сферичні полімерні частинки з іммобілізованим в них ферментом. Якщо замість водонерозчинного твердого полімеру використовуються рідкі вуглеводні з високою молекулярною масою, метод називається іммобілізацією шляхом включення в рідкі мембрани. До модифікацій методу іммобілізації ферментів з використанням напівпроникних оболонок відносяться також включення у волокна (при цьому замість крапель, що містять ферменти, виходять нитки) і включення в ліпосоми. Застосування систем мембранного типу дозволяє отримувати іммобілізовані препарати з високим вмістом ферменту. Метод, як і попередній, досить універсальний, тобто застосовується як до ферментів, так і до клітин, а також їх фрагментів. Завдяки високому відношенню поверхні до об'єму і малій товщині мембрани вдається уникнути значних дифузійних обмежень швидкості ферментативних реакцій. Основний недолік мембранних систем - неможливість ферментативного перетворення високомолекулярних субстратів.

При іммобілізації ферментів з використанням систем двофазного типу обмеження свободи переміщення ферменту в обсязі системи досягається завдяки його здатності розчинятися тільки в одній із фаз. Субстрат і продукт ферментативного перетворення розподіляються між обома фазами відповідно до їх розчинності в цих фазах. Природа фаз підбирається таким чином, що продукт накопичується в тій із них, де фермент відсутній. Після завершення

реакції цю фазу відокремлюють і витягують з неї продукт, а фазу, яка містить фермент, знову використовують для проведення чергового процесу. Одним з найважливіших переваг систем двофазного типу є те, що вони дозволяють здійснювати ферментативні перетворення макромолекулярних субстратів, які неможливі при застосуванні жорстких носіїв з обмеженим розміром пор.

Головною відмітною ознакою хімічних методів іммобілізації є те, що шляхом хімічної взаємодії на структуру ферменту в його молекулі створюються нові ковалентні зв'язки, зокрема між білком і носієм. Препарати іммобілізованих ферментів, отримані із застосуванням хімічних методів, володіють принаймні двома важливими перевагами. По-перше, ковалентний зв'язок ферменту з носієм забезпечує високу міцність утворення кон'югату. При широкому варіюванні таких умов, як рН і температура, фермент не десорбується з носія і не забруднює цільових продуктів. Це особливо важливо при реалізації процесів медичного та харчового призначення, а також для забезпечення стійких, відтворюваних результатів в аналітичних системах. По-друге, хімічна модифікація ферментів здатна приводити до істотних змін їх властивостей, таких як субстратна специфічність, каталітична активність і стабільність. Хімічна іммобілізація ферментів є мистецтвом, рівень якого визначається, в першу чергу, умінням експериментатора. Основне завдання експериментатора полягає у формуванні нових ковалентних зв'язків в молекулі ферменту при використанні його функціональних груп, несуттєвих для прояву його каталітичної активності. При хімічній модифікації ферменту його активний центр бажано захищати. При зіставленні різних прийомів іммобілізації хімічні методи для великомасштабних біотехнологічних процесів здаються малопривабливими через складність і дорожнечу. У промислових процесах зазвичай використовуються ті чи інші методи фізичної іммобілізації.

4. Застосування іммобілізованих ферментів

Особливо відчутний внесок іммобілізовані ферменти внесли в тонкий

органічний синтез, в аналіз, в медицину, в процеси конверсії енергії, в харчову та фармацевтичну промисловості.

Для синтетичної органічної хімії важливо те, що у двофазних реакційних середовищах фермент зберігає каталітичну активність навіть при виключно малому вмісті води, тому рівновагу каталізуючої реакції (вихід продукту) експериментатор може регулювати в широких межах, підбираючи потрібний органічний розчинник. Імобілізовані ферменти дали поштовх до створення принципово нових методів «безреагентного» безперервного аналізу багатокomпонентних систем органічних (у ряді випадків і неорганічних) сполук.

У майбутньому важливу роль у контролі навколишнього середовища і в клінічній діагностиці повинні зіграти такі методи, як біоломінісцентний та імуноферментний аналізи.

У медицині імобілізовані ферменти відкрили шлях до створення лікарських препаратів пролонгованої дії зі зниженою токсичністю і алергенністю.

Імобілізаційні підходи сприяють вирішенню проблеми спрямованого транспорту ліків в організмі. Проблеми біоконверсії маси і енергії в даний час намагаються вирішити мікробіологічним шляхом. Проте імобілізовані ферменти вносять відчутний внесок у здійснення фотоліза води і в біоелектрокаталізі. Заслуговує увагу і використання імобілізованих ферментів у процесах переробки лігноцелюлозної сировини. Імобілізовані ферменти можуть використовуватися і як підсилювачі слабких сигналів. На активний центр імобілізованого ферменту можна подіяти через носій, піддаючи останній ультразвуковій обробці, механічних навантажень або фотохімічними перетвореннями. Це дозволяє регулювати каталітичну активність системи фермент - носій під дією механічних, ультразвукових і світлових сигналів. На цій основі були створені механо-і звукочутливі датчики і відкритий шлях до безсрібної фотографії.

Промислові процеси із застосуванням імобілізованих ферментів

впроваджені насамперед у харчову та фармацевтичну промисловості. У харчовій промисловості за участю іммобілізованих ферментів йдуть процеси отримання глюкозо-фруктозних сиропів, глюкози, яблучної та аспарагінової кислоти, оптично активних L- амінокислот, дієтичного безлактозною молока, цукрів з молочної сироватки та ін.

У медицині іммобілізовані ферменти використовуються також як лікарські препарати, особливо в тих випадках, коли потрібний локальний вплив. Крім того, біокаталізатори широко використовуються в різних апаратах для перфузійного очищення різних біологічних рідин. Можливості та перспективи використання в медицині ферментів в іммобілізованому стані набагато ширші, ніж досягнуті на сьогоднішній день, саме на цьому шляху медицину чекає створення нових високоефективних методів лікування.

5. Іммобілізація клітин

У 70-х роках ХХ століття з'явилися перші публікації про іммобілізацію клітин мікроорганізмів, а перше промислове застосування іммобілізованих клітин було здійснено в Японії в 1974 р. З їх допомогою отримували аспарагінову кислоту.

Іммобілізовані клітини мають ряд переваг як перед іммобілізованими ферментами, так і перед вільними клітинами:

- відсутність витрат на виділення та очищення ферментів;
- зниження витрат на виділення та очищення продуктів реакції;
- більш висока активність і стабільність;
- можливість створення безперервних і напівнеперервних автоматизованих процесів;
- здатність до тривалого функціонування поліферментних систем без екзогенних кофакторів.

Для іммобілізації можуть бути використані клітини в різному стані: живі та пошкоджені в різній мірі. Одностадійні реакції можуть здійснювати і живі, і пошкоджені клітини. Поліферментні реакції проводять із

застосуванням живих клітин, які можуть тривалий час регенерувати АТФ і коферменти (НАДФ, НАД). Проблема використання ферментативної активності іммобілізованих мікроорганізмів має глибоке коріння.

Понад 150 років тому швидкий спосіб отримання оцту був заснований на застосуванні мікроорганізмів, адсорбованих на деревній стружці. Методи іммобілізації клітин схожі з методами іммобілізації ферментів.

Хімічний метод заснований на утворенні ковалентних зв'язків з активованим носієм, на поперечній зшивці клітин за рахунок активних груп в клітинній оболонці з біфункціональними реагентами (наприклад, глутаровим альдегідом).

До фізичних методів відносяться адсорбція і агрегація. Іммобілізація клітин шляхом включення в різні гелі, мембрани, волокна заснована на хімічних і фізичних взаємодіях. Хімічні методи використовуються рідше в порівнянні з іншими методами і малопридатні для іммобілізації живих клітин. Набагато більшого поширення набуло включення клітин до складу гелів, мембран і волокон. При такому способі іммобілізації клітини можуть зберігати життєздатність і в присутності живильного середовища розмножуватися в приповерхневих шарах гелів.

Біокаталітична активність цілих іммобілізованих клітин в даний час може бути використана в різних галузях науки і техніки:

- при біосинтезі і трансформації таких сполук, як амінокислоти, органічні кислоти, антибіотики, стероїди вуглеводи, вуглеводні, нуклеотиди і нуклеозиди;
- в пивоварінні і виноробстві;
- при очищенні стічних та природних вод;
- при добуванні металів зі стічних вод;
- при асиміляції сонячної енергії;
- при виготовленні водневих сонячних елементів;
- в азотфіксації;
- в аналітичних цілях при виготовленні електродів.

Найбільша кількість досліджень по іммобілізації клітин мікроорганізмів проведено японськими дослідниками. Особливі успіхи були досягнуті ними в області синтезу амінокислот, органічних кислот та антибіотиків.

У Московському державному університеті був розроблений метод отримання аспарагінової кислоти, який за ефективністю не поступається японським. Клітини *E.coli*, включені в армований поліакріламідний гель, були з успіхом використані для отримання аспарагінової кислоти, період напіввиведення каталізатора - 110 діб. Іммобілізувати можна не тільки клітини мікроорганізмів, але й клітини рослинних і тваринних тканин, використовуючи для їх синтезу фізіологічно активні сполуки.

Цікава можливість відкривається і при іммобілізації клітинних органел як активних поліферментних систем. Все це свідчить про перспективність розвитку одного з напрямків біотехнології, пов'язаного з вивченням і застосуванням іммобілізованих клітин.

Контрольні питання:

1. Що таке іммобілізовані ферменти?
2. Яка сутність іммобілізованих ферментів?
3. Вкажіть переваги іммобілізованих ферментів перед нативними попередниками.
4. Перерахуйте вимоги до носіїв іммобілізованих ферментів.
5. Класифікація носіїв іммобілізованих ферментів.
6. Охарактеризуйте методи іммобілізованих ферментів.
7. Застосування іммобілізованих ферментів.
8. Переваги іммобілізованих клітин над ферментами.
9. Методи іммобілізованих клітин.

ЛЕКЦІЯ № 10

ПРОМИСЛОВА БІОТЕХНОЛОГІЯ У ВИРІШЕННІ ЕКОЛОГІЧНИХ ПРОБЛЕМ

Питання:

1. Біодеградація ксенобіотиків
 2. Аеробні системи очистки стічних вод
 3. Анаеробні системи очистки стічних вод
 4. Показники забрудненості стічних вод
-

1. Біодеградація ксенобіотиків

У видаленні ксенобіотиків з навколишнього середовища важливі ряд факторів:

1. стійкість ксенобіотиків до різних впливів;
2. розчинність їх у воді;
3. летючість ксенобіотиків;
4. рН середовище;
5. здатність ксенобіотиків надходити в клітини мікроорганізмів;
6. схожість ксенобіотиків та природних сполук, що піддаються природній біодеградації.

Для біодеградації ксенобіотиків краще використовувати асоціації мікроорганізмів, оскільки вони більш ефективні, ніж окремо взяті види. При цьому типи зв'язків в подібній асоціації можуть бути різні.

Один вид мікроорганізмів може безпосередньо брати участь в розкладанні ксенобіотиків, а інший - постачати відсутні живильні речовини. Це може бути метаболічна «атака» на субстрат, коли синтезуються різні компоненти ферментативного комплексу, або ж ланцюжок ферментативних реакцій (багатосубстратні конверсії) тощо. Особливо важко розкладаються такі біоциди, як детергенти, пластики і вуглеводні. Самими здатними до

боротьби із забруднювачами різного типу є представники роду *Pseudomonas* - вони практично «всеїдні». Клітини цих мікроорганізмів містять оксидоредуктази і гідроксилази, здатні розкласти велику кількість молекул вуглеводнів та ароматичних сполук, таких як бензол, ксилол, толуол.

Гени, що кодують ці ферменти, перебувають у складі плазмід. Наприклад, плазміда ОСТ відповідає за розкладання октана і гексана, ХУЛ - ксилолу і толуолу, НАН - нафталіну, САМ - камфори. Плазмиди САМ і НАН забезпечують власний перенос, індукуючи схрещування бактеріальних клітин; інші плазмиди можуть бути перенесені тільки в тому випадку, якщо в бактерії введені інші плазмиди, що забезпечують схрещування.

У 1979 р. Чакрабарті (у той час спільно з компанією «Дженерал електрик») після успішних схрещувань отримав штам, який містить плазмиди ХУЛ і НАН, а також гібридну плазмиду, отриману шляхом рекомбінації частин плазмид САМ і ОСТ (самі по собі вони несумісні, тобто не можуть співіснувати як окремі плазмиди в одній бактеріальній клітині). Цей штам здатний швидко рости на неочищеній нафті, так як він метаболізує вуглеводні набагато активніше, ніж будь-який з штамів, що містить тільки одну плазмиду. Штам може бути особливо корисний в очисних водоймах для стічних вод, де можна контролювати температуру та інші зовнішні чинники. Ці мікроорганізми зручно використовувати для очищення нафтових плям на суші або морі при різних аваріях. Для більшої ефективності створюють мікроемульсію, що містить бактеріальні штами і капсули з сумішшю основних поживних елементів - азоту, фосфору і калію всередині. Додавання цих речовин стимулює розмноження бактеріальних штамів. Застосування такого методу дозволяє очистити від 70 до 90% забрудненої поверхні, за цей же час очищається всього близько 10-20% необробленої поверхні.

Перевага бактеріального очищення у порівнянні з хімічним полягає в тому, що воно не викликає появи нового забруднюючого агента в навколишньому середовищі. Щільність фітопланктону після бактеріального очищення підвищується. Деякі мікроорганізми здатні змінювати молекулу

ксенобіотика і робити її доступною і привабливою для інших мікроорганізмів («кометаболізм»). Прикладом може служити розкладання інсектициду паратіона під дією двох штамів *Pseudomonas* - *P. aeruginosa* і *P. stutzeri*. У деяких випадках відбувається неповне перетворення молекули ксенобіотика - фосфорилування, метилювання, ацетилювання тощо, результатом якого є втрата цією речовиною токсичності.

Одним із сильних забруднювачів є ЕДТА (етилендіамінтетраоцтової кислоти). Причина в тому, що ЕДТА зв'язує важкі метали, сприяючи їх накопиченню в ґрунті. Бактерії родів *Pseudomonas* та *Bacillus* здатні за два тижні зруйнувати всі зв'язки комплексу Fe-ЕДТА. Ці бактерії успішно застосовуються для очищення побутових стічних вод, куди потрапляють детергенти миючих засобів. Крім *Pseudomonas*, біодеградацію ксенобіотиків можуть здійснювати і представники родів *Acinetobacter*, *Metviosinus*. Проте, в деяких випадках внесення цих мікроорганізмів у ґрунт може змінити екосистему місцевості. Уникнути цього можна обмежуючи час життєдіяльності бактерій.

Наприклад, опромінюючи штами ультрафіолетом, отримали мутант, ауксотрофності за лейцином. Бактерії розмножують в живильному середовищі, який містить лейцин. Суспензією мікроорганізмів у живильному середовищі просочують деревну стружку, яку розкидають по забрудненій території. Кількість лейцину розраховується на час, достатній для знищення шкідливих домішок, тому після очищення мутантні штами гинуть.

Ще ефективніше, ніж бактерії, справляються з забруднювачами гриби. Вони можуть руйнувати такі речовини, як пентахлорбензол, пентахлорфенол. В одному з експериментів грибами обробили близько 10000 тонн ґрунту з території деревопереробного комплексу. В цьому ґрунті вміст пентахлорфенола досягало 700 мг/кг, але за рік діяльності кількість знизилася до 10 мг/кг, що є допустимою нормою. Бактерії змогли б переробити цей ґрунт лише за 4-5 років. Гриби активні і взимку, руйнують високомолекулярні поліароматичні вуглеводні, діють позаклітинно,

виділяючи неспецифічні ферменти. Вартість грибного і бактеріального очищення однакові, але застосування грибів дозволяє скорочувати терміни деградації і суттєво здешевлює її.

2. Аеробні системи очистки стічних вод

Біологічна переробка відходів спирається на ряд дисциплін: біохімію, генетику, хімію, мікробіологію, обчислювальну техніку. Зусилля цих дисциплін концентруються на трьох основних напрямках: деградація органічних і неорганічних токсичних відходів; відновлення ресурсів для повернення в кругообіг речовин вуглецю, азоту, фосфору, сірки; отримання цінних видів органічного палива.

При очищенні стічних вод виконують чотири основні операції:

1. При первинній переробці відбувається усереднення і освітлення стічних вод від механічних домішок (пісколовки, решітки, відстійники).

2. На другому етапі відбувається руйнування розчинених органічних речовин за участі аеробних мікроорганізмів. Утворений мул, що складається головним чином з мікробних клітин, або віддаляється, або перекачується в реактор. При технології, що використовує активний мул, частина його повертається в аераційний тенк.

3. На третьому (необов'язковому) етапі проводиться хімічне осадження і розділення азоту і фосфору.

4. Для переробки мулу, що утворюється на першому та другому етапах, зазвичай використовується процес анаеробного розкладання. При цьому зменшується обсяг осаду і кількість патогенів, усувається запах і утворюється цінне органічне паливо - метан.

На практиці застосовуються одноступінчасті і багатоступінчасті системи очищення. Одноступінчата схема очищення стічної води представлена на рис. 26.

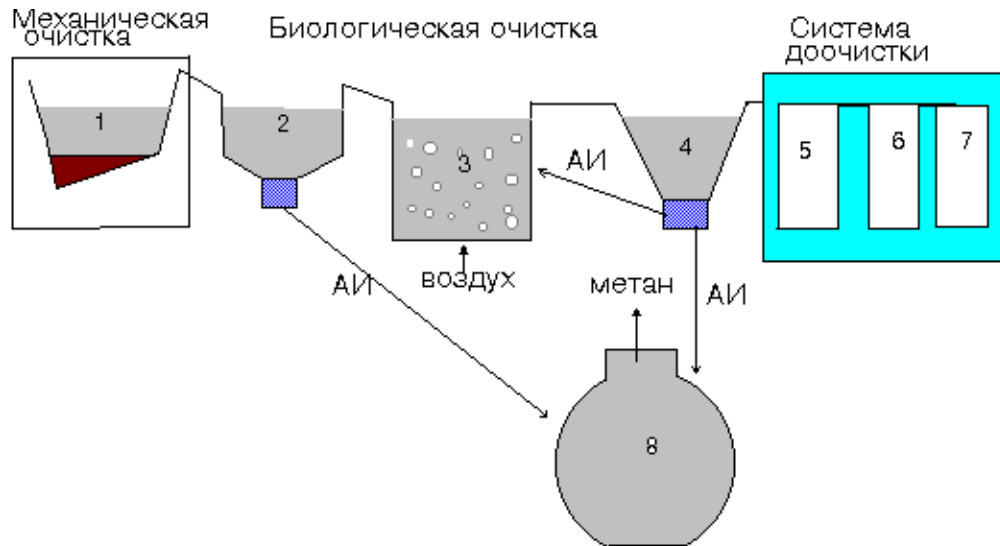


Рис. 26. Принципова схема очисних споруд

1 - піскоуловлювачі; 2 - первинні відстійники; 3 - аеротенк; 4 - вторинні відстійники; 5 - біологічні ставки; 6 - освітлення; 7 - реагентна обробка; 8 - метантенк; АИ - активний мул

Стічні води надходять в усереднювач, де відбувається інтенсивне перемішування стоків з різним якісним і кількісним складом. Перемішування здійснюється за рахунок подачі повітря. У разі необхідності в усереднювач подаються також біогенні елементи в необхідних кількостях і аміачна вода для створення певного значення рН. Час перебування в усереднювачі становить зазвичай кілька годин.

При очищенні фекальних стоків та відходів нафтопереробки необхідним елементом очисних споруд є система механічного очищення - пісколовки і первинні відстійники. У них відбувається відділення води, що очищається від грубих суспензій і нафтопродуктів, що утворюють плівку на поверхні води. Біологічне очищення води відбувається в аеротенках. Аеротенк являє собою відкриту залізобетонну споруду, через яку проходить стічна вода, що містить органічні забруднення і активний мул. Суспензія мулу в стічній воді протягом усього часу перебування в аеротенку піддається аерації повітрям. Інтенсивна аерація суспензії активного мулу киснем приводить до відновлення його здатності сорбувати органічні домішки. В

основі біологічного очищення води лежить діяльність активного мулу (АМ) або біоплівки, природно виниклого біоценозу, що формується на кожному конкретному виробництві залежно від складу стічних вод і вибраного режиму очистки. Активний мул являє собою темно-коричневі пластівці, розміром до декількох сотень мікрметрів. На 70% він складається з живих організмів і на 30% - з твердих частинок неорганічної природи.

Живі організми разом з твердим носієм утворюють зооглею - симбіоз популяцій мікроорганізмів, покритий загальною слизовою оболонкою. Мікроорганізми, виділені з активного мулу відносяться до різних родів: *Actynomyces*, Азотобактер, *Bacillus*, бактерії, коринебактерії, *Desulfomonas*, синьогнійна, *Sarcina* та ін. Найбільш численні бактерії роду *Pseudomonas*, про всеїдність яких згадувалося раніше.

Залежно від зовнішнього середовища, якою в даному випадку є стічна вода, та чи інша група бактерій може виявитися переважною, а інші стають супутниками основної групи. Істотна роль у створенні та функціонуванні активного мулу належить найпростішим. Функції найпростіших досить різноманітні; вони самі не беруть безпосередньої участі в споживанні органічних речовин, але регулюють віковий та видовий склад мікроорганізмів в активному мулі, підтримуючи його на певному рівні. Поглинаючи велику кількість бактерій, найпростіші сприяють виходу бактеріальних екзоферментів, що концентруються в слизовій оболонці і тим самим беруть участь у деструкції забруднень.

В активних мулах зустрічаються представники чотирьох класів найпростіших: саркодові (*Sarcodina*), джгутикові інфузорії (*Mastigophora*), вийчасті інфузорії (циліат), сисні інфузорії (*Suctoria*).

Показником якості активного мулу є коефіцієнт протозойності, який відображає співвідношення кількості клітин найпростіших мікроорганізмів до кількості бактеріальних клітин. У високоякісному мулі на 1 мільйон бактеріальних клітин має припадати 10-15 клітин найпростіших. При зміні складу стічної води може збільшитися чисельність одного з видів

мікроорганізмів, але інші культури все одно залишаються в складі біоценозу.

На формування ценозів активного мулу можуть впливати і сезонні коливання температури, забезпеченість киснем, присутність мінеральних компонентів. Все це робить склад або складним і практично невідтворюваним. Ефективність роботи очисних споруд залежить також від концентрації мікроорганізмів у стічних водах і віку активного мулу. У звичайних аеротенках поточна концентрація активного мулу не перевищує 2-4 г/л. Збільшення концентрації мулу в стічній воді призводить до зростання швидкості очищення, але вимагає посилення аерації, для підтримки концентрації кисню на необхідному рівні.

Таким чином, аеробна переробка стоків включає в себе наступні стадії:

- 1) адсорбція субстрату на клітинній поверхні;
- 2) розщеплення адсорбованого субстрату позаклітинними ферментами;
- 3) поглинання розчинених речовин клітинами;
- 4) ріст і ендогенне дихання;
- 5) вивільнення екскретованих продуктів;
- 6) «виїдання» первинної популяції організмів вторинними споживачами.

В ідеалі це повинно призводити до повної мінералізації відходів до простих солей, газів і води. На практиці очищена вода і активний мул з аеротенках подаються у вторинний відстійник, де відбувається відділення активного мулу від води. Частина активного мулу повертається в систему очищення, а надлишок активного мулу, що утворився в результаті росту мікроорганізмів, надходить на мулові майданчики, де зневоднюється і вивозиться на поля. Надлишок активного мулу можна також переробляти анаеробним шляхом. Перероблений активний мул може служити і як добрива, і як корм для риби, худоби.

Система повної доочистки може складатися з безлічі елементів, які визначаються подальшим призначенням стічної води. Можливе застосування біологічних ставків, де біологічно очищена вода проходить освітлення і

насичується киснем. Ставки також відносяться до системи біологічної очистки, в якій під впливом біоценозу активного мулу відбувається окислення органічних домішок. Склад біоценозів біологічних ставків визначається глибиною знаходження даної групи мікроорганізмів. У верхніх шарах розвиваються аеробні культури, в придонних - факультативні аероби і анаероби, здатні здійснювати процеси метанового бродіння або відновлення сульфатів. Насичення води киснем відбувається за рахунок процесів фотосинтезу, що здійснюється водоростями, з яких особливо широко представлені *Clorella*, *Scenedesmus*, зустрічаються євгленові, вольвоксові тощо. У ставках також в тій чи іншій мірі представлена мікро- і макрофауна: найпростіші, черви, коловертки, комахи тощо.

У біоставках з води добре видаляються нафтопродукти, феноли та інші органічні сполуки. У деяких випадках воду після біологічної очистки піддають реагентній обробці - хлоруванню або озонуванню. Інтенсифікувати процеси біологічної очистки можна шляхом аерації суспензії активного мулу чистим киснем. Цей процес можна здійснити в модифікованих аеротенках закритого типу - оксітенках, з примусовою аерацією стічної води. На відміну від аеротенків в біофільтрах (або перколяційних фільтрах) клітини мікроорганізмів знаходяться в нерухомому стані, так як прикріплені до поверхні пористого носія. Утворену таким чином біоплівку можна віднести до іммобілізованих клітин. У цьому випадку іммобілізована не монокультура, а цілий консорціум, неповторний за якісним і кількісним складом і розрізняється залежно від його місцезнаходження на поверхні носія.

Вода, що очищується контактує з нерухомим носієм, на якому іммобілізовані клітини і за рахунок їх життєдіяльності відбувається зниження концентрації забруднювача. Перевага застосування біофільтрів полягає в тому, що формування конкретного ценозу призводить до практично повного видалення всіх органічних домішок.

Недоліками цього методу можна вважати: нереальність використання

стоків з високим вмістом органічних домішок; необхідність рівномірного зрошення поверхні біофільтра стічними водами, що подаються з постійною швидкістю; стічні води перед подачею повинні бути звільнені від зважених часток щоб уникнути замулювання.

В якості носіїв можна використовувати кераміку, щебінь, гравій, керамзит, металевий або полімерний матеріал з високою пористістю. Для біофільтрів характерна наявність противотока води, яка надходить зверху і повітря, що подається знизу. Відірвалися частинки мікробної плівки після відділення їх у вторинному відстійнику не повертаються назад в біофільтр, а йдуть на мулові майданчики або в анаеробну переробку.

Існують також системи, що поєднують в собі як систему біофільтрів, так і активного мулу в аеротенках. Це так звані аеротенки-витискувачі. У аеруєму стічну воду поміщають або склоєрші, або створюють систему сіток всередині тенку, в які вкладаються прокладки з пористого поліефіру. У порожнинах цих прокладок і на поверхні склоєршів відбувається накопичення біоценозу активного мулу. Носій періодично видаляється з тенку, біомаса знімається, після чого носій повертається в реактор.

Система з іммобілізованими на мобільному носії клітинами відрізняється від біофільтрів своєю економічністю, так як використовуються високі концентрації мікроорганізмів і немає необхідності брати в облогу кінцеві продукти. Така система може знайти застосування в очищенні локальних стоків, з вузьким спектром забруднень. Їх доцільно очищати в самостійних біологічних системах, не змішуючи зі стоками інших виробництв. Це дозволяє отримати біоценози мікроорганізмів, адаптовані до даного вузького спектру забруднень, при цьому швидкість і ефективність очищення різко зростають.

3. Анаеробні системи очистки стічних вод

Як уже згадувалося, надлишок активного мулу може перероблятися двома способами: після висушування як добриво або ж потрапляє в систему

анаеробної очистки. Такі ж способи очищення застосовують і при зброджування висококонцентрованих стоків, що містять велику кількість органічних речовин. Процеси бродіння здійснюються в спеціальних апаратах - метатенках.

Розпад органічних речовин складається з трьох етапів: розчинення і гідроліз органічних сполук; ацидогенез; метаногенез. На першому етапі складні органічні речовини перетворюються на масляну, пропіонову і молочну кислоти. На другому етапі ці органічні кислоти перетворюються в оцтову кислоту, водень, вуглекислий газ. На третьому етапі метаноутворюючі бактерії відновлюють діоксид вуглецю в метан з поглинанням водню. За видовим складом біоценоз метатенка значно бідніший аеробних біоценозів. Нараховують близько 50 видів мікроорганізмів, здатних здійснювати першу стадію - стадію кислотоутворення. Найчисленніші серед них - представники бацил і псевдомонад. Метаноутворюючі бактерії мають різноманітну форму: коки, сарціни і палички. Етапи анаеробного бродіння йдуть одночасно, а процеси кислотоутворення і метаноутворення протікають паралельно.

Оцтовокислі і метаноутворюючі мікроорганізми утворюють симбіоз, що вважався раніше одним мікроорганізмом під назвою *Methanobacillus omelianskii*. Процес метаноутворення - джерело енергії для цих бактерій, так як метанове бродіння являє собою один з видів анаеробного дихання, в ході якого електрони з органічних речовин переносяться на вуглекислий газ, який відновлюється до метану. В результаті життєдіяльності біоценозу метатенка відбувається зниження концентрації органічних речовин і утворення біогазу, який є екологічно чистим паливом. Для отримання біогазу можуть використовуватися відходи сільського господарства, стоки переробних підприємств, що містять цукор, побутові відходи, стічні води міст, спиртових заводів і т.д.

Метатенка являє собою герметичний ферментер обсягом у кілька кубічних метрів з перемішуванням, який обов'язково обладнується

газовідділювачами з протиполаменними пастками. Метатенка працюють в періодичному режимі завантаження відходів або стічних вод з постійним відбором біогазу та вивантаженням твердого осаду після завершення процесу. В цілому, активне використання метаногенеза при зброджування органічних відходів - один із перспективних шляхів спільного вирішення енергетичних та екологічних проблем, який дозволяє агропромисловим комплексам перейти на автономне енергозабезпечення.

4. Показники забрудненості стічних вод

На всіх етапах очистки стічних вод ведеться суворий контроль за якісним складом води. При цьому проводиться детальний аналіз складу стічної води із з'ясуванням не тільки концентрацій тих чи інших сполук, але і більш повне визначення якісного і кількісного складу забруднювачів. Необхідність такого аналізу визначається специфікою системи переробки, так як в стічних водах можуть бути присутні токсичні речовини, здатні привести до загибелі мікроорганізмів і вивести систему з ладу. Визначення таких показників, як органолептичні (колір, вигляд, запах, прозорість, каламутність), оптична щільність, рН, температура не викликає труднощів.

Складніше визначити вміст органічних речовин в стічній воді, який необхідно знати для контролю роботи очисних споруд, повторного використання стічних вод в технологічних процесах, вибору методу очищення і доочищення, закінчення процесу очищення, а також оцінки можливості скидання води у водойми.

При визначенні вмісту органічних речовин широко використовуються два способи: хімічне споживання кисню і біохімічне споживання кисню. У першому випадку методика заснована на окисленні речовин, присутніх у стічних водах, 0,25% розчином дихромата калію при кип'ятінні проби протягом 2 годин в 50% (за обсягом) розчині сірчаної кислоти. Для повноти окислення органічних речовин використовується каталізатор - сульфат срібла. Дихроматний спосіб досить простий і легко автоматизується, що

обумовлює його широке поширення.

Біохімічне споживання кисню вимірюється кількістю кисню, який витрачається мікроорганізмами при аеробному біологічному розкладанні речовин, що містяться в стічних водах при стандартних умовах за певний інтервал часу. Визначення біохімічного споживання кисню вимагає спеціальної апаратури. У герметичний ферментер поміщається певна кількість досліджуваної стічної води, яку засівають мікроорганізмами. У процесі культивування реєструється зміна кількості кисню, який пішов на окислення сполуки, присутнього в стічних водах. Найкраще культивувати мікроорганізми з уже працюючих біологічних систем, адаптованих до даного спектру забруднень.

Визначення лише одного з показників якості стічної води (хімічного або біохімічного споживання кисню) не завжди дозволяє оцінити як її доступність для біологічного очищення, так і ступінь кінцевої очистки. Так, наприклад, є цілі групи сполук, визначення хімічного споживання кисню для яких неможливо, хоча ці сполуки цілком доступні для біохімічного визначення кисню і навпаки. Все це говорить про те, що для оцінки чистоти стічних води необхідно використовувати одночасно обидва методи.

Біотехнологія буде надавати різноманітний і все зростаючий вплив на способи контролю за навколишнім середовищем і на її стан. Хорошим прикладом такого роду служить створення нових, більш досконалих способів переробки відходів, однак застосування біотехнології в даній сфері аж ніяк не обмежується цим. Біотехнологія буде грати все більшу роль у хімічній промисловості та сільському господарстві, допомагаючи створити замкнуті і напівзамкнуті технологічні цикли, вирішуючи хоча б частково існуючі тут проблеми.

Контрольні питання:

1. Вкажіть фактори видалення ксенобіотиків з навколишнього середовища.
2. Як здійснюється біодеградація ксенобіотиків?

3. Аеробна система очищення стічних вод: складові, операції, стадії, система та технологія очищення.
4. Анаеробна система очистки стічних вод: способи, апарати, етапи, технологія.
5. Показники забрудненості стічних вод.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Альбертс Б. Молекулярная биология клетки / Б. Альбертс, Д. Брей, Д. Льюис. – М. : Мир, 1994. – 380 с.
2. Артамонов В. И. Занимательная физиология растений / В. И. Артамонов. – М. : Агропромиздат, 1991. – 336 с.
3. Безбородов А. М. Ферменты микроорганизмов и их применение / А. М. Безбородов. – М. : Наука, 1984. – 256 с.
4. Березин И. В. Иммуобилизованные ферменты / И. В. Березин, Н. Л. Клячко, А. В. Левашев. – М. : Высшая школа, 1987. – 160 с.
5. Биотехнология - сельскому хозяйству /Лобанок А. Г., Залашко М. В., Анисимова Н. И. [и др]. – Минск: Урожай, 1988. – 199 с.
6. Бирюков В. С. Основы промышленной биотехнологии / В. С. Бирюков. – М. : Колос, 2004. – 296 с.
7. Варфоломеев С. Д. Биотехнология преобразования солнечной энергии. Современное состояние, проблемы, перспективы / С. Д. Варфоломеев, Е. С. Панцхава. – М. : Наука, 1984. – 202 с.
8. Голубовская Э. К. Биологические основы очистки воды / Э. К. Голубовская. – М. : Высшая школа, 1978. – 270 с.
9. Егоров Н. С. Основы учения об антибиотиках / Н. С. Егоров. – М. : Высшая школа, 1986. – 448 с.
10. Каравайко Г. И. Биоготехнология металлов / Г. И. Каравайко. – М. : Наука, 1984. – 265 с.
11. Клесов А. А. Применение иммобилизованных ферментов в пищевой промышленности / А. А. Клесов. – М. : Наука, 2004. – 200 с.
12. Мартинек К. Иммуобилизованные ферменты / К. Мартинек. – М. : Наука, 2005. – 342 с.
13. Микробные ферменты и биотехнология / под ред. В. М. Фогарти; пер. с англ. – М. : Агропромиздат, 1986. – 405 с.
14. Промышленная биология и успехи генетической инженерии / под ред.

- Г. К. Скрыбина; пер. с англ. – М. : Мир, 1984. – 176 с.
15. Сельскохозяйственная биотехнология / под ред. В. С. Шевелухи. – М. : Высшая школа, 1998. – 416 с.

Навчальне видання

Лихач Анна Василівна

ПРОМИСЛОВА БІОТЕХНОЛОГІЯ

Курс лекцій

Формат 60x84 1/16. Ум. друк. арк. 13,4
Тираж 15 прим. Зам. № ___

Надруковано у видавничому відділі
Миколаївського національного аграрного університету
54020, м. Миколаїв, вул. Паризької Комуни, 9

Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 4490 від 20.02.2013 р.