

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
МИКОЛАЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ

Факультет технології виробництва і переробки
продукції тваринництва, стандартизації та
біотехнології

Кафедра генетики, годівлі тварин та біотехнології

ТЕХНОЛОГІЇ
МІКРОБНОГО СИНТЕЗУ

Методичні рекомендації
для виконання лабораторно-практичних занять
для здобувачів вищої освіти СВО «Магістр»
спеціальності 162 - «Біотехнології та біоінженерія»
денної форми навчання

Миколаїв
2020

УДК 606
Т 38

Друкується за рішенням науково-методичної комісії факультету технології виробництва і переробки продукції тваринництва, стандартизації та біотехнології Миколаївського національного аграрного університету від 17 червня 2020 р., протокол № 11.

Укладачі:

- І. Ю. Горбатенко – доктор біол. наук, професор, професор кафедри генетики, годівлі тварин та біотехнології, Миколаївський національний аграрний університет;
- О. О. Кравченко – канд. с.-г. наук, доцент, доцент кафедри генетики, годівлі тварин та біотехнології, Миколаївський національний аграрний університет

Рецензенти:

- І. В. Наконечний – доктор біологічних наук, професор кафедри екології та природоохоронних технологій, Національний університет кораблебудування ім. адм. Макарова;
- В. А. Кириченко – кандидат с.-г. наук, доцент кафедри зоогігієни та ветеринарії, Миколаївський національний аграрний університет.

© Миколаївський національний аграрний університет, 2020

ЗМІСТ

ВСТУП.....	5
Основні правила техніки безпеки при виконанні лабораторних робіт.....	6
МОДУЛЬ 1. Обмін амінокислотних речовин в культурах мікроорганізмів. Виробництво амінокислот шляхом біосинтезу.....	7
<i>Лабораторна робота 1.</i> Загальні відомості про мікроорганізми, їх будова та форма. Вплив факторів зовнішнього середовища на життєдіяльність мікроорганізмів.....	7
<i>Лабораторна робота 2.</i> Азотовмісні компоненти мікробних клітин.....	11
<i>Лабораторна робота 3.</i> Участь азотовмісних компонентів середовища в обміні речовин мікроорганізмів та їх вплив на формування продуктів біосинтезу.....	16
Лабораторна робота 4. Отримання амінокислот шляхом біосинтезу.....	19
МОДУЛЬ 2. Обмін вуглеводів в культурах мікроорганізмів. Вплив жирів на процеси біосинтезу.....	23
<i>Лабораторна робота 5.</i> Вуглеводні компоненти мікробних клітин.....	23
<i>Лабораторна робота 6.</i> Характеристика основних джерел вуглеводів, які використовуються для біосинтезу.....	28
<i>Лабораторна робота 7.</i> Хімічний склад жирів, які синтезуються мікроорганізмами.....	33
<i>Лабораторна робота 8.</i> Вплив умов культивування на синтез жирів.....	37
МОДУЛЬ 3. З'єднання фосфору та їх участь в синтезі мікроорганізмів. Вплив мінеральних компонентів на біосинтез. Значення рН для життєдіяльності мікроорганізмів.....	42
<i>Лабораторна робота 9.</i> Фосфоровмісні компоненти мікробних клітин.....	42
<i>Лабораторна робота 10.</i> Вплив фосфору на біосинтез антибіотиків.....	46

<i>Лабораторна робота 11.</i> Зольний склад мікроорганізмів.....	51
<i>Лабораторна робота 12.</i> Мінеральні компоненти середовища, їх участь в обміні речовин та вплив на біосинтез.....	53
<i>Лабораторна робота 13.</i> Значення рН для життєдіяльності мікроорганізмів.....	59
МОДУЛЬ 4. Технології мікробного синтезу ферментних препаратів та вітамінів.....	63
<i>Лабораторна робота 14.</i> Механізми регуляції синтезу ферментних білків мікроорганізмами.....	63
<i>Лабораторна робота 15-16.</i> Методи отримання ферментних препаратів з мікроорганізмів.....	68
<i>Лабораторна робота 17.</i> Технології мікробного синтезу вітамінів.....	74
ЛІТЕРАТУРА	86

ВСТУП

За елементарним складом мікроорганізми нічим не відрізняються від рослин і тварин.. Клітини мікроорганізмів звичайно містять 15-25% сухих речовин, а на 75-85% складаються з води. Хімічний склад мікроорганізмів може змінюватися в залежності від складу поживного середовища. Культури мікроорганізмів різних видів при культивуванні на середовищах, що мають однаковий склад, містять різну кількість білків, вуглеводів, жирів.

Дані елементарного аналізу і сумарні величини вмісту білків, вуглеводів, жирів не можуть досить повно характеризувати особливості хімічного складу мікробних клітин. Для їх характеристики користуються більш сучасними аналітичними методами, що дозволяють ідентифікувати окремі компоненти.

Поживні речовини потрапляють з середовища в мікробну клітину в розчиненому стані. Всі життєво важливі хімічні реакції в клітині відбуваються у водних розчинах. Дуже часто вода бере участь у процесі обміну речовини як компонент хімічної реакції. У клітині вода міститься в двох видах - вільному і зв'язаному. Вільна вода може брати участь в процесах обміну речовин. Зв'язана вода утримується білковими молекулами клітини за допомогою водневих зв'язків і утворює тому частину структури протоплазми.

Ці методичні рекомендації надають студентам можливість оволодіти основними мікробіологічними та біохімічними методами дослідження, які необхідні майбутньому спеціалісту для роботи на виробництвах та в лабораторіях біотехнологічної промисловості.

ОСНОВНІ ПРАВИЛА ТЕХНІКИ БЕЗПЕКИ ПРИ ВИКОНАННІ ЛАБОРАТОРНИХ РОБІТ

До виконання лабораторних робіт студенти допускаються лише після інструктажу з техніки безпеки, що проводиться викладачем, який веде заняття, або завідуючим лабораторією з відповідним записом в спеціальному журналі та підписами кожного студента.

Робота в лабораторії вимагає уваги та обережності для запобігання нещасним випадкам, які можуть статися внаслідок недбалого ставлення до їдких, горючих і отруйних речовин, недотримання техніки безпеки під час роботи з приладами.

Приступати до виконання лабораторних робіт без інструктажу з техніки безпеки, а також при незнанні експериментальної установки й порядку проведення дослідів не дозволяється.

Студенти несуть особисту відповідальність за недотримання вимог техніки безпеки. Далі перерахуємо основні з них.

1. При виконанні лабораторних робіт потрібно суворо користуватися методичними посібниками. Будь-яке відхилення від методики чи порядку аналізу можливо тільки з дозволу викладача.

2. До виконання лабораторних робіт студенти допускаються тільки при наявності захисного одягу – халату.

3. При роботі з електроприладами суворо дотримуватись всіх правил, які приведені при описанні прилад. Переносити чи ремонтувати обладнання, яке знаходиться під напругою, забороняється.

4. В лабораторії необхідно дотримуватися та підтримувати чистоту. По закінченні роботи вимикають електроприлади, забезпечують електроізоляцію на лабораторних столах, закривають газ, ретельно миють використаний посуд, прибирають робоче місце, миють руки з милом та закривають водопровідні крани.

МОДУЛЬ 1

Обмін амінокислотних речовин в культурах мікроорганізмів. Виробництво амінокислот шляхом біосинтезу

Лабораторна робота 1

Тема: Загальні відомості про мікроорганізми, їх будова та форма. Вплив факторів зовнішнього середовища на життєдіяльність мікроорганізмів.

Мета заняття: Ознайомитися з будовою та формами мікроорганізмів та вивчити загальні відомості про них. Дізнатися вплив факторів зовнішнього середовища на життєдіяльність мікроорганізмів.

За елементарним складом мікроорганізми нічим не відрізняються від рослин і тварин. Близько 50% від загальної кількості сухих речовин клітини припадає на вуглець, 7-13% - на азот, 6-8% - на водень і до 30% - на кисень. Ці чотири елементи прийнято називати органогенами. Від 3 до 12% сухих речовин становлять зольні елементи. Серед них найбільший відсоток припадає на фосфор, потім калій, магній, сірку, кальцій. Крім них, в золі зустрічаються і інші речовини, але в мікрокількостях, в основному ті, що відносяться до металів, які прийнято називати мікроелементами. Клітини мікроорганізмів звичайно містять 15-25% сухих речовин, а на 75-85% складаються з води. Аналіз сухих речовин продуцента пеніциліну гриба *Penicillium chrysogenum* показав, що 36-38% становить білок; 0,4-0,9% - редуцировані речовини (в основному вуглеводи); 4% - жири; 10-12% - зола. З досліджуваних зольних елементів фосфору виявилось 2,35% (до сухої ваги); кальцію-1,39%; магнію - 0,86%; заліза - 0,38%. Хімічний склад мікроорганізмів може змінюватися в залежності від складу поживного середовища. Культури мікроорганізмів різних видів при культивуванні на середовищах, що мають однаковий склад, містять різну кількість білків, вуглеводів, жирів.

Поживні речовини потрапляють з середовища в мікробну клітину в розчиненому стані. Всі життєво важливі хімічні реакції в клітині відбуваються у водних розчинах. Дуже часто вода бере участь у процесі обміну речовини як компонент хімічної реакції.

Кількісний вміст різних азотовмісних компонентів в мікроорганізмах мінливий, він змінюється з віком, залежить від штаму і умов культивування. Наприклад молодий міцелій більш багатий білками, ніж старий. При старінні кількість небілкового азоту, зазвичай, підвищується (табл. 1).

Таблиця 1

Зміна співвідношення фракцій азоту в міцелії різних культур *Penicillium*, в мг / г сухої маси

Культура	Час культивування (в годинах)	Загальний азот	Білковий азот	Небілковий азот	% Небілкового азоту до загального азоту
<i>Penicillium Jancewskii</i>	0	83,6	61,5	22,1	24,4
	24	78,2	36,9	41,3	52,8
<i>Penicillium chrysogenum</i> 248/1	0	83,1	62,2	17,7	21,3
	24	78,9	50,2	28,7	36,3
<i>Penicillium</i> ВНИИА-А	0	75,0	56,5	18,5	24,7
	24	67,7	42,0	21,0	31,0

За якісним амінокислотним складом міцелій нічим не відрізняється від інших рослинних і тваринних об'єктів, до його складу входить 14-20 амінокислот (за даними різних досліджень). Найбільша кількість припадає на глютамінову і аспарагінову кислоти, групу лейцинів, аланін, пролін, треонін. Кількість деяких амінокислот залежить в значній мірі від середовища.

При культивуванні *Penicillium chrysogenum* на синтетичному середовищі Чапека кількість фенілаланіну збільшувалася майже в три рази, проліна - в 1,8 рази, глютамінової кислоти - в 1,25 рази в порівнянні з комплексним середовищем (табл. 2). Кількість білка в міцелії, що виростили на синтетичному середовищі, становило 28,8% від сухої ваги, на комплексному - 13,7%.

Таблиця 2

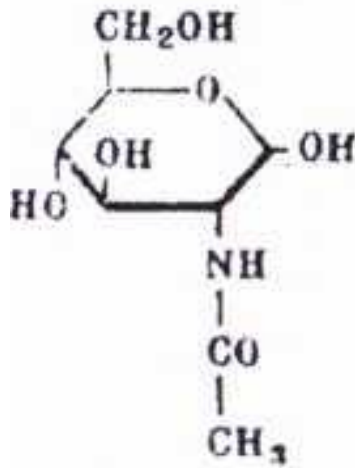
Вміст амінокислот міцелію *Penicillium chrysogenum* при культивуванні на комплексному середовищі і синтетичному середовищі Чапека, в % на суху вагу

Амінокислоти	Середовище комплексне	Середовище синтетичне
Гліцин	1,95	2,20
Аланін	1,33	1,98
Валін	1,00	1,30
Лейцин	2,63	3,51
Пролін	1,81	3,20
Фенілаланін	0,98	2,86
Цистин или цистеїн	1,32	1,57
Метіонін	0,22	0,34
Триптофан	0,33	0,37
Аргінін	0,38	1,88
Гістидин	Сліди	Сліди
Лізін	0,23	0,23
Аспарагінова кислота ...	1,20	1,75
Глютамінова кислота ..	1,98	2,50
Серин	0,76	0,95
Треонін	1,32	1,63
Тирозин	0,54	0,77

Останнім часом завдяки тонким біохімічним методам аналізу вдалося провести вивчення хімічної природи клітинної стінки мікроорганізмів. Одним з основних компонентів клітинної стінки грибів є хітин. Хітин дуже стійке до впливу різних хімічних речовин поєднання. Тільки шляхом тривалого кислотного

гідролізу вдалося розщепити його на аміноцукор і оцтову кислоту.

Він представляє собою полісахарид, побудований із залишків N-ацетил-О-глюкозаміну. До 12-20% сухої ваги клітинної стінки припадає на аміноцукри. Крім О-глюкозаміну, іноді зустрічається О-галактозамін. До складу клітинної стінки входять також білки, тісно пов'язані з поліцукровими компонентами.



N=Ацетил=D=глюкозамін

Питання для самоконтролю

1. Які існують форми мікроорганізмів?
2. Назвати елементарний склад сухої речовини мікробної клітини.
3. Які фактори зовнішнього середовища можуть впливати на життєздатність мікроорганізмів?
4. Які ви знаєте амінокислоти?
5. Назвіть приклади комплексних і синтетичних поживних середовищ.

Лабораторна робота 2

Тема: Азотовмісні компоненти мікробних клітин.

Мета заняття: визначення азотовмісних компонентів в мікроорганізмах.

Якісний і кількісний склад амінокислот мікроорганізмів вивчений досить добре. Зазвичай визначають зміст амінокислот в гідролізатах білків, виділених з клітин. У процесі розвитку культури кількісні співвідношення між амінокислотами змінюються.

Поки що немає узагальнюючих даних про зв'язок між амінокислотним складом білків продуцента і біосинтезу антибіотика. Відомо лише, що при утворенні антибіотика культурою *Act. violaceus* міцелій, інтенсивно утворює антибіотичну речовину, бідніше основними і багатше дикарбоновими амінокислотами в порівнянні з міцелієм, слабо створює антибіотики. Зміст гістидину, аспарагінової і глютамінової кислот різко відрізняється як у дводобовій, так і чотирьохдобовій культур (табл. 3).

Таблиця 3

Вміст амінокислот у фагочутливих і фагостійких культур *Act. globisporus streptomycini*

Амінокислота	Куль тура			
	фагочутлива		фагостійка	
	2-добова	4-добова	2-добова	4-добова
Аспарагінова кислота	3,23	4,93	5,77	2,43
Глютамінова »	7,77	7,10	8,71	5,80
Гістидин	0,58	0,67	0,67	1,62

На кількісний та якісний склад вільних амінокислот істотно впливає поживне середовище. Найбільш яскраво виражено вплив органічних кислот, що входять до циклу ди-і трикарбонових кислот. Наявність в середовищі кетокислот, особливо піровиноградної і а-кетоглютарової, призводить до інтенсивного синтезу всередині клітини відповідних амінокислот: а-аланіну і

глутамінової кислоти. Вуглеводи і амінокислоти менш помітно впливають на кількісний склад внутрішньоклітинних вільних амінокислот. Найбільша кількість серед них припадає на глутамінову і аспарагінову кислоти, аланін, гістидин, аргінін, валін, лейцин. Мало метіоніну і цистину - сіркомістких амінокислот (табл. 4). У процесі розвитку культури кількісні співвідношення між окремими вільними амінокислотами різко не змінюються, хоча змінюється сумарна кількість а-аміноазоту. Якщо культура виявляється поставленою в умови азотного голодування, тобто в середовище, позбавлене азоту, але містить вуглеводи, то використовується ендогенний азот і в першу чергу азот вільних внутрішньоклітинних амінокислот. В цьому випадку з найбільшою інтенсивністю в обмінні процеси включається глутамінова кислота.

Таблиця 4

Динаміка зміни змісту деяких вільних амінокислот міцелію *Act. citreofuorescens* в залежності від віку культури, в % до загальної суми всіх вільних амінокислот

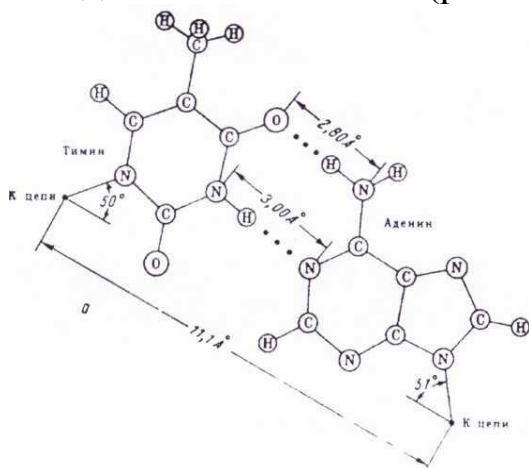
Амінокислоти	Вік культури в добах				
	1	2	3	4	5
Аргінін	1,8	10,3	9,0	14,3	9,0
Аспарагінова кислота	9,2	9,7	9,5	12,0	12,0
Серін	6,2	6,8	5,4	5,0	6,3
Глутамінова кислота	15,0	13,6	14,1	15,6	13,8
Аланін	10,2	8,9	9,3	8,7	10,2
Метіонін	1,0	1,2	1,8	0,6	1,3

Всі природні нуклеїнові кислоти поділяються на два хімічно різних типи - дезоксирибонуклеїнову кислоту (ДНК) й рибонуклеїнову кислоту (РНК). Обидва типи нуклеїнових кислот є полімерами нуклеотидів. Головним хімічним відмінністю нуклеотидів дезоксирибонуклеїнової і рибонуклеїнової кислот є природа їх вуглеводного компонента.

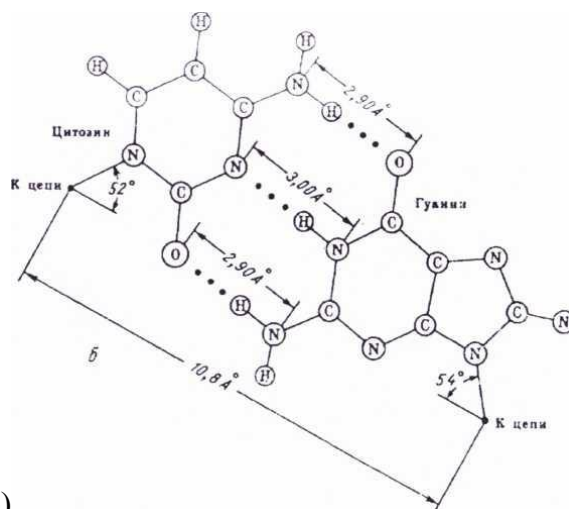
Обидва типи нуклеїнових кислот обов'язково присутні у всіх без винятку живих клітинах організму, і лише віруси містять тільки один з них.

Біологічно ДНК і РНК нерівнозначні. У них різна локалізація в клітці, різні функції, і обидві вони в рівній мірі необхідні для життя. Таким чином, ДНК і РНК представляють з себе функціонально різні полімери.

Відомо, що молекула ДНК являє собою дуже довгий ланцюг, що складається з вуглеводних і фосфатних груп, що чергуються. Вуглевод приєднаний до фосфату так, що фосфатно-вуглеводні групи уздовж довгого ланцюга повторюються в суворо визначеній послідовності. Але якщо фосфатно-вуглеводний ланцюг зберігає сувору періодичність, то молекула в цілому такою періодичністю не володіє, так як до кожного вуглеводу приєднані різні основи. Зазвичай знаходять чотири типи основ: дві з них - аденін і гуанін - належать до групи пуринів, а дві інші - тимін і цитозин - до групи піримідинів, і з'єднуються вони між собою водневими зв'язками(рис.1).



а)



б)

Рис. 1. Утворення пар аденіну і тиміну (а) і цитозину і гуаніну (б) за допомогою водневих зв'язків.

Порівняльне вивчення кількісного вмісту азотистих основ деяких мікроорганізмів показало, що у цвілевих грибів, що відносяться до роду аспергілів, кількість гуаніну, аденіну, цитозину, тиміну приблизно однакова. У актиноміцета, продуцента стрептоміцину, відзначається високий вміст гуаніну і цитозину; у золотистого стафілокока - аденіну і тиміну. При цьому відношення $\frac{Г+Ц}{А+Т}$ у аспергіла близько одиниці, у золотистого стафілокока воно менше одиниці; у актиноміцетів, як правило, знаходиться в межах 2,5-2,8. У близьких в систематичному відношенні видів відмінності в складі ДНК зазвичай значно менше, ніж у далеких (табл. 5).

Таблиця 5

Склад ДНК и РНК деяких мікроорганізмів
(по А. Н. Белозерському, 1959)

Найменування мікроорганізму	Дезоксирибонуклеїнова кислота					Рибонуклеїнова кислота				
	вміст основ, в молярних відсотках				$\frac{Г+Ц}{А+Т}$	вміст нуклеотидів, в молярних відсотках				$\frac{Г+Ц}{А+Т}$
	гуанін	аденін	цитозин	тимін		гуанілова кислота	аденілова кислота	Цитидилова кислота	урідилова кислота	
Staphylococcus pyogenes aureus	17,3	32,3	17,4	33,0	0,53	28,7	26,9	22,4	22,0	1,05
Aspergillus sp.	25,1	25,0	25,0	24,9	1,00	30,1	25,0	25,0	19,9	1,23
Bacterium coli	26,0	23,9	26,2	23,9	1,09	30,7	26,0	24,1	19,2	1,21
Corynebaclerlum diphleriae	27,2	22,5	27,3	23,0	1,20	31,6	23,1	23,8	21,5	1,24
Mycobacterium tuberculosis	34,2	16,5	33,3	16,0	2,08	33,0	22,6	26,1	18,3	1,45
Actinomyces globisporus streptomycini	36,1	13,4	37,1	13,4	2,73	31,1	23,8	25,2	19,9	1,29

Одним з найбільш важливих і цікавих питань теоретичної біології є вивчення специфіки нуклеїнових кислот.

Специфічність їх визначається в основному:

- 1) кількісними співвідношеннями різних пуринових і піримідинових основ;
- 2) послідовністю розташування нуклеотидів;
- 3) конфігурацією макромолекул.

У різних типах ДНК може бути або переважання аденіну над гуаніном і тиміну над цитозином ($A + T > G + C$) або переважання гуаніну і цитозину над аденін і тиміном ($G + C > A + T$). Таким чином, склад ДНК у різних мікроорганізмів може відрізнятися тільки величиною відношення $\frac{G+C}{A+T}$, яке і є показником видової специфічності ДНК по нуклеотидному складу.

Питання про хімічну специфічність різних ДНК далеко не вичерпується встановленням відмінностей в кількісних співвідношеннях основ у складі ДНК. Найглибші і найтонші відмінності між молекулами ДНК полягають в послідовності розташування різних нуклеотидів уздовж ланцюга.

Питання для самоконтролю

1. Які азотовмісні компоненти входять до складу мікробної клітини?
2. Як впливає поживне середовище на вміст амінокислот в клітинах мікроорганізмів?
3. Назвіть основні функції ДНК і РНК в мікробних клітинах.
4. Які типи зв'язків існують в середині молекули нуклеїнової кислоти(ДНК та РНК)?

Лабораторна робота 3

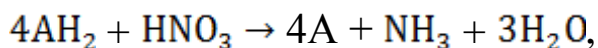
Тема: Участь азотовмісних компонентів середовища в обміні речовин мікроорганізмів та їх вплив на формування продуктів біосинтезу

Мета заняття: визначення участі азотовмісних компонентів середовища в обміні речовин мікроорганізмів та дослідження їх впливу на формування продуктів біосинтезу.

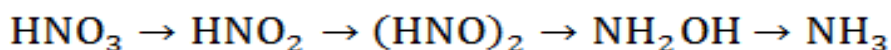
Всім живим істотам, в тому числі мікроорганізмам, абсолютно необхідний азот. Земна атмосфера містить його набагато більше, ніж потрібно для задоволення потреб живих істот. Однак азот хімічно стійкий, він важко окислюється. Кругообіг азоту в природі являє собою складний цикл, в процесі якого спочатку порушується хімічна інертність азоту. Ряд мікроорганізмів має здатність поглинати вільний азот повітря і пов'язувати його у вигляді органічних сполук. Відомі продуценти біологічно активних речовин, як правило, не є фіксаторами атмосферного азоту, хоча є дані, що свідчать про наявність механізму фіксації атмосферного азоту деякими актиноміцетами. У середовищі для культивування необхідно мати такі азотовмісні речовини, які можуть бути засвоєні мікроорганізмами. Азотовмісні речовини, так само як і інші компоненти середовища, повинні перш за все відповідати таким вимогам: забезпечувати досить високий вихід синтезованого продукту, бути вигідними економічно. Азот живильного середовища йде головним чином на синтез білків мікроорганізмів. Білки, як відомо, складаються з амінокислот. Можуть бути принципово два різних шляхи для задоволення потреб в амінокислотах: отримання готових амінокислот ззовні і самостійний синтез амінокислот з компонентів середовища.

Чисті амінокислоти застосовуються при ферментації в виняткових випадках. В якості компонентів поживних середовищ застосовують також мінеральні сполуки, які містять азот. Такими сполуками є солі амонію або нітрати. Для того, щоб азот нітрату міг бути використаний для синтезу амінокислоти, а потім білка, необхідно попередньо перевести його в відновлену

форму. У загальному вигляді процес відновлення відбувається так:



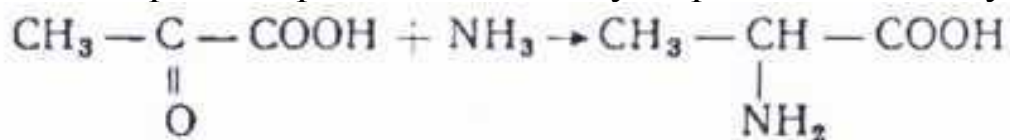
де АНЗ - відновник, що міститься в середовищі. У разі, якщо такого відновника в середовищі немає, то культура виявляється не в змозі утилізувати нітратний азот. Вважають, що процес відновлення проходить через ряд проміжних етапів.



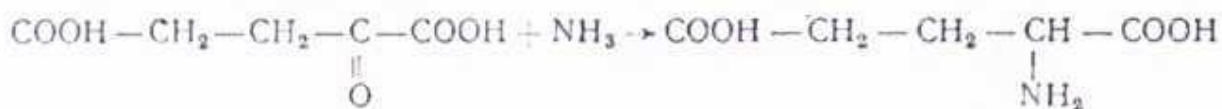
Азотна кислота → Азотиста кислота → Гіпонітрит → Гідроксиламін → Аміак

Для здійснення цього процесу необхідна наявність ферменту або ферментної системи, яка носить назву нітрат редуктази. Проміжні продукти виділити дуже важко. Накопичуються вони, ймовірно, в невеликих кількостях, крім того, в високих концентраціях вони токсичні для мікроорганізмів. Потреба мікроорганізму в сірці або фосфорі менше, ніж в азоті, тому при використанні азоту в середовищі залишається аніон. При цьому відзначається зрушення рН середовища в кислу сторону. Щоб уникнути закислення, в середовище додають крейду. Він зв'язує вільний аніон і нейтралізує середовище. Слід зазначити, що сам по собі іон Ca^{++} може виявитися не індиферентною речовиною і чинити певний вплив на хід обміну речовин.

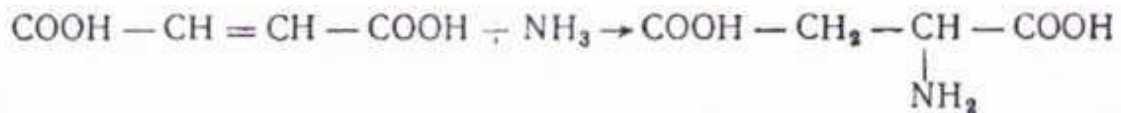
Для актиноміцетів найбільш доведеною є реакція амінування піровиноградної кислоти з утворенням а-аланіну.



Деякі бактеріальні культури, продуценти амінокислот, мають систему відновного амінування, в яку входить а-кетоглютарова кислота. При цьому відбувається синтез глутамінової кислоти.

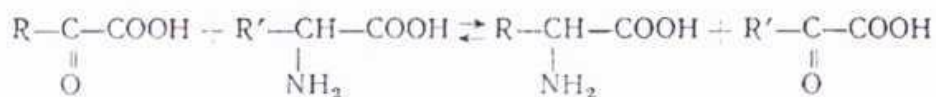


Інша реакція амінування відбувається за допомогою наявного у деяких мікроорганізмів, зокрема актиноміцетів, ферменту аспартази. При цьому аміак впроваджується за місцем подвійного зв'язку фумарової кислоти з утворенням аспарагінової кислоти.



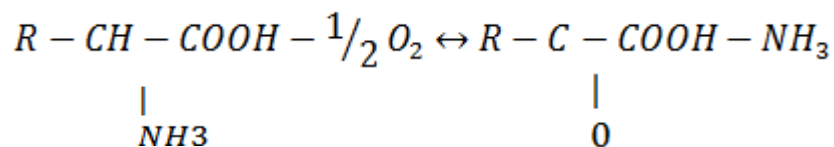
Синтез амінокислот може здійснюватися також за допомогою реакції переамінування. Реакція відбувається між амінокислотою і кетокислотою, при цьому аміногрупа амінокислоти переноситься на кетогрупу кетокислот. Реакція переамінування є зворотною. З кетокислот найбільш поширеними серед продуктів обміну речовин мікроорганізмів є піровиноградна, а-кетоглютарова і щавелевоуксусна кислоти. Не всі амінокислоти, особливо циклічні, вступають з ними в реакцію переамінування. Здатність вступати в ферментативні реакції переамінування визначається наявністю у культур певних ферментних систем, а також відповідних умов середовища, що створюють можливість здійснення цих реакцій.

Є порівняно мало прикладів того, щоб амінокислоти середовища без відповідної трансформації безпосередньо включилися б в клітинні структури.



Одним з найбільш поширених механізмів включення амінокислот середовища в обмін речовин є реакція дезамінування.

При зсуві рН середовища в кислу зону відзначається реакція декарбосилування амінокислот з утворенням амінів:



Питання для самоконтролю

1. Яким чином азотовмісні компоненти середовища впливають на обмін речовин мікроорганізмів?
2. Які азотовмісні речовини додають до поживних середовищ?
3. В якій формі організм краще поглинає азот, і чому?
4. Яким вимогам повинні відповідати азотовмісні речовини?

Лабораторна робота 4

Тема: Отримання амінокислот шляхом біосинтезу.

Мета заняття: вивчення методів отримання амінокислот шляхом біосинтезу.

При дослідженні можливості використання амінокислот в якості джерел вуглецевого і азотного живлення до складу середовища вводять досліджувану амінокислоту, потім визначають її кількісний вміст в ході культивування. Паралельно проводять спостереження за ростом культури. При використанні комплексних середовищ, що містять в своєму складі складні органічні речовини (кукурудзяний екстракт, соєве борошно і т. д.), частина амінокислот знаходиться у вільному стані, частина в зв'язаному, в основному в білкових молекулах. В цьому випадку дуже важко встановити, які з присутніх в середовищі амінокислот найбільш інтенсивно включаються в метаболізм.

Для оцінки інтенсивності включення амінокислот в обмін речовин створюють синтетичні середовища, що складаються з чистих амінокислот. Аналіз вмісту амінокислот в таких середовищах показує, що з найбільшою інтенсивністю в метаболізм деяких актиноміцетів включаються глютамінова і аспарагінова кислоти, а-аланін і гістидин.

Для оцінки впливу окремих компонентів середовища їх по черзі вводять до складу середовища відомого складу, не змінюючи кількості інших речовин. При цьому регулярно під час всього процесу ферментації аналізують кількість синтезованого продукту. Оцінка кількості синтезованої речовини може проводитися в вагових одиницях або одиницях активності на мілілітр культуральної рідини. При переході до роботи з новими селекціонованими штамми вже відомого продуцента необхідно ретельно проаналізувати вплив різних компонентів середовища на біосинтез антибіотика. У зв'язку з тим, що соєве борошно, кукурудзяний екстракт і інші подібні речовини мають досить складний хімічний склад, важко часом оцінити, які їх складові частини мають позитивний вплив на процес біосинтезу антибіотика. Для оцінки впливу різних компонентів, що входять

до складу соєвої муки, проводять її фракціонування за допомогою ряду фізико-хімічних методів. При введенні до складу середовищ для культивування окремих фракцій кислотного гідролізату знежиреного соєвого борошна було показано, що фракція моноамінокислоти сприяє зростанню актиноміцета, а основні амінокислоти - біосинтезу стрептоміцину(табл. 6).

Досліджуючи вплив різних фракцій поживного середовища на біосинтез стрептоміцину, екстракт фракціонували методом електрофорезу. У зоні катода була отримана фракція, яка при введенні в середу для культивування сприяла підвищенню виходу антибіотика в порівнянні з контролем.

Таблиця 6

Вплив різних джерел органічного азоту на утворення стрептоміцину

Джерело азоту	Максимальна активність В МКГ/МЛ		Продуктивність мицелію в МКГ/МГ	
	штами		штами	
	В-178	ЛС-1	В-178	ЛС-1
Гліцинін	251	1475	35	247
Ферментативний гідролізат гліциніну	583	925	84	195
Кислотний гідролізат гліциніну ...	631	1170	115	246
Соєва мука ...	200	1480	—	—

Детальний аналіз цієї фракції показав, що вона складається з основних амінокислот (аргінін, гістидин, лізин, пролін). Порівняльне вивчення різних партій кукурудзяного екстракту як компонентів середовищ для культивування призвело до висновку про те, що найвищий рівень вмісту стрептоміцину може бути досягнутий, застосовуючи таку партію екстракту, де

відзначається певне співвідношення між кількістю основних амінокислот і моноамінокислот.

Вивчення впливу окремих компонентів середовища зазвичай проводять на синтетичних середовищах шляхом введення досліджуваної речовини в їх склад. Іншим методом є «гострий» дослід. В цьому випадку мікроорганізми культивують на рідкому середовищі, потім їх ретельно відмивають від неї в стерильних умовах. Міцелій стерильно переносять в нове середовище, що містить компоненти, вплив яких необхідно досліджувати. Для дослідницьких цілей «гострий» дослід має деякі переваги перед культивуванням.

Безпосереднє включення амінокислот середовища в молекулу антибіотика - явище досить рідкісне, бо, як правило, джерелом для синтезу є вільні внутрішньоклітинні амінокислоти.

З мінеральних азотовмісних речовин в поживних середовищах найбільш часто використовують амонійні солі сірчаної, соляної або азотної кислот(табл. 7).

Таблиця 7

Інтенсивність росту, споживання нітратного азоту і утворення антибіотиків при ферментації на середовищах з різними джерелами мінерального азоту

Джерело мінерального азоту	Штам	Активність у %	Час максимальної активності в годинах	% витраченого нітратного азоту	Вага міцелію (максимальна) в мг %
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Act. aureofaciens	87	68	—	768
NH_4Cl		100	68	—	802
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$		14	60	—	726
NH_4NO_3		94	68	0	776
NaNO_3		22	60	45	613

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Act. rimosus	100	99	—	833
MH_4Cl		88	84	—	808
$(\text{NH}_4)_2\text{HP0}_4$		16	99		809
NH_4NO_3		47	99	37	637
NaNO_3		31	76	100	628

Вплив джерела азоту на біосинтез антибіотика залежить не тільки безпосередньо від самого джерела азоту, але також і від загальної композиції середовища. Суттєве значення в цьому має відношення присутнього в середовищі азоту до вуглецю (N:C). Стосовно кожного штаму-продуцента ця величина буде різною. Сутність створення поживного середовища для біосинтезу полягає в підборі такої композиції, яка забезпечувала б накопичення метаболітів-напівпродуктів молекули антибіотика і відповідних ферментних систем, що здійснюють синтез.

Питання для самоконтролю

1. Який тип поживних середовищ доречніше використовувати оцінки інтенсивності включення амінокислот в обмін речовин, і чому?
2. В чому полягає суть «гострого» досліджу?
3. Як проводять оцінку впливу окремих компонентів середовища на мікроорганізми?

МОДУЛЬ 2

ОБМІН ВУГЛЕВОДІВ В КУЛЬТУРАХ МІКРООРГАНІЗМІВ. ВПЛИВ ЖИРІВ НА ПРОЦЕСИ БІОСИНТЕЗУ

Лабораторна робота 5

Тема: Вуглеводні компоненти мікробних клітин.

Мета заняття: вивчення вуглеводневої природи компонентів мікробних клітин.

У міцелії грибів і актиноміцетів вуглеводи присутні у вигляді полісахаридів

До складу вивчених полісахаридів, виділених з міцелію актиноміцетів, входять в найбільшій кількості глюкоза, галактоза, маноза; в меншій кількості - арабіноза, ксилоза, рамноза. Полісахариди, які складаються із залишків різних моносахароз, називаються гетерополісахаридами.

Різні види мікроорганізмів відрізняються один від одного будовою специфічних полісахаридів, ними обумовлені також антигенні і токсичні властивості. Наявність або відсутність деяких моноз в складі полісахаридів пов'язують іноді з таксономічними ознаками.

Вуглеводи входять також до складу полісахаридів клітинної стінки. Актиноміцети на відміну від грибів не містять таких полімерів, як хітин і целюлоза, хоча в їх складі виявлено глюкозамін.

З клітинних стінок деяких актиноміцетів були виділені тейхоєві кислоти. В даний час відомі два їх типи: рибіттейхоєва і гліцеринтейхоєва кислоти (рис.2, рис. 3).

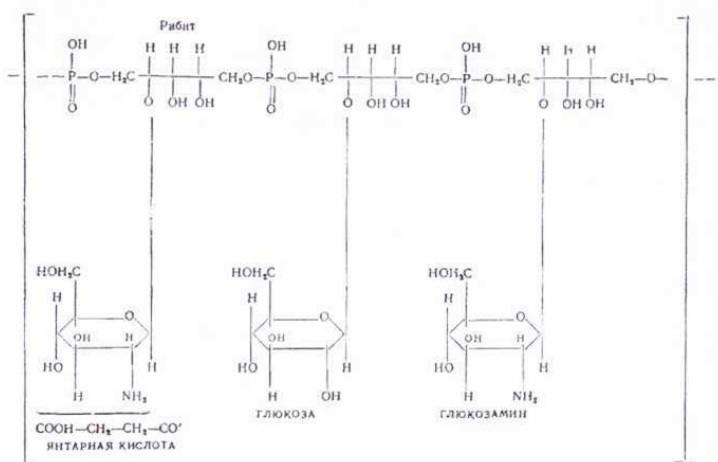


Рис. 2 Фрагмент рибіттейхоєвої кислоти з *Act. streptomycini* ЛС-1

До складу полімеру входить бурштинова кислота, що має з ним ефірний зв'язок. Кількість тейхоевих кислот змінюється в залежності від віку культури. Так, при дослідженні *Act. streptomycini* ЛЗ-1 найбільшу кількість рибітфосфатного полімеру було виявлено в молодому міцелії в той період часу, коли починається синтез стрептоміцину. На відміну від культури *Act. streptomycini* ЛС-1 у культури *Act. violaceus* виявлена тейхоева кислота, позбавлена глюкозаміну. Іншим типом тейхоевих кислот є гліцеринтейхоева кислота, виділена з *Act. rimosus* T-118. Повна структура цього полімеру не встановлена.

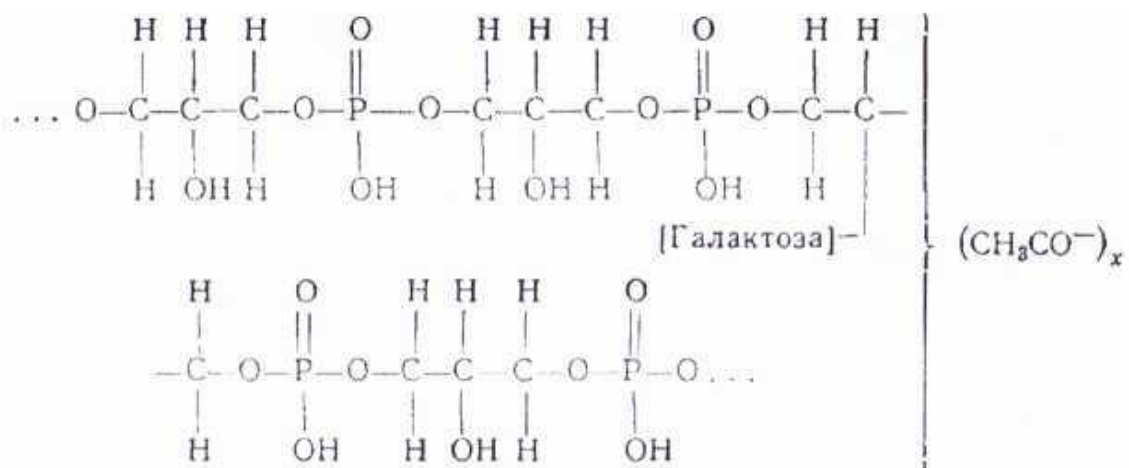


Рис.3 Фрагмент гліцеринтейхоевої кислоти з *Act.rimosus* T-118

Гліцеринтейхоевая кислота з *Act. antibioticus* 39 є полімером, до складу якого входять два фосфорних ефіру: гліцерфосфат і глікозилгліцеринмонофосфат. Складноєфірним зв'язком з'єднана з полімером оцтова кислота.

Аналіз клітинних стінок різних мікроорганізмів дозволяє стверджувати, що за їх хімічним складом актиноміцети найбільш близькі до грампозитивних бактерій

Для того, щоб правильно вести процес біосинтезу, необхідно знати шляхи обміну вуглеводів і вміти ними керувати. Вуглеводний обмін покликаний задовольняти три основні потреби клітини: 1) отримання енергії, 2) утворення попередників, необхідних для синтезів, 3) створення окислювально-відновних механізмів для перетворення цих попередників у відповідні проміжні або кінцеві продукти, придатні в якості клітинних компонентів. Одним із шляхів

вуглеводного обміну є гліколіз. Гліколіз є сукупністю анаеробних ферментативних процесів розпаду глюкози.

Процес анаеробного розщеплювання глюкози починається з її фосфорилування і утворення глюкозо-6-фосфату. Ця реакція здійснюється ферментом гексокінази або глюकोкінази. Біологічне значення гліколізу полягає в тому, що в результаті розпаду вуглеводів утворюються багаті енергією фосфорні сполуки і речовини, що використовуються для цілей синтезу, а також є основними субстратами для процесів окислення. Одним з головних субстратів окислення є пірвіноградна кислота.

Іншим на відміну від анаеробного є шлях, який називають пентозним, гексозомонофосфатним або апотомічним шляхом розпаду вуглеводів. Це - шлях окислювального розпаду глюкози, центральною ланкою якого є утворення пентоз, що знову перетворюються через ряд проміжних продуктів в гексози.

Пентозний цикл починається з окислення глюкозо-6-фосфату за участю дегідрогенази(рис. 4).

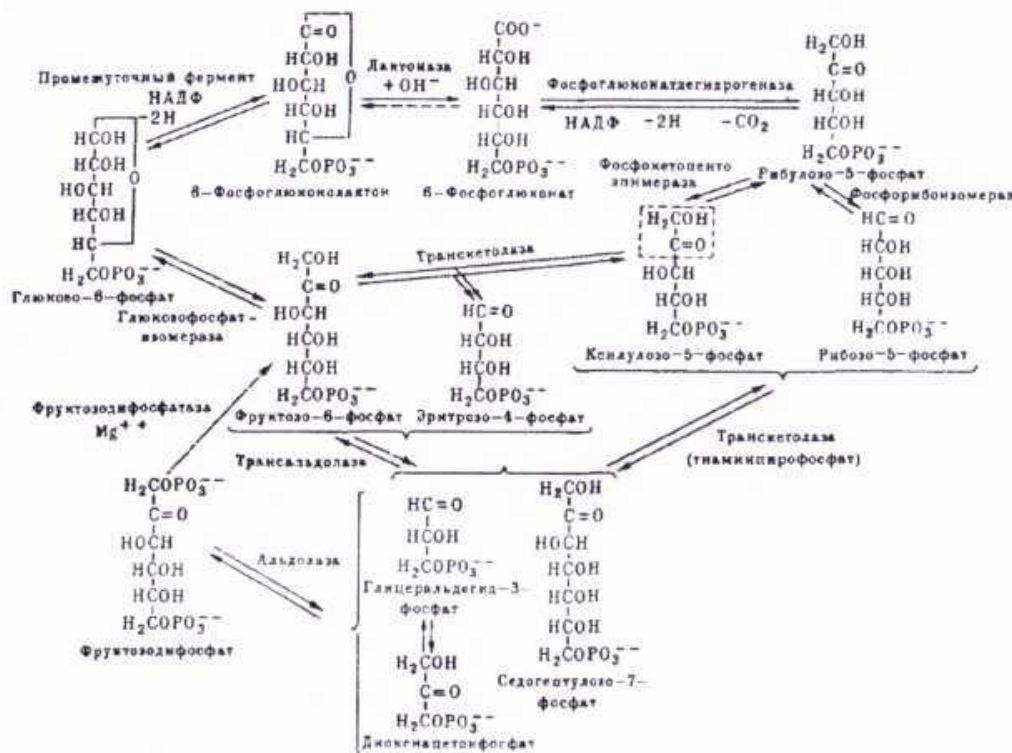


Рис. 4 Обмін глюкозо-6-фосфату по пентозофосфатному шляху.

У деяких мікроорганізмів пентозний цикл може бути головним шляхом розщеплення вуглеводів, але для більшості організмів

він забезпечує можливість синтезу рибоза-5-фосфату, який бере участь в утворенні нуклеотидів і коферментів.

У деяких мікроорганізмів можуть бути відхилення від класичних схем, наведених вище. Процес дисиміляції вуглеводів у продуцента олеандоміцину *Act. antibioticus* на перших етапах розщеплення цукрів здійснюється через пентозний цикл. Починаючи з моменту окислення фосфотріоз в фосфогліцеринові кислоти, в ньому бере участь гліколітичний цикл обміну. Нижче представлена схема процесу дисиміляції глюкози у *Act. Antibioticus*.(рис.5)

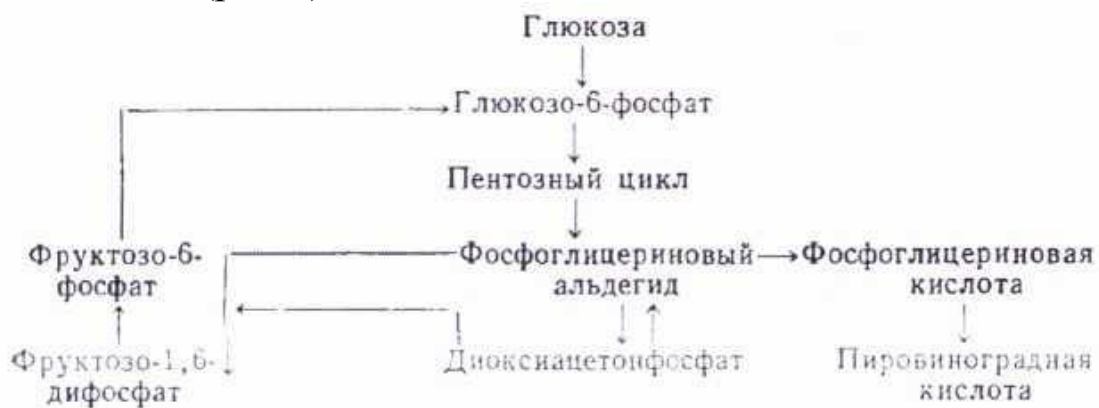


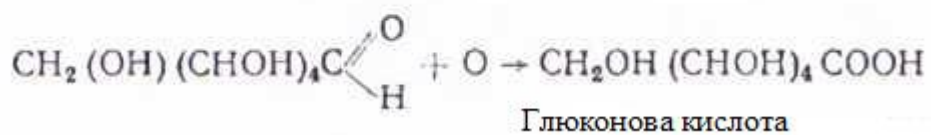
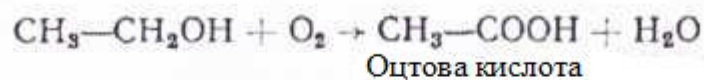
Рис. 5. Процесу дисиміляції глюкози у *Act. Antibioticus*

Розрізняють дві групи принципово відмінних енергетичних перетворень речовин:

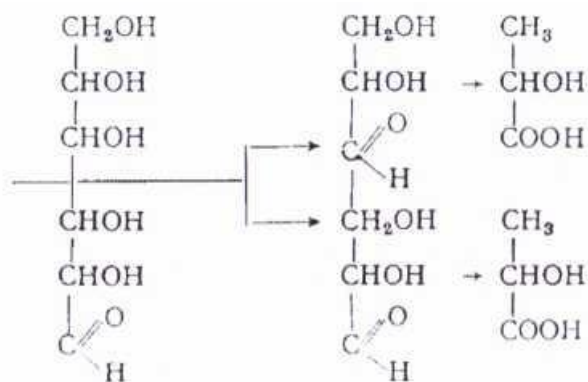
- 1) анаеробні процеси, що протікають без будь-якої участі кисню
- 2) аеробні, в яких кисень повітря обов'язково бере участь

Таким чином, можуть бути встановлені три наступних типи енергетичних процесів:

1. Пряме окислення речовини субстрату

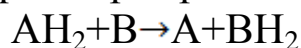


2. Десмолітичне розщеплення речовин без участі кисню повітря, але зі стабілізацією продуктів бродіння :



3. Окисний десмоліз, тобто десмолітичне розщеплення, пов'язане з окисненням продуктів десмолізу киснем повітря, - дихання.

А. Клюйвер (1959) вважає, що схожість між спиртовим бродінням і диханням, якими би далекими не здавалися ці процеси на перший погляд, полягає в тому, що і в тому і в іншому випадках істотну роль грає реакція:



Різниця між обома процесами, мабуть, обмежується тим, що при диханні молекула В, яка відіграє роль кінцевого акцептора водню, представлена вільним киснем, тоді як при бродінні цим акцептором В служить якась органічна сполука, що утворюється з самого субстрату.

Наведені вище реакції мають місце в обміні речовин більшості мікроорганізмів, що утворюють біологічно активні речовини

Питання для самоконтролю

1. Які найрозповсюдженіші полісахариди входять до складу компонентів мікробної клітини?
2. Які вуглеводи входять до складу клітинної стінки?
3. Які потреби в клітині задовольняє вуглеводневий обмін?
4. Які енергетичні перетворення відбуваються в клітині?

Лабораторна робота 6

Тема: Характеристика основних джерел вуглеводів, які використовуються для біосинтезу.

Мета заняття: визначення основних джерел вуглеводів необхідних для біосинтезу.

Вуглеводи є однією з найважливіших складових частин середовищ для культивування мікроорганізмів. Вони використовуються для синтезу клітинних структур і є одночасно джерелом енергії. Вуглеводи є сполуками, багатими вуглецевими атомами. Вуглець входить до складу протоплазми клітин, клітинних оболонок, ферментів і т.п. Близько половини сухої ваги всіх мікроорганізмів припадає на частку вуглецю. Вуглеці забезпечують побудову вуглецевої структури молекули більшості антибіотиків, амінокислот, вітамінів і т. д. Тому сполуки, що містять вуглець, мають першочергову роль в харчуванні мікроорганізмів.

Мікроорганізми-продуценти можуть споживати різні вуглеводи, але найбільш часто вживаними для промислового використання є глюкоза або крохмаль. За хімічною структурою глюкоза є альдогексозою.

До складу поживних середовищ для виробництва хлортетрацикліну, ністатину і деяких інших антибіотиків входить крохмаль. Він на 96-97,5% складається з полісахаридів, що утворюють глюкозу. Вуглеводна частина крохмалю складається з двох полісахаридів: амілози і амілопектину. Амілоза є лінійним полімером глюкози, з молекулярною вагою 50 - 160 тисяч. Амілоза добре розчиняється в теплій воді, утворюючи розчини порівняно невисокою в'язкості. У молекул амілози залишки глюкози пов'язані між першим і четвертим вуглецевими атомами.

Амілопектин відрізняється від амілози розгалуженою будовою своєї молекули. Його розчинність в воді менша, ніж у амілози. Розчини амілопектину при охолодженні можуть утворювати гелі.

Аналіз кількісних співвідношень між амілозою і амілопектином у крохмалів, отриманих з різних рослин, дав наступні результати(табл. 8.)

Таблиця 8

Кількісне співвідношення між амілозою і амілопектином у крохмалів.

Сорт крохмалю	Амілоза (у %)	Амілопектин (у %)
Картопляний.	19—22	78-81
Пшеничний ..	24	76
Кукурудзяний	21—23	77—79
Рисовий	17	83

Вивчаючи механізми використання поживних субстратів, в першу чергу вуглеводів, необхідно відзначити, що багато гідролітичних ферментів, зокрема амілолітичні, є позаклітинними ферментами. Їх роль в основному зводиться до перетворення складних з'єднань в більш прості, засвоювані організмом. Реакції синтезу здійснюються в основному усередині клітини. Речовини, що гідролізуються в середовищі, поступово асимілюються клітиною, тим самим постійно зрушуючи потенційно можливе становлення рівноваги ферментативної реакції. Процеси гідролізу в середовищі практично йдуть до кінця. Усередині клітини відбувається безперервне накопичення продуктів гідролізу, що сприяє зворотній реакції або, інакше кажучи, синтезу. Таким чином, можна очікувати, що синтез всередині клітини повинен відбуватися переважно в ті періоди, коли в клітину безперервно надходить велика кількість простих молекул поживних речовин. У тих же випадках, коли в клітину не надходить поживних речовин або коли їх надходить недостатньо, відбувається гідроліз запасних поживних речовин.

В якості критерію для оцінки ефективності використання культурою джерела вуглецю найбільш широке поширення отримав економічний коефіцієнт, що виражає співвідношення між вагою біомаси і вагою використаного вуглеводу. Для підрахунку після закінчення досліду визначають кількість вуглецю в середовищі, що залишився незасвоєним. Вважають, що мікроорганізми, що володіють достатньою біохімічною

активністю, перетворюють приблизно половину вуглеводів, що містяться в середовищі, в складові частини клітини. У лабораторних умовах практично ця величина значно менше.

При вивченні впливу вуглеводів на біосинтез різних біологічно активних речовин, як правило, для культивування продуцентів використовують синтетичні середовища. Створюється певна композиція середовища, в якій потім в серії послідовних дослідів один вуглевод замінюють іншим в рівних кількостях. На прикладі дослідів, проведених на синтетичних середовищах з кількома штамми продуцента стрептоміцину, доцільно розглянути деякі питання, пов'язані з впливом вуглеводів на біосинтез антибіотика (табл. 9). З даних таблиці випливає, що найбільш інтенсивно в більшості дослідів використовувалися глюкоза, фруктоза, маноза, мальтоза, крохмаль. На середовищах з цими вуглеводами було відмічено утворення найбільшої кількості біомаси.

Таблиця 9

Застосування вуглеводів штамми *Str. griseus*, що ростуть на синтетичному середовищі

Вуглеводи	Кількість використаних вуглеводів у %			Продукція стрептоміцину в мкг/мл			Вага міцелію в мг/мл		
	штами			штами			штами		
	а	в	с	а	в	с	а	в	с
Глюкоза.....	90	85	85	175	660	710	5,1	4,3	5,4
Фруктоза.....	90	85	90	195	675	410	4,3	3,9	4,3
Маноза.....	90	90	90	195	410	530	5,3	3,7	3,8
Галактоза.....	25	15	90	<25	<25	390	<1	<1	3,1
Лактоза.....	<10	<10	35	<25	<25	145	<1	<1	1,7
Сахароза.....	<10	<10	<10	<25	<25	<25	<1	<1	<1
Мальтоза.....	95	95	30	190	770	115	3,9	4,7	1,1
Крохмаль.....	95	95	25	215	690	110	5,1	4,9	1,1

Таким чином, при оцінці результатів впливу вуглеводів на синтез того чи іншого антибіотика необхідно враховувати штам продуцента, його специфічну потребу у вуглеводах і особливості метаболізму, що забезпечують накопичення в середовищі потрібного продукту.

Крім штаму, необхідно враховувати загальну композицію середовища. Якщо ті ж вуглеводи, які застосовували в

синтетичному середовищі, застосувати в комплексному, що містить соєве борошно, то ступінь їх використання і впливу на вихід антибіотика може бути іншим, ніж на синтетичному середовищі (табл.10).

Таблиця 10

Використання вуглеводів штамами *Sr. griseus*, що ростуть на соєвому середовищі

Вуглеводи	Кількість використаних вуглеводів у %			Продукція стрептоміцину в мкг/мл		
	а	в	с	а	в	с
Глюкоза	95	95	95	225	535	1010
Галактоза	95	95	95	65	290	875
Крохмаль	95	95	15	240	465	50
Мальтоза	95	95	15	235	170	60

Однією з причин різної продуктивності тих самих штамів на середовищах, що містять глюкозу або крохмаль, є відмінність в обміні речовин в присутності даних вуглеводів.

Для оцінки доцільності застосування того чи іншого компонента середовища, зокрема вуглеводу або вищого спирту, необхідно враховувати час досягнення максимуму змісту антибіотика в культуральній рідині(табл.11).

Таблиця 11

Утворення антибіотика і час досягнення його максимального вмісту на середовищах з різними джерелами вуглецю.

Джерело вуглецю	<i>Act. aureofaciens</i>		<i>Act. rimosus</i>	
	максимальна активність у %	час максимальної активності за годину	максимальна активність у %	час максимальної активності за годину
Крохмаль	100	81	100	94
Мальтоза	—	—	115	105
Галактоза	—	—	24	81
Глюкоза	120	81	3	69
Гліцерин	119	93	15	69
Маніт	—	—	72	93

Примітка: активність на середовищі з крохмалем прийнята за 100%.

При оцінці впливу різних джерел вуглеводу на біосинтез антибіотиків необхідно мати на увазі, що при стерилізації середовищ для культивування під тиском 1,5-2,0 атм в них відбуваються різні хімічні процеси, що впливають на хід ферментації. При зазначених умовах вуглеводи взаємодіють з амінокислотами, з солями амонію. Візуально це зазначається потемніння середовища. Тому рекомендується стерилізацію вуглеводів проводити окремо, зокрема при системі виносної стерилізації. При ферментації на середовищах, де вуглеводи втратили свою якість після стерилізації, спостерігаються нижчі виходи.

Слід зазначити, що в останні роки увагу великої кількості дослідників привертає можливість використання вуглеводнів, одержуваних з різних фракцій при перегонці нафти, в якості джерела вуглецю. Найбільш значні успіхи при їх використанні досягнуті при отриманні кормових дріжджових білків. Результати, які досягнуті при культивуванні продуцентів антибіотиків, амінокислот і т. д., не дають підстави для широкого впровадження середовищ, що містять вуглеводні, в промисловість через занадто незначні виходи продуктів ферментації, а також у зв'язку з деякими ускладненнями технології та їх виділення і очищення.

Питання для самоконтролю

1. Які основні джерела вуглеводів використовуються для біосинтезу?
2. В чому відмінність використання вуглеводів, штамами що культивуються на різних середовищах?
3. Що таке економічний коефіцієнт?
4. Від чого залежить вибірковість продуцентів до вуглеводів, що входить до складу середовища?
5. Які недоліки виникають при культивуванні продуцентів на середовищах, що містять вуглеводні?

Лабораторна робота 7

Тема: Хімічний склад жирів, які синтезуються мікроорганізмами.

Мета заняття: вивчення синтезованих мікроорганізмами жирів, та дослідження їх хімічного складу.

Як продуцентів жирів і ліпидо-білкових комплексів для кормових цілей в основному використовуються дріжджові культури. З мікроорганізмів, що утворюють біологічно активні речовини, найбільш повно вивчений хімічний склад жирів у грибів, що відносяться до родів *Penicillium* і *Aspergillus*.

Вміст жиру в грибах, що утворюють міцелій, коливається в дуже широких межах, від 1 до 50% (на суху вагу), в залежності від культури, віку і умов культивування. Основна маса ліпоїдної фракції складається з гліцеридів, що містять зазвичай насичені і ненасичені жирні кислоти з C_{16} і C_{18} , головним чином пальмітинову, стеаринову, олеїнову та лінолеву кислоти.

При дослідженні жирних кислот, що входять до складу жиру *Penicillium sorpії*, були виявлені наступні жирні кислоти (у відсотках до загальної суми): міристинова - 0,3, пальмітинова - 22,0, стеаринова - 7,6, арахісова - 0,9, гексадеценова - 3,3, олеїнова - 45,2, лінолева - 20,0, ліноленова - 0,3, ейкозенова - 0,3. За складом жирних кислот виділений жир нагадує арахісове масло.

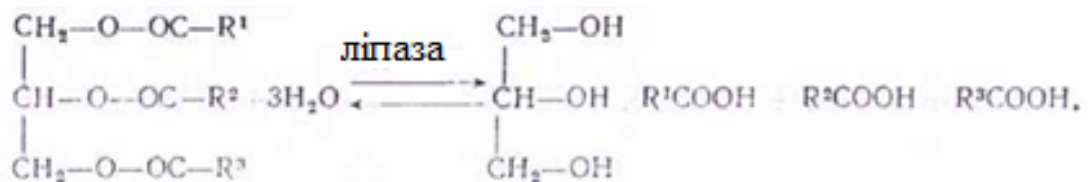
Фізико-хімічні константи жирів мікроорганізмів характеризують загальноприйнятими для жирів показниками: кислотним та йодним числами, числом омилення, температурами затвердіння і плавлення.

Оскільки приєднання йоду відбувається за місцем подвійних зв'язків, наявних в ненасичених жирних кислотах, йодне число дає уявлення про зміст в жирі ненасичених кислот. Чим вище йодне число, тим у жиру більш рідка консистенція. Чим вище йодне число, тим жир легше окислюється. За величиною йодного числа жири, виділені з грибів, що відносяться до пеніцил і аспергіл, займають проміжне положення між рослинними і тваринними жирами. Таке ж становище

займають виділені з мікроорганізмів жири за величиною їх температури плавлення.

Крім власне жирів, до складу міцелію входять інші речовини, відмітними ознаками яких, так само як і жирів, є гідрофобність і нерозчинність у воді. Речовини цієї групи, що носять загальну назву ліпоїди, розчиняються в різних органічних розчинниках: етиловому ефірі, бензині, бензолі, хлороформі, ацетоні, етанолі і т. д. Деяка частина ліпоїдів знаходиться в зв'язаному стані, тому визначення кількості жирів в міцелії дає більш високі показники після спеціальної його обробки, яка дозволяє виділити жири з різних комплексних сполук, наприклад ліпопротеїдів

Ліпаза - фермент, який діє на складний ефірний зв'язок між гліцерином і високомолекулярними жирними кислотами. В результаті цієї реакції утворюються гліцерин і жирні кислоти. Ліпаза виявлена у багатьох мікроорганізмів, зокрема у продуцентів антибіотиків:



У зв'язку із застосуванням різних жирів в якості піногасників і джерел вуглецевого харчування ліпаза становить значний інтерес. Наявність ліпази є одним з факторів, що сприяють засвоєнню жирів в якості поживних речовин. Завдяки присутності ліпази в культуральній рідині відбувається розпад жирів, які були введені в середовище.

Ліпаза *Act. aureofaciens* виявлена як в міцелії, так і в культуральній рідині. Вона має два максимуми активності в кислій (рН 5,0) і лужній (8,0-8,5) зонах. Більш високу активність фермент проявляє в лужній зоні. Активність ліпази *Act. aureofaciens* ЛСБ-16 щодо різних масел і жирів неоднакова (табл. 12). Вона має найвищу активність щодо соняшникової олії і низьку - щодо кокосового і пальмоядрового масел. Присутність в живильному середовищі масла сприяє збільшенню ліполітичної активності культури.

При вивченні культури *Penicillium chrysogenum* було показано, що в процесі ферментації активність ліпази міцелію поступово збільшується і досягає максимуму на третю добу культивування. У культуральну рідину ліпаза виділяється швидко і, коли закінчується ріст міцелію і спостерігається інтенсивне пеніциліноутворення, накопичується у великій кількості. Потім її кількість поступово знижується.

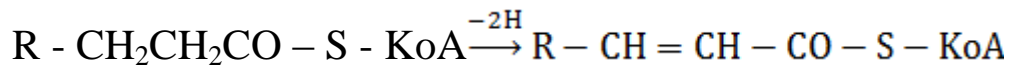
Таблиця 12

Активність внутрішньоклітинної ліпази міцелію *Act. aureofaciens* ЛСБ-16 щодо різних жирів і масел (у мл 0,1н. луку на 1 г абсолютно сухої ваги)

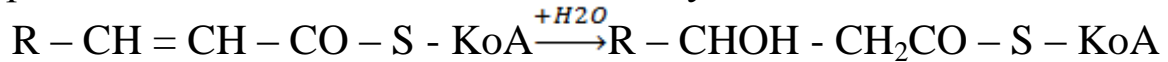
Субстрат	рН	
	5,1	8,2
Оливкова олія .	1,57	3,51
Касторова »	2,32	2,79
Льняна.....	1,96	3,28
Кукурудзяна...	1,57	3,03
Персикова	1,46	3,40
Абрикосова.....	2,06	3,64
Соняшникова .	1,71	6,50
Кашалотовий жир	1,84	3,90
Пальмоядрова олія	1,52	2,53
Кокосова	1,14	2,15
Трибутирин ...	5,60	7,18

β - окислення жирних кислот. Механізм, за допомогою якого у мікроорганізмів відбувається окислення утворених в результаті гідролізу жиру жирних кислот, добре вивчений у актиноміцетів. Він носить назву β -окислення. Механізм β -окислення полягає в послідовному укорочуванні жирної кислоти на два вуглецевих атома.

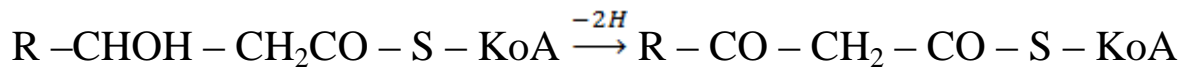
У реакціях β -окислення бере участь коензим А. Реакція дегідрування ацил-коензиму А похідного жирної кислоти каталізується відповідною ацилдегідрогеназою, в результаті чого утворюється сполука, що має подвійний зв'язок у другого вуглецевого атома:



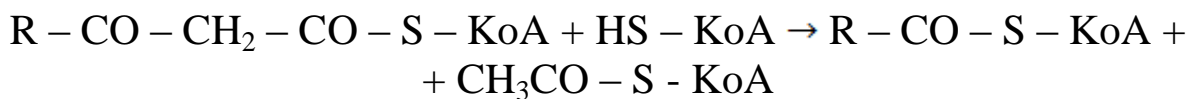
Далі діє фермент еноілгідраза, що каталізує реакцію приєднання води до ненасичених сполук:



Потім відбувається дегідрогенізація (3-оксикислоти до кетокислот за допомогою β -оксиацилдегідрогенази:



Перед дією β -кетואцилтіолази відбувається заключна реакція:



Таким шляхом утворюється ацил-коензим А - похідне жирної кислоти, укороченої на два вуглецевих атома, з яких виникає ацетилкоензим А. Утворене КоА - похідне жирних кислот проходить через такі ж чотири реакції і знову коротшає на два вуглецевих атома і т. д. Коензим А після включення ацетильного радикалу в цикл трикарбонових кислот, знову звільняється і може знову діяти як каталізатор.

Питання для самоконтролю

1. Який хімічний склад жирів в дріжджових грибах?
2. Яке фізико-хімічне значення йодного числа жирів?
3. Які основні функції ліпази ?
4. Поясніть механізм β - окислення жирних кислот.
5. Яка роль коензиму-А в реакціях β - окислення?

Лабораторна робота 8

Тема: Вплив умов культивування на синтез жирів.

Мета заняття: визначити, який вплив мають умови культивування мікроорганізмів на синтез жирів.

У тваринному організмі жири можуть утворюватися з вуглеводів. Те ж саме має місце у мікроорганізмів і вищих рослин.

Найбільш істотний вплив на синтез жирів мікроорганізмами надають вуглеводи середовища, їх концентрація та хімічна природа. Концентрація цукру повинна знаходитися в певних межах, так як при високих її величинах зростання грибів виявляється пригніченим.

Синтез жиру найбільш інтенсивно відбувається в тому випадку, коли співвідношення N:C невелике. При збільшенні цього співвідношення відбувається переважно синтез білків, а не жирів. Гриби можуть синтезувати жири, засвоюючи різні вуглеводи і багатоатомні спирти, наприклад глюкозу, маніт, сахарозу, ксилозу, арабінозу, гліцерин і т. д. Цей факт вказує на те, що при розщепленні молекул всіх цих речовин утворюється однакове проміжне з'єднання, яке служить вихідним матеріалом для синтезу жирів грибами.

На склад жирних кислот, що входять в жири міцелію або бактеріальних клітин, істотно впливає склад жирних кислот олій, присутніх в середовищах для культивування. У дослідях з *Penicillium nigricans* Thom, було переконливо показано, що в жирах міцелію, особливо на ранніх етапах його розвитку, переважають ті ж жирні кислоти, які перебували в оліях, що містяться в середовищі.

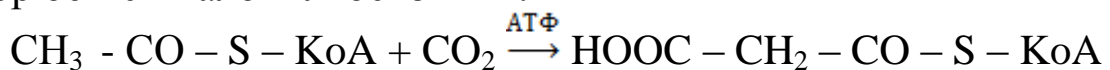
На хімічний склад жирів, зокрема на жирні кислоти, що входять до його складу, істотно впливають умови культивування. Низькі температури, наприклад, сприяли утворенню у *Aspergillus niger* великої кількості жирів, що містять ненасичені кислоти. Впливає на синтез жирів величина рН середовища. Середовища, що мають нейтральне значення величини рН, є найбільш

сприятливими для утворення жирів. На прикладі гриба *Aspergillus fischeri* було показано, що на кількісний вміст жиру і якісний склад жирних кислот, що входять до його складу, істотний вплив роблять мінеральні солі: сульфати калію і магнію і однозаміщений фосфат натрію. Залежно від їх концентрацій змінюються співвідношення між насиченими і ненасиченими жирними кислотами.

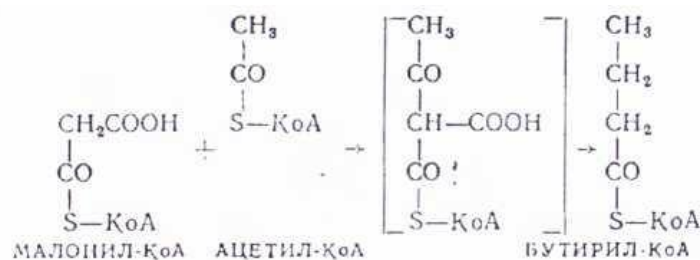
Стимулювати синтез жиру можна додаванням в середовище інгібіторів деяких ферментативних реакцій вуглеводного обміну, наприклад арсеніта натрію.

При спрямованих процесах біосинтезу, наприклад антибіотиків, необхідно виключити умови, що сприяють накопиченню жиру, так як для його синтезу використовуються ті ж самі компоненти середовища, в першу чергу вуглеводи, що і для синтезу антибіотиків.

Щодо механізму біосинтезу жирів грибами і актиноміцетами досить переконливі дані відсутні. Деякі непрямі експериментальні дані дозволяють припускати, що синтез жирних кислот відбувається аналогічно тому, як це має місце у вищих рослин: шляхом послідовного приєднання до вуглецевого ланцюжку ацетильних (ацильних) радикалів за допомогою ацетилкоензима А. Ацетил-коензим А за рахунок енергії, укладеної в АТФ, карбоксилюється CO_2 , в результаті чого утворюється малонілкоензим А:



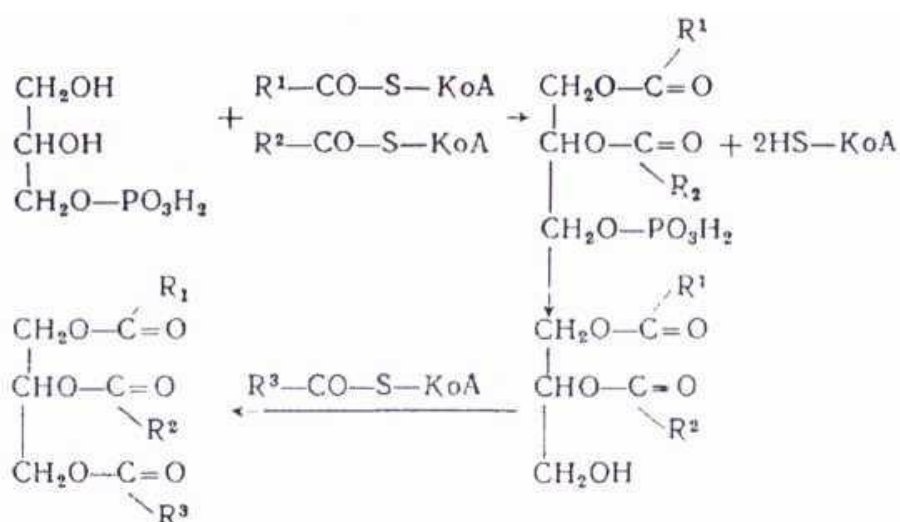
На наступному етапі малонілкоензим А реагує з молекулою іншого ацетилкоензима А. Однак продукт конденсації відразу ж відновлюється і втрачає CO_2 , в результаті чого утворюється бутирилкоензим А.



Ацил-коензим А, що утворився, - похідне жирної кислоти з 4 вуглецевими атомами, в свою чергу, конденсується з молекулою малонілкоензима А. Після відновлення і декарбоксилювання

продукту, що виникає таким шляхом, утворюється ацил-КоА - похідне капронової кислоти і т. д.

Синтез жиру здійснюється в кілька етапів. На першому - α -гліцеринфосфат реагує з двома молекулами ацил-коензиму А, в результаті чого утворюється фосфатидна кислота і дві молекули коензиму А. На другому етапі відбувається відщеплення від фосфатидної кислоти неорганічного фосфату з утворенням дигліцериду. На третьому - дигліцерид ацилюється за допомогою ацилкоензиму А. Продуктом останньої реакції є тригліцерид (нейтральний жир).



З рослинних масел найбільш часто використовують соняшникову, арахісову, соєву олії, з тваринних жирів - кашалотовий жир. Кашалотовий жир складається в основному з спермацету, що є сумішшю складних ефірів одноатомних спиртів з великим числом атомів вуглецю ($\text{C}_{16} - \text{C}_{18}$) і жирних кислот, наприклад цетилового спирту і пальмітинової кислоти. Рослинні масла складаються з тригліцеридів, до складу яких входить значна кількість ненасичених жирних кислот. Так, в соняшниковій олії на ненасичені кислоти (олеїнову і лінолеву) припадає до 93% від загальної кількості жирів, а в соєвому - до 90%. З інших жирних кислот у складі рослинних жирів виявлені пальмітинова, стеаринова і арахінова кислоти (табл. 13).

Підбір оптимальної концентрації жирів, що додаються, має значення також в силу тієї обставини, що великі концентрації олії значно уповільнюють асиміляцію вуглеводів, мабуть, замінюючи їх в окислювальному обміні.

Присутність в середовищі для культивування масла впливає на багато показників процесу ферментації. На прикладі культури *Act. streptomycini* ЛС-1 було показано, що вага міцелію при наявності в середовищі масла протягом усього процесу ферментації значно вище, ніж на контрольному середовищі без масла. У присутності масла значно швидше і повніше використовувався амонійний азот, а виділення його в середовищі сповільнювалося. Введення масла надавало стабілізуючий вплив на величину рН, зменшуючи в порівнянні з контролем діапазон коливань. При високій концентрації масла уповільнювалося використання вуглеводів

Таблиця 13

Хімічний склад масел

Масло	Жирна кислота					
	олеїнов а	лінолев а	ліноле- нова	пальмі- тинова	стеари- нова	арахіно ва
Вміст (у %)						
Соняшникове	39	54		Близько 9 насичених кислот		
Арахісове	50—70	13—26	—	6—11	2—6	5—7
Кукурудзяне	До 45	До 48	—	До 7,7	До 3,6	До 0,4
Соєве	25—36	52—65	2—3	6 - 8	3—5	0,4—1,0
Хлопкове	30—35	40—45	—	20—22	2	0, 1— 0,6
Льняне	13—29	15—30	44—61	9—11	6—7	насиче- них кис- лот

Таким чином, при ферментації ліпаза майже без залишку руйнує жир на гліцерин і жирні кислоти. Аналіз вихідного жиру і жиру, що міститься в культуральній рідині, показує, що по ходу ферментації значно знижується йодне число. Цей факт може свідчити про найбільш зручне споживання ненасичених кислот.

Різні масла можуть повністю замінити глюкозу при біосинтезі стрептоміцину. До їх числа відносяться кукурудзяне, соєве, бавовняне, льняне, оливкове, арахісове масло і лярд.

Як відомо, до складу деяких середовищ для біосинтезу антибіотиків входить соєве борошно. Соєве борошно містить до 19% олії. Для того, щоб встановити вплив олії сої на біосинтез стрептоміцину, застосовували знежирене борошно. У порівнянні з контролем, де використовували незнежирене соєве борошно, кількість синтезованого стрептоміцину знижувалася в 2-3 рази. Таким чином, для біосинтезу антибіотика використовується не тільки білок соєвого борошна, а й її жирові речовини.

У зв'язку з тим, що жири при ферментативному гідролізі утворюють гліцерин і жирні кислоти, були поставлені досліди по впливу складових частин жиру (гліцерину і деяких жирних кислот) на біосинтез антибіотиків.

При ферментації хлортетрацикліну використовували гліцерин, стеаринову, міристинову і олеїнову кислоти (табл. 14).

Таблиця 14

Вплив жирних кислот і гліцерину на біосинтез хлортетрацикліну

Компоненти живильного середовища	Концентрація у %		
	0,01	0,05	0.1
	вміст хлортетрацикліну у % до контролю		
Стеаринова кислота	87	79	92
Міристинова »	—	82	103
Олеїнова »	—	30	30
Гліцерин	—	—	64

У зв'язку з тим, що жири при ферментативному гідролізі утворюють гліцерин і жирні кислоти, були поставлені досліди по впливу складових частин жиру (гліцерину і деяких жирних кислот) на біосинтез антибіотиків.

При ферментації хлортетрацикліну використовували гліцерин, стеаринову, міристинову і олеїнову кислоти (табл. 14).

Питання для самоконтролю

1. Від чого залежить синтез жирів в мікроорганізмах?
2. Що впливає на хімічний склад синтезованих жирів?
3. З яких етапів складається синтез жирів?
4. Чому необхідно додавати олії до середовищ для культивування мікроорганізмів, що синтезують жири та жирні кислоти?

МОДУЛЬ 3

З'ЄДНАННЯ ФОСФОРУ ТА ЇХ УЧАСТЬ В СИНТЕЗІ МІКРООРГАНІЗМІВ. ВПЛИВ МІНЕРАЛЬНИХ КОМПОНЕНТІВ НА БІОСИНТЕЗ. ЗНАЧЕННЯ pH ДЛЯ ЖИТТЄДІЯЛЬНОСТІ МІКРООРГАНІЗМІВ.

Лабораторна робота 9

Тема: Фосфоровмісні компоненти мікробних клітин.

Мета заняття: визначити та вивчити фосфоровмісні компоненти мікробних клітин.

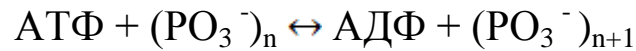
Поліфосфати, їх будова і фізіологічне значення. Поліфосфати являють собою лінійні полімери ортофосфорної кислоти, мають високу молекулярну вагу.

Вони є сполуками з макроергічними зв'язками, де в кожній зв'язку -P-O-P- укладено близько 10 ккал-мол. За своїми фізико-хімічними властивостями поліфосфати поділяють на кислоторозчинні (КР) і кислотонерозчинні (КНР). КР переходять в розчин при екстракції з міцелію холодним розчином п'ятивідсоткової трихлороцтової кислоти. КНР витягають слабкими розчинами лугів або гарячими розчинами трихлороцтової і хлорної кислот. КР поліфосфати містяться в клітині у вільному стані і не пов'язані з будь-якими іншими органічними сполуками. Вони містять приблизно від 3 до 25 фосфатних залишків. КНР поліфосфати є високополімерними сполуками, вони містять до 70-85 залишків фосфорної кислоти. Вони утворюють лабільні поліфосфатно-нуклеїнові комплекси або міцні комплекси з іншими клітинними компонентами, можливо, білками. КНР поліфосфати є акумуляторами енергії, в цьому відношенні їх можна порівняти з АТФ. Остання міститься в деяких мікроорганізмів в незначній кількості. У культури *Asp. niger*, наприклад, виявлено 2 мг% АТФ. Це дуже небагато, якщо мати на увазі те, що в м'язах людини міститься 200 мг%, а з м'язах кролика - 150 мг%.

Однією з функцій поліфосфатів є, на думку деяких дослідників, їх участь у перенесенні глюкози через клітинні стінки. Ймовірно, роль поліфосфатів в даному випадку полягає в передачі фосфатних груп глюкози, перенесення якої відбувається шляхом фосфорилування.

Для синтезу поліфосфатів в поживному середовищі необхідно мати достатню кількість фосфору і джерел енергії. Так, велика

кількість поліфосфатів у клітинах виявляється при наявності в середовищі великої кількості фосфору і субстратів, що легко окислюються, наприклад глюкози. У синтезі поліфосфатів бере участь АТФ, при цьому відбувається передача фосфорних груп від АТФ до поліфосфатів та назад:



Синтезується відразу високополімерна фракція без попереднього проходження через стадію низьких полімерів (КР), причому їх утворення здійснюється на якійсь органічній основі. Можливо, що цією речовиною є білок. Низькополімерні поліфосфати, що знаходяться в зв'язку з якимось, поки невідомим, органічним компонентом клітини, можуть служити «запалом» для цього синтезу. Кислоторозчинні поліфосфати утворюються шляхом ферментної деградації КНР-поліфосфатів. Ділянки АТФ в синтезі поліфосфатів, очевидно, для деяких культур не є обов'язковим. До їх числа належить, наприклад *Neurospora crassa*. З мікроорганізмів утворюють антибіотики, поліфосфати виявлені у *Pen. chrysogenum*, *Act. aureofaciens*, *Act. erythreus*. Наявність поліфосфатів не є точною систематичною ознакою, зокрема, як це у свій час припускали, характерною властивістю всіх низькоорганізованих організмів. Про наявність поліфосфатів рекомендують говорити, з огляду на конкретні умови культивування та вік міцелію. Так, наприклад, не вдалося виявити поліфосфати в міцелії *Pen. chrysogenum* при культивуванні гриба на середовищі з кукурудзяним екстрактом. На синтетичному середовищі у того ж мікроорганізму поліфосфати були знайдені на всіх стадіях розвитку. У міцелії *Act. aureofaciens* і *Act. erythreus* не вдалося виявити КР поліфосфати, якщо актиноміцети культивували на синтетичних середовищах, їх можна виявити тільки при вирощуванні на середовищі, що містив кукурудзяний екстракт. Незважаючи на наявні експериментальні дані, питання про наявність чи відсутність поліфосфатів у мікроорганізмів в залежності від складу середовища вимагає ґрунтовного вивчення.

Обмін поліфосфатів у різних мікроорганізмів відбувається в загальному по одним і тим самим закономірностям. Так, в процесі проростання спор цвілевих грибів і в латентну фазу розвитку бактерії йде інтенсивний синтез високополімерних поліфосфатів. Створення КНР поліфосфатів йде в цей період за рахунок низькополімерної КР

поліфосфатів, кількість яких різко знижується. У цей період ферменти, що розщеплюють КНР поліфосфати, знаходяться в неактивному стані. Фосфор поживного середовища не надходить в спори цвілевих грибів, тому при синтезі нуклеїнових кислот поліфосфати є для них джерело фосфору.

З початком інтенсивного росту і ділення клітин, зокрема при утворенні міцелію у грибів, високополімерні поліфосфати КНР-фракції використовуються на синтетичні процеси, які активно йдуть в цей час, і в першу чергу на біосинтез білка і нуклеїнових кислот. З переходом в стаціонарну фазу розвитку використання поліфосфатів для синтетичних цілей дещо призупиняється. Кількісні відносини між КНР і КР поліфосфатами залежать від умов культивування, що забезпечують, зокрема, ферментативну активність різних деполімераз поліфосфатів.

А. Н. Білозерський і І. С. Кулаєв вважають, що наявність конденсованих неорганічних фосфатів в відчутних кількостях тільки у нижчих організмів пов'язано з властивою цим організмам надзвичайно високою швидкістю поділу їх клітин. Поліфосфати, будучи концентратом великих кількостей фосфору і енергії, можливо якраз і забезпечують таку високу швидкість ділення у цих організмів.

Волютин. При фарбуванні клітин мікроорганізмів водним розчином метиленового синього при мікроскопії чітко видно густозабарвлені в синьо-фіолетовий колір зерна волютина на тлі блакитного забарвлення протоплазми. Волютин утворюється в міцелії, головним чином на пізніх стадіях розвитку, при надлишку в середовищі неорганічних сполук фосфору або вуглеводів або при нестачі азотовмісних речовин по відношенню до вуглеводів. У продуцентів антибіотиків найбільше вивчена природа волюти нових зерен в культурі *Act. aureofaciens*.

Волютинові гранули, що знаходяться в гіфах, незалежні від ядерних елементів. Основними компонентами волютину є РНК та кислото нерозчинні поліфосфати. Співвідношення між ними змінюється з віком. У молодих культур у складі валюти нових гранул міститься більша кількість РНК по відношенню до поліфосфатів, у старих – основним компонентом валютину є поліфосфати.

На утворення волютину в міцелії суттєвий вплив надає склад середовища для культивування. При цитологічному вивченні *Act. Aureofaciens* А.А. Прокоф'євою-Бельговською та Л.І. Поповою було встановлено, що збільшення вмісту фосфору неорганічних сполук в поєднанні с кукурудзяним екстрактом супроводжується інтенсивною

репродукцією ядерних елементів у молодому міцелії, тоді як збільшення вмісту фосфату в синтетичному середовищі закономірно тягне за собою появу в цитоплазмі багато чисельних гранул валютину. Утворення валютину – процес оборотний. Оскільки він є запасною живильною рідиною, основні компоненти валютину можуть витрачатися міцелієм в процесі росту. Більш того, валютинові зерна в окремих випадках можуть взагалі зникати до кінця ферментації. Однак поліфосфати валютину, ймовірно, не приймають у актиноміцетів безпосередню участь в синтезі білку та РНК. Як зазначалося вище, відокремлення гранул відбувається зазвичай на більш пізніх стадіях розвитку культури, коли синтез білку майже закінчений. Інтенсивне утворення валютинових зерен у більшості вивчених культур супроводжується зниженням синтезу антибіотиків.

Фітин. Фітин являє собою Са-Mg-сіль інозитфосфорної кислоти. Інозит є циклічним шестиатомним спиртом, що має ту ж сумарну формулу, що й глюкоза. Присутність фітину в міцелії доведено у *Penicillium chrysogenum* та деяких актиноміцетів.

Кількість фітину в міцелії залежить від складу середовища. В міцелії *Penicillium chrysogenum* при культивуванні на синтетичному середовищі з KH_2PO_4 міститься значно менше фітину (0,002-0,03%), ніж на середовищі з кукурудзяним екстрактом (3-5%). При додатковому введенні фосфату та інозиту в синтетичне середовище кількість фітину різко не збільшувалось (до 0,05-0,06%).

В міцелії *Act.aureofaciens* відмічалася кореляція між кількісним вмістом фітину та РНК. Зменшення кількості фітину призводило до збільшення кількості РНК. Можливо, що фосфор фітину витрачається на синтез молекули РНК.

Питання для самоконтролю

1. На які дві групи поділяють поліфосфати, та які їх основні властивості?
2. Яка залежність вмісту поліфосфатів в мікроорганізмах від умов культивування та віку культури?
3. Що таке валютин?
4. Як склад середовища для культивування впливає на утворення валютину?
5. Що таке фітин і чому він утворюється в клітинах?

Лабораторна робота 10

Тема: Вплив фосфору на біосинтез антибіотиків.

Мета заняття: дослідити вплив фосфору на біосинтез антибіотиків.

На біосинтез антибіотиків значний вплив має концентрація в середовищі з'єднань фосфору. Такими поєднаннями найбільш часто бувають одно- або двозаміщенні фосфати калію та натрію. Зміни вмісту фосфату у середовищі несе за собою зміни в синтезі важливих для життєдіяльності клітини фосфоровмісних компонентів: нуклеопротейдів цитоплазми та ядерних елементів.

Дослідні дані, які були отримані при ферментації деяких антибіотиків, показали, що підвищенні концентрації фосфату у середовищі значно знижують їх вихід. При ферментації на середовищі з кукурудзяним екстрактом вміст фосфору 2мг% більш сприятливий, ніж 12мг%. При вивченні впливу різних концентрацій однозаміщеного фосфату калію на біосинтез окситетрацикліну штамами *Act.rimosus* ЛС-118 та 293 було показано, що оптимальний вміст фосфату у середовищі залежить від штаму.

З табл. 15 випливає, що оптимальна концентрація фосфору для штаму 118 нижче, ніж для штаму 293.

У деяких ферментативних середовищах, що містять кукурудзяний екстракт, неорганічний фосфор під час приготування середовища і стерилізації частково зв'язується крейдою. Тому в початковому середовищі, поряд з розчиненим неорганічним фосфором, завжди присутня деяка кількість неорганічного фосфору у вигляді осаду. Вивчення споживання цих форм фосфору в процесі ферментації хлортетрацикліну показало, що фосфор розчинних мінеральних сполук дуже швидко використовується мікроорганізмом і вже до 18-ї години зростання він практично зникає з культуральної рідини. Фосфор нерозчинних мінеральних сполук використовується продуцентом в значно меншому ступені.

Таблиця 15

Вплив фосфору неорганічних з'єднань (K_2HPO_4) на процес ферментації *Act.rimosus* штамів ЛС-Т-118 та 293 (при рівному вмісті кукурудзяного екстракту)

Штам	Кількість розчиненого фосфору у середовищі в мг% K_2HPO_4	Окситетрациклін в мкг/мл	Вага міцелію		Вуглеводи у %	
			43 ч	Максимальна	67 ч	91 ч
118	1,55	3440	444	646	0,88	0,47
118	3,20	2840	567	687	0,68	0,35
118	8,92	1940	575	693	0,45	0,25
118	24,00	232	627	648	0,28	0,09
293	1,55	1400	345	436	1,56	1,41
293	3,20	2020	395	622	1,25	1,04
293	8,92	2260	587	785	0,74	0,63
293	24,0	314	—	—	0,20	0,08

У табл. 16 показані залежності між кількістю доданого в середовище фосфату і кількістю витраченої сахарози, а також вмістом пірвіноградної кислоти. У середовищах II і III з високим вмістом азоту пірвіноградної кислоти утворюється менше, ніж на бідному азотом середовищі I. Новоутворена пірвіноградна кислота найбільш інтенсивно включається в метаболізм тоді, коли вуглеводи середовища виявляються майже повністю зруйнованими.

Таблиця 16

Вплив фосфату на метаболізм сахарози *Str. aureofaciens* на різних середовищах

Середовище	Кількість доданого K_2HPO_4	Витрачено сахарози (г/100 мл)			Утворення пірвіноградної кислоти (г/100 мл)		
		24 ч	36 ч	48 ч	24 ч	36 ч	48 ч
I	—	1,24					
I	0,03 %	1,36	2,20	3,10	0,007	0,042	0,068
II	—	1,23	1,60	3,06	0,002	0,006	0,026
II	0,03 %	2,10	2,50	3,18	0,006	0,078	0,064
III	—	0,54	1,84	3,02	0,005	0,007	0,021
III	0,06 %	0,84	2,16	3,23	0,019	0,067	0,095

Істотний вплив на обмін речовин має час введення фосфатів в середовищі. При введенні надлишкової кількості фосфатів у середовище при біосинтезі стрептоміцину було встановлено, що гальмування біосинтезу антибіотика відбувається у всіх випадках, однак найбільше пригнічення синтезу спостерігалось, якщо фосфат був доданий в ранні терміни ферментації.

Одним з основних фосфоровмісних компонентів соєвого борошна і кукурудзяного екстракту є фітин. Тому багатьох дослідників цікавив вплив фітину на процеси біосинтезу антибіотика і засвоєння вуглеводів при використанні його як компонента середовища для культивування.

Порівняльний аналіз динаміки кількісних змін вуглеводів культуральної рідини *Act.streptomycini* штамів ЛС-1 і В-178 показав, що заміна однозаміщеного фосфату калію фітином веде до різкого пригнічення використання вуглеводів культурою. Одночасно було відзначено, що зміст стрептоміцину в культуральній рідині було значно нижче на середовищі з фітином, ніж на середовищі з фосфатом. При вивченні впливу фітину на обмін речовин *Pen. chrysogenum* насамперед було встановлено, що гриб виробляє руйнуючий фітин фермент фітаз, оптимум активності якого розташований в зоні рН 5,4-5,6. За дві години дії ферменту відбувається відщеплення 6-10% неорганічного фосфату фітину. При введенні фітину в якості єдиного джерела фосфору в середовище для культивування було показано, що при заміні фосфату калію рівною по фосфору кількістю фітину синтез антибіотика залишається приблизно на тому ж рівні (табл. 17).

Таблиця 17

Розвиток *Pen.chrysogenum* на синтетичному середовищі з фітином

Штами гриба	Джерело фосфору	Суша вага мицелію у мг%	Пеніцилін культуральної рідини у ОД/мл	Пеніцилін мицелію в ОД/мг
ВНІП-А	КН ₂ РО ₄	1288	515	39,9
	Фітин	1135	480	42,3
Новий гібрид	КН ₂ РО ₄	1643	1632	99,3
	Фітин	1668	1540	92,4

Одним з важливих для розуміння механізму асиміляції фосфору клітинами є питання про первинний акцептор фосфату, що міститься в середовищі. В дослідях з *Penicillium chrysogenum* було показано, що найбільша кількість радіоактивного фосфору міститься у фракції, що екстрагується з мицелію холодним трис-буфером при рН 9. Хімічна природа сполук, що входять до складу даної фракції, не встановлена.

Залежність між біосинтезом антибіотиків та вмістом фосфору в мицелії. Як було показано численними дослідями, продуктивність мицелію залежить від кількості фосфору, що в ньому знаходиться. Кількість фосфору в мицелії залежить від концентрації фосфору в середовищі. В. А. Северин і С.В.Горська (1957) вивчали названі закономірності на синтетичному середовищі, що містить глюкозу, молочну кислоту, сульфат амонію, сірчаноокислі солі магнію, заліза, марганцю, цинку. Кількість КН₂РО₄ була змінною. Вони встановили, що мицелій, що містить 5-6 мкг фосфору на 1 мг сухого мицелію, продукує мало стрептоміцину. Клітини такого мицелію володіють зниженою здатністю споживати основні поживні речовини середовища. Мицелій утворює нехарактерні для даного виду форми. 20-37 мкг фосфору на 1 мг мицелію також гальмують

утворення стрептоміцину, хоча динаміка процесу ферментації в цьому випадку інша - повне споживання вуглеводів, швидке накопичення біомаси, ранній автоліз міцелію. Кількість фосфору в 10-13 мкг на 1 мг міцелію найбільш сприятлива для успішного біосинтезу антибіотика (рис. 15). Така кількість фосфору накопичується в міцелії, якщо синтетичне середовище містить 12-15 мг% фосфору (або 0,05% K_2HPO_4).

З фосфорних сполук, що входять до складу клітин, найбільше значення для життєдіяльності мають нуклеїнові кислоти. Зміна здатності культури до утворення антибіотика зумовлена повною зміною життєвого циклу культури, пов'язаних з інтенсивним накопиченням нуклеїнових кислот, ядерної речовини та пригніченням другої фази розвитку. В залежності від кількісного вмісту фосфоровмісних речовин в міцелії та в першу чергу від ДНК та РНК визначається здатність культури синтезувати антибіотик. На ферментаційному середовищі, де кількість фосфору збалансована з вмістом інших компонентів, вміст ДНК відносно невеликий. Вміст РНК високий в перші години розвитку культури, потім прогресивно знижується, стимулюючи швидкий перехід культури у другу фазу, коли здійснюється біосинтез антибіотика. При надлишку фосфору в середовищі у протоплазмі інтенсивно накопичується ядерна речовина, що характеризується високим рівнем ДНК, вміст РНК залишається протягом тривалого часу високим, затримується перехід культури у другу фазу розвитку. При цьому здібність мікроорганізму до біосинтезу антибіотика різко знижується.

Питання для самоконтролю

1. Як впливає на біосинтез антибіотиків з'єднання фосфору в середовищі?
2. Як на обмін речовин впливає час введення фосфатів в середовище?
3. В яких випадках присутність фітину в середовищі пригнічує синтез антибіотиків, а в яких ні?
4. Яка залежність між біосинтезом антибіотиків та вмістом фосфору в міцелії?

Лабораторна робота 11

Тема: Зольний склад мікроорганізмів.

Мета заняття: визначення зольного складу мікроорганізмів

Поряд з органічними компонентами - білками, вуглеводами, жирами, в протоплазмі клітин містяться сполуки, що складають велику групу мінеральних речовин. Мінеральні речовини потрібні в невеликій кількості, але за їх відсутності виникають різні зміни в життєдіяльності клітин. Їх умовно можна поділити на структурні, метаболічні та каталітичні. За участю мінеральних елементів забезпечується ряд життєво важливих процесів. Це стосується насамперед підтримання певних фізико-хімічних констант - осмотичного тиску, кислотно-лужної рівноваги, процесів збудження та гальмування, каталітичної активності ферментів тощо. Кількісний вміст їх різний, багато хто з них виявлений в мікрокількостях. Для того, щоб визначити, які елементи входять до складу мікробних клітин, проводять спалювання біомаси (озолення), а потім аналізують золу, застосовуючи специфічні хімічні реакції або емісійний спектральний аналіз.

Спектральний аналіз міцелію продуцента стрептоміцину дозволив виявити в відчутних кількостях кальцій, магній, натрій, кремній, залізо, калій, фосфор, а стронцій, алюміній, літій, рубідій, марганець, свинець - у вигляді слідів. Приблизно такі ж елементи були виявлені в золі міцелію гриба *Asp. niger*, де, крім названих елементів, були ідентифіковані мідь, вісмут і срібло. У цього ж гриба проводилося окреме вивчення вмісту мінеральних компонентів в міцелії і спорах. Виявилось, що одні мінеральні речовини переважно накопичуються в спорах, інші в міцелії (табл. 18). Як видно з даної таблиці, спори містять в три рази більше золи, ніж міцелій. Кожен з представлених елементів, за винятком кальцію, присутній в спорах в більшій кількості, ніж в міцелії. Коливання вмісту мінеральних речовин в міцелії можуть бути досить значними. Так, в залежності від концентрації елементів в середовищі, їх вміст в міцелії спостерігався в

наступних межах: K^+ - 0,073-0,27 мМ/г; Ca^{++} - 0,0012-0,139 мМ/г; Mn – 0,007-0,172 мМ/г.

Таблиця 18

Хімічний склад золи спор та міцелію *Aspergillus niger* (у мМ на 1 г сухої ваги)

Матеріал	K	Mg	Ca	Mn	Na	P	Загальна кількість золи
Міцелій	0,067	0,014	0,114	0,005	0,007	0,034	1,84
Спори	0,328	0,098	0,007	0,011	0,016	0,047	5,77
Спори/міцелій	4,9	7,0	0,062	2,1	2,3	1,4	3,13

Наявність мінеральних речовин в протоплазмі клітин обумовлено їх присутністю в середовищі. Однак зольний склад протоплазми клітин не є точним відображенням кількісних відносин мінеральних компонентів середовища. Склад зольних елементів клітини залежить від присутніх в середовищі компонентів. Наприклад, оцтова кислота в кислому середовищі перешкоджає проникненню фосфору всередину клітини *Asp. niger*, але не впливає на перенесення одноатомних іонів, таких, як хлорид і йодид. Зольний склад міцелію залежить також від композиції мінеральних компонентів середовища: додавання 1,0 мг заліза до культуральної рідини збільшує майже в два рази вміст в міцелії калію і зменшує вміст фосфору.

Питання для самоконтролю

1. Навіщо мікроорганізмам мінеральні речовини?
2. Що таке озолення і як проводять аналіз золи?
3. Чому спори містять в три рази більше золи, ніж міцелій?
4. Які фактори зовнішнього середовища впливають на склад мінеральних речовин в клітинах?

Лабораторна робота 12

Тема : Мінеральні компоненти середовища, їх участь в обміні речовин та вплив на біосинтез.

Мета заняття: вивчити мінеральні компоненти середовищ, та дослідити їх участь в обміні речовин та вплив на біосинтез.

При вивченні впливу мінеральних компонентів середовища на біосинтез необхідно мати на увазі, що практично ми завжди вносимо в середовище значну і часом не враховану їх кількість.

Можливими джерелами мінеральних іонів можуть бути хімічні реактиви, посівний матеріал, вода, посуд і ін. При аналізі деяких хімічних речовин спектрографічним методом було виявлено, наприклад, в глюкозі присутність у вигляді домішок сімнадцяти елементів, в сульфаті магнію і сульфаті цинку - по дев'ять елементів. Вода зазвичай найбільш багата солями заліза, кальцію і магнію. Для спеціальних досліджень при вивченні мінерального обміну рекомендується користуватися двічі дистильованою водою.

Джерелом забруднення середовищ мінеральними іонами може бути скляний посуд, зокрема колби, де відбувається культивування. Відомо, що скло піддається вилужуванню, при цьому деякі іони – натрій, калій, магній, кальцій – можуть переходити з скла в середовище.

Мінеральні компоненти середовища мають різне фізіологічне значення. Однією з їх істотних властивостей є вплив на фізико-хімічний стан колоїдів протоплазми. Під впливом неорганічних солей поверхневий шар клітини безперервно зазнає змін, які позначаються і на швидкості ферментативних реакцій і на обміні речовин в цілому. Відзначають, наприклад, що під впливом присутнього в живильному середовищі хлористого натрію при біосинтезі стрептоміцину відбувається зміна проникності клітинної мембрани; цим забезпечується більш легкий перехід антибіотика з міцелію в культуральну рідину. Метали мають велике значення в здійсненні ферментативних реакцій. Деякі метали (цинк, залізо, магній, марганець і ін.) є

активаторами дії ферментів. В іншій групі ензимів метали входять до складу молекули, такі ензими називаються металоензимами. Механізм активуючої дії металів на ферменти поки ще мало вивчений.

Підсумовуючи сучасні уявлення про механізми участі катіонів металів в ферментативних реакціях, виділяють основні з них:

- а) метал є складовою частиною каталітично активного центру ферменту;
- б) метал створює або стабілізує певну конформацію білкової молекули, необхідну для забезпечення каталітичної дії фермента;
- в) метал впливає на субстрат, змінюючи його електронну структуру таким чином, що він легше вступає в ферментативну реакцію;
- г) метал забезпечує приєднання коферменту до апоферменту або активацію коферменту;
- д) метал виконує функцію «містку», що зв'язує фермент та субстрат при утворенні з них проміжного з'єднання;
- є) рол металу у ферментативній реакції обумовлена поєднанням тих або інших перерахованих вище механізмів.

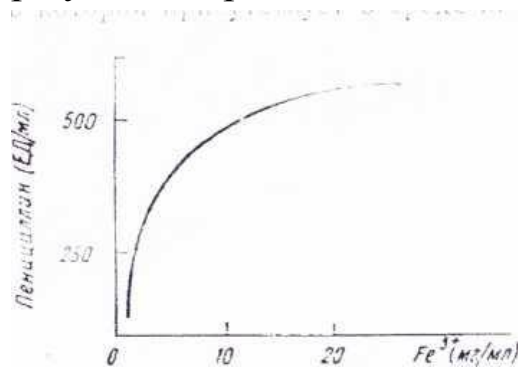
Міцність з'єднання металу з ферментом зазвичай визначають шляхом діалізу. Для встановлення наявності певного металу в ферменті використовують реакції, які пов'язують метал і викликають пригнічення ферментативної активності. Якщо шляхом введення інгібітора в сферу ферментативної реакції вдається пригнічити дію ферменту, а потім введенням певного металу вдається здійснити реактивацію, то цей факт може свідчити про участь металу в даній ферментативній реакції.

З металів, які входять в якості інгредієнтів в поживні середовища, при виробництві антибіотиків великий інтерес представляє залізо. Крім того, що залізо у вигляді солей, найчастіше сульфату, входить до складу багатьох середовищ, воно входить до складу сталі, з якої виготовлені ферментери. При ферментації в апаратах, виготовлених з вуглецевих сортів сталі, виявляється до 20-40 мкг заліза на мілілітр середовища.

При біосинтезі стрептоміцину залізо неоднаково впливає на ріст продуцента та утворення антибіотика. Оптимальні та

токсичні концентрації заліза різні для різних штамів. Для одного з штамів відмічаються, наприклад, наступні закономірності: 0,03 мг% заліза достатньо для оптимального росту; оптимум для біосинтезу антибіотику знаходиться у межах 0,1-0,2 мг%. При більш високих концентраціях заліза ріст та утворення антибіотику значно падає. При 5,0 мг% заліза ріст складає біля 75% від максимального, а утворення стрептоміцину – тільки 45% від максимуму.

На синтез стрептоміцину також впливає форма, в якій присутнє в середовищі залізо.



Зокрема, при утворенні в середовищі гелю заліза (колоїдного заліза) міцелій покривається його тонкою плівкою, при цьому дихальний коефіцієнт знижується, зростання культури і біосинтез стрептоміцину значно пригнічуються (рис.6).

Рис 6. Вплив концентрації заліза в середовищі на біосинтез пеніциліну.

Гнітючу дію заліза на біосинтез окситетрацикліну пов'язують з присутністю в середовищі масел, використовуваних при піногасінні. При однаковій кількості заліза в поживному середовищі пригнічення біосинтезу виражено більш яскраво там, де присутньо масло з великим йодним числом, тобто з великою кількістю ненасичених зв'язків. Наприклад, в присутності соняшникової, лляної і соєвого масел, тобто масел з великим йодним числом, гальмівну дію заліза виражено особливо яскраво. З іншого боку, присутність заліза практично не знижувало утворення окситетрацикліну в присутності речовин з низьким йодним числом - пальмового масла або тваринного жиру. Як вважають, переважна дія ненасичених масел в присутності заліза пов'язана з утворенням перекисів. Поки ще не ясно, чи діє перекис прямо або побічно, шляхом утворення перекису водню.

На утворення пеніциліну залізо має стимулюючий вплив в обмежених межах концентрації. Після досягнення певної

величини подальше підвищення концентрації заліза на біосинтезі пеніциліну помітно не позначається (рис. 6).

При проведенні промислових ферментацій важливо мати на увазі, що з плином часу внутрішня поверхня ферментера покривається захисною колоїдною плівкою, яка значно перешкоджає корозії та переходу заліза в середовище.

Крім заліза, велике значення для біосинтезу антибіотиків мають цинк, мідь, марганець, бор, калій, магній, кальцій та ін. перші п'ять з названих елементів застосовуються в мікрокількостях та часто наявність їх у вигляді домішок з основними компонентами середовища є достатньою для нормального розвитку мікроорганізмів.

Кукурудзяний екстракт, що широко застосовується в промисловості, містить, за даними емісійного спектрального аналізу золи, наступні елементи: алюміній, миш'як, бор, кальцій, хром, кобальт, мідь, залізо, свинець, літій, магній, марганець, нікель, фосфор, калій, кремній, срібло, олово, вольфрам, цинк.

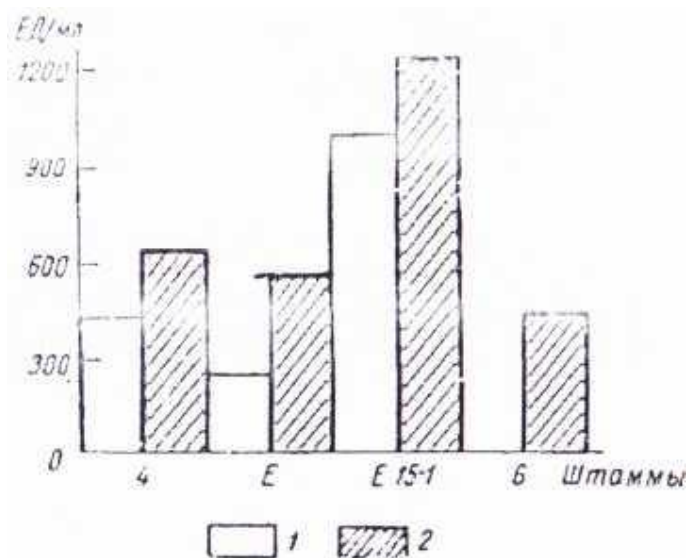


Рис. 7. Вплив води на біосинтез стрептоміцину різними культурами *Act. streptomycini*.

1 – дистильована вода; 2 – водопровідна вода

Вода, на якій готуються поживні середовища, містить багато мінеральних речовин. При вивченні двох поживних середовищ одного складу, що використовуються для біосинтезу стрептоміцину, але приготованих на дистильованій і

водопровідній воді, виявилось, що активність була вищою на середовищі, приготовленому на водопровідній воді (рис.7).

Одна з партій кукурудзяного екстракту мала такий вміст деяких елементів (у % на суху вагу):

Марганець.....	0,004
Калій.....	0,5 – 1,5
Мідь.....	0,001
Магній.....	0,5 – 1,0
Цинк....	0,005
Калій.....	1,0 – 2,0

Будь-які оптимальні концентрації мінеральних компонентів, універсальні для всіх середовищ і антибіотиків, не можуть бути рекомендовані, бо ці величини будуть ефективні тільки у застосуванні до даних умов досліду, до данного співвідношення інгредієнтів. Співвідношення мінеральних компонентів середовища та їх взаємний вплив треба враховувати при складанні середовищ або підібрати ці співвідношення дослідним шляхом. Було, наприклад, підібрано для одного з штамів пеніциліну, що утворює пеніцилін, наступне співвідношення деяких компонентів середовища – $\text{KH}_2\text{PO}_4 : \text{MgSO}_4 : \text{NaNO}_3 = 0,475 : 0,05 : 0,475$.

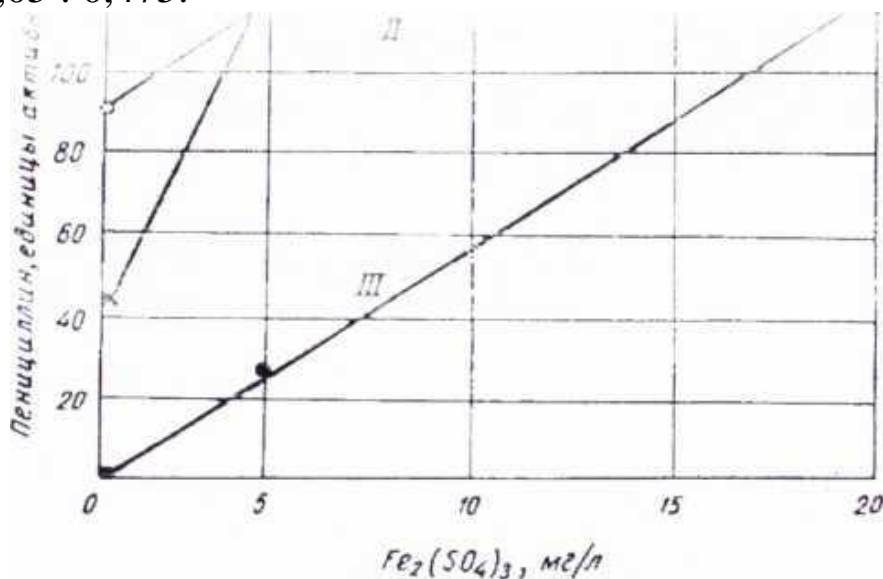


Рис. 8. Додавання міді ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) до живильного середовища пригнічує утворення пеніциліну *Pen.chrysogenum*, але не пригнічує ріст гриба. Залізо [$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$] нейтралізує дію міді.

I – 0,5 мг $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ на 1 л середовища; II – контроль, без $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; III – 2 мг $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ на 1 л середовища.

В середовищах може проявлятися дія так званого антагонізму іонів, коли один з катіонів може знімати дію іншого катіону. Може бути наведено приклад, коли біосинтез пеніциліну пригнічується $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. При додатковому введенні в середовище $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ гальмівна дія іона міді знімається і активність культуральної рідини виявляється рівною контролю (рис. 18).

Аналогічний приклад може бути приведений з пригніченням активності манозидострептоміцинази *Str.griseus*. При введенні в середовище двовалентного заліза (близько 50 мкг/мл) повністю пригнічується прояв ферментативної активності. Однак одночасне внесення в середовище двовалентного кальцію знімає інгібуючу дію заліза. У разі, якщо двовалентний нікель пригнічує утворення манозидострептоміцинази, то його дія може бути знята введенням заліза.

У деяких випадках іони металів входять до складу молекули біологічно активних речовин. Наприклад, кобальт входить до складу вітаміну B_{12} . У цьому випадку обов'язковим є присутність солі кобальту в якості компонента середовища.

Прикладом інших речовин, що містять в молекулі метал, можуть бути сидероміцини та сидераміни, що синтезуються актиноміцетами та грибами. До їх числа відносять антибіотики альбоміцин та гризеїн, до складу молекули яких входить залізо. Для біосинтезу цих антибіотиків необхідна наявність в середовищі солей заліза.

Внаслідок технічних труднощів метаболізм мінеральних з'єднань у мікроорганізмів є одним з найменш вивчених розділів обміну речовин.

Питання для самоконтролю

1. Які є джерела мінеральних речовин необхідних для поживних середовищ?
2. Назвіть мінеральні речовини необхідні для повноцінного метаболізму мікроорганізмів.
3. Яке значення мінеральних речовин для біосинтезу продуктів мікроорганізмами?
4. Яким чином необхідно підбирати склад мінеральних речовин для певних середовищ, певних мікроорганізмів?

Лабораторна робота 13

Тема: Значення рН для життєдіяльності мікроорганізмів.

Мета заняття: вивчити значення рН для життєдіяльності мікроорганізмів.

Для культивування мікроорганізмів застосовують різні середовища, як комплексні, так і синтетичні. Одним з факторів, що визначають придатність того чи іншого середовища для мікроорганізму, є її активна кислотність, що характеризується величиною рН.

Встановлено, що активна кислотність впливає на зростання культури в залежності від двох факторів. Перший фактор це безпосередній вплив іонів водню або гідроксильних іонів на живу клітину. Цей фактор пов'язаний з особливостями протопласту клітин, в значній мірі ще нез'ясований, а також активністю ферментних систем. Другий фактор - це побічна дія рН середовища на клітину. Величина рН регулює ступінь дисоціації компонентів середовища. У кислому середовищі слабкі кислоти виявляються у вигляді цілих молекул, а лужному - у вигляді іонів, так як солі слабких кислот сильно дисоційовані, а самі кислоти - слабо. При цьому для кожної кислоти і солі є певна критична зона рН, в якій кислота може переходити з дисоційованого стану в недисоційований.

Деякі мікроорганізми виявляються здатними самі регулювати рН середовища. Так, бактерії, що утворюють при зброджуванні вуглеводів нейтральні продукти, можуть протягом усього циклу розвитку культури підтримувати оптимальне значення рН.

При цьому спочатку відбувається перетворення вуглеводів до утворення органічних кислот, а коли кислотність середовища досягає певної величини, в дію вступають ферментативні системи, що сприяють утворенню не кислоти, а нейтральних продуктів, зокрема спиртів.

При розвитку мікроорганізмів на середовищах, що містять білки або продукти їх розпаду, утворюються лужні продукти, в тому числі аміак. Для боротьби із зайвою лужністю деякі мікроорганізми мають спеціальні ферментативні системи.

Наприклад, для максимального утворення тетрациклінових антибіотиків оптимальним значенням рН є 6,0-8,0, для стрептоміцину - 7,0-8,5, для пеніциліну 6,8-7,5. Отже, величина рН в процесі біосинтезу антибіотиків повинна змінюватися таким чином, щоб реакція середовища сприяла не тільки зростанню мікроорганізму, а й утворенню потрібної речовини. Стосовно біосинтезу пеніциліну для фази росту продуцента величина рН повинна бути близька до 6,8 і в фазі пеніциліноутворення - близько 7,3.

Створення середовища з певним значенням рН здійснюється шляхом підбору таких інгредієнтів, які при їх використанні мікроорганізмом сприяють зрушенню рН в бажану зону. Відомо, що високі концентрації глюкози при відсутності нейтралізуючих речовин призводять до закислення середовища, внаслідок утворення значної кількості органічних кислот (рис. 9).

Введення крейди в якості фактору, що регулює рН, має широке розповсюдження в промисловості. Суттєве значення має його вихідна концентрація. На рис.10 представлені залежності між концентрацією крейди в середовищі, пеніциліноутворенням та змінами рН.

На зміну величини рН впливають не тільки джерела вуглецю, а й азоту. При біосинтезі окситетрацикліну на середовищах, що містять глюкозу і солі амонію або нітрати, відзначаються різні коливання рН, в залежності від джерела живлення (табл. 19). Найбільш різке зниження рН виявлено в тих випадках, коли при йоні амонію знаходяться аніони сірчаної та соляної кислот або використовується двозаміщенна сіль фосфорної кислоти. Величина рН залежить також від кількості використаного азоту. При інтенсивному засвоєнні амонійного азоту середовище закислюється в значній мірі.

Вплив джерел азоту на рН середовища при біосинтезі окситетрацикліну (вихідне рН 7,2)

Азотмістка середовища	речовина	Мінімальне значення рН	рН через 90 год
(NH ₄) ₂ SO ₄		6,00	6,74
NH ₄ Cl		5,93	7,02
(NH ₄) ₂ HPO ₄		5,28	6,95
NH ₄ NO ₃		6,51	7,27
NaNO ₃		6,80	7,86

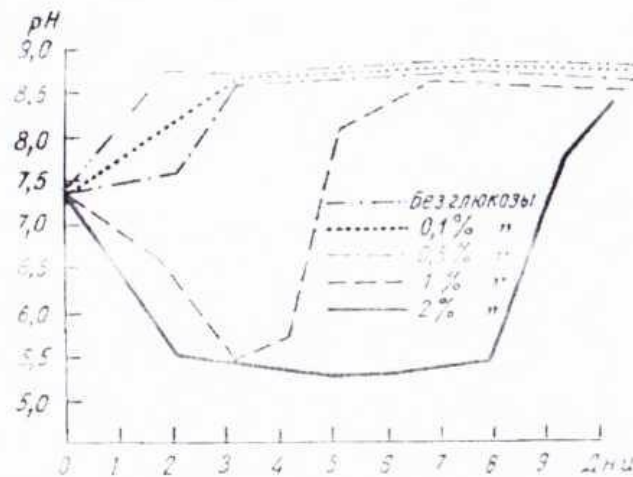


Рис. 9. Вплив концентрації глюкози у середовищі на зміну рН при культивуванні *Act. globisporus streptomycini*.

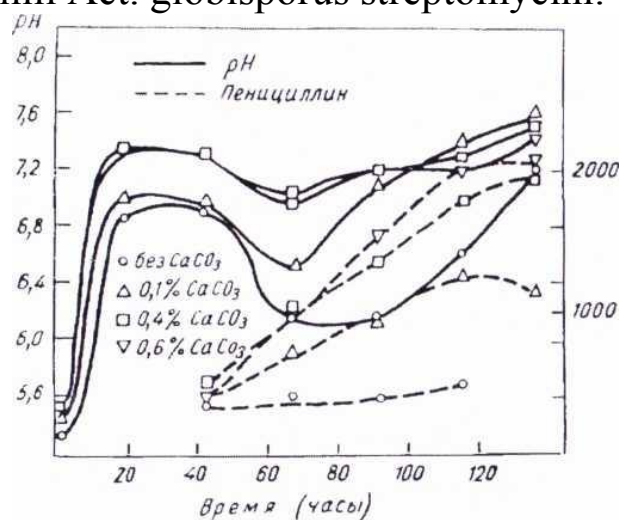


Рис. 10. Вплив крейди на рН культуральної рідини і утворення пеніциліну (ОД / мл)

Цілком ймовірно, більш низький вміст антибіотика в культурі, що розвивається на середовищі з неоптимальною величиною початкового рН, можна пояснити наступним чином: біосинтез антибіотика можна уявити як ряд послідовних етапів синтезу, за рахунок різних продуктів метаболізму продуцента. Ці продукти метаболізму продуцент утворює на різних стадіях свого розвитку. Якщо значення рН під час ферментації будуть такими, що накопичення «напівпродуктів» для синтезу буде забезпечено, то синтез самої молекули антибіотика буде протікати успішно, з хорошим кількісним виходом. Якщо в якісь періоди життєдіяльності продуцента рН середовище не сприятиме активності ферментних систем, що забезпечують синтез необхідних метаболітів, то і синтез молекули антибіотика буде відбуватися на низькому рівні через відсутність в середовищі достатньої кількості необхідних напівпродуктів. Таким чином, можна припустити, що, якщо початкове рН середовища не буде оптимальним для даного продуцента, то метаболіти-напівпродукти, які повинні були накопичуватися на ранніх етапах розвитку культури, не синтезуються зовсім або синтезуються в меншій кількості.

Таким чином, до періоду синтезу антибіотика найбільш інтенсивно функціонують системи, що беруть участь в вищих щаблях окислення. Зрушення рН в низькі області призводить до зміни метаболізму, зокрема, швидше за можливе утворення таких продуктів, як етанол.

Питання для самоконтролю

1. Значення рН для життєдіяльності мікроорганізмів?
2. Яким чином мікроорганізми можуть самі регулювати рівень рН?
3. Які речовини здатні регулювати рівень рН середовища?
4. Як глюкоза впливає на зміну рівня рН при культивуванні мікроорганізмів?

МОДУЛЬ 4

Технології мікробного синтезу ферментних препаратів та вітамінів

Лабораторна робота 14

Тема: Механізми регуляції синтезу ферментних білків мікроорганізмами.

Мета заняття: дослідити механізми регуляції синтезу ферментних білків мікроорганізмами.

Ферменти є біокатализаторами білкової природи і своєю участю в обміні речовин забезпечують динамічну єдність між середовищем і організмом.

Інтенсивність каталітичної активності ферменту залежить від впливу на них відповідних активаторів і інгібіторів. Пригнічення ферментів може відбуватися як під впливом неспецифічних, так і специфічних інгібіторів. До числа перших можна віднести солі важких металів (свинцю, ртуті), трихлороцтову кислоту. Дія їх заснована на здатності зв'язуватися з білками, з утворенням нерозчинного осаду.

В останні роки велика увага дослідників приділяється генетичній ролі ДНК. Було показано, що здатність до синтезу специфічних білків і передача цієї здатності в покоління пов'язана з ДНК. Як відомо, молекула ДНК являє собою довгу двутяжну структуру, функціонально неоднорідну по своїй довжині. Різні ділянки молекули ДНК відповідальні за специфічний синтез різних білків. Тим самим одна молекула ДНК може визначати синтез великої кількості різних білків клітини. За синтез кожного одного типу білків відповідальна певна ділянка молекули ДНК. Таку ділянку молекули ДНК, пов'язану з синтезом якого-небудь одного білка в клітині, прийнято позначати терміном «цистрон» або, враховуючи, що вона визначає специфічну структуру цього білка, «структурний цистрон» або «структурний ген». Різні цистрони (гени) розташовані лінійно уздовж молекули ДНК. При цьому кожен цистрон займає в молекулі фіксоване місце, і порядок

проходження різних цистрон по довжині молекули суворо постійний для даного виду клітин.

Зміна послідовності пар нуклеотидів кожного структурного цистрона веде до зміни хімічної і біологічної специфічності даного білка. Хімічно це зміна виражається порушенням послідовності амінокислот у поліпептидному ланцюзі, а біологічно - втратою специфічної ферментативної функції, якою раніше володів даний білок.

Синтез білка не відбувається безпосередньо на молекулі ДНК. На молекулі ДНК (на структурному цистроні) синтезується відповідна інформаційна, або матрична, РНК (м-РНК), яка передає в рибосому місце синтезу білка, інформацію. Таким чином, передача структурної інформації йде за схемою: ДНК→м-РНК→білок. Клітина ніколи не синтезує всіх білків, які вона може синтезувати, а лише ті, які їй «потрібні» в даний момент. При зміні умов існування припиняється синтез одних ферментів і починається синтез деяких нових ферментів.

У мікроорганізмів явище синтезу нових ферментів добре відомо в тих випадках, коли клітини отримують новий субстрат, на який повинен діяти фермент. Речовина, що викликає (індуцює) подібний синтез, називають «індуктором» ферменту, а сам фермент називають «індукованим». Однак більшість ферментів утворюються в значних кількостях під час відсутності внесеного ззовні індуктора. Такі ферменти називають «конститутивними».

Якщо клітини отримують яку-небудь речовину, яку вони раніше синтезували самі, в готовому вигляді, то утворення ферментів, що забезпечують синтез цієї речовини, може припинитися. Це явище називають репресією. Репресія ферменту може бути викликана також в результаті накопичення продукту діяльності цього ферменту всередині клітини, коли подальший синтез цього продукту на якийсь час уже не потрібний.

Загальна схема регуляції синтезу білків запропонована на підставі фундаментальних робіт групи Jacob і Monod в Пастерівському інституті в Парижі(рис.11).Крім структурних цистронів, уздовж ланцюга ДНК розташовані ще деякі функціональні одиниці, що мають відношення до синтезу білка.

Однією з таких функціональних одиниць (ділянок на молекулі ДНК) є регуляторні цистрони, або цистрони-регулятори (гени-регулятори). Цистрони-регулятори контролюють діяльність відповідних структурних цистронів. Кщо відбувається зміна або порушення цистрона-регулятора, то діяльність структурних цистронів виявляється безконтрольною і вони виробляють відповідні специфічні білки без урахування потреб в них клітини. Ніяких порушень в структурі і функції цих білків не відзначається. При порушенні регуляторного цистрона структурний цистрон завжди або майже завжди активується до діяльності, тобто до вироблення м-РНК. Функція нормального цистрона-регулятора полягає в тому, щоб блокувати діяльність відповідного структурного цистрона, коли ця діяльність не потрібна. Регуляторний цистрон «забороняє» структурному цистрону виробляти м-РНК, а отже, клітина перестав виробляти і відповідний білок. Регуляторний цистрон контролює синтез речовини-посередника, яка діє на структурний цистрон. Ця речовина називається репресором. Воно діє виключно специфічно на строго певні структурні цистрони. За своєю хімічною природою репресор, очевидно, є білком.

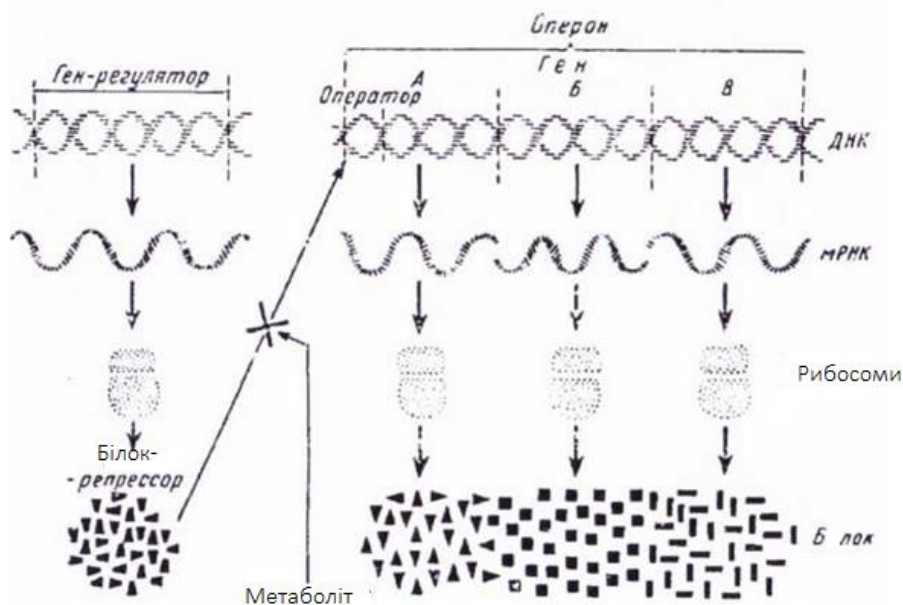


Рис. 11. Схема регуляції синтезу білка по Jacob і Monod.

На підставі викладених даних про механізм блокади структурних цистронів була запропонована теорія, що пояснює синтез індукованих ферментів. Відомо, наприклад, що у ряду мікроорганізмів синтез р-галактозидази відзначається тільки тоді, коли в живильному середовищі знаходиться лактоза. Лактоза проникає в клітину і за допомогою якихось проміжних механізмів пов'язує, інактивує репресор, який блокував роботу структурного цистрона. При цьому регуляторний цистрон не перестає функціонувати, а продовжує виробляти все нові кількості репресора, які постійно інактивуються лактозою, що надходить із середовища. Репресії структурного цистрона не спостерігаються, і поки в середовищі є лактоза, виробляється фермент. Як тільки надходження лактози з середовища припиниться, її запаси будуть вичерпані, синтез р-галактозидази припиняється. Це відбувається через те, що репресор більше не інактивується і блокує відповідний структурний цистрон, відповідальний за синтез р-галактозидази. Механізм репресії синтезу будь-якого ферменту аналогічний механізму індукції, але замість інактивації активного репресора в разі індукції тут має місце активація раніше неактивного репресора.

Наприклад, засвоєння лактози вимагає не тільки р-галактозидази, але і ферменту пермеази, який активно переносить лактозу із зовнішнього середовища в клітину. Виявилось, що синтез цих білків починається і припиняється одночасно і, хоча синтез визначається різними структурними цистронами, обидва вони підкоряються одному цистрону-регулятору. Обидва ці структурні цистрони дійсно виявилися розташованими поруч в ланцюзі ДНК, тобто є єдиним опероном.

Репресор, контрольований цистрон-регулятором, не діє безпосередньо на структурні цистрони. До регульованого цистрона, якщо він одиночний, або до регульованого оперона безпосередньо примикає ділянка ДНК, яку називають цистрон-оператором, або геном-оператором. Саме він є місцем дії репресора, саме він керує роботою оперона, що примикає до нього, або одиночного структурного цистрона.

Порушення структури цистрона-оператора ніяк не позначається на структурі і функції вироблених білків, але призводить до їх нерегульованого конститутивного синтезу так само, як і в разі порушення цистрона-регулятора.

Крім зазначеного, для життєдіяльності клітин виняткове значення має алостеричний механізм регуляції синтезу метаболітів. Відомо, що

синтез більшості продуктів обміну речовин проходить ряд етапів, кожен з яких здійснюється завдяки діяльності певного ферменту. Встановлено, що кінцевий результат ряду послідовних синтетичних реакцій визначається перш за все активністю ферменту, що каталізує «головну» реакцію. Цей фермент суттєво відрізняється від інших ензимів тим, що, крім здатності реагувати зі своїм субстратом, володіє специфічною чутливістю до кінцевого продукту. Кінцевий продукт обміну речовин, накопичуючись в клітині, пригнічує активність першого ферменту і тим самим регулює утворення самого себе за принципом негативного зворотного зв'язку. На поверхні молекули ферменту є ділянка, до якої може приєднатися молекула кінцевого продукту - «алостеричного ефектора» («алостеричний» позначає просторово різноманітний). Структура такого ферменту, який також називають алостеричним, відрізняється особливо великою гнучкістю, і найменші її зміни впливають на стан і активність каталітичного центру. Зміни ці можуть викликати лише суворо певні метаболіти-ефектори. Прикладом може служити алостерична регуляція синтезу валіну. При підвищенні концентрації кінцевого продукту – валіну - останній впливає на «головний» фермент, пригнічуючи його активність. В результаті ланцюг взаємопов'язаних синтезів блокується на першому ж етапі. Таким чином, механізми регулювання, хімічні за своєю природою, носять кібернетичний характер (рис. 12).

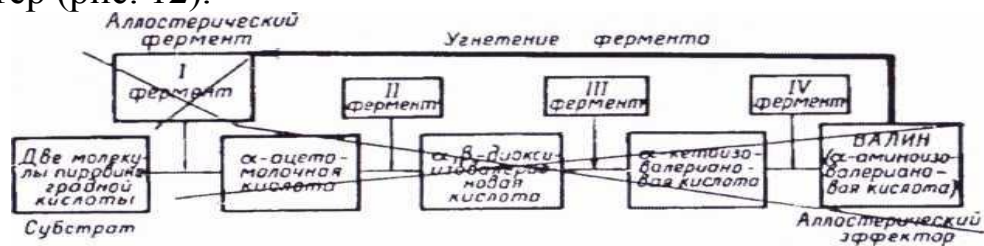


Рис. 12. Алостерична регуляція синтезу валіну в бактеріальній клітині

Питання для самоконтролю

1. Що таке ферменти? Чому вони необхідні мікроорганізмам?
2. Від чого залежить активність ферментів?
3. Яка роль ДНК в функціональній активності ферментів?
4. Що таке репресія ферменту?
5. Поясніть схему регуляції синтезу білка по Jacob і Monod.
6. Яке значення алостеричної регуляції синтезу метаболітів?

Лабораторна робота 15-16

Тема: Методи отримання ферментних препаратів з мікроорганізмів. Перспективи використання.

Мета заняття: визначити та вивчити методи отримання ферментних препаратів з мікроорганізмів. Дізнатися перспективи їх використання.

Ферментні препарати мікроорганізмів можуть бути отримані з міцелію, бактеріальної маси і культуральної рідини. Багато ферментів переходять з міцелію в культуральну рідину в результаті автолізу клітин.

У разі, якщо ферменти необхідно витягти з міцелію, клітини повинні бути попередньо зруйновані. Руйнування клітин проводиться різними способами. Одним з найстаріших лабораторних методів є розтирання густої міцеліальної суспензії з кварцовим піском в ступці. Суспензія міцелію готується, як правило, на фізіологічному сольовому розчині. При такому методі вилучення значна частина білків і ферментів переходить в розчин.

Існують також спеціальні гомогенізатори. У них мікробні клітини руйнуються під дією ножів особливої форми, що обертаються з великою швидкістю. Деякі мікроорганізми піддаються руйнуванню за рахунок дії ультразвуку.

Клітинні стінки деяких мікроорганізмів можуть бути зруйновані при впливі на них ферменту лізоциму. Лізоцим лізує клітинні стінки, звільняючи протоплазму оболонки.

Виділення ферментів може здійснюватися також методом електрофорезу на крохмальному або агаровому гелі. Після елюації з різних ділянок і визначення ферментативної активності елюатів вдається визначити місце розташування ферменту в гелі. Шляхом підбору відповідних умов - буферні розчини, градієнт потенціалу, час, температура - можна домогтися отримання ферментних препаратів високого ступеня чистоти. В даний час цей метод має значення лише в лабораторній практиці.

Висушування отриманих ферментних препаратів найкраще проводити методом сушіння сублімацією (ліофільної сушки),

після попереднього заморожування розчину, що містить фермент, при мінусових температурах (-15, -40 °).

Протеолітичні ферменти. Гриби і актиноміцети здатні використовувати в якості джерел азотистого харчування білкові сполуки, що містяться в соєвому борошні, макухах, кукурудзяному екстракті і т. д. Перетворення складних білкових речовин в більш прості азотовмісні компоненти відбувається за допомогою протеолітичних ферментів. Протеолітичні ферменти піддають гідролітичному розщепленню пептидний зв'язок. Вони діють або на білки або на продукти їх розпаду. Протеолітична активність залежить від складу середовища, на якій культивується мікроорганізм. При використанні в якості джерел азоту амінокислот, пептидів і білків для культивування продуцента стрептоміцину *Act.streptomycini* було показано, що найвища протеолітична активність середовища відзначалася на середовищах з амінокислотами, низька - на середовищах з білком. Аналогічні результати були отримані на середовищах з гліциніном (білком соєвого борошна) і його кислотним гідролізатом.

При використанні в якості джерел азоту мінеральних азотовмісних речовин величина активності залежить в основному від специфічних особливостей культури (рис. 13).

Крім того, активність протеолітичних ферментів залежить також від значення рН середовища, в якій діє фермент. Найбільша протеолітична активність спостерігається в межах рН 7,2-8,2. При кислому значенні рН активність різко падає (приблизно в 2-3 рази). Активність ферменту залежить і від субстрату. Різні білки при інших рівних умовах одним і тим же ферментом гідролізуються з різним ступенем глибини гідролізу.

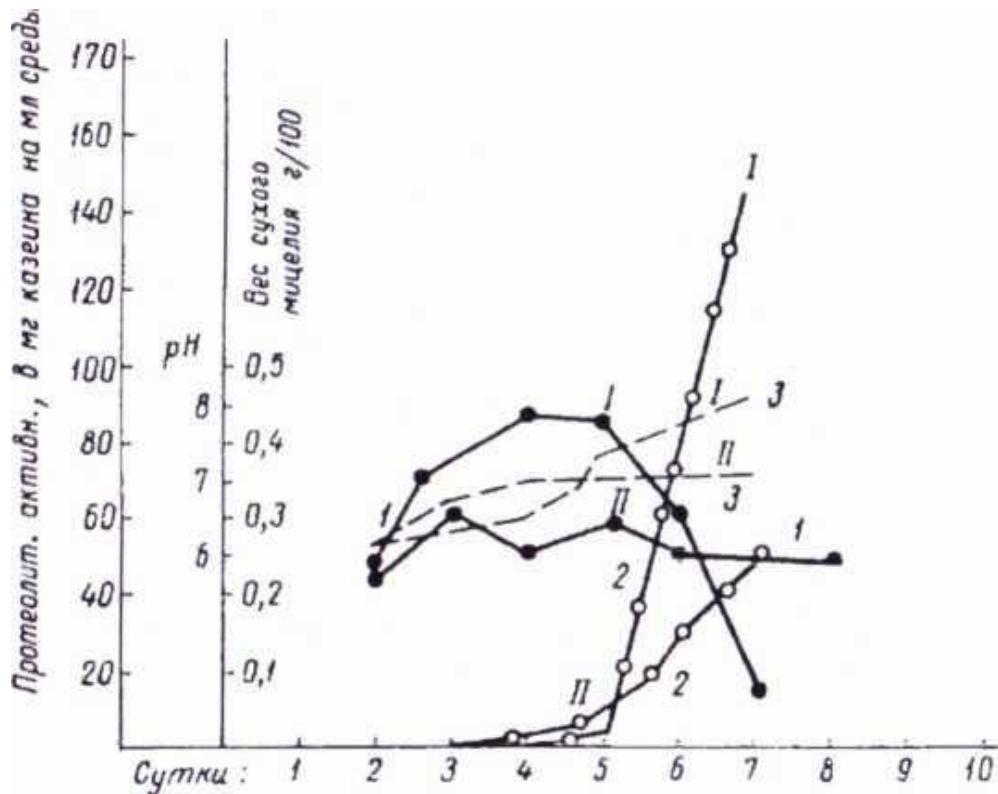


Рис. 13. Залежність накопичення протеолітичних ферментів від розвитку і автолізу культури *Act. lavendulae* з різною кількістю сірчаноокислого амонію.

I- на середовищі з 0,35% сульфату амонію; II - з 0,1% сульфату амонію. 1 - біомаса; 2 - протеолітичні ферменти; 3 - рН

На активність ферменту істотний вплив роблять мінеральні іони, зокрема іон Ca^{++} , який стабілізує активність і може запобігати денатурації. При культивуванні актиноміцетів підвищенню активності сприяє наявність в середовищі іона калію і присутність глюкози.

Ферментація здійснюється в таких же апаратах, що й у виробництві антибіотиків. Після видалення бактеріальної маси або міцелію залишається нативний розчин, що містить, зокрема, протеїнази. Промислові препарати протеїназ в більшості своїй є суміші протеолітичних ферментів (табл. 20).

Таблиця 20

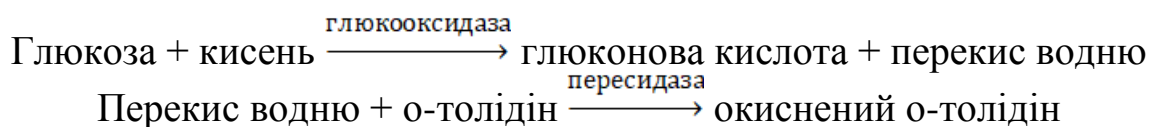
Інтенсивність гідролізу казеїну різними протеїназами

Протеїназа	Кількість використаного ферменту в мг	Кількість вільних карбоксильних груп, звільнених з 1г казеїну (мк-екв. COOH)	Коефіцієнт активності щодо протеази	Відсоток гідролізованого субстрату
Протеаза (<i>Str. griseus</i>)	7	3600	1,00	75
Трипсин	7	1120	0,31	23
Хімотрипсин	7	760	0,21	16
Пепсин (неочищений)	14	1510	0,42	31
Папаїн (неочищений)	70	1360	0,38	28
Те ж.....	140	1440	0,40	30
Протеїназа (<i>Bac. subtilis</i>) . . .	7	1960	0,54	40

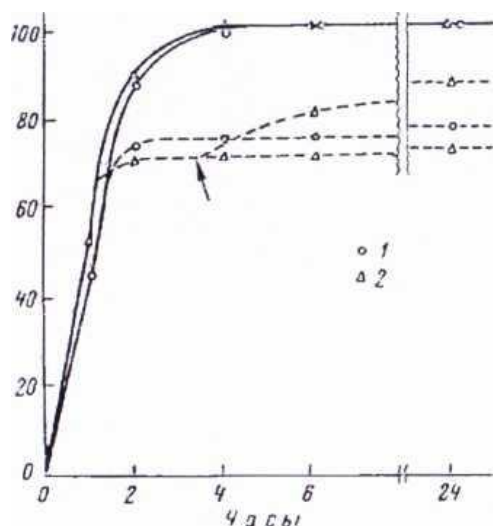
Глюкозооксидаза. Глюкозооксидаза є одним з поширених ферментів у грибів; описана вона також і у деяких актиноміцетів. Фермент каталізує реакцію окислення глюкози в глюконову кислоту, а молекулярний кисень при цьому відновлюється до перекису водню.

Сильна антибактеріальна дія антибіотиків, можливо, зумовлено перекисом водню, що виділяється в присутності глюкози. Однак у трактуванні механізму дії антибіотика немає єдиної думки. Вважається, що при наявності активної каталази тваринних тканин і мікроорганізмів не відбувається накопичення перекису водню. Вони припускають, що дві різні функції ферменту-антибіотика обумовлені різними активними центрами білкової молекули.

Виробництво глюкозооксидази зарубіжними фірмами засноване на застосуванні *Asp. niger*. Внутрішньоклітинні ферменти екстрагуються з міцелію і осідають додатком безводних органічних розчинників. Промисловий препарат ферменту містить значну кількість каталази. Крім сухого препарату, випускається папір, просочений сумішшю ферментів глюкозооксидази-пероксидази і індикатора о-толідіна. Якщо смужку такого паперу змочити розчином, що містить глюкозу, то в результаті наступних реакцій протягом однієї хвилини з'являється синє забарвлення (окислений о-толідін).



Амілолітичні ферменти мікроорганізмів. У мікроорганізмів широке поширення мають амілази, гідролізуючі глюкозидні зв'язки. Амілази грибів відрізняються від амілаз бактерій. Останні виявляють значну активність при високих температурах. Амілази грибів при температурах 70-75 ° повністю втрачають активність.



Для промислового отримання глюкози з крохмалю застосовують послідовно бактеріальні та грибні амілази. Необхідно мати таку культуру, яка гідролізує розчинний крохмаль до глюкози, тобто має відповідний ферментний комплекс. Такою культурою є гриби роду *Rhizopus*. Вони в однаковій мірі гідролізують глюкозидні зв'язки амілози і амілопектину (рис. 14).

Рис 14. Гідроліз розчинного крохмалю (1) та амілопектину (2) амілоглюкозидазами *Rhizopus delemar* (суцільна лінія) і *Asp.niger* (переривчаста лінія). Стрілка показує додавання ферменту в кількості, що в 1000 разів перевищує спочатку взяте.

На відміну від грибів роду *Aspergillus*, *Rhizopus* не мають активної трансглюкозидази, в результаті дії якої утворюються деякі олігосахариди, що мають гіркуватий смак. *Rhizopus* зазвичай культивують поверхневим методом з використанням пшеничних висівок в якості середовища. З культури отримують екстракт, з якого додаванням сульфату амонію виділяють осад, що містить необхідний фермент. Осад використовується в якості препарату. Після руйнування бактеріальної амілази нагріванням при високій температурі до отриманого розчину додають ферментний препарат з *Rhizopus* і проводять гідроліз протягом декількох годин при 55° і рН 4,5. Потім гідролізат піддають подальшій обробці з метою отримання кристалічної глюкози.

Перспективи використання

Питання, що стосуються застосування ферментних препаратів в клініці для лікування різних захворювань, привертають велику увагу

біохіміків і лікарів. Протеолітичні ферменти (трипсин і хімотрипсин) використовують для лікування сильних опіків, некротичних ран і т. д. Застосування цих ферментів засноване на тому, що він швидко розщеплює білки загиблих (некротизованих) клітин і лише дуже повільно або зовсім не діє на живі клітини і тканини. При руйнуванні мертвих тканин виникає найкраща можливість проникнення лікарських речовин до ураженої ділянки. У минулому столітті було отримано очищений препарат протеолітичного ферменту з *Aspergillus terricola*, який дозволяє лізувати тромби і відновлювати прохідність кровоносних судин. Виділена проназа знаходить застосування при отриманні амінокислот, поживних середовищ для бактерій, у виробництві сирів, кіноплівок, рибного борошна і т. д. Ферменти, що деполімеризують нуклеїнові кислоти, також починають впроваджуватися в медичну практику. Дезоксирибонуклеаза (ДНКаза) викликає лізис вірусів, що містять ДНК, руйнує гній, що утворився в ранах. Отриманий за кордоном препарат ДНКази носить фірмове назва - стрептодорназа.

Торкаючись перспектив подальшого застосування ферментів в народному господарстві вважають що ферменти живих організмів володіють чудовими властивостями, які відрізняють їх від найкращих каталізаторів, які застосовуються в хімії. Це перш за все їх вражаюча активність і специфічність. Вони змушують навіть самі інертні речовини реагувати при звичайних температурах і тисках. Так, за допомогою ферментів деякі бактерії легко засвоюють атмосферний азот, в той час як на штучних каталізаторах утворення аміаку з азоту і водню відбувається лише при високих температурах і тисках.

Досліджуючи механізм дії ферментів, можливо, вдасться синтезувати каталізатори набагато простіші, дещо менш специфічні, але зате і набагато більш потужні, ніж ферменти. Це справило б переворот в хімічній промисловості.

Питання для самоконтролю

1. Як отримують ферментні препарати з мікроорганізмів?
2. Методи руйнації клітини поділяються на:..
3. Поясніть як відбувається виділення ферменту методом електрофорезу, і які його переваги.
4. Які властивості протеолітичних ферментів?
5. Які властивості глюкооксидаз?
6. Які властивості амілаз?
7. Які основні перспективи використання ферментних препаратів?

Лабораторна робота 17

Тема : Технології мікробного синтезу вітамінів.

Мета заняття: вивчити технології мікробного синтезу вітамінів: В₁₂, рибофлавін, тіамін та інших.

Вітаміни мають винятково велике значення в обміні речовин. Багато з них входять до складу ферментів як коензими. Для більшості мікроорганізмів відсутні прямі докази наявності у них вітамінів. Непрямими доказами є ферментативні реакції, в яких вітаміни виступають як коензими. Наприклад, до складу простетичної групи кокарбоксілази входить тіамін (В₁); коензимом ряду окислювально-відновних ферментів є рибофлавін (В₂), в реакціях переамінування бере участь піридоксин (В₆). При промисловому одержанні пеніциліну деякі штами синтезують в помітних кількостях пантотенову кислоту (до 18 мкг / мл), а також біотин і піридоксин.

Для біосинтезу відомих промислово важливих антибіотиків вітаміни в чистому вигляді в живильне середовище, як правило, не додаються. Було показано, що *Penicillium chrysogenum* і *Streptomyces griseus* самі синтезують необхідні вітаміни. Для одного з мутантних штамів *Micrococcus glutamicus*, який синтезує глютамінову кислоту, з метою інтенсифікації процесу додається біотин. Більшість актиноміцетів-продуцентів антибіотиків містять в міцелії вітамін В₁₂. При біосинтезі вітаміну В₁₂ культурою *Act. olivaceus* утворюються також значні кількості інших вітамінів групи В: біотин, піридоксин, тіамін, рибофлавін.

Вітамін В₁₂

Біосинтез вітаміну В₁₂ здійснюється спеціальними культурами, до числа яких можуть бути віднесені актиноміцети (*Act. Olivaceus*, *Act. Griseus*, *Act. Aureofaciens*, *Act. Fradiae*), а також бактерії (*Bac. Megatherium*, *Lactobacillus casei*, *Clostridium tetanomorphicum*, пропіоновокислі бактерії). Найбільше промислове значення мають *Act. olivaceus* і *Propionobacterium shermanii*.

Крім біосинтезу вітаміну В₁₂ спеціальними продуцентами,

існують методи отримання вітаміну паралельно з антибіотиками, зокрема з хлортетрацикліном. Отримання вітаміну В₁₂ мікробіологічним шляхом економічно значно вигідніше, ніж з тваринної сировини, де в якості вихідного продукту використовують печінку.

Поряд з біосинтезом вітаміну В₁₂, який носить назву цианкобаламіну, можуть утворитися його похідні: окси-, хлоро-, сульфато-, нітрито-кобаламін, які не поступаються за своєю клінічною ефективністю цианкобаламіну (рис 15). Інші аналоги вітаміну В₁₂ характеризуються тим, що в нуклеотидній частині молекули замість 5,6-диметилбензимідазола міститься аденін або метиладенін, або їх похідні. Вони не мають біологічну активність для людини і тварин і є, отже, псевдовітамінами.

Перевага отримання вітаміну В₁₂ пропіоновокислими бактеріями в порівнянні з актиноміцетами полягає в тому, що вони синтезують виключно істинний вітамін В₁₂.

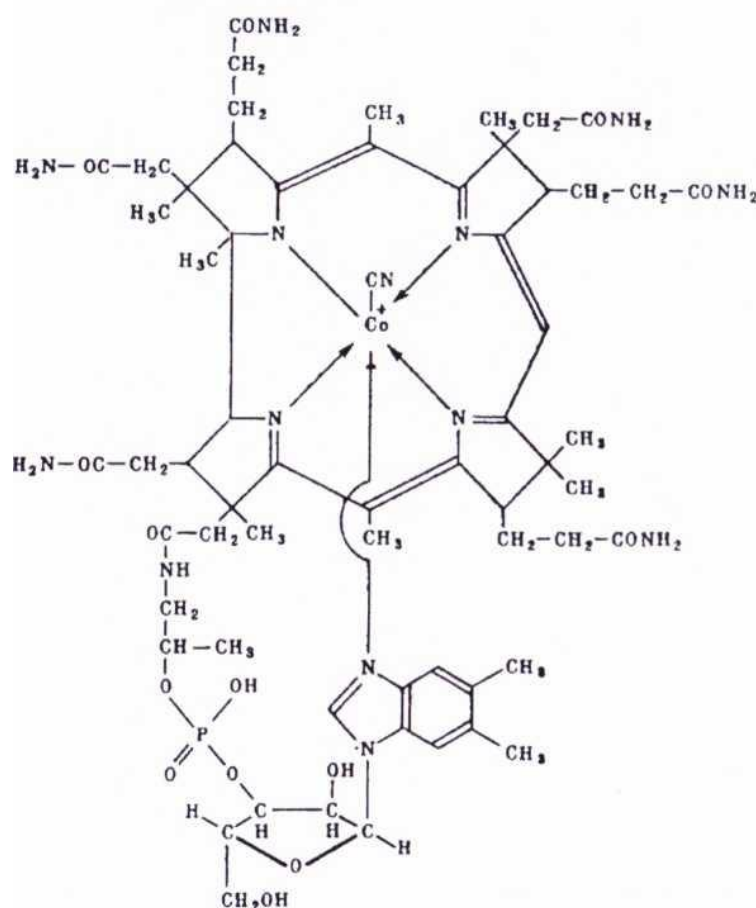


Рис. 15. Хімічна формула цианкобаламіну

. Біосинтез вітаміну В₁₂ може здійснюватися паралельно з хлортетрацикліном, рідше зі стрептоміцином. Є також вказівки,

що вітамін B_{12} утворюється при ферментації ністатину і еритроміцину.

Утворення вітаміну B_{12} і антибіотиків протікає, як правило, майже паралельно. У перші години ферментації (для *Act. Aureofaciens* через 24 год і *Act. Globisporus streptomycini* через 48 год), у період інтенсивного утворення біомаси, в середовищі виявляється незначна кількість вітаміну і антибіотиків, і лише коли зростання культури припиняється, починається інтенсивне накопичення цих продуктів обміну в культуральній рідині. Подібний факт є важливим в тому відношенні, що дозволяє поєднувати обидва процеси, оскільки час закінчення біосинтезу антибіотика збігається за часом зі значним вмістом вітаміну B_{12} (рис. 16).

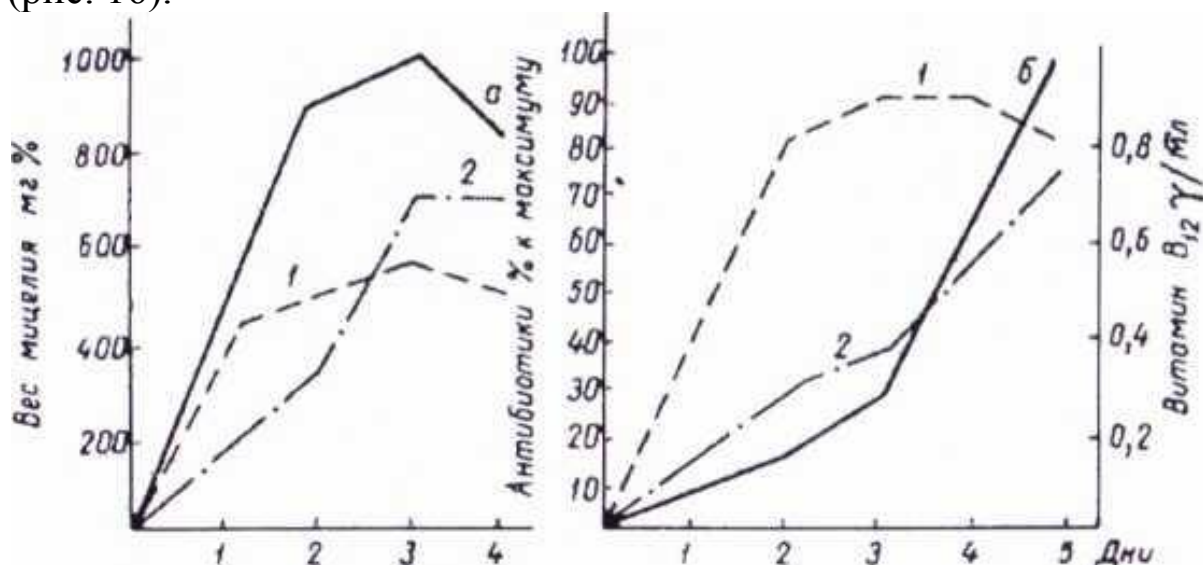


Рис. 16. Утворення вітаміну B_{12} при біосинтезі хлортетрацикліну та стрептоміцину
 а — хлортетрациклін; б — стрептоміцин; 1 — біомаса; 2 — вітамін B_{12}

Деякі спеціальні штами пропіоновокислих бактерій і актиноміцетів є продуцентами тільки вітаміну B_{12} і не синтезують антибіотики. У промисловості переважно використовують пропіоновокислі бактерії. Однією з істотних позитивних сторін процесу є відсутність аерації. Відомої трудностю є підвищені вимоги в дотриманні асептичних умов процесу. При біосинтезі антибіотиків, особливо широкого спектру, антибіотик, що утворюється в середовищі, має

бактеріостатичну або бактерицидну дію на сторонню мікрофлору. При біосинтезі вітаміну B_{12} небезпека зараження значно вище.

Найбільш елементарними прийомами, що забезпечують асептичність операції, є ретельна стерилізація середовища при її приготуванні; ретельна стерилізація повітря; захист паром вентилів, що відкриваються в ферментер.

В останні роки, крім перерахованих вище способів отримання вітаміну B_{12} , був запропонований метод, що дозволяє використовувати в якості продуцентів термофільні метанові бактерії. Процес бродіння часто використовують для знешкодження стічних вод. При метановому бродінні відбувається відновлення CO_2 або CO молекулярним воднем або воднем, що відщеплюється від органічних речовин в процесі їх дегідрування.

Для отримання вітаміну B_{12} при метановому бродінні може бути використана барда, яка надходить з ацетано-бутилових заводів, а також паточная спиртова барда, що є промисловими відходами. Паточная барда перед введенням її в середу повинна бути попередньо нейтралізована розчинами їдкого натру або аміаку до рН 7,0-8,0. Оптимальною зоною рН, в якій процес біосинтезу протікає найбільш активно, є величини в інтервалі 6,8-8,5. В процесі біосинтезу вітамін B_{12} залишається всередині клітин і не переходить в живильне середовище. Залежно від способу відділення біомаси вітамінний склад змінюється. Якщо біомаса відокремлюється за допомогою коагуляції хлорного заліза, то на грам сухої ваги припадає 61 мкг вітаміну B_{12} і 35 мкг рибофлавіну. Якщо хлорне залізо не застосовується, то вітаміну B_{12} міститься 172 мкг / г і рибофлавіну 69 мкг / г.

Рибофлавін

Рибофлавін синтезується багатьма мікроорганізмами: бактеріями, дріжджами і грибами. Найбільш відомими продуцентами рибофлавіну є *Eremothecium ashbyii*, *Ashbya gossypii*, *Clostridium acetobutylicum*, деякі штами *Candida* і *Mycobacterium* (рис. 17).

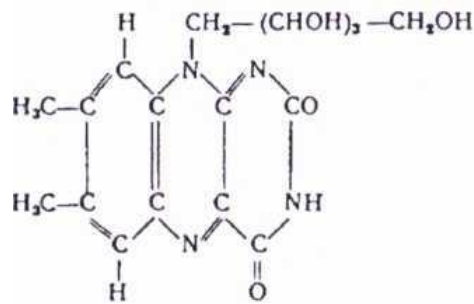


Рис. 17. Хімічна формула рибофлавіну

Рибофлавін бере участь в процесах перенесення водню в окисно-відновних реакціях, що є складовою частиною флавінаденіндинуклеотиду. Рибофлавін присутній в культуральній рідині у вільній формі. У клітинах *E.ashbyii* він зустрічається у вигляді флавінаденіндинуклеотиде і вільного вітаміну, розташованого в вигляді жовтих кристалів в вакуолях. Для вирощування *E.ashbyii* придатні глибинний і поверхневий методи. Як джерела азотного харчування використовується молочна сироватка, насіння бобових рослин, рибне борошно, кукурудзяний екстракт, соєве борошно і казеїн. З вуглеводів - глюкоза, сахароза. Ненасичені жирні кислоти цис-конфігурації стимулюють біосинтез рибофлавіну *E.ashbyii* на противагу насиченим, які гальмували його або не чинили зовсім ніякого впливу. Для отримання флавінаденіндинуклеотиду біомасу екстрагують сумішшю піридин: метанол : вода (1:3:1) і потім хроматографічно очищують від супутніх домішок.

Шляхи біосинтезу молекули рибофлавіну культурами *Ashbya gossypii*, *Eremothecium aslibyii* і деякими штамми *Candida* були вивчені за допомогою «мічених» по вуглецю (C^{14}) з'єднань. Як було встановлено, формування кілець В і С відбувається за тими ж шляхами, по яких йде синтез пуринових основ, таких, як аденін, ксантин і гуанін. Досить імовірно, що безпосереднім попередником цих кілець є діаміноурацил, що утворюється з ксантина в результаті відщеплення вуглецевого атома (С-8).

У дослідженнях з «міченою» глюкозою, метою яких було встановити закономірності біосинтезу кільця А, було показано, що глюкоза перетворюється шляхом анаеробного гліколізу до піровиноградної кислоти. У разі біосинтезу кільця А остання не декарбоксилюється з утворенням ацетату. З піровиноградної

кислоти утворюється ацетальдегід, який потім може реагувати з іншими молекулами пірвіноградної кислоти з утворенням ацетону:

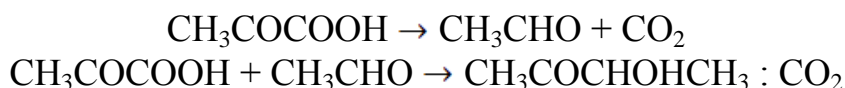
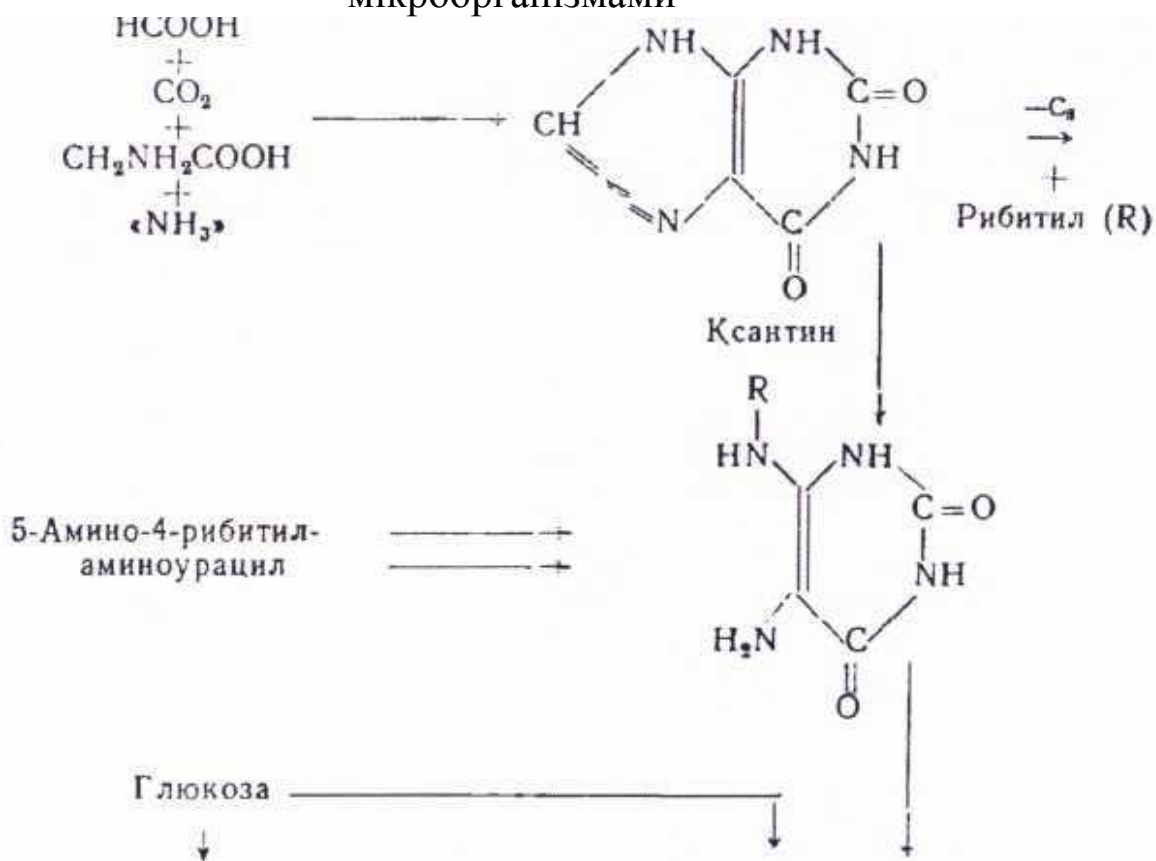
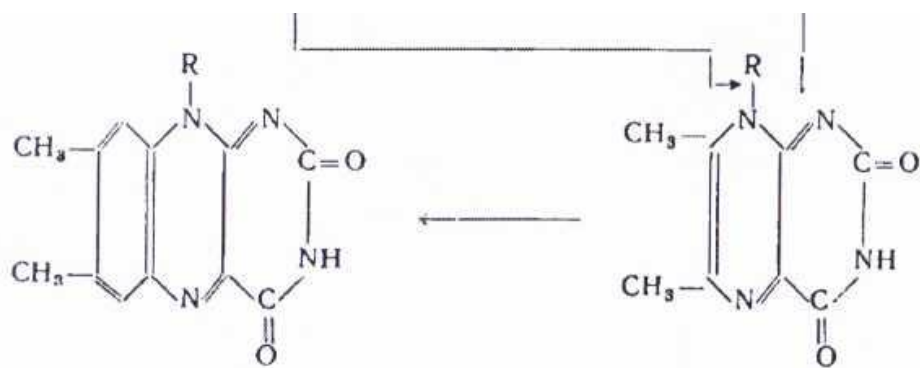


Схема механізму біосинтезу молекули рибофлавіну мікроорганізмами



Дві молекули речовини, що містить 2 вуглецевих атома (але не ацетат), або одна молекула речовини, що містить 4 вуглецевих атома (можливо ацетоін)

Дві молекули речовини, що містить 2 вуглецевих атома (але не ацетат), або одна молекула речовини, що містить 4 вуглецевих атома (можливо ацетоін)



Рибофлавін

6,7-диметил-8-рибітил-
лумазин

Тіамін

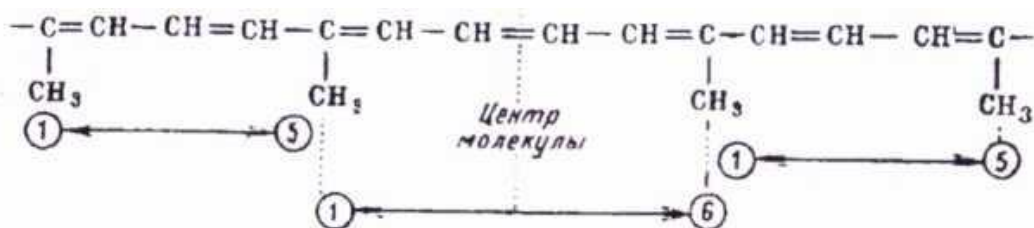
Тіамін синтезують багато мікроорганізмів, однак промисловий метод його отримання шляхом ферментації ще не набув поширення. Однією з причин цього є відсутність селекціонованих високопродуктивних культур, що синтезують тіамін в таких кількостях, які дозволяють при використанні мікробіологічного методу отримати належний економічний ефект у порівнянні з хімічним синтезом. При вивченні шляхів біосинтезу тіаміну основна увага дослідників приділялася механізму формування молекули з похідних піримідину і тiazолу. З дріжджів були отримані ферментні препарати, які дозволили припустити, що на цьому етапі відбувається з'єднання похідних тiazолу з піримідинів за участю іонів магнію і АТФ, за рахунок якого утворюються фосфорильовані похідні, які вступають в реакцію. Непрямим підтвердженням можливості подібних реакцій є добре відомий факт, коли тіамін дефіцитні культури мікроорганізмів добре розвиваються, якщо в живильне середовище замість тіаміну будуть введені похідні піримідину і тiazолу. Вітамін міститься як в міцелії, так і в культуральній рідині. На накопичення тіаміну істотний вплив роблять середовище, значення його початкової величини рН і концентрація амонійного азоту. В умовах експерименту було встановлено, що при концентрації амонійного азоту 0,4% оптимальна величина вихідного значення рН повинна дорівнювати 6,6.

кількості глюкози. Біохімічний механізм синтезу молекули вітаміну мікроорганізмами дозволений ще не повністю.

β-Каротин

Відомі мікроорганізми, колонії яких мають жовтий колір різних відтінків. Як показав аналіз виділених пігментів, багато які з них мають каротиноїдну природу.

За класичним визначенням каротиноїди - це жовті або червоні пігменти аліфатичної або аліциклічної будови, побудовані з ізопренових залишків (зазвичай з восьми), останні з'єднані таким чином, що дві найближчі до центру молекули метильні групи знаходяться в положенні 1:6, тоді як всі інші бічні метальні групи стоять в положеннях 1:5; серії пов'язаних подвійних зв'язків складають хромофорну систему каротиноїдів.



Вивчення біосинтезу каротиноїдів у мікроорганізмів проводилося в основному з культурами *Blakeslea trispora*, *Phycomyces blakesleeanus* і деякими дріжджами.

Локалізація β-каротину внутрішньоклітинна. Найбільш інтенсивний синтез його відбувається після того, як зростання культури практично закінчене (рис. 18). Дуже важливим фактором, що впливає на біосинтез, є концентрація в середовищі джерел вуглецю і азоту. Чим більше відношення C:N, тим більше утворюється каротину. Зрозуміло, це положення має певні межі, які зумовлені фізіологічними особливостями культури.

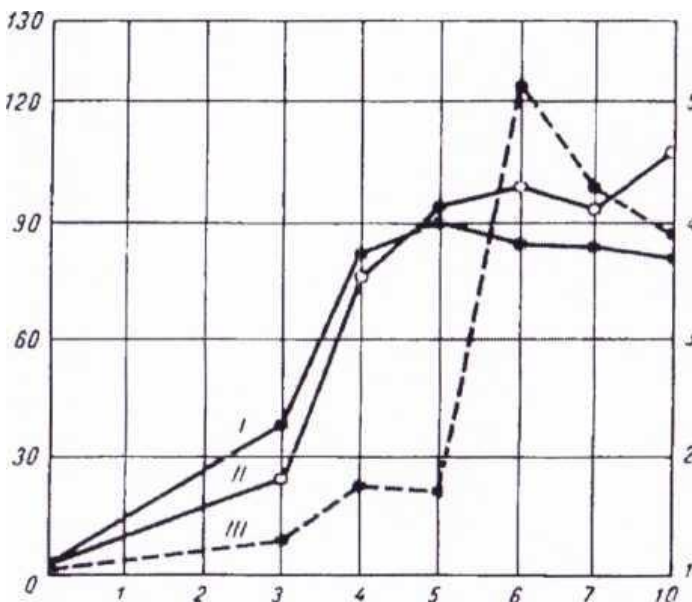


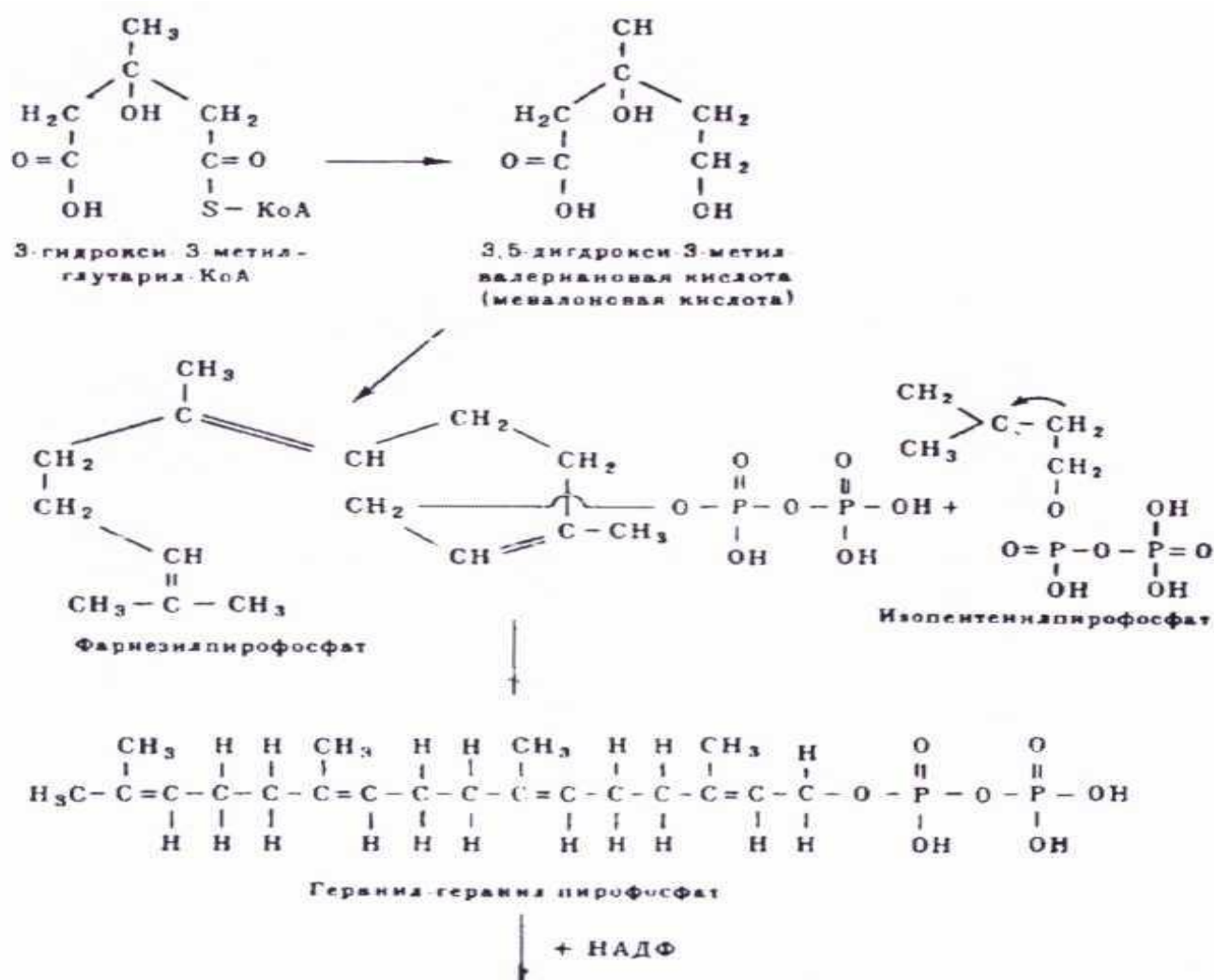
Рис. 18. Синтез β-каротину, вміст азоту у середовищі і зростання біомаси *Phycomyces blakesleeanus*. По осі абсцис - час у днях; по осі ординат ліворуч - вага сухої речовини в міліграмах і

кількість каротину у мікрограмах; праворуч - кількість азоту в міліграмах. I - азот; II - суху речовину; III - β-каротин

Серед різних пропозицій щодо вдосконалення складу середовищ для біосинтезу β-каротину висловлюється можливість використання міцелію *Blakeslea trispora*, що залишився після екстракції β-каротину в якості компонента середовища.

Механізм біосинтезу каротиноїдів повністю не з'ясований. Можливо, що він має деяку схожість з синтезом полієнових антибіотиків, що містять, як і каротиноїди, пов'язані подвійні зв'язки і ізопренові угруповання, що чергуються.

Схема механізму біосинтезу каротиноїдів з мевалонової кислоти



Мікроорганізми, очевидно, не синтезують вітамін А, однак культура *Pseudomonas aeruginosa* при зростанні на рідкому синтетичному середовищі, в яке входить β -каротин як єдине джерело вуглецю, перетворювало β -каротин в вітамін А.

Питання для самоконтролю

1. Яке значення вітамінів для обміну речовин мікроорганізмів?
2. Яким чином відбувається біосинтез вітаміну В₁₂?
3. Що ви знаєте про мікробний синтез рибофлавіну?
4. Як відбувається біосинтез тіаміну?
5. Які умови необхідні для біосинтезу аскорбінової кислоти?
6. Яким чином відбувається біосинтез β -каротину?

Література

1. Антипова Л. В. Прикладная биотехнология : учеб. пособие для вузов / Л. В. Антипова, И. А. Глотова, А. И. Жаринов – Воронеж : Воронеж. гос. технол. акад., 2000. – 283 с.
2. Безбородов А. М. Биотехнология продуктов микробного синтеза: Ферментативный катализ, как альтернатива органического синтеза / А. М. Безбородов – М. : Агропромиздат, 1991. – 238 с.
3. Бекер М. Е. Биотехнология / М. Е. Бекер, Г. К. Лиепиньш, Е. П. Райпулис – М. : Агропромиздат, 1990. – 334 с.
4. Биотехнология микробных ферментов / [А. Г. Лобанок, Н. И. Астапович, Р. В. Михайлова, А. М. Безбородов] – Минск : Наука и техника, 1989. – 204 с.
5. Биотехнология. Принципы и применение / [Бич Г., Бест Д., Брайерли К. и др.]; пер. с англ. ; под ред. И. Хиггинса, Д. Беста, Дж. Джонса. – М. : Мир, 1988. – 480 с.
6. Бирюков В. В. Основы промышленной биотехнологии / В. В. Бирюков – М. : Колос, 2004. – 296 с.
7. Воробьева Л. И. Промышленная микробиология: учеб. пособие / Л. И. Воробьева – М. : Изд-во МГУ, 1989. – 294 с.
8. Егоров Н. С. Биотехнология : микробиологическое производство биологически активных веществ и препаратов : учеб. пособие для вузов. / Н. С. Егоров, В. Д. Самуилов. – М. : Высшая школа, 1997. – 143 с.
9. Машины и аппараты пищевых производств : учебник для вузов / [С. Т. Антипов, И. Т. Кретов, А. Н. Остриков и др.]; под ред. В. А. Панфилова. – М. : Высшая школа, 2001. – 704 с.
10. Пирог Т. П. Загальна мікробіологія: підручник / Т. П. Пирог – К. : НУХТ, 2004. – 471 с.
11. Пирог Т.П. Загальна біотехнологія: підручник / Т. П. Пирог, О. А. Ігнатова. – К. : НУХТ, 2009. – 336 с.
12. Промышленная микробиология : учеб. пособие для вузов / [З. А. Аркадьева, А. М. Безбородов, И. Н. Блохина и др.]; под ред. Н. С. Егорова. – М. : Высшая школа, 1989. – 688 с.
13. Сельскохозяйственная биотехнология / [В. С. Шевелуха, Е. А. Калашникова, Е. З. Кочиева и др.]; под ред. В. С. Шевелухи. - [3-е изд., перераб. и доп.] – М. : Высшая школа, 2008. – 710 с.

Навчальне видання

ТЕХНОЛОГІЇ МІКРОБНОГО СИНТЕЗУ

Методичні рекомендації

Укладач: **Кравченко** Олена Олександрівна

Формат 60×84.1/16. Ум. друк. арк. 5,4

Тираж __ прим. Зам № _____

Надруковано у видавничому відділі
Миколаївського національного аграрного університету
54020, м. Миколаїв, вул. Георгія Гонгадзе, 9

Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 4490 від 20.02.2013.

