

**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**

### **ЗАГАЛЬНА БІОТЕХНОЛОГІЯ**

**методичні рекомендації для самостійного вивчення дисципліни  
і виконання лабораторно-практичних робіт для здобувачів вищої  
освіти СВО «Молодший бакалавр» освітньої спеціальності 162-  
«Біотехнології та біоінженерія» денної форми навчання**



Миколаїв  
2021

Друкується за рішенням науково-методичної комісії факультету технології виробництва і переробки продукції тваринництва, стандартизації та біотехнології Миколаївського національного аграрного університету від “08” листопада 2021р., протокол № 4.

Укладачі:

**О. І. Юлевич** – доцент кафедри генетики, годівлі тварин та біотехнології Миколаївського національного аграрного університету, канд. техн. наук, доцент

**О. І. Каратєєва** – доцент кафедри генетики, годівлі тварин та біотехнології Миколаївського національного аграрного університету, канд. с.-г. наук, доцент

Рецензенти:

**С. І. Ковтун** – заступник директора з наукової роботи Інституту розведення і генетики тварин НААН, д-р с.-г. наук, професор, член-кореспондент НААН

**С. П. Кот** – завідувач кафедри зоогієни та ветеринарії Миколаївського національного аграрного університету, канд. біол. наук., доцент

## З М І С Т

	Вступ	5
1.	Загальні правила техніки безпеки в лабораторії на заняттях з біотехнології	7
2.	Методи конструювання продуцентів біологічно активних речовин	12
3.	Методи генетичної інженерії	18
3.1.	Методи отримання генів	18
3.2.	Введення гена у вектор і клонування	21
3.3.	Методи трансформації клітин рослин і тварин	24
3.4.	Скринінг	25
4.	Сировинна база біотехнології	27
4.1.	Характеристика компонентів поживних середовищ	27
4.2.	Вимоги, що надаються до поживних середовищ	31
4.3.	Стерилізація поживних середовищ	32
5.	Типові технологічні прийоми і апаратурне оснащення	34
5.1.	Апарати та процеси в біотехнології	34
5.1.1.	Піноутворення та піногасіння	38
5.1.2.	Підготовка стерильного повітря і очищення відпрацьованого повітря	39
6.	Особливості культивування клітин рослин і тварин	40
6.1.	Особливості культивування клітин рослин	41
6.1.1.	Метод вегетативного клонування рослин (клонального мікророзмноження)	41
6.1.2.	Культивування калюсних тканин	44
6.1.3.	Приготування поживних середовищ для культивування ізольованих клітин і тканин рослин	46
6.2.	Особливості культивування клітин тварин	49
6.2.1.	Поживні середовища і умови культивування	49
6.2.2.	Системи культивування клітин	51
7.	Відділення, очищення, модифікація і виділення кінцевих продуктів	54
7.1.	Відділення цільового продукту	54
7.2.	Очищення цільового продукту	56
7.3.	Модифікація і виділення кінцевих продуктів	56
8.	Застосування іммобілізованих ферментів і клітин в біотехнології	61
9.	Контроль і управління біотехнологічним і процесами	64
10.	Виробництво білка одноклітинних. Багатотоннажне мікробіологічне виробництво ферментних препаратів	67
10.1.	Виробництво білка одноклітинних	68
10.2.	Мікробіологічне виробництво ферментних препаратів	70
11.	Багатотоннажне мікробіологічне виробництво амінокислот і органічних кислот	75

11.1.	Виробництво амінокислот	76
11.2.	Отримання харчових кислот за допомогою мікроорганізмів	79
12.	Медична біотехнологія	87
12.1.	Схема промислового біотехнологічного виробництва антибіотиків	87
12.2.	Удосконалення виробництва антибіотиків	89
12.3.	Основні способи отримання інтерферонів	90
12.4.	Соматотропін	92
12.5.	Отримання інсуліну	93
12.6.	Фактори згортання крові	95
12.7.	Створення вакцин	96
12.8.	Моноклональні антитіла	97
13.	Біоенергетика	100
13.1.	Біогаз як екологічне паливо	101
13.2.	Виробництво етанолу	104
13.3.	Біодизельне паливо	107
13.4.	Отримання біоводню	109
14.	Біотехнологія і харчова промисловість	112
14.1.	Мікроорганізми і виробництво молока і молочних продуктів	112
14.2.	Використання мікроорганізмів у хлібопеченні	115
14.3.	Бродильні виробництва	116
14.4.	Використання мікроорганізмів у виробництві білкових продуктів	119
15.	Екологічна біотехнологія	121
15.1.	Очищення стічних вод	121
15.2.	Біохімічні методи очищення стічних вод	125
15.3.	Очищення ґрунту від нафтового забруднення	128
15.4.	Освоєння екологічно чистих матеріалів	129
16.	Сільськогосподарська біотехнологія	133
16.1.	Промислове одержання кормових добавок	134
16.2.	Біотехнологічна модифікація рослинних кормів	136
16.3.	Премікси та пробіотики в тваринництві	138
	Перелік навчальної літератури	141
	Додаток	142

## Вступ

Розвиток біотехнології дозволяє істотно інтенсифікувати виробництво, підвищити ефективність використання природних ресурсів, вирішити екологічні проблеми, створити нові джерела енергії. Можливості біотехнології при міжнародному співробітництві фахівців можуть бути спрямовані на вирішення світових кризових проблем, пов'язаних з поповненням дефіциту білка та енергії, запобіганням небезпечних захворювань, охороною навколишнього середовища.

В даний час досягнення біотехнології перспективні в наступних галузях:

- промисловості (харчова, фармацевтична, хімічна, нафтогазова) – використання біосинтезу і біотрансформації нових речовин на основі сконструйованих методами генної інженерії штамів бактерій і дріжджів із заданими властивостями;

- екології – підвищення ефективності екологізації захисту рослин, розробка екологічно безпечних технологій очищення стічних вод, утилізація відходів агропромислового комплексу, конструювання екосистем;

- енергетиці – застосування нових джерел біоенергії, отриманих на основі мікробіологічного синтезу і модельованих фотосинтетичних процесів, біоконверсії біомаси в біогаз;

- сільському господарстві – розробка в області рослинництва трансгенних агрокультур, біологічних засобів захисту рослин, бактеріальних добрив, мікробіологічних методів рекультивації ґрунтів; в області тваринництва – створення ефективних кормових препаратів з рослинної, мікробної біомаси та відходів сільського господарства;

- медицині – розробка медичних біопрепаратів, моноклональних антитіл, діагностикумів, вакцин, розвиток імунобіотехнології.

У рекомендаціях подано ряд завдань практичного плану, виконання яких дозволить студентам краще ознайомитися з досягненнями та різноманітними методами, використовуваними в сучасній біотехнології.

Практикум з дисципліни "Загальна біотехнологія" включає в себе роботи з вивчення властивостей біологічних агентів і методів їх використання в біотехнологічних процесах.

Промислова біотехнологія об'єднує методи переробки, в яких для отримання цінних продуктів використовуються живі організми та біологічні процеси. Якщо в хімічній технології на сировину впливають хімічними реагентами, то в біотехнологічних процесах на вихідний матеріал – субстрат впливають біологічними агентами.

Біологічними агентами можуть бути мікроорганізми, клітини тварин і рослин і виділені з клітин біологічні структури.

Лабораторно-практичні роботи є важливим етапом навчального процесу, що дозволяє вдосконалювати теоретичну й практичну підготовку студентів. Вони містять теоретичні положення, принципові блок-схеми біотехнологічних виробництв, їх постадійний опис, питання для

самоконтролю, довідковий матеріал у вигляді таблиць, контрольні завдання, список рекомендованої літератури. Дидактична мета цих рекомендацій – закріплення теоретичних знань, набутих у лекційному курсі, а також формування в студентів навичок самостійної пошуково-аналітичної роботи з даної дисципліни.

Практикум проводиться паралельно з теоретичним курсом, що дає можливість глибше й повніше засвоїти матеріал. Лабораторні заняття з курсу "Загальна біотехнологія" виконуються відповідно до навчального плану підготовки бакалаврів денної форми навчання за напрямом 6.051401 «Біотехнологія».

Мета курсу "Загальна біотехнологія" – вивчення сучасного стану в галузі біотехнології, отримання практичних навиків вивчення мікроорганізмів у об'ємі, необхідному для розуміння протікання основних процесів, зв'язку біотехнології з суміжними науками, сільським господарством, медициною та мікробіологією, що повинно створити студентам базу для проведення біотехнологічних досліджень в науково-дослідних чи виробничих установах.

## **1. Загальні правила техніки безпеки в лабораторії на заняттях з біотехнології**

1. Працювати в лабораторії необхідно в халаті, захищаючи одяг і шкіру від попадання і роз'їдання реактивами і обсіменіння мікроорганізмами.
2. Кожен повинен працювати на закріпленому за ним робочому місці. Перехід на інше місце без дозволу викладача не допускається.
3. Робоче місце слід підтримувати в чистоті, не захаращувати його посудом і побічними речами.
4. Студентам забороняється працювати в лабораторії без присутності викладача або лаборанта, а також у невстановлений час без дозволу викладача.
5. До виконання кожної лабораторної роботи можна приступити тільки після отримання інструктажу з техніки безпеки і дозволу викладача.
6. Приступаючи до роботи, необхідно: усвідомити методику роботи, правила її безпечного виконання; перевірити відповідність взятих речовин тим речовинам, які вказані в методиці роботи.
7. Досвід необхідно проводити в точній відповідності з його описом в методичних вказівках, особливо дотримуватися черговості додавання реактивів.
8. Для виконання досвіду користуватися тільки чистим, сухим лабораторним посудом; для відмірювання кожного реактиву потрібно мати мірний посуд (піпетки, бюретки, мензурку, мірний циліндр або мірний стакан); не слід виливати надлишок налитого в пробірку реактиву назад у тару, щоб не зіпсувати реактив.
9. Якщо в ході досвіду потрібно нагрівання реакційної суміші, треба слідувати передбаченим методичним вказівкам способу нагрівання: на водяній бані, на електроплитці або на газовому пальнику та ін.. Сильно летючі горючі речовини небезпечно нагрівати на відкритому вогні.
10. Пролиті на підлогу і стіл хімічні речовини знешкоджують і прибирають під керівництвом лаборанта (викладача) у відповідності з правилами.
11. При роботі в лабораторії слід дотримуватися таких вимог: виконувати роботу потрібно акуратно, сумлінно, уважно, економно, бути спостережливим, раціонально і правильно використовувати час, відведений для роботи.
12. По закінченні роботи слід привести в порядок своє робоче місце: помити посуд, протерти поверхню робочого лабораторного столу, закрити водопровідні крани, вимкнути електричні прилади.

### ***Правила техніки безпеки в лабораторії при роботі з кислотами і лугами***

1. Кислоти і луги в більшості відносяться до речовин підвищеного класу небезпеки і здатні викликати хімічні опіки та отруєння. Тому

необхідно уважно стежити за тим, щоб реактиви не потрапляли на обличчя, руки та одяг.

2. Не ходити по лабораторії з концентрованими кислотами і лугами, а наливати їх тільки у відведеному для цього місці.

3. Розливати концентровану азотну, сірчану і соляну кислоти слід тільки при включеній вентиляції у витяжній шафі.

4. Забороняється набирати кислоти і луги в піпетку ротом. Для цього слід застосовувати гумову грушу і інше обладнання для відбору проб.

5. Для приготування розчинів сірчаної, азотної та інших кислот необхідно їх доливати до води тонким струменем при безперервному перемішуванні, а не навпаки. Приливати воду в кислоту забороняється!

6. Розчиняти тверді луги слід шляхом повільного додавання їх невеликими шматочками до води при безперервному перемішуванні. Шматочки лугу потрібно брати тільки щипцями.

7. При змішуванні речовин, яке супроводжується виділенням тепла, необхідно користуватися термостійким товстостінним скляним або фарфоровим посудом.

8. Розлиті кислоти або лугу необхідно негайно засипати піском, нейтралізувати, і тільки після цього проводити прибирання.

9. При попаданні на шкіру або одяг кислоти, треба змити її великою кількістю води, а потім 3-5% розчином питної соди або розведеним розчином аміаку.

10. При попаданні на шкіру або одяг лугу, після змивання її великою кількістю води, потрібно провести обробку 2-3% розчином борної, лимонної або оцтової кислоти.

11. Речовини, фільтри, папір, використані при роботі, слід викидати в спеціальний відро, концентровані розчини кислот і лугів також зливати в спеціальний посуд.

### ***Правила техніки безпеки в лабораторії з легкозаймистими і горючими рідинами (ЛЗР та ГР)***

1. Всі роботи з ЛЗР і ГР повинні здійснюватися у витяжній шафі при включеній вентиляції, відключених газових проводках і електронагрівальних приладів.

2. Забороняється нагрівати на водяних банях речовини, які можуть вступати між собою в реакцію, що супроводжується вибухом або виділенням парів і газів.

3. При випадковому проливанні ЛЗР (сірковуглець, бензин, діетиловий ефір та ін), а також при втратах горючих газів необхідно негайно відключити всі джерела відкритого вогню, електронагрівальні прилади.

4. Посудини, в яких проводилися роботи з ЛЗР та ГР, після закінчення досліджень повинні бути негайно звільнені від решти рідини і промиті.

5. Досвіди з отруйними речовинами та речовинами, які мають сильно виражений запах, можна проводити тільки у витяжній шафі.



6. При гасінні бензину, спирту, ефіру, користуватися піском, яким слід засипати на спалахнуло полум'я.

7. При розпізнаванні газу по запаху, що виділяється, нюхати газ тільки на певній відстані, направляючи його струмінь рухом руки від судини до себе.

### ***Правила техніки безпеки в лабораторії з побутовим газом, спиртівкою і сухим пальним***

1. У зв'язку з небезпекою вибуху газоповітряної суміші, застосування побутового газу для нагріву в лабораторіях допускається в крайніх випадках, коли відсутні електронагрівальні прилади.

2. Перед запалюванням спиртівки потрібно переконатися, що корпус її виправлений, гніт випущений на потрібну висоту і розгорнутий, а горловина і держак гніта сухі.

3. Запалену спиртівку не переносити з місця на місце; не можна запалювати одну спиртівку від іншої.

4. Гасити спиртівку треба накриваючи полум'я ковпачком. Задувати полум'я забороняється.

5. У спиртівки використовується тільки етиловий спирт; користуватися бензином або іншими горючими рідинами забороняється.

6. Брикети (таблетки) сухого пального іноді можуть використовуватися для нагріву. Запалювати їх слід на керамічних пластинках, гасити - ковпачками для спиртівки або керамічними тиглями. Брикети, які не догоріли, після гасіння треба прибрати в витяжну шафу.

7. Нагрівання реакційних сумішей в пробірках і інших скляних посудинах потрібно проводити обережно, попередньо насухо витерти зовнішні стінки судини і, не допускаючи розбризкування суміші з посудини. Горловина посудини повинна бути спрямована в бік, як від себе, так і від тих, хто працює поруч. Пробірку слід тримати під нахилом. Не можна нахилитися над рідиною, яка нагрівається, тому що іноді вона може википати з посудини. При нагріванні пробірки над спиртівкою необхідно використовувати спеціальний тримач для пробірок.

8. При виникненні пожежі, насамперед треба вимкнути усі нагрівальні прилади, потім гасити полум'я. Його не можна задувати. Якщо горять органічні речовини, не слід заливати полум'я водою. Використовуйте пісок, пожежні ковдри, вогнегасники (краще вуглекислотні).

9. При незначних опіках (гарячими предметами, речовинами або парою) місце опіку необхідно обробити спиртом або міцним розчином перманганату калію, а при більш тяжких опіках слід негайно звернутися до лікаря.

### ***Правила техніки безпеки в лабораторії з хімічної посудом***

1. Основним травмуючим фактором, який пов'язаний з використанням скляного посуду, апаратів і приладів, є гострі осколки скла, що здатні

викликати порізи тіла працюючого, а також опіки рук при необережному поводженні з нагрітими до високої температури частинами скляного посуду.

2. Розмішувати реакційну суміш в посудині скляною паличкою або шпателем треба обережно, не допускаючи розлому судини. Тримати посудину при цьому необхідно за її горловину.

3. Переносячи посудини з гарячою рідиною, треба тримати їх двома руками: однією - за дно, інший - за горловину, використовуючи при цьому рушник (щоб уникнути опіків кистей і пальців рук).

4. При закриванні товстостінної посуду пробкою слід тримати її за верхню частину горловини. Нагрітий посуд не можна закривати притертою пробкою поки він не охолоне.

5. У дослідах з нагріванням необхідно користуватися посудом, який має відповідне маркування.

6. У разі порізу склом потрібно спочатку уважно оглянути рану і витягти з неї осколки скла, якщо вони є, а потім обмити поранене місце 2% розчином перманганату калію, змастити йодом і зав'язати бинтом або заклеїти лейкопластиром.

### ***Правила техніки безпеки в лабораторії з електрообладнанням та електроприладами***

1. Хімічні лабораторії (включаючи біохімічні та мікробіологічні) згідно зі ступенем небезпеки ураження електричним струмом відносяться до приміщень з підвищеною або особливою небезпекою, яка обумовлена можливістю впливу на електрообладнання хімічно активних середовищ.

2. Усі роботи, пов'язані із застосуванням електроприладів повинні проходити під наглядом викладача (лаборанта).

3. При роботі з водяною лазнею не можна пробувати ступінь нагріву води рукою.

4. При несправності в роботі електроприладу (наприклад, підсвічування в мікроскопі) необхідно звернутися до викладача. Лагодити самостійно прилади забороняється.

5. При ураженні електричним струмом, якщо потерпілий залишається в зіткненні з струмоведучими частинами, необхідно негайно вимкнути струм за допомогою пускача або вивернути охоронну пробку або перерубати струмопровідний провід ізольованим інструментом. До постраждалого, поки він знаходиться під струмом, не можна торкатися незахищеними руками (без гумових рукавичок). Якщо потерпілий втратив свідомість, після вимикання струму потрібно негайно, не чекаючи лікаря, робити штучне дихання.

### ***Правила техніки безпеки в лабораторії при роботі з реактивами***

1. Якщо до роботи не дано вказівок щодо дозування реактивів, то брати їх для проведення дослідів необхідно в можливо меншій кількості (економія матеріалів і часу, який витрачається на досвід).

2. Надлишок реактиву можна висипати і виливати назад в посудину, з якої він був узятий.

3. Після витрачання реактиву банку або склянку необхідно відразу закрити пробкою і поставити на місце.

4. Сухі реактиви брати з допомогою лопаток, пластмасових або металевих шпатель. Шпатель повинен бути завжди сухим і чистим. Після використання слід його ретельно обтерти.

5. Коли реактив відбирається піпеткою, ні в якому разі не можна тій же піпеткою, не вимивши її, брати реактив з іншої ємності.

6. При наливанні реактивів не можна нахилитися над посудиною, запобігаючи потрапляння бризок на обличчя або одяг.

7. Не можна тримати банку або склянку з реактивом, яку потрібно відкрити, тримаючи в руках, її треба поставити на лабораторний стіл і тільки після цього відкривати.

### ***Правила техніки безпеки в лабораторії при роботі з біооб'єктами***

1. Необхідно чітко виконувати інструкції до лабораторних занять.

2. У лабораторії забороняється приймати їжу, пити воду.

3. Роботу з біологічним матеріалом проводити тільки інструментами.

4. Для забезпечення стерильності роботу з мікроорганізмами краще проводити в спеціальних скляних або полускляних камерах-боксах, які бувають різних розмірів. У боксах вмонтовані ультрафіолетові бактерицидні лампи, що знищують мікроорганізми.

5. Необхідно стежити за тим, щоб дріжджова маса не забруднювала руки, стіл і навколишні предмети. Ватні пробки, що закривають судини з мікроорганізмами, не повинні своєю внутрішньою частиною стикатися зі столом або руками. Пролиту дріжджову суспензію не обходимо знешкодити з використанням дезінфікуючих засобів (спирт і т.п.).

6. Бактеріальна петля після пересіву мікроорганізмів повинна бути прожарити над полум'ям і поставлена в спеціальний штатив. Вся робоча лабораторний посуд, що містить живі мікроорганізми, після роботи повинна піддатися термічній обробці в автоклаві.

7. При випадковому потраплянні біологічного матеріалу (особливо мікроорганізмів) на стіл, руки, потрібно провести обробку дезінфекційним розчином (наприклад, хлораміном).

8. Після роботи необхідно ретельно вмити руки з використанням дезінфекційних засобів (детергентів).

### ***Заходи першої допомоги при отруєннях неорганічними та органічними речовинами:***

*Азотною кислотою.* Свіже повітря, спокій, тепло. Вдихання кисню. Сульфадимезин чи іншої сульфаніламідний препарат (2 г), аскорбінова кислота (0,5 г), кодеїн (0,015 г). Штучне дихання. Консультація лікаря.

*Сірчаною кислотою.* Свіже повітря. Промити верхні дихальні шляхи 2% розчином питної соди. У ніс - 2-3 краплі 2% розчину ефедрину. Тепле

молоко з содою, кодеїн (0,015 г) або дионин (0,01 г). При попаданні в органи травлення змастити слизову рота 2% розчином дикаїну. Промивання шлунка великою кількістю води. Всередину прийняти: столову ложку оксиду магнію на склянку води кожні 5 хвилин, яєчний білок, молоко, крохмальний клейстер, шматочки вершкового несолоного масла, шматочки льоду. Не можна викликати блювоту і застосовувати карбонати. Консультація лікаря.

*Лугами.* Вдихання теплої водяної пари (у воду додати трохи лимонної кислоти). Всередину - тепле молоко з медом, кодеїн (0,015 г) або дионин (0,01 г). *Гірчичники.* При попаданні в органи травлення змастити слизові оболонки рота і горла 1% розчином новокаїну. Всередину - по столовій ложці 1% розчину лимонної кислоти кожні 3-5 хвилин, крохмальний клейстер з додаванням лимонної або оцтової кислоти, 2-3 столові ложки рослинної олії, шматочки льоду. Консультація лікаря.

*Ефіром, хлороформом, спиртом.* Свіже повітря. Всередину 0,03 г фенаміну або 0,1 г коразол, або 30 крапель кордіаміну, або 0,5 г камфори. Штучне дихання і вдихання кисню.

По завершенні роботи необхідно привести в порядок робоче місце. Не дозволяється кидати в раковини папір, вату, скло від розбитої хімічної посуду. Двері лабораторії тримають зачиненими. Для позначення дійсного чи можливого присутності біологічної небезпеки вживають міжнародний знак біологічної небезпеки (рис. 1).



*Рис. 1. Знак біологічної небезпеки*

Даним знаком позначають приміщення, обладнання, ємності, а також матеріали, в яких вирощуються живі мікроорганізми. Знак забарвлений люмінесцируючої помаранчевої або оранжево-червоною фарбою. Поруч зі знаком дається відповідна інформація про характер небезпеки, та вказуються заходи, що забезпечують безпечну роботу з даною групою мікроорганізмів.

## **2. Методи конструювання продуцентів біологічно активних речовин**

Кількість *біооб'єктів*, що використовуються в біотехнологічному виробництві дуже багато. Наприклад, в ролі біооб'єкту може виступати людина-донор. З його допомогою виробляють гомологічну імунну плазму

(антистафілококову, проти корі, еритроцитарну і лейкоцитарну масу для трансфузій і так далі)

У ролі біооб'єкту може виступати тварина (кінь, олень, корова, свиня, курка, кролик і так далі). З їх допомогою забезпечується промислове виробництво інсуліну, панкреатину, лізоциму, пантокрину, антитоксичних сироваток, вірусних вакцин і так далі.

В якості біооб'єкту можна використовувати різні рослини. наприклад, бруньки та однорічні пагони тополі представляють сировину при виготовленні простагландинів, смола сосни - це напівпродукт отримання скипидару, смола піхти - це сировина для бальзамів, камфорне дерево - сировина для отримання камфори і так далі.

В якості біооб'єктів широко використовуються і мікрооб'єкти:

- прокаріоти (синьо-зелені водорості, бактерії, віруси, бактеріофаги, актиноміцети) і прокаріоти - бактерії як біооб'єкти використовуються у виробництві, наприклад, вітаміну цианокобаламіна (вітаміну B12).

- еукаріоти (найпростіші, водорості, гриби, цвілі, дріжджі). Наприклад, використання клітин цвілі при виробництві антибіотиків, а клітин дріжджів - при виробництві ергостерину (попередника вітаміну D), бетакаротина (попередника вітаміну A) і так далі.

Узагальнюючи все це, можна сказати, що в цілому до біооб'єктів, що використовуються у біотехнологічному виробництві належать:

1. Макроорганізми рослинного і тваринного походження
2. Гриби, бактерії, віруси, культури клітин еукаріот, біологічні макромолекули з інформаційною (ДНК, РНК), або функціональної активністю (ферменти, біокатализатори).

Що стосується нових технологій біотехнологічного виробництва, то особливе місце в біотехнології займають біооб'єкти рослинного походження, що використовуються для отримання культур клітин таких як калюсних (вирощування клітин на твердій поверхні) і суспензійні культури (вирощувані в рідких середовищах). Слово «калюс» позначає «грубий нарост», «мозоль» як сукупність клітин на пошкодженій тканини рослини.

Для біооб'єктів з мікросвіту характерно досить швидке розмноження (віруси, бактеріофаги). Ділення дріжджів відбувається 1 раз в 90-120 хвилин, а бактерій 1 раз в 20-60 хвилин.

Цілі, які необхідно досягати біотехнології при вдосконаленні продуцента:

1. Збільшення продуктивності для покращення виходу продукту на одиницю біомаси.
2. Надати продуценту здатність використовувати менш дефіцитні і більш дешеві середовища.
3. Продуцент не повинен ретроінгібувати біосинтез кінцевого продукту.
4. Стійкість продуцента до вірусних інфекцій (бактеріофагам).

5. Невимогливість до обладнання, тобто біосинтез не повинен уповільнюватися при несучасній технології обладнання (наприклад, досягнення меншої здатності до піноутворювання культуральної рідини)

6. Оптимізація властивостей продуцента в аспекті медичної промисловості (продуцент не повинен мати неприємного запаху і т.д.).

Підвищення продуктивності мікроорганізму як продуцента зводиться до селекції та мутагенезу. Селекційна робота з мікроорганізмом складається з пошуку природних форм, які володіють будь-якими корисними для людини властивостями (наприклад, синтез БАВ, висока швидкість росту, здатність засвоювати дешеві середовища і так далі, в подальшому вдосконаленні його, в створенні на його основі промислових штамів.

Сукупність життєздатних мікроорганізмів, вирощених на певному поживному середовищі, називається *культурою мікроорганізмів*, а сам процес вирощування – *культивуванням*. *Чиста культура* мікроорганізмів представляє собою популяцію мікроорганізмів одного виду, що виросла на стерильному поживному середовищі. *Вид* – таксономічна категорія, що об'єднує групу мікроорганізмів спільного походження, близьких за своїми властивостями, відокремлену відбором від інших видів і пристосовану до певної середовищі існування. Культуру, що складається з різних видів мікроорганізмів, називають *змішаною культурою*. У біотехнології застосовують високопродуктивні штами мікроорганізмів.

*Штамом* називають чисту культуру мікроорганізмів, виділених з певного джерела, тобто з середовища їх проживання, і відрізняються деякими спадковими властивостями від інших представників виду. Штам являє собою генетично однорідну культуру, яку штучно підтримують за допомогою відбору спадково однорідних клітин.

У реальних умовах одночасно співіснують різні види мікроорганізмів. З природного середовища існування мікроорганізми переносяться в спеціальні середовища, умови в яких будуть сприятливі тільки для певного виду мікроорганізмів і несприятливі для супутніх видів. Такі поживні середовища називають *елективними*.

Елективні умови можна створювати, змінюючи склад середовища, значення рН, температуру і т.і. Наприклад, дріжджі виділяють, використовуючи кислі середовища (рН 3,5...5,0) або середовища, збагачені вуглеводами (масова частка цукрів 20...50%). У елективному поживному середовищі відбувається накопичення певного виду мікроорганізмів і пригнічення життєдіяльності супутніх видів. Отримані культури називають *накопичувальними*.

З накопичувальної культури виділяють *чисту культуру* мікроорганізмів, використовуючи методи, що засновані або на біологічних властивостях мікроорганізмів, або на принципі механічного їх поділу. Практично виділення чистої культури зводиться до ізоляції однієї клітини і отримання чистої культури у вигляді потомства цієї батьківської клітини. Генетично однорідне потомство однієї клітини називається *клоном*. Таким чином, отримання чистої культури мікроорганізмів та її використання

включає три етапи: отримання накопичувальної культури, виділення чистої культури і контроль чистоти культури.

Накопичення чистої культури в лабораторії проводять у два етапи - вирощування в пробірках, а потім в колбах на рідких і щільних середовищах. Контролем чистоти виділеної культури служить однорідність клітин під мікроскопом і однотипність колоній на чашці Петрі при подальшому розсіві.

Дріжджі більш зручний об'єкт для дослідження, ніж інші мікроорганізми. Клітини дріжджів досить великі, мають круглу, овальну або подовжену форму, з максимальними розмірами від декількох мікрометрів до 15-25 мкм і більше. Дріжджі не токсичні і не патогенні для людини і з найдавніших часів використовуються в якості біологічного агента для виробництва харчових продуктів.

Термін "дріжджі" не має самостійного таксономічного значення. Дріжджами називають грибні організми, які проводять більшу частину свого життєвого циклу у вигляді окремих клітин. Отже, дріжджі можуть бути визначені як одноклітинні гриби, що розмножуються брунькуванням або поділом. Однак, як представники вищих грибів, вони можуть утворювати міцелій і розмножуватися спорами, в тому числі і статевим способом.

Дріжджі, що відносяться до недосконалих грибів, серед яких виділяються представники роду *Candida*, використовують для виробництва білкової біомаси, так як в дріжджових клітинах міститься багато білка, вуглеводів, амінокислот і вітамінів групи В. Окремі види дріжджів вирощують не тільки на вуглеводному сировині, але і на вуглеводневому.

*Методи сучасної селекції* - це генетичне конструювання, коли можна змінити генетичну програму мікроорганізму.

Генетичне конструювання в живій клітині *in vivo* включає отримання і виділення мутантів з використанням різних способів обміну спадковою інформацією живих мікробних клітин.

Генетичне конструювання *in vitro* засноване на застосуванні генетичної інженерії, яка маніпулює виділеною з організму ДНК.

Кожен організм має свій генотип і фенотип.

Біотехнолог для вдосконалення біооб'єкту використовує:

- спадкові зміни фенотипу, які передаються спадково;
- спадкові зміни генотипу.

Мутації розрізняють на цитоплазматичні (позахромосомні) і ядерні (хромосомні).

Спадкові зміни називаються мутаціями в геномі, але є й позахромосомні зміни. Таким чином мутації виявляються на субклітинному і молекулярному рівні.

Хромосомні мутації включають три основних типи:

1. зміна числа хромосом
2. зміна числа і порядку розташування генів (перебудова хромосом веде до структурних змін)
3. зміни індивідуальних генів (внутрігенні зміни).

У селекції мікроорганізмів основне значення мають два останні типи мутацій.

Важливою характеристикою мутантів є їх здатність до *реверсії*, тобто повернення до вихідного фенотипу (зворотне мутування).

Мутанти, які з'являються в результаті реверсії називаються *ревертанти*.

Сучасна селекція заснована на виділенні клонових культур.

Визначення клона: *клон* - це генетично однорідне потомство однієї клітини (це колонія, що виросла з однієї клітини). Клонова культура, що має спадкову однорідність, називається *штамом*.

### **Типи мутацій.**

1. Делеція (стирання) - випадання ділянок хромосоми або декількох генів.

2. Дуплікація - подвоєння генів.

3. Ампліфікація - множення окремих генів або групи генів.

4. Транспозиція - вставка ділянки хромосоми в нові місця на хромосомі.

5. Інверсія - зміна порядку розташування генів на хромосомі, при цьому може бути втрата одних функцій і придбання нових.

6. Летальні мутації - це мутації, що захоплюють занадто великі ділянки геному, в результаті чого організм гине.

7. внутрігенні мутації:

- точкові - зміна послідовності нуклеотидів в межах одного гена.

- транзіції або трансверсії - випадання або вставка одного або декількох основ, наприклад, транзіції - пурин заміщається на пурин або піримідин на піримідин, трансверсії – пурин заміщується на піримідин.

**Вдосконалення біооб'єкту** - це отримання біооб'єктів-продуцентів з мутаціями в геномі, які відрізняються від вихідного біооб'єкту в бік поліпшення біотехнологічних властивостей, зокрема, в бік збільшення утворення цільового продукту.

Класифікація біооб'єктів і можливості цільового впливу на них:

1. Макрооб'єкти: людина, ссавці, рептилії, риби, комахи, рослини

2. Мікрооб'єкти:

2.1. Еукаріоти - нижчі гриби, водорості (крім нитчастих)

2.2. Прокаріоти - актиноміцети, бактерії, синьо-зелені водорості.

2.3. Мікробіосистеми - ферменти, протопласти.

**Людина:** можна впливати тільки на окремі гени, але проти використання людини як біооб'єкту в плані мутагенного впливу заперечує етика.

**Людину можна піддавати тільки неспадкової імунізації.**

Людину можна використовувати:

1. донор крові - необхідно, щоб людина була здорова, кров не повинна бути заражена, при взятті крові не повинен порушуватися гомеостаз.

2. донор органів та тканин (після його смерті).



Людину можна використовувати в якості зразка для визначення продуктів, які необхідно отримувати (інтерферон, інсулін, гормони внутрішньої секреції, різноманітні фактори росту).

Питання етики перешкоджає вдосконаленню людини як біооб'єкту.

**Ссавці:** вдосконалення ссавців як біооб'єктів сумнівно, хоча в принципі, можна домогтися збільшення продукції інсуліну підшлунковою залозою свиней або великої рогатої худоби.

**Рептилії:** отруту змій краще збирати навесні.

**Рослини:** селекція і відбір - єдиний шлях їх вдосконалення до теперішнього часу. Щоб збільшити вихід цільового продукту сьогодні використовують культури рослинних клітин - отримують біоженьшень, серцеві глікозиди та ін.

**Еукаріоти і прокаріоти:** головні успіхи при селекції та відборі отримані у мікроорганізмів, оскільки вони легко розмножуються, мають велику кількість мутантів і легше відбирається біооб'єкт з важливими для біотехнолога властивостями. Методом відбору та мутагенезу було досягнуто підвищення активності у продуцента пеніциліну з 40-х років в 100 000 разів., стрептоміцину в 20 000 разів. Такі ж результати отримані в роботі з продуцентами вітамінів і амінокислот.

Існують традиційні методи вдосконалення:

**Природний відбір - селекція.**

Варіації обумовлені спонтанними мутаціями (неконтрольовані, раптові або причини яких не встановлені).

**Індукований мутагенез** - шлях вдосконалення біооб'єктів радикальними методами. До таких методів належать:

- Обробка біооб'єкту хімічними мутагенами, націленими на ДНК або ДНК-тропними агентами. Після цієї обробки число мутантів різко зростає, як «позитивних» так і «негативних». При цьому у частини мутантів різко змінюються ознаки, причому, чим більша доза мутагену, тим більше і летальних, не потрібних мутантів, але одночасно і більше відсоток тих мутантів, що вижили. Необхідно, щоб зберігався баланс між летальними мутаціями і кількістю тих мутантів, що вижили.

1. **Хімічні мутагени:**

а) нітрозогуанідін - алкілує основи в реплікативній вилці, викликає мутації по типу трансверсії, транзичії і делеції,

б) нітрозометілсечовина - викликає трансверсії

в) акридинові барвники (акридиновий помаранчевий) - вставка іншого гена між основами

г) деякі протипухлинні антибіотики, які є ДНК-тропними агентами.

2. **Фізичні мутагени:**

а) УФ-опромінення, при цьому утворюються димери піридинових основ, йдуть мутації по типу транзичії і трансверсії. змінюється порядок зчитування генів на рівні трансляції.

б) рентгенівське опромінення

в) швидкі нейтрони

г)  $\gamma$ -промені (гама-лучи)

д) ультразвук.

Мутаційно-ступінчастий відбір - при цьому відборі підвищується частота мутацій. За допомогою цього методу вдалося домогтися збільшення активності продуцента пеніциліну в 100 000 разів за рахунок ампліфікації (множення) генів, що кодують утворення LLD- трипептида.

### ***Питання для самоперевірки***

1. Що таке «біооб'єкт»?
2. Які види біооб'єктів розрізняють?
3. Які цілі необхідно досягати біотехнології при вдосконаленні продуцента?
4. Що розуміють під терміном "чиста культура", "клон", "штам"?
5. Які ознаки встановлюють при ідентифікації чистих культур?
6. Які мутації розрізняють в селекції?
7. Які хромосомні мутації існують?
8. Які типи мутацій розрізняють?
9. Які особливості необхідно враховувати при селекції мікроорганізмів?
10. Які мутанти називаються ауксотрофними?
11. В чому полягає гібридизація мікроорганізмів?
12. Які питання можна вирішити за рахунок гібридизації мікроорганізмів?
13. Вкажіть, які вимоги надаються до промислових штамів мікроорганізмів?
14. Вкажіть прийоми, що використовують для консервації продуцентів?
15. Які існують можливості цільового впливу на біооб'єк залежно від його класифікації?
16. Що таке «індукований мутагенез»?
17. Які види мутагенів існують?

### **3. Методи генетичної інженерії**

У новій біотехнології частіше використовуються віруси і бактерії, рослини і тварини та їх клітини, отримані (або поліпшені) з використанням методів генетичної інженерії.

Послідовність генно-інженерних процесів наступна:

1. Отримання генів.
2. Введення гена в вектор і їх клонування.
3. Методи трансформації тваринних і рослинних клітин.
4. Скринінг - відбір бактерій або клітин, в яких вбудований ген.
5. Експресія (функціонування) генів у реципієнта.
6. Виловлювання генних продуктів з «брудної» суміші.

#### ***3.1. Методи отримання генів***

1. *Хімічний синтез*. Розшифрувавши послідовність амінокислот у білку і використовуючи генетичний код, визначають послідовність нуклеотидів ДНК на ділянці гена і здійснюють його синтез з нуклеотидів за допомогою ферменту ДНК-полімераза-1. Таким шляхом в 1969 р. Корані вперше синтезував ділянку молекули ДНК, що кодує аланінову т-РНК, а в 1977 р. Бойер синтезував ген соматостатину людини, а потім і ген інсуліну. У 1977 р. В. Гілбертом, а також Ф. Сенгером був запропонований метод *секвенування*, тобто розпізнавання послідовності нуклеотидів в фрагментах нуклеїнових кислот. Метод хімічного синтезу генів виявився трудомістким і малоефективним.

Потім з'явилися швидкі і прості методи синтезу порівняно довгих олігонуклеотидів з певною, заздалегідь заданою, послідовністю нуклеотидів. Тепер досить легко можна синтезувати послідовність до 100 нуклеотидів. Автоматизація цих процесів ще більше полегшує і прискорює синтез.

2. *Рестрикційний метод*, або отримання генів за допомогою специфічних ендонуклеаз – рестриктаз. Ці ферменти відкриті в 1953 р. у бактерій. За допомогою рестриктаз розщеплюють ДНК бактерій іншого штаму або клітини-господаря. До теперішнього часу з різних мікроорганізмів виділено понад тисячі різних рестриктаз; в генетичній інженерії використовується близько 200.

Рестриктази гідролізують ДНК строго по певним специфічним послідовностям, званим *сайтами рестрикції*. Кожна з рестриктаз розпізнає свій сайт рестрикції і розрізає ДНК або всередині сайту, або в безпосередній близькості від нього. Позначення рестриктаз складається з початкових літер латинської назви виду бактерії, з якої виділено фермент, і додаткового позначення, оскільки з бактерій одного виду може бути виділено декілька різних рестриктаз: *Escherichia coli* - *Eco RI*, *Eco RV*; *Thermus aquaticus* - *TagI*.

З декількох типів рестриктаз в генній інженерії часто використовуються рестриктази двох типів, які дізнаються певну послідовність ДНК і гідролізують її всередині послідовності сайту рестрикції. Фрагменти ДНК, що мають однакові «липкі» кінці, можуть з'єднуватися один з одним за допомогою ДНК-лігази, при цьому сайт рестрикції відновлюється. Фрагменти з «липкими» кінцями найбільш зручні для створення рекомбінантних ДНК. Однак рестриктази не «вистригають» повністю ген і його потрібно або добудувати хімічним шляхом, або відщеплює зайві нуклеотидні послідовності.

3. *Ферментативний синтез* генів став можливий після відкриття ферменту зворотної транскриптази або ДНК-ревертази (Г. Темін, Мізутані, 1970), виділеної з онкогенних вірусів. Ревертази можуть синтезувати комплементарну ланцюг ДНК (к-ДНК) на РНК-матриці. Для початку реакції синтезу ДНК-ревертазой потрібний запал у вигляді невеликого дволанцюжкового відрізка. Цю функцію виконують короткі олігонуклеотиди з 18-20 тимінових залишків (полі-Т), які з'єднуються за принципом комплементарності з полі-А-послідовністю і-РНК. В результаті утворюється гібридна і-РНК - к-ДНК молекула, причому на кінці у неї буде синтезуватися

короткий відрізок дволанцюжкової ДНК – *шпилька*. Шпилька служить запалом для синтезу другого комплементарного ланцюга ДНК, що здійснюється вже ферментом ДНК-полімеразою (рис. 2).

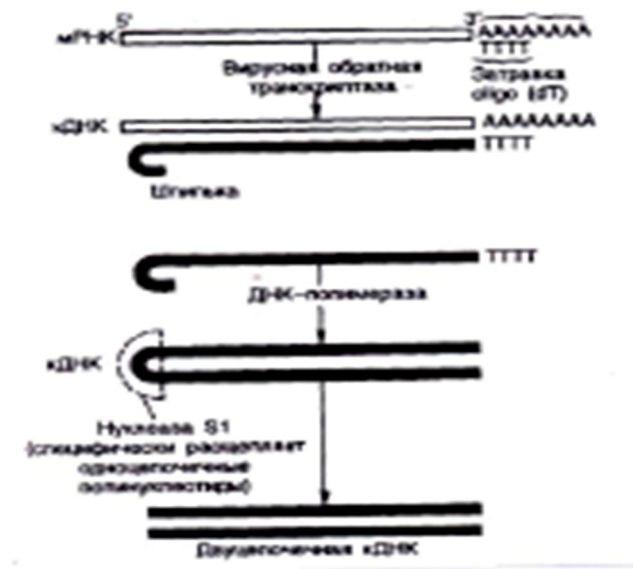


Рис. 2. Схема синтезу дволанцюгової к-ДНК на м-РНК (і-РНК)

Ланцюг і-РНК гідролізується РНК-азой, а шпилька (одноланцюгова ДНК) – ендонуклеазою S1. В результаті створюється дволанцюгова молекула к-ДНК, що відповідає структурному гену, з якого транскрибувалася вихідна молекула і-РНК. До отриманої ДНК приєднують «липкі» кінці для вбудовування в плазмідну і розмноження гена. Подібна схема була використана для одержання генів, що кодують інсулін, гормон росту, інтерферон, альбумін, імуноглобуліни та ін. білки, виробництво яких вже налагоджене в промислових масштабах.

Можливо і з'єднання фрагментів ДНК з «тупими» кінцями за рахунок дії ДНК-лігази, але ефективність такого «зшивання» на порядок нижче. Розроблено методи з'єднання фрагментів ДНК з «липкими» і «тупими» кінцями, що дозволяє створювати рекомбінантні молекули ДНК і в тих випадках, якщо навіть ці фрагменти були отримані з використанням різних рестриктаз.

Під *рекомбінантними ДНК* розуміють ДНК, утворені об'єднанням *in vitro* двох і більше фрагментів ДНК, виділених з різних біологічних джерел.

4. *Хіміко-ферментативний синтез* генів застосовується найбільш часто. Хімічним шляхом синтезують олігонуклеотиди: лінкер, адаптери, праймери, промотори, а гени синтезують ферментативним методом.

*Лінкер* (англ. «link» – з'єднувати) – короткий дволанцюговий олігонуклеотид, що містить сайти впізнавання для ряду рестриктаз.

*Адаптери* – це лінкери, що містять більше одного сайту впізнавання рестриктазою, він призначений для з'єднання фрагментів з несумісними кінцями.

*Праймери* – короткі одноланцюгові фрагменти, комплементарні початку або кінцю гена.

*Промотор* (80...10 нуклеотидів) – фрагмент ДНК, що розпізнається РНК-полімеразою.

### **3.2. Введення гена у вектор і клонування.**

Дуже важливою операцією в генній інженерії є введення в клітину і стабільна підтримка генетичної інформації, що міститься в рекомбінантних молекулах ДНК.

ДНК, що введена в бактеріальну клітину, гідролізується її ферментами до нуклеотидів. Якщо навіть ДНК «виживає» в клітині, то вона втрачається в процесі подвоєння. Для того, щоб рекомбінантна ДНК стала складовою частиною геному клітини, вона повинна або інтегруватися в хромосому і реплікуватися за її рахунок, або бути здатною до автономної реплікації. Це досягається за допомогою векторних молекул (*векторів*). Рекомбінантні ДНК привносять в організм реципієнта нові властивості: синтез амінокислот і білків, гормонів, ферментів, вітамінів та ін.

*Вектор* – молекула ДНК, здатна переносити в клітину чужорідну ДНК і забезпечувати там її розмноження (клонування) або рідше – включення в геном. До векторів пред'являються певні вимоги:

- кільцева молекула ДНК може реплікуватись в клітинах, якщо містить ДНК-реплікатор (огі-послідовність).

- вектор повинен містити унікальні сайти рестрикції для декількох рестриктаз,

- володіти певною ємністю і не викидати вбудований фрагмент;

- містити маркерний ген, що полегшує відбір клітин, несучих вектор,

- ген повинен експресуватися (створюється продукт, синтезований за інформацією введеного гена);

- містити специфічні для даної клітини промотори і термінатори («стоп»-кодони) транскрипції.

У свою чергу, РНК-транскрипт буде транслюватися, якщо РНК містять сигнали зв'язування з рибосомами і кодони ініціації і термінації трансляції.

Вбудовування чужорідного фрагмента ДНК в геном вектора здійснюється в два етапи: спочатку ДНК вектора розрізається за допомогою рестриктази, а потім у них вбудовується чужорідний фрагмент.

При відсутності комплементарних «липких» кінців у фрагментів, що зшиваються, їх добудовують за допомогою лінкерів.

В якості векторів використовують, як правило, плазміди, бактеріофаги, мобільні елементи, віруси тварин. В даний час створена велика кількість векторів, і за профілем використання їх можна підрозділити на кілька типів.

1. Вектори для клонування. Використовують для *ампліфікації* (збільшення кількості) шляхом реплікації фрагменту ДНК, що вбудований у такий вектор. Для цього найчастіше використовують бактеріальні плазміди і фаги. Для клонування великих фрагментів геному використовують вектори – штучні бактеріальні і дріжджові хромосоми (*BAC i YAC*).

2. Вектори експресії. Їх використовують для аналізу певних послідовностей генів і білкових продуктів, а також для наробітки певного білку. Існує значна кількість систем експресії, особливо для прокаріотичних організмів. Є також вектори для експресії генів у клітинах дріжджів, рослин і тварин. Вектори експресії для еукаріотів завжди містять промотор, здатний працювати у даному типі організму і сайт поліаденілірування (poly(A) – хвіст), який складається приблизно з 200 залишків аденозину. Наявність poly(A)- хвосту дозволяє відокремити матричну - мРНК від рибосомальної - рРНК і транспортної - тРНК, а також надає можливість приєднання олігомерів oligo(dT), які ініціюють синтез комплементарних ДНК-копій (кДНК) на підставі мРНК за допомогою рестриктази.

3. Вектори для трансформації. Використовують для введення чужорідного фрагменту ДНК у геном реципієнту. Як правило, такі вектори містять специфічні послідовності, які сприяють інтеграції у геном.

Сучасні векторні системи часто бувають поліфункціональні і з'єднують декілька функцій в одному векторі.

Більшість з них сконструйовано за допомогою методів генної інженерії. В якості векторів прокаріотів використовують плазмідні, бактеріофаги і їх комбінації. *Плазмідні* - це бактеріальні позакромосомні дволанцюгові кільцеві молекули ДНК з варіабельними молекулярними масами (1...3% генома бактеріальної клітини). Використовують плазмідні, здатні розмножуватися автономно, створюючи до 200 копій, а під дією інгібітору біосинтезу протеїнів (хлорамфеніколу) - до кількох тисяч. Використовують кон'югативні плазмідні (*F*) і некон'югативні (*R*, *Col*, *D*).

*R*-плазмідні містять гени стійкості до антибіотиків, *Col*-плазмідні забезпечують синтез різних коліцинів – високоспецифічних антибіотиків, що пригнічують життєдіяльність інших штамів і видів бактерій, *D*-плазмідні викликають біодеградацію. Бактеріальна клітина зазвичай може містити у своєму складі плазмідні тільки одного типу.

Вбудовування чужорідної ДНК у векторну плазмідну – досить рідка подія. Тільки одна з 10...30 отриманих після легування молекул буде рекомбінантною, тобто містити у своєму складі чужорідний фрагмент. Такі клітини відбирають на селективній середовищі з антибіотиками.

Плазмідні вектори мають невелику ємність, в них можна клонувати фрагменти довжиною не більше 7-8 тисяч нуклеотидних пар (т.н.п.), тобто вони придатні тільки для клонування генів прокаріотів. В генетичній інженерії часто використовують плазмідну *pBR 322*, яка містить реплікатор коліциногенної плазмідної *Col E1*, ген стійкості до антибіотиків - ампіциліну (*Amp<sup>r</sup>*) і тетрацикліну (*Tc<sup>r</sup>*).

Плазмідні вектори використовуються найчастіше для розмноження (клонування) гена. В даний час клонування генів успішно здійснюється за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) в спеціальних автоматах.

Фрагмент ДНК (ген) поміщають в прилад, додають праймери (олігонуклеотиди, комплементарні кінцям фрагмента ДНК), нуклеотиди,

ДНК-полімераза. Розчин нагрівають до 95°C, викликаючи денатурацію ДНК. Потім суміш охолоджують до 50...65°C, і праймери прикріплюються до кінців кожної вільної нитки ДНК. Знову підвищують температуру до 72°C, і ДНК-полімераза починає приєднувати нуклеотиди до праймерів і будувати копії ланцюжка ДНК. Змінюючи температуру, повторюють цикл і копіюють ДНК десятки і сотні разів. Після 20 циклів рахунок йде на мільйони.

Для прокариотів сконструйовані вектори на основі фага  $\lambda$ , в які можна включати фрагменти чужорідної ДНК до 22 т.н.п. З генома фага вирізують його власну ДНК, кінцеві фрагменти фага залишаються незмінними, так як вони необхідні для реплікації і упаковки ДНК в головку фага (*cos*-сайти).

Для клонування і перенесення більших фрагментів ДНК (30...45 т.н.п.) були сконструйовані штучні вектори - *косміди*, що містять *cos*-ділянку генома фага, за рахунок чого вони можуть упаковуватися в голову фага  $\lambda$  і спеціальні послідовності (*ori*-сайт), що дозволяють їм реплікуватися по типу плазмід.

Космідами трансформують клітини *E. coli*, де вони розмножуються як плазміди, і кожна з фагових часток викликає утворення колонії індивідуального бактеріального трансформанта.

Клонування фрагментів ДНК від 100 т.н.п. і більше здійснюється в спеціально сконструйованих векторах *BAC* і *VAC*. *BAC*-вектори отримані на основі *F*-плазмід бактерій і містять гени, відповідальні за реплікацію і копіюність цих плазмід у бактеріальних клітинах. Ємність *BAC*-векторів складає 100...300 т.н.п.

*VAC*-вектори являють собою штучну дріжджову мініхромосому, містять центроміру, теломери і точку початку реплікації. У такий вектор можна вбудувати фрагмент чужорідної ДНК більше 100 т.н.п., і така мініхромосома, що введена в клітини дріжджів, буде реплікуватися і вести себе аналогічно іншим дріжджовим хромосомам при мітозі.

Еукаріотичні віруси знайшли більш скромне застосування в якості векторів.

Практично використовується тільки онкогенний вірус *SV-40* і його похідні. Всі ці вектори - дефектні віруси, не здатні створювати повноцінні вірусні частки в клітині господаря.

У прокариот сумарну ДНК гідролізують рестриктазою і кожен з отриманих фрагментів вбудовують у вектор. Потім необхідно виявити специфічну лінію клітин (клон), яка містить необхідну послідовність, відділити її і охарактеризувати. Процес розділення геномної ДНК на елементи для клонування, введення цих елементів у клітини-хазяїв має назву створення геномної бібліотеки. Повна бібліотека за визначенням містить весь геном даного організму.

Один із способів створення бібліотеки ДНК полягає в обробці донорської ДНК рестриктазою в умовах, коли відбувається лише часткове розщеплення, таким чином, що створюються фрагменти різних розмірів. Частковий гідроліз дозволяє клонувати цілі гени, однак, оскільки сайти рестрикції розташовані не випадково, деякі фрагменти можуть виявитися

занадто великими для клонування. Для вирішення цієї проблеми використовують іншу додаткову рестриктазу.

Фрагменти, що отримані, з'єднують з ДНК векторів за допомогою лігази і, за можливістю, упаковують в підготовлені головки фагових часточок. Бібліотеку зберігають у вигляді фагового банку під хлороформом при  $t = -70^{\circ} \text{C}$ . Таким чином бібліотека здатна зберігатися десятки років. Ампліфікацію бібліотеки (розмноження) отриманих геномних клонів, а також розшук необхідного клону проводять при зараженні фагової бібліотекою бактеріальні клітини, які потім висівають на чашках Петрі з агаризованим середовищем. Повний гаплоїдний набір клітин ссавців містить біля  $3 \cdot 10^9$  пар основ. При ємності вектору 15 т.п.н. бібліотека може містити біля 1 млн. фагових часточок. Перевірка мільйона фагових бляшок дозволяє перевірити весь геном на наявність необхідного гена. Так можна ідентифікувати певно ті фагові часточки, які містять послідовність дослідженого гена, розмножити ДНК цієї послідовності і проводити з нею подальші маніпуляції.

### **3.3. Методи трансформації клітин рослин і тварин**

*Трансформація – це процес переносу генетичної інформації, при якому ДНК, що виділена з клітини-донору, потрапляє у клітину-реципієнту.* Трансформація може відбуватися як хромосомною, так і плазмідною ДНК. Процес, при якому в бактеріальні клітини потрапляє виділена ДНК фага і зумовлює утворення в них зрілих фагових часточок, має назву *трансфекція*.

Мікроорганізми не завжди здатні до трансформації. Трансформуються лише *компетентні* клітини, які здатні адсорбувати і поглинати ДНК. У багатьох бактерій компетентність виникає лише на певному етапі росту культури – в стадії компетентності.

Один з найважливіших етапів генетичної трансформації – це перенесення молекул ДНК через оболонку клітини. На стан компетентності клітин впливають різні фактори зовнішнього середовища. До них належать температура, рН, іони важких металів, осмотичний тиск та ін..

Компетентні клітини відрізняються від некомпетентних зміною властивостей клітинної оболонки. В них знижений поверхневий заряд, підвищена чутливість до осмотичного шоку. Мікроорганізми, в яких відсутня природна компетентність також можуть бути трансформовані. Для цього клітини оброблюють тім, чи іншим способом, для ініціації в них здатності до поглинання ДНК. Найбільш поширений метод індукції компетентності у клітин *E.coli* – це обробка крижаним розчином  $\text{CaCl}_2$ . Використовують також спосіб глибокого заморожування з наступним відтаюванням клітин, що забезпечує збільшення проникності для фагової, плазмідної і хромосомної ДНК. Метод має назву *кріотрансформація*. Для підвищення проникності клітинних мембран на них впливають електричним струмом. Ця процедура називається *електропорація*. Умови її проведення різні для різних видів бактерій. При роботі з *E.coli* клітинну суспензію і ДНК розміщують в посудині з зануреними електродами і подають одиничний імпульс струму.



Після цього ефективність трансформації покращується до  $10^9$  для коротких плазмід (приблизно 3 т.п.н.) і до  $10^6$  для великих (приблизно 135 т.п.н.).

*Трансдукція – це переніс генетичної інформації від клітини донора до клітини-реципієнта за допомогою фагу.*

Однак, нема потреби очікувати коли ДНК фага буде захоплювати фрагмент чужорідної ДНК для її внесення в клітину-реципієнта, якщо можливо штучно створити рекомбінантну ДНК фага і використовувати такий фаг в якості вектора (наприклад, для клонування великих фрагментів ДНК). Тем більш, що фаговий вектор вводить рекомбінантну ДНК при зараженні клітини, тобто *методом інфекції*, що значно ефективніше ніж шляхом трансформації або трансдукції.

В даний час розроблені способи введення генів у ембріональні клітини ссавців, мух і деяких рослин з метою зміни таких властивостей організму, як швидкість росту, стійкість до захворювань і зовнішніх впливів.

Мікроін'єкцію клонованих генів проводять в один або обидва пронуклеуси щойно заплідненої яйцеклітини. Потім яйцеклітину негайно імплантують в яйцепровід матери-реципієнта або дають можливість розвиватися в культурі до стадії бластоцисти, після чого імплантують в матку. Таким образом були ін'єктовані гени інтерферону і інсуліну людини, ген глобіну кролика, ген тімідінкіназного вірусу герпесу і к-ДНК вірусу лейкемії мишей. Виживає зазвичай від 10 до 30% яйцеклітин, а частка мишей, народжених з трансформованих яйцеклітин, становить до 40%. Рівень експресії чужорідного гена залежить від місця інтеграції ДНК з хромосомами, від диференціювання тканин.

### **3.4. Скринінг**

Наступний після створення бібліотеки етап - це розшук клону (клонів), які містять необхідну послідовність ДНК. Для цього використовують три методи: гібридизацію з міченим ДНК-зондом з наступним радіоавтографічним аналізом; імунологічний *скринінг* (ідентифікація одиничного об'єкту шляхом перевірки чисельних об'єктів); скринінг за активністю білку, який кодується геном – мішенню.

*Скринінг за допомогою гібридизації.* Необхідну нуклеотидну послідовність у зразку ДНК можна виявити за допомогою ДНК-зонду, який з'єднується лише з послідовністю, що розшукується.

ДНК-гібридизація полягає в тому, що ДНК-мішень піддають денатурації (роз'єднанню ланцюгів ДНК під дією теплової обробки або впливу лугів) і одно ланцюгові молекули міцно приєднують до твердої підложки (нітроцелюлозного або нейлонового фільтру). Потім фільтр інкубують з одно ланцюговим ДНК-зондом, який помічений радіоізотопами або іншими мітками. Якщо нуклеотидні послідовності зонду і ДНК-мішені комплементарні, то відбувається їх спарування (тобто гібридизація). Гібридні молекули можна виявити радіографічним або іншими методами. Для гібридизації необхідно, щоб на ділянці довжиною 50 нуклеотидів співпадало більш 80% з них.

Мічені ДНК-зонди для скринінгу бібліотеки можна отримати як найменш двома способами. По-перш, можна використовувати клоновану ДНК близькоспорідненого організму (гетеролітичний зонд). По друге, зонд можна отримати методом хімічного синтезу, заснованого на відомій амінокислотній послідовності білкового продукту гену, який розшукується.

*Імунологічний скринінг.* При відсутності ДНК-зонду можна використовувати інші методи, наприклад, якщо клонований ген здатний до експресії (реалізації генетичної інформації), то його продукт – весь білок, або його частину – можна виявити імунологічними методами. Всі клітинні лінії (клони) бібліотеки висівають на чашки з поживним середовищем. Колонії, що виростили, переносять на фільтр, клітини лізують (руйнують), а білки, що звільнилися, фіксують на фільтрі. Потім на фільтр наносять перші антитіла, які специфічно зв'язуються з певним білком (антигеном), усі антитіла, що не зв'язалися віддаляють, а фільтр поміщають у розчин других антитіл, специфічних до перших антитіл. Часто використовують кон'югати других антитіл з ферментом, під впливом якого відбувається гідроліз субстрату з утворенням забарвленої речовини в тому місті, де здійснюється реакція.

*Скринінг за активністю білку.* В тому випадку, коли ген, що розшукується, кодує фермент, який не синтезується клітиною-хазяїном, використовують метод ідентифікації на чашках. Для виявлення клонів, які містять цей ген, клони *E.coli*, що складають геномну бібліотеку даного організму (клітини-хазяїна), висівають на середовищі із специфічним субстратом. Клітини, які здатні утилізувати цей субстрат, після фарбування набувають певного забарвлення.

Якщо ген, що розшукується, кодує продукт, без якого клітина-хазяїна не здатна рости на мінімальному середовищі, то бібліотеку можна створювати методом *трансформації мутантних клітин*. Клонів, що не містять цього гену будуть гинути, а на мінімальному поживному середовищі залишаться лише клітини, до складу яких увійшов необхідний ген.

### **Завдання 1**

Генна інженерія з'явилася завдяки роботам багатьох дослідників у різних галузях біохімії та молекулярної генетики. Генна інженерія – сукупність методів, що дозволяють в пробірці переносити генетичну інформацію з одного організму в інший. Перенесення генів дає можливість долати міжвидові бар'єри і передавати окремі спадкові ознаки одних організмів іншим. Ціль – отримання клітин, здатних в промислових масштабах напрацьовувати деякі білки.

1. Що представляють із себе плазміди, їх роль в генній інженерії.
2. Для чого бактеріальні клітини виробляють рестриктази?
3. Сутність процесу клонування для отримання рекомбінантної ДНК із застосуванням плазмід та рестриктаз.
4. Основні продуценти, що використовують в побудові рекомбінантних білків.

## 5. Поняття вектора в генній інженерії.

### **Питання для самоперевірки**

1. Які Вам відомі методи отримання генів?
2. Хімічний синтез гена. Хто і коли здійснив його вперше? Які відомі Вам гени синтезовані хімічно?
3. Рестрикційні нуклеази (рестриктази). Які організми їх містять і з якою метою?
4. Що таке «липкі кінці» і «тупі кінці» ДНК?
5. Метод «вистригання» генів, його недоліки.
6. Як здійснюється ферментативний синтез ДНК?
7. Хіміко-ферментативний синтез генів.
8. Охарактеризуйте олігонуклеотиди: лінкер, адаптери, праймери і промотори.
9. Які ферменти використовуються в генній інженерії?
10. У чому суть методу полімеразної ланцюгової реакції? Хто і коли її винайшов?
11. Що таке вектор? Що використовується в якості вектора?
12. Що таке маркерний ген (ген-репортер)?
13. Яким чином клонують гени?
14. Як отримують химерні вектори-косміди?
15. Які вектори використовують для переносу генів бактерій?
16. Навіщо потрібен *ori*-сайт в *R*-плазміді?
17. Як створені *BAC* і *VAC* вектори і яка їхня нуклеотидна ємність?
18. Як здійснюється перенесення генів у клітини-реципієнти?
19. Якими прийомами підвищують проникність плазмолемі клітини-реципієнта?
20. Які існують методи трансформації рослинних клітин?
21. Якими методами визначають що ген донора вбудувався в клітини реципієнта?
22. Як здійснюється скринінг (відбір) трансформованих клітин або бактерій?
23. Які специфічні фрагменти повинен містити вектор, щоб вбудувати ген і він був здатним до експресії в реципієнтах (бактеріях, клітинах, організмах)?
24. Які вектори частіше використовуються для клонування генів тварин і способи їх введення в клітини тварин?

## **4. Сировинна база біотехнології**

Завжди при створенні нових технологій спочатку слід провести розрахунок параметрів середовища, конструкції реактора і режиму його роботи, тобто дотримуватися наукової обґрунтованості біотехнологічних процесів.

*Джерела сировини для біосинтезу продуктів.* Серед безлічі компонентів поживного середовища основним вважається той, який служить мікроорганізмам джерелом вуглецю та енергії. Такі компоненти називають *субстратом*, а всі інші - допоміжними речовинами. Особливу значимість мають субстрати для біосинтезу мікробного білка.

Поживними середовищами називають суміші речовин, на яких вирощують мікроорганізми в лабораторних і промислових умовах. Склад поживного середовища і його фізико-хімічні характеристики повинні відповідати фізіологічним потребам вирощуваної культури мікроорганізмів.

#### **4.1. Характеристика компонентів поживних середовищ**

Найбільше біогенне значення для будь-якого живого організму має вуглець. Він входить до складу всіх органічних молекул, що утворюються в клітині і на його частку припадає в середньому 50% клітинної речовини. З цієї причини джерела вуглецю займають основне місце серед компонентів поживних середовищ.

У мікробіологічній промисловості широко використовуються чисті вуглеводи, а також природні і технічні продукти, багаті вуглеводами. До них відносяться глюкоза, сахароза, лактоза, крохмаль, кукурудзяна мука, меляса, зелена патока.

Азотне живлення мікроорганізмів за своїм значенням наближається до вуглецевого, хоча поступається за обсягом. Азот входить до складу клітинних компонентів, які забезпечують життєздатність організмів. Джерелами азотного живлення для продуцентів БАР служать різні азотовмісні речовини неорганічного й органічного походження. Джерелами мінерального азоту найчастіше є солі амонію та азотної кислоти. В якості органічних джерел азоту в промисловості найбільш широко застосовуються кукурудзяний екстракт та соєве борошно.

*Технічна глюкоза* містить не менше 99,5% редуруючих речовин (в перерахунку на сухий залишок) і фактично являє собою чистий вуглевод.

*Сахароза* – буряковий чи тростинний цукор. Технічна сахароза, що використовується в промисловості, містить не менше 99,75% сахарози, яка являє собою дисахарид, що складається з глюкози і фруктози.

*Крохмаль* на 96...97% складається з полісахаридів, крім того, в ньому присутні мінеральні речовини і жирні кислоти. Полісахариди крохмалю представлені двома типами – амілози (10...20%) і амілопектину (80...90%).

Ці речовини сильно розрізняються за своїми фізичними та хімічними властивостями. Так, наприклад, від йоду амілоза забарвлюється у синій колір, а амілопектин – у червоно-фіолетовий. Вони розрізняються також за розчинністю: амілоза легко розчинюється у теплій воді та дає розчини з відносно невисокою в'язкістю, у той час, як амілопектин розчинюється у воді лише при нагріванні та під високим тиском та дає дуже в'язкі розчини.

Крохмаль отримують з картоплі або кукурудзи. Крохмаль різного походження значно розрізняється за розгалуженістю ланцюгів, ступеня полімеризації та деяким іншим властивостям. Під дією амілолітичних ферментів крохмаль розщеплюється до глюкози, яка в подальшому

утилізується продуцентом по гліколітичному або пентозофосфатному шляхах.

*Кукурудзяне борошно* отримують при розмелюванні зерен кукурудзи. У промислових середовищах кукурудзяна мука часто замінює крохмаль, будучи більш дешевою сировиною.

Кукурудзяна мука містить: крохмаль – 67...70%; інші вуглеводи (клітковина, пентозани, розчинні вуглеводи) – 10%; білки – 12%; зола – 0,9%.

Серед зольних елементів в найбільшій кількості присутні іони фосфору, калію, магнію. Склад кукурудзяного борошна може коливатися в значних межах залежно від сорту кукурудзи, умов її вирощування та зберігання.

*Кукурудзяний екстракт* – це відходи виробництва крохмалю з кукурудзи. За зовнішнім виглядом це густа рідина темно-коричневого кольору у вигляді пластівчастої суспензії або майже однорідна (табл.1)

Таблиця 1

### Склад кукурудзяного екстракту

Речовина	Вміст, %
Азот загальний	6,0-8,0
Азот амінний	1,0-3,0
Азот білковий	0,8-2,0
Вуглеводи	0,0-10,0
Органічні кислоти	15,0-20,0
Зола	не більше 24,0

Основними елементами золи є фосфор, калій, магній. Кукурудзяний екстракт також містить вітаміни групи В, деякі ростові речовини, біостимулятори.

*Соєве борошно* отримують при розмелюванні соєвих бобів, а також соєвої макухи і шроту, що утворюються після вилучення соєвої олії. Соєве борошно підрозділяється на незнежирене, полуннежирене і знежирене. Крім того, соєве борошно буває дезодорованим (оброблене паром) і недезодорованим. Обробка парою дозволяє збільшити термін зберігання, і дезодороване борошно може зберігатися протягом року, а не дезодороване – 1,5-3 місяці.

З основних компонентів соєвого борошна особливе значення для процесів ферментації мають азотовмісні речовини. Азот соєвого борошна знаходиться головним чином у складі білків, на частку яких припадає 40,5%. Крім білків в соєвій борошні містяться вуглеводи – до 25%; органічні кислоти – 1,5%; зола – 4,5...6,5%.

У незнежиреному борошні міститься 19,5% жиру. До складу золи входять іони калію, фосфору, магнію, кальцію, а також ряд мікроелементів.

Мінеральні елементи в клітинах мікроорганізмів необхідні для регулювання осмотичного тиску, окисно-відновних умов і величини рН.

Одна з основних функцій мінеральних елементів – участь у ферментативному каталізі. В даний час дія четвертої частини всіх ферментів у клітині пов'язано з металами. Мінеральний склад поживного середовища формує розподіл електричних зарядів на поверхні клітини. Зазвичай клітини мікроорганізмів мають негативний заряд. При додаванні в середовище електролітів він знижується і тим сильніше, чим вище валентність протиіона, що додається. Зміна електричного потенціалу клітин може змінити їх фізіологічну діяльність, впливати на селективність клітинної мембрани, викликати флокуляцію або флоотацію клітин.

*Лузга соняшника* – відхід при виробництві масла з насіння соняшнику. Лушпиння містить 1,4% багатого вуглецем пігменту фітомелану, 23,6...28,0% пентозанів, 52...66% клітковини, 24,8...29,6% лігніну, 31,0...42,4% целюлози.

Для вирощування мікроорганізмів використовують пентозо-гексозні гідролізати лузги після видалення з них фурфуролу.

*Пшеничні висівки* – вторинна сировина при виробництві борошна із зерна пшениці. Відбір висівок здійснюється при складних (сортових) повторювальних помелах. Їх вихід складає 13-27% і визначається технологічними прийомами помелу зерна і просіювання борошна. Висівки містять крохмалю – 20,0-22,8%, клітковини – 22,05%, пентозанів – 22,5%, сахарози – 5,49%, ліпідів – 4,77%, азоту загального – 3,25%, золи – 5,49%. Мінеральний склад в мг/100г сухої речовини: калію – 1197,5; кальцію – 115,0; магнію – 475,8; заліза – 17,8; загального фосфору (нефітінового – 139,9; фітінового – 854,4...85,9%); Ca:Mg – 0,242.

*Продукти переробки зерна.* Крупи являють собою цілі або роздроблені частини зерен злакових, гречки і насіння бобових, з яких повністю або частково вилучені оболонки. *Гречану крупу* виробляють 2-х видів: ядриця і січка (звичайна і швидкорозварювана). Січка – це роздроблені ядра гречки, отримують її як побічний продукт при виготовленні ядриці.

З *рису* виробляють крупи таких найменувань: рис шліфований, полірований і подрібнений шліфований. Останній отримують як побічний продукт при виробництві шліфованого і полірованого. Він являє собою колені ядра рису розміром менше 2/3 цілого ядра.

Сорт крупи – *пшоно*, виробляють з проса. Залежно від показників якості, передбачених стандартом, пшоно поділяють на три сорти: вищий, перший і другий.

Для вирощування мікроорганізмів використовують гідролізати деревних відходів.

*Солод* – продукт штучного пророщування зерен злаків, що містить фермент. Солод випускають у вигляді цілих зерен і у вигляді порошку (розмелені зерна), ферментований – з низькою активністю ферментів, і неферментований – з високою активністю. Останній використовується у виробництві для оцукрювання крохмальвмістної сировини, так як містить в активному стані амілолітичні ферменти. Відповідно до державного стандарту масова частка вологи у солоді не повинна перевищувати 10%.

#### **4.2. Вимоги, що надаються до поживних середовищ**

Поживні середовища за своїм призначенням поділяються на діагностичні, елективні та виробничі. *Діагностичні* середовища призначені в основному для виявлення, виділення та ідентифікації патогенних мікроорганізмів за морфологічними і фізіологічними ознаками. *Елективні* середовища забезпечують переважний розвиток одного виду або групи споріднених мікроорганізмів і непридатні або менш придатні для інших. *Виробничі* поживні середовища, в свою чергу, підрозділяють на *посівні та основні* ферментаційні. Перші призначені для приготування посівного матеріалу, другі для виробництва продукції.

Середовища повинні містити окремі інгредієнти в певних співвідношеннях, пропорційних потребам в них даної культури мікроорганізмів. Специфічність поживних середовищ визначається набором з'єднань, що поставляють клітинам вуглець і азот. У багатьох випадках сполуки, необхідні для існування одних мікроорганізмів, виявляються абсолютно непридатними для інших, і тому не може бути універсального поживного середовища для всіх мікроорганізмів. Менш різноманітні організми за потребами в мінеральних речовинах, тому мінеральний фон середовищ для багатьох мікроорганізмів буває дуже близьким за складом.

Поживні середовища за складом поділяють на природні, штучні і синтетичні. *Природні, або натуральні* середовища являють собою натуральні продукти тваринного або рослинного походження зі складним і невизначеним складом (солодове сусло, молоко, яйця, овочі і т.п.). Їх використовують для підтримки культур мікроорганізмів та накопичення біомаси. *Синтетичні* середовища готуються з певних хімічно чистих сполук у точно зазначених концентраціях. Ці середовища, на відміну від натуральних, мають певний склад і використовуються для вивчення обміну речовин у мікроорганізмів і складання рецептур поживних середовищ. *Штучні, або напівсинтетичні* середовища готують на основі натуральних продуктів складного складу (дріжджовий екстракт, солодове сусло, гідролізати рослинних матеріалів тощо) з додаванням органічних і неорганічних сполук відомого складу (вуглеводи, фосфати, нітрати та ін.) Такі середовища широко застосовуються в промисловій біотехнології для виробництва великотоннажних продуктів.

Для поживних середовищ крім складу дуже важливі і такі фізико-хімічні фактори, як рН, осмотичний тиск або активність води, окислювально-відновний потенціал, парціальний тиск кисню та ін.. Кислотність середовища є важливим фактором, значення якого для різних мікроорганізмів може істотно відрізнятись (рН від 3,5 до 9,0). Більшість мікроорганізмів розвивається в нейтральному або слабколужному середовищі, тоді як дріжджі зазвичай розвиваються в більш кислому середовищі.

Активність води (0,6...0,998) визначає межі життя мікроорганізмів і враховується при складанні рідких середовищ і визначенні вологості твердих поживних середовищ. При тривалому культивуванні мікроорганізмів може відбуватися значне концентрування рідких середовищ внаслідок

випаровування води, що міститься в них, що виявиться несприятливим для росту мікроорганізмів. Тому в процесі тривалого культивування необхідно регулярно доводити обсяг культуральної рідини до початкового об'єму стерильною водою.

#### **4.3. Стерилізація поживних середовищ**

При приготуванні поживних середовищ необхідно враховувати можливість їх інфікування сторонніми мікроорганізмами. Джерелом інфекції можуть бути навколишнє повітря, вода, компоненти поживного середовища, забруднена посуд та обладнання. Тому вживають заходів для знищення живих мікроорганізмів і запобігання їх попаданню під час зберігання та проведення досліджень у поживне середовище. Обробка, при якій досягається повне звільнення від живих мікроорганізмів, у тому числі і від їх спорових форм, називається *стерилізацією*.

Поживні середовища знезаражують з використанням різних методів (табл. 4). Найбільш поширені *термічні* методи, при яких поживні середовища нагріваються і витримуються при певній температурі протягом часу, достатнього для стерилізації. Зазвичай поживні середовища стерилізують обробкою насиченою водяною парою під тиском в автоклавах – судинах, призначених для роботи під тиском. Поживні середовища перед стерилізацією паром під тиском (автоклавуванням) розливають у чистий посуд не більше ніж на половину її місткості і закривають ватно-марлевими пробками і паперовими ковпачками. Ємності з поживним середовищем поміщають в автоклав, в який подається водяна пара. Після видалення з автоклава повітря і заповнення його паром закривають паровий клапан і контролюють температуру і тиск в автоклаві. Тривалість обробки залежить від температури і об'єму стерилізується середовища.

Невеликі об'єми рідини (приблизно до 3000 см<sup>3</sup>) можна простерилізувати при 115...117°C (0,7 МПа) протягом 30 хв., для стерилізації великих обсягів потрібна більш тривала обробка.

Деякі компоненти поживного середовища можуть не витримати тривалу обробку при підвищених температурах (понад 100°C), тому доводиться знижувати температуру стерилізації. Однак при температурах 100°C і нижче багато спорових форм мікроорганізмів залишаються життєздатними і для їх знищення використовують дробову стерилізацію. Сутність *дробової стерилізації* полягає в тому, що матеріал, який стерилізується, нагрівають і витримують за певної температури протягом часу, достатнього для знищення вегетативних клітин, потім охолоджують і витримують при 18...37°C. Спорові форми при цій температурі проростають і перетворюються у вегетативні, які при повторних прогревах загинуть. Дробову стерилізацію при 100°C проводять текучою паром, використовуючи автоклав з відкритим паровипускним клапаном. Дробова стерилізація при 60... 80°C називається *тиндалізація*.

Недоліком дробової стерилізації є можливість утворення спорових форм вегетативними клітинами, які утворились з спор, що проросли. Слід зазначити, що цей недолік можна використовувати для виділення



спороутворюючих чистих культур в методі званому *пастеризацією*. Одноразовий нагрів при 60...80°C вбиває безспоріві мікроорганізми. Пастеризацію проводять при 60...75°C протягом 15...30 хв. або при 80°C – 10...15 хв. Іноді нагрівають до 90°C і відразу ж охолоджують. Пастеризацію широко застосовують в промисловості при переробці харчових продуктів.

Таблиця 3

### Способи та режими стерилізації

№	Матеріал, що стерилізується	Спосіб стерилізації	Режим стерилізації	Примітка
1.	<p>Поживні середовища: - рідкі та агарізовані, що не містять компонентів, що розкладаються при 120°C</p> <p>- рідкі та агарізовані, з цукрами та іншими речовинами, що не витримують нагрівання 120°C</p> <p>- сусло-агар</p>	Автоклавування	120°C (0,1 МПа) 20 хв.	У колбах, пробірках, флаконах та ін., що закрити ватними пробками із паперовими ковпачками
		Автоклавування	110°C (0,05 МПа) 15...30 хв.	Теж саме
		Дробова стерилізація	Текучий пар (100°C) 30...60 хв. 3 дня поряд	- " -
		Автоклавування	115°C (0,07 МПа) 25...40 хв.	- " -
2.	Колби, хімічні стакани, флакони, пробірки	Сухій жар	160...170°C 90 хв.	Теж саме
		Автоклавування	120°C (0,1 МПа) 20 хв.	- " -
3.	Чашкі Петрі, піпетки, шпателі	Сухій жар	160...170°C 90 хв.	Загорнуті у папір
		Автоклавування	120°C (0,1 МПа) 30 хв.	Теж саме
4.	Держателі бактеріальних фільтрів, гумові пробки та шланги, фільтри Зейтца	Автоклавування	120°C (0,1 МПа) 20 хв.	Загорнуті у папір
5.	Мембранні фільтри	Автоклавування	110°C (0,05 МПа) 15 хв.	У посуді з дистильованою водою
		кип'ятіння	30 хв. (2...3 рази змінюють воду)	

Для стерилізації поживного середовища, що містить термолабільні компоненти, можна використовувати "холодну" стерилізацію ультрафільтрацією. При стерилізації ультрафільтрацією рідка середа продавлюється (0,1...1,0 МПа) через мембранний фільтр, що затримує мікроорганізми і спори. Мембранні фільтри являють собою пористі матеріали – мембрани з розмірами пор 0,01...0,1 мкм. Стерилізують їх у дистильованій воді автоклавуванням або тривалим кип'ятінням.

#### **Питання для самоперевірки**

1. Які компоненти поживного середовища називають «субстратом»?
2. Які вуглеводи використовуються у мікробіологічній промисловості?
3. Які відходи виробництв використовують у мікробіологічній промисловості?
4. Як поділяються поживні середовища за своїм призначенням?
5. Як поділяють поживні середовища за складом?
6. Якими методами знезаражують поживні середовища?
7. Які існують методи термічної стерилізації?
8. В чому полягає сутність методу «дробової стерилізації»?
9. Як стерилізують поживні середовища, що містять термолабільні компоненти?
10. Які види захисту біооб'єкту, середовища його проживання і кінцевого продукту існують в біотехнологічних виробництвах?
11. Як поділяють приміщення за ступенем забрудненості повітря?

### **5. Типові технологічні прийоми і апаратне оснащення**

Найважливішим завданням будь-якого біотехнологічного процесу є розробка та оптимізація науково-обґрунтованої технології та апаратури для нього.

У загальному вигляді система біотехнологічного виробництва продуктів мікробного синтезу представлена на схемі (рис.4).

Основні етапи біотехнологічного процесу

Початкова обробка: обробка сировини для використання її мікроорганізмами в якості джерела поживних речовин.

1. Ферментація і біотрансформація: ріст мікроорганізмів у великому біореакторі (ферментація) з наступним утворенням необхідного метаболіту, наприклад, антибіотика, амінокислоти, білку (біотрансформація).

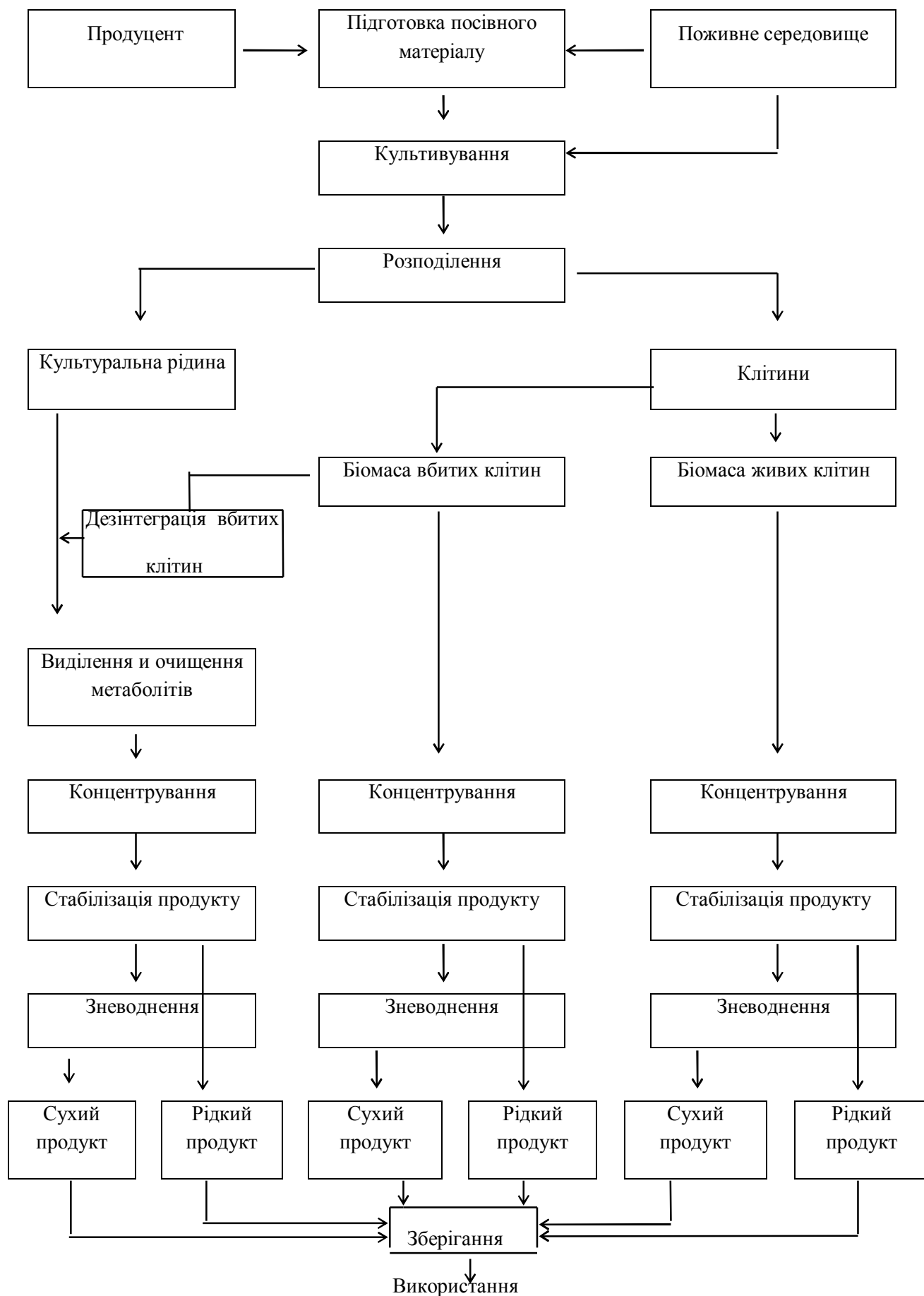
2. Кінцева обробка: очистка необхідної речовини від компонентів культурального середовища або клітинної маси.

Метою біотехнологічних досліджень є максимальне підвищення ефективності кожного з цих етапів.

#### **5.1. Апарати та процеси в біотехнології**

Біотехнологічні виробництва повинні мати хорошу технічну оснащеність. При цьому слід добиватися, щоб біореактори можна було б використовувати для культивування різних біооб'єктів (бактерій, грибів, клітин рослин і ссавців).

Сучасний ферментатор повинен володіти системами:



**Рис.4. Принципова біотехнологічна схема виробництва продуктів мікробного синтезу**

- Ефективного перемішування і гомогенізації живильного середовища;
- Забезпечення доступу та швидкої дифузії газоподібних агентів;
- Теплообміну;
- Піногасіння;
- Стерилізації середовищ, апаратури і повітря;
- Контролю і регулювання процесу.

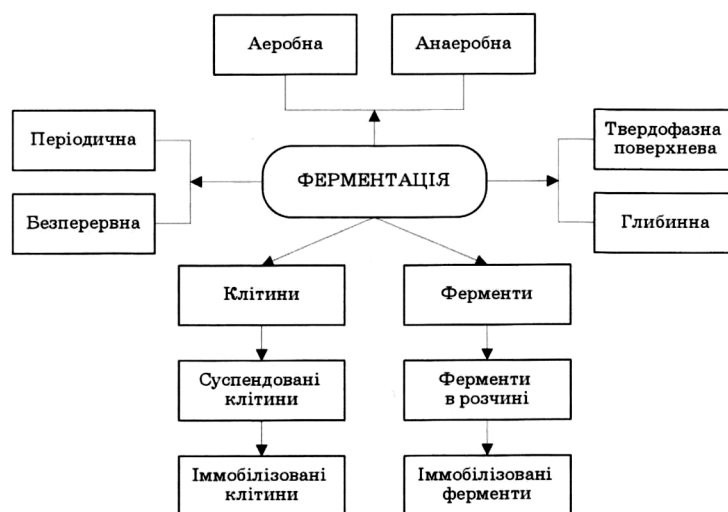
Розрізняють такі типи біореакторів:

- За способом перемішування та аерації. Сюди відносять апарати з механічним, пневматичним і циркуляційним перемішуванням;
- За розміром і цільовим призначенням: лабораторні, пілотні, промислові;
- За режимом роботи: періодичні і безперервно діючі;
- За умовами культивування: аеробні та анаеробні, мезофільні і термофільні, для глибинного та поверхневого культивування, апарати для рідких поживних середовищ, твердофазні і газофазні.

Найважливішим етапом кожного типу біотехнологічного процесу є культивування (*ферментація*) різних біооб'єктів.

В промисловій біотехнології виділяють два типи процесів. Перший спрямований на одержання білка одноклітинних шляхом накопичення їх біомаси і її застосування після висушування у вигляді готового продукту. Другий тип виробництв спрямований на отримання цінних речовин, що утворюються в ході росту і розвитку культури. Цей тип виробництва використовують для отримання амінокислот, ферментів, антибіотиків, токсинів, бактеріальних добрив і препаратів для захисту сільськогосподарських рослин. За аналогічним типом отримують лікарські засоби і вітаміни. Останнім часом виникли виробництва, де цільовим продуктом виявляється сполука, що знаходиться всередині клітин (інтерферони, гормон росту), змінених генно-інженерним шляхом.

Розрізняють такі види аеробної і анаеробної ферментації: глибинна, поверхнева, періодична, безперервна, з іммобілізованим продуцентом і ін. (рис. 5)

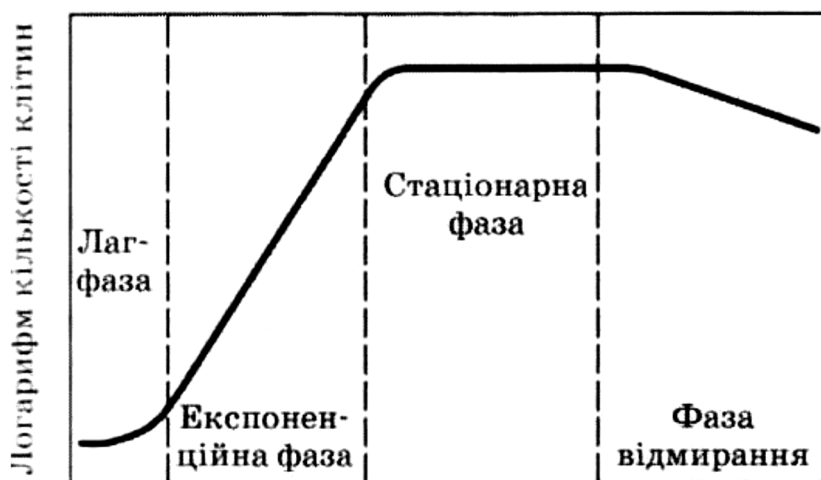


**Рис. 5. Варіанти ферментації** (за Пиріг Т. П., Ігнатова О.А., 2009)

Культивування біологічних об'єктів може здійснюватися в періодичному і проточному режимах, напівбезперервному з підживленням субстратом. В ході періодичної ферментації вирощувана культура проходить ряд послідовних стадій (рис. 6):

- лаг-фазу,
- експоненційну,
- уповільнення зростання,
- стаціонарну
- відмирання.

При цьому відбуваються суттєві зміни фізіологічного стану біооб'єкту, а також ряду параметрів середовища. *Цільові продукти утворюються в експоненційній* (первинні метаболіти – ферменти, амінокислоти, вітаміни) і *стаціонарній* (вторинні метаболіти – антибіотики) фазах, тому в залежності від цілей біотехнологічного процесу в сучасних промислових процесах застосовують принцип диференційованих режимів культивування. В результаті цього створюються умови для максимальної продукції того чи іншого цільового продукту.



**Рис. 6.** Крива росту клітинної популяції. (Фази росту: I – лаг-фаза; II – експоненційна; III – сповільненого росту; IV–стаціонарна; V – відмирання; VI – виживання)

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

*Експоненційна фаза.* Ця фаза характеризується максимальною швидкістю поділу клітин. У цій фазі процеси росту проходять збалансовано (тобто подвоєння біомаси супроводжується подвоєнням кількості білка, ДНК, РНК та ін.). Можна сказати, що культура в експоненційній фазі складається із «стандартних» клітин. Але треба мати на увазі, що і в експоненційній фазі клітини періодичної культури зазнають змін, оскільки постійно змінюється середовище — зменшується концентрація субстрату, збільшується густина клітинної суспензії, накопичуються продукти обміну. У зв'язку з тим що в цій фазі швидкість поділу відносно постійна, вона найзручніша для визначення швидкості поділу та швидкості росту.

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

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

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

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

*Основні фактори середовища,* що визначають ріст і біосинтетичну активність продуцентів: склад і концентрація поживних речовин, концентрація продуктів та інгібіторів, температура, осмотичний тиск, вміст розчиненого кисню, діоксиду вуглецю, перемішування середовища, в'язкість середовища та ін.

### **5.1.1. Піноутворення та піногасіння**

У біотехнологічних процесах серйозною проблемою є спінювання культурального середовища. Особливо важливу роль процеси піноутворення і піногасіння грають при аеробному глибинному культивуванні мікроорганізмів.

*Піноутворення* викликають ПАР (поверхнево-активні речовини) середовища - білки і продукти розпаду ліпідів - мила. У пінному шарі або кисневому коктейлі, з одного боку, добре ростуть аеробні мікроорганізми, особливо дріжджі, посилена масопередача кисню в системі повітря/вода, знижуються витрати на перемішування і аерацію. З іншого боку, піноутворення скорочує об'єм реактора, виникає загроза зараження сторонньої мікрофлорою. Тому складовою частиною біотехнологічних процесів є система *піногасіння*.

Розрізняють механічні, акустичні, хімічні піногасники та їх комбінації. Хімічні піногасники діляться на жирові і синтетичні. До жирових відносять

соєву, рапсову, кокосову, соняшникову, гірчичну олію, сало, риб'ячий жир та ін. Жири виявляють здатність до піногасіння у відносно високих концентраціях (0,2-1% від об'єму середовища і вище). Вони добре гасять піну і є цінним субстратом для мікроорганізмів. Однак продукти їх утилізації культурою сприяють піноутворенню. Досить ефективними є синтетичні піногасники: силікони, пропінол, контраміни, полімерні багатоатомні спирти, поліефіри та ін. До механічних піногасників відносять лопаті, диски, барабани, розташовані у верхній частині біореактора, а також сепаратори піни.

**5.1.2. Підготовка стерильного повітря і очищення відпрацьованого повітря.** У повітрі атмосфери завжди містяться пари води, дрібнодисперсні частинки, клітки і спори мікроорганізмів. Так, в технологічному повітрі знаходиться до 4,5% актиноміцетів, до 33,5% коків, до 22,5% паличок, до 18,7% спір бацил і до 8,1% пліснявих грибів. Такий склад мікроорганізмів у повітрі непостійний і залежить від пори року, погодних умов, місця розташування підприємств, висоти забору повітря і т.д.

Найбільше мікробів у поверхні землі, з висотою концентрація їх убуває і стає постійною на рівні близько 30 м від землі. Тому очищення повітря, отримання великих кількостей стерильного повітря є однією з важливих задач біотехнології. *Стерильне повітря* застосовується в процесах ферментації для аерації, для вентиляції ділянок цехів стерильної зони та ін. Для очищення повітря використовують в основному два методи.

Один з них заснований на знищенні мікроорганізмів, наприклад, ультрафіолетовим випромінюванням.

Інший - на видаленні мікробів. Для цього використовують різні волокнисті і пористі матеріали, на яких завдяки інерційним і дифузійним механізмам осаджуються частинки, клітини мікроорганізмів, а ступінь чистоти повітря досягає 99,99%.

Для повноцінного очищення повітря треба застосовувати фільтри різної структури.

Технологічна схема очищення повітря складається з трьох етапів або підсистем:

1. Очищення від пилу і стиск;
2. Приведення повітря до термодинамічного стану для розподілу аерозолі;
3. Поділ аерозолі в фільтрах грубого і тонкого очищення.

Для біотехнологічних процесів важливе не тільки очищення повітря, що надходить в ферментатори, але і очищення *відпрацьованого повітря*. Для очищення такого повітря застосовують кілька методів:

- метод каталітичного доопалювання.
- метод рідкофазного окислення;
- метод із застосуванням сітчастих фільтрів.

### **Завдання 2.**

У загальному вигляді система біотехнологічного виробництва продуктів мікробного синтезу представлена на схемі (рис.4).

1. Скільки стадій біотехнологічного виробництва Ви знаєте? Назвіть їх і охарактеризуйте відбуваються в них процеси.
2. Розкажіть про технології приготування поживних середовищ для мікробіологічного синтезу речовини. Що входить до складу поживного середовища? Особливості введення в середу джерел вуглецю.
3. Асептика при приготуванні поживного середовища в процесі мікробіологічного синтезу. Стерилізація газових і рідинних потоків. Вимоги до хімічних антисептиків.
4. Чи потребує стерилізації середовище, в якому субстратами служать метанол, етанол або концентрована оцтова кислота? Чому? Як досягається дотримання асептики в даному випадку?

### **Питання для самоперевірки**

1. Перерахуйте основні стадії біотехнологічної схеми отримання продуктів мікробного синтезу.
2. Вкажіть системи сучасного ферментера.
3. Основне призначення ферментера.
4. Які розрізняють типи біореакторів?
5. Які особливості спостерігаються в біореакторах з механічним, пневматичним і циркуляційним перемішуванням?
6. В яких випадках застосовують лабораторні, пілотні та промислові біореактори?
7. Вкажіть стадії періодичної ферментації при вирощуванні культури.
8. Вкажіть основні фактори середовища.
9. Які відомі варіанти періодичного культивування?
10. В чому полягає особливість хемостатного і турбідостатного режимів безперервного культивування?
11. В яких біотехнологічних процесах зростання біооб'єктів відбувається на межі розділу двох фаз?
12. В чому полягають переваги та недоліки твердо фазної ферментації?
13. З чім пов'язана необхідність масообміну в процесі ферментації?
14. Від чого залежить швидкість споживання кисню біооб'єктами?
15. З чім пов'язана необхідність здійснення теплообміну?
16. Які позитивні та негативні процеси викликає піноутворення при ферментації?
17. Які піногасники належать до механічних, акустичних і хімічних?
18. Яким чином здійснюється підготовка стерильного повітря?
19. Яким чином здійснюється очищення відпрацьованого повітря?

## **6. Особливості культивування клітин рослин і тварин**

Клітинна інженерія – це один з найбільш важливих напрямків в біотехнології. Вона заснована на використанні принципово нового об'єкта – ізольованої культури клітин або тканин еукаріотичних організмів, які здатні існувати та розмножуватися на штучному поживному середовищі (*in vitro*).



Причому клітинна інженерія більшою мірою вивчає рослинні клітини і тканини, оскільки клітини рослин здатні до регенерації і володіють унікальною властивістю – *тотипотентністю*, тобто здатністю утворювати цілу рослину від однієї вихідної клітини. Крім того, кожна клітина рослини зберігає всі необхідні господарсько-корисні властивості материнського організму, в результаті чого всі штучно отримані особини є копією материнської.

### **6.1. Особливості культивування клітин рослин**

На сучасному етапі склалися 3 основних напрямки клітинної інженерії рослин:

1. Оздоровлення та розмноження генетично цінних рослин, при якому при культивуванні *in vitro* переносники систем хвороб повністю усуваються, тому цей метод виявляється дуже зручними для швидкого розмноження і зберігання рослин, які були вражені захворюваннями, особливо вірусними. У цілому від однієї меристеми можна отримати сотні тисяч рослин на рік. Крім того, даний спосіб дозволяє значно скоротити період вегетативного розвитку культивованих рослин. Так, вегетаційний період груші в лабораторних умовах скоротився з 25 років до 4 років.

2. Отримання від культивованих калюсних тканин речовин вторинного синтезу, які використовуються в медицині, парфумерії, косметичці та інших галузях промисловості. Це алкалоїди, стероїди, глікозиди, гормони, ефірні олії та ін. Наприклад, для медицини отримують такі препарати, як безпечна речовина кодеїн з маку снодійного; дигоксин, тонізуючий серцеву діяльність – з наперстянки; стимулятор – кофеїн – з рослин чаю та кави; тонізуючі речовини – з клітин женьшеню та ін.

3. Кріозберігання диких видів рослин з метою забезпечення припливу генів диких рослин сільськогосподарським сортам, що селекціонуються.

Залежно від мети використання рослинних клітин і тканин застосовується два методи культивування:

- 1) вегетативне клонування рослин (метод мікророзмноження);
- 2) культивування калюсних тканин. Таким чином, роль культури клітин і тканин величезна, а способи їх культивування є потужним інструментом розширення можливостей селекційної роботи.

#### **6.1.1. Метод вегетативного клонування рослин (клонального мікророзмноження)**

*Клональним мікророзмноженням* називають нестатеве розмноження рослин за допомогою методу культури тканин, що дозволяє отримувати рослини, ідентичні вихідному. В основі отримання таких рослин лежить здатність соматичних клітин рослин повністю реалізовувати свій потенціал розвитку, тобто властивість тотипотентності.

Вегетативне клонування має істотні переваги перед традиційними способами розмноження:

- 1) високий коефіцієнт розмноження. Одна рослина при мікроклонуванні може дати до 1 млн нових рослин в рік, тоді як при звичайних способах розмноження – тільки 50...100 рослин;
- 2) відсутність генетичної строкатості посадкового матеріалу, а отримання генетично однорідного масиву;
- 3) можливість оздоровлення рослин, звільнення їх від вірусів;
- 4) можливість розмноження рослин, які в природних умовах репродукуються з великими труднощами;
- 5) відтворення посадкового матеріалу круглий рік, що значно економить площі, що займають маточні рослини і рослини, що розмножують;
- 6) скорочення тривалості ювенільного періоду.

Однак було виявлено, що для більшості видів, в першу чергу для деревних порід, проблема вегетативного розмноження залишається до кінця не вирішеною. Так, не всі породи можуть розмножуватися даними способом (дуб, сосна, ялина, горіхоплідні тощо), і, крім того, практично неможливо за допомогою живцювання розмножувати багато видів деревних порід старше 10...15 років.

Процес вегетативного клонування включає наступні етапи:

- 1) вибір рослини-донора та ізолювання експлантів.

*Експлант* – це ізольований фрагмент тканини або органу рослини, що інкубується на поживному середовищі самостійно або використовується для отримання первинного калюсу. В цілому працювати можна з будь якою меристематичною тканиною, потенційно здатної сформуватися в рослину. Це може бути як сам зародок, так і кінчик основного пагона чи пазушних пагонів, що утворюються пізніше, а також тканини з різних органів рослини;

- 2) перенесення стерильного експланта на штучне живильне середовище;
- 3) підрощування стерильної культури;
- 4) перенесення проростків на середовище, що сприяє утворенню коренів.

Тривалість росту меристематичних тканин і формування первинних пагонів протягом перших чотирьох етапів становить 1...2 місяці;

- 5) дорощування на гідропоніці;
- 6) висадка в ґрунт.

Найбільш сприятливий час для пересадки пробіркових рослин в ґрунт – весна або початок літа. Рослини повинні мати 2...3 листки і добре розвинену кореневу систему. Наприклад, щоб отримати рослини, вільні від вірусних хвороб, необхідно взяти маленький шматочок в 0,3...0,5 мм верхівкової тканини стебла, що складається з конуса наростання і 2...3 листових зачатків, оскільки було виявлено, що дана меристематична тканина не містить вірусів.

*Необхідні умови роботи:*

*Дотримання суворої стерильності.* Для цього органи рослин, з яких беруть експланти, миють щіткою в мильному розчині і споліскують дистильованою водою, після чого поміщають на кілька секунд у 70%-ний етанол. Після цього знову ретельно промивають дистильованою водою.

Рослини, з яких збираються отримати культури тканин, вирощують в можливо більш чистому довкіллі, уникаючи надмірного поливу, забризкування листя. Зазвичай внутрішні тканини і серцевини цибулин, бульб і кореневищ є досить стерильними, тому що захищені верхніми шарами листя або лусочками. Тому структури, що покривають, спочатку протирають 70%-ним етанолом і обережно видаляють їх по одній, витягуючи потрібні для культивування тканини.

Стерилізацію експлантів більш відкритих органів і насіння проводять витримуванням протягом 5...20 хвилин в стерилізуючій розчині (сулема, хлорамін, діацід, гіпохлорид та ін.) з наступним багаторазовим обмиванням стерильною водою. При необхідності використовують антибіотики (тетрациклін, бензилпеніцилін та ін.) в концентрації 100...200 мг/л. Поживні середовища стерилізують в автоклаві при температурі 120°C з тиском 0,175...1,0 атмосфери протягом 20 хвилин. Посуд загортають у фольгу або обгортковий папір і стерилізують сухим жаром в сушильній шафі при температурі 180°C протягом 4 годин.

*Контроль якості поживних середовищ.* Поживні середовища для культивування повинні містити основні поживні речовини, мікро- і макроелементи. Обов'язково контролюють наявність солей азоту, сахарози (не менше 3%), вітамінів, деяких амінокислот, факторів росту (ферменти і гормони). Крім того, істотне значення має стан середовища. Зазвичай поживне середовище роблять твердим, додаючи агар (0,7...1,0% маси до об'єму), однак для деяких рослин (суниця, вишня, чорна смородина, ананаси тощо) або на певних стадіях культивування переважно використовують рідкі середовища. Найчастіше використовують середовища Мурасіге і Скуга (1962), Ніча і Уайта.

На перших трьох етапах, як правило, використовують середовище, що містить мінеральні солі за рецептом Мурасіге і Скуга, а також різні біологічно активні речовини та стимулятори росту (ауксини, цитокініни) в різних поєднаннях в залежності від об'єкта. У випадку, коли спостерігається інгібування росту первинного експланту за рахунок виділення їм у поживне середовище токсичних речовин (фенолів, терпенів та ін.), посилити їх зростання можна, використовуючи антиоксиданти (аскорбінова кислота 1...60 мг/л), глутатіон (4...5 мг/л), полівінілпіролідон (5000...10000 мг/л) та ін.) У деяких випадках доцільно додавати у поживне середовище адсорбент – деревне активоване вугілля в концентрації 0,5...1,0%.

На четвертому етапі, домагаючись отримання максимальної кількості *мериклонів* (рослини, що отримані з одної частки рослини), використовують середовища, що містять біологічно активні речовини, також регулятори росту. При цьому концентрація цитокинінів (названий так через здатність речовини стимулювати цитокинез (ділення клітини) повинна бути на рівні 1...10 мг/л, а ауксинів (сприяють прискоренню зростання, стимулюючи поділ клітин і збільшення їх розмірів, а також взаємодіючи з іншими гормонами) – до 0,5 мг/л.

На п'ятому етапі вегетативного клонування з метою укорінення рослин, а також адаптації їх до ґрунтових умов перед висадкою у ґрунт використовують середу Уайта, що містить в 2...4 рази менше мінеральних солей і цукрів (до 0,5...1,0%). Крім того, повністю виключається вміст цитокининів. При пересадці рослин-регенерантів в субстрат (ґрунт) коріння відмивають від залишків поживного середовища і висаджують в ґрунтовий субстрат, попередньо простерилізований при 85...90°C протягом 1...2 годин.

Для більшості рослин в якості субстратів використовують торф, пісок (3:1); торф, дерновий ґрунт, перліт (1:1:1); торф, пісок, перліт (1:1:1).

*Фізичні фактори.* Для поліпшення вегетативного клонування фізичні фактори необхідно підбирати з урахуванням природного ареалу вирощання культивованих рослин.

### **6.1.2. Культивування калюсних тканин**

Культивування ізолюваних тканин в лабораторних умовах здійснюється з метою отримання продуктів вторинного синтезу. Культура ізолюваних тканин зазвичай буває представлена калюсними або рідше пухлинними тканинами.

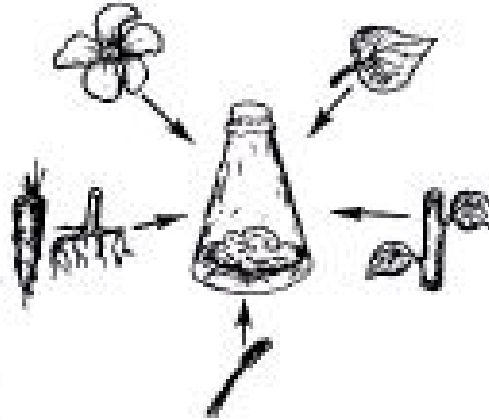
*Калюсна культура* – це тканина, що неорганізовано ділиться, складається з дедиференційованих клітин. Калюс в перекладі означає «мозоль». Калюс утворюється в місцях пошкодження цілих рослин, а також у стерильній культурі на експлантах.

*Дедиференцировки* – це повернення клітин в меристематичний стан (здатність до мікрочеренкування), при якому вони зберігають здатність ділитися.

Інтактні (готові) рослини складаються з диференційованих клітин, які втратили здатність до поділу. Тільки при пораненнях виділяються гормони (травматінова кислота), які викликають утворення калюсу. Тому обов'язковою умовою дедиференцировки рослинних клітин у лабораторних умовах є присутність у поживному середовищі двох фітогормонів: ауксинів і цитокининів. Ауксини викликають процеси дедиференцировки, а цитокинини ініціюють ділення клітин. Якщо у поживному середовищі їх не виявиться, то клітини не будуть ділитися, і калюсна тканина не утворюється. В якості експлантів використовуються фрагменти стебла, кореня, листка, пелюсток, тичинок і ін., які є цінними для культивування (рис. 7).

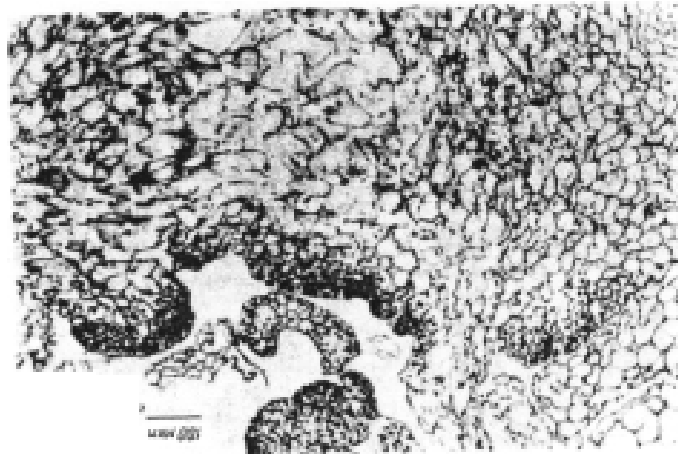
#### *Цикл розвитку калюсу*

1. Підготовка клітин до поділу за допомогою фітогормонів. При цьому під дією ауксинів (найчастіше 2,4-діхлорфеноксіоцтової кислоти) вихідна тканина втрачає свої характерні риси. Клітини втрачають запасні речовини: крохмаль, білки, ліпіди; в них руйнуються спеціалізовані клітинні органели, такі як хлоропласти, апарат Гольджі, перебудовується ендоплазматична мережа. Через кілька годин (на штучному поживному середовищі) починається новий синтез білка. У результаті клітини стають здатними до поділу, і утворюється калюс.



**Рис. 7.** Отримання культури калюсної тканини з різних експлантів: фрагментів стебла, кореня, листа, пелюстків, тичинок

2. Фаза інтенсивного росту клітин (поділ мітозом) (рис. 8, 9).
3. Фаза уповільненого росту клітин.
4. Стаціонарна фаза, при якій калюс не ділиться.
5. Відмирання калюсу.



**Рис. 8.** Мікрофотографія калюсу *Fresia*

Зазвичай калюсна тканина буває білого або жовтого кольору. При старінні калюсних клітин колір може бути темно-коричневим. Тому щоб уникнути старіння тканину необхідно пересаджувати через кожні 3...4 тижні на нове поживне середовище, що містить фітогормони.

Необхідними умовами роботи при культивуванні калюсу є ті ж вимоги, що і при вегетативному клонуванні, однак більшість калюсних клітин не потребує світла, тому що вони не мають хлоропластів і годуються гетеротрофно за рахунок поживного середовища. Виняток становить люцерна.



**Рис. 9. Морфогенетичні реакції калюсної тканини**

Культивування тканин – не зовсім проста задача, тому не всі вирощені клітини схожі з материнською особиною. Цьому заважає ряд факторів. Так, при багаторазових пересаджуваннях культури на свіжі поживні середовища здатність тканини регенерувати паростки знижується, і, крім того, серед клітин з'являються поліплоїди та інші генетично *аберантні* (мутантні, змінені) клітини, що викликає несхожість клітин з батьківськими формами.

### **6.1.3. Приготування поживних середовищ для культивування ізольованих клітин і тканин рослин**

Поживні середовища для культивування ізольованих клітин і тканин повинні включати всі необхідні рослинам макроелементи: азот, фосфор, калій, кальцій, сірку, магній, залізо; мікроелементи: бор, цинк, мідь, марганець та ін., а також вітаміни, вуглеводи, фітогормони. Деякі поживні середовища включають гідролізат казеїну, амінокислоти. Крім того, до складу поживних середовищ входить ЕДТА (етилендіамінтетраоцтова кислота) або її натрієва сіль, які покращують доступність заліза для клітин в широких межах рН.

Для отримання калюсних тканин в окремих випадках до поживного середовища додають рідкий ендосперм кокосового горіха (кокосове молоко), каштана та ін.

*Вуглеводи* є необхідним компонентом поживних середовищ для культивування ізольованих клітин і тканин, так як в більшості випадків останні не здатні до автотрофного харчування. Найчастіше в якості вуглеводу використовують сахарозу або глюкозу в концентрації 2...3%.

Обов'язковими компонентами поживних середовищ повинні бути ауксини, що викликають дедиференцію клітин експлантів, і цитокинини, які індукують клітинні ділення. При зміні співвідношення між цими фітогормонами або при додаванні інших фітогормонів можуть бути викликані різні типи морфогенезу. На середовищах без гормонів ростуть пухлинні і «звிகлі» тканини. Автономність по відношенню до обох гормонів або до одного з них пов'язана зі здатністю цих клітин продукувати гормони (табл. 5).

**Склад поживних середовищ, що використовують  
при культивуванні клітин і тканин, за Р.Г. Бутенко (1999)**

Компонент середовища	Концентрація поживних середовищ, мг/л			
	Мурасіге і Скуга, 1962	Гамборга і Евелєга, 1968	Уайта, 1939	Нича і Нич, 1974-1975
KNO <sub>3</sub>	1900	3000	81	950
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	-	-	720
Ca (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	-	-	142	-
Ca (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · H <sub>2</sub> O	-	-	-	-
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	134	-	-
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	370	500	74	185
CaCl <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O	-	-	-	166
CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	440	150	-	-
CaCl	-	-	65	-
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	-	12	68
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	-	150	-	-
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	-	10	-	-
MnSO <sub>4</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	22,3	-	-	25
ZnSO <sub>4</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	8,6	-	-	-
ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	-	2	-	10
H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub>	6,2	3	-	10
CuSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O	0,025	0,075	-	0,025
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,25	0,25	-	0,25
CoCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	0,025	-	-	-
FeSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	27,8	-	-	2
Na EDTA·2 H <sub>2</sub> O	37,3	-	-	3
Секвестрен 330-Fe	-	28	-	-
Мезоинозит	100	-	-	200
Аскорбиновая кислота	-	-	-	3
Тиамин-НСІ	0,5	-	-	3
Пиридоксин-НСІ	0,5	-	-	1
Никотиновая кислота	0,5	-	-	-
Сахароза	30 000	20 000	2000	60 000
Агар «Дифко», гельрит, агароза	-	-	-	7000

В якості ауксину в поживних середовищах використовують 2,4-діхлорфеноксіцтову кислоту (2,4 Д), індолилцтову кислоту (ІОК), α-наортілоцтову кислоту (НОК). ІОК майже в 30 разів менш активна, ніж 2,4 Д.

Для індукції калюсу зазвичай необхідні високі концентрації ауксинів (частіше це 2,4 Д), при наступних пересадках їх зменшують.

В якості цитокининів в штучних поживних середовищах використовують кинетін, 6-бензілалмініопурін (6-БАП), зеатін. Зеатін і 6-БАП у порівнянні з кинетіном більш активні щодо підтримки зростання ізольованих тканин і індукції органогенезу. До складу деяких поживних середовищ входить аденін.

Крім ауксинів і цитокининів, окремі поживні середовища включають гібберелову кислоту (ГК). Присутність ГК в середовищі не є обов'язковою, але в деяких випадках вона стимулює ріст ізольованої тканини.

Тверді поживні середовища готують на агар-агарі. Він являє собою полісахарид, отриманий з морських водоростей. Найменшу кількість небажаних домішок містить бактеріальний агар (*Bacto Agar* або агар вітчизняного виробництва). Зазвичай до середовища додають 0,7% агару.

До найбільш поширених поживних середовищ належать наступні.

Середа Мурасіге і Скуга – сама універсальна. Вона придатна для утворення калюсів, підтримання неорганізованого калюсного росту, індукції морфогенезу у більшості дводольних рослин.

Так, зміна співвідношення ауксину і кинетіну призводить до утворення або коренів (переважання ауксину), або стеблових культур (переважання кинетіна).

Середа Гамборга і Евелега добре підходить для культивування клітин і тканин бобових рослин і злаків, середа Уайта забезпечує вкорінення пагонів і нормальний ріст стебла після регенерації, а середа Ніча і Ніч придатна для індукції андрогенезу в культурі пиляків.

З метою економії часу розчини макросолей, мікросолей, вітамінів і фітогормонів готують концентрованими, що дозволяє їх багаторазово використовувати. Маткові розчини зберігають у холодильнику (причому для зберігання вітамінів потрібна негативна температура).

### ***Питання для самоперевірки***

1. На яких властивостях еукаріотичних клітин базується клітинна інженерія рослин?
2. Основні напрямки клітинної інженерії рослин.
3. Дати поняття експлантів і меристематичних тканини.
4. Охарактеризувати основні етапи вегетативного клонування рослин.
5. Охарактеризувати умови роботи при культивуванні вегетативних клонів рослин.
6. Особливості стерилізації експлантів і органів рослин.
7. Вимоги до поживних середовищ для культивування ізольованих культур клітин і тканин рослин.
8. Дати поняття калюсу. Механізм його утворення в природних умовах виростання рослин.
9. Фітогормони та їх функції.
10. Цикл розвитку калюсу.



11. Необхідні умови культивування калюсу в лабораторних умовах.
12. Які основні складові частини поживних середовищ для культивування ізолюваних клітин і тканин?
13. Які вуглеводи і для чого використовують в поживних середовищах?
14. Які гормони і для яких цілей використовують для приготування поживних середовищ?
15. Які тканини ростуть на поживних середовищах без гормонів?
16. В які поживні середовища вносять агар-агар і з чого його отримують?
17. На що впливає ауксин і кинетин при індукції морфогенезу?

## **6.2. Особливості культивування клітин тварин**

Для культивування поза організмом живі клітини можуть бути отримані декількома способами. Вони можуть бути виділені із крові, але до росту в культурі здатні лише лейкоцити. Моноядерні клітини можуть бути виділені з м'яких тканин за допомогою таких ферментів як колагеназа, трипсин, проназа, що руйнують позаклітинний матрикс. Крім того, у поживне середовище можна помістити шматочки тканин.

Відповідно до мети і завдань експериментальної роботи можна виділити два напрямки культивування клітин тварини:

- культури клітин;
- культури органів і тканин (органні культури).

Клітини в культурах розмножуються, що забезпечує одержання великої маси клітин, потім їх ідентифікують (за фенотиповими ознаками, шляхом вирощування на селективному середовищі, генотиповими), розділяють на ідентичні паралелі і, якщо це необхідно, зберігають.

Список типів клітин, що вже введені в культуру, досить великий. Це елементи сполучної тканини людини (фібробласти), скелетні тканини (кістка й хрящі), скелетні, серцеві і гладенькі м'язи, епітеліальні тканини (печінка, легені, нирки й ін.), клітини нервової системи, ендокринні клітини (наднирники, гіпофіз, клітини острівців Лангерганса), меланоцити й різні пухлинні клітини.

### **6.2.1. Поживні середовища і умови культивування**

Клітини одного й того типу в тканині взаємодіють одна з одною і узгоджують швидкість розподілу, щоб підтримувати належну щільність популяції. Епітеліальні клітини або фібробласти, поміщені в чашку, за наявності сироватки будуть «приклеюватися» до поверхні, розпластуватися й розподілятися, поки не утвориться суцільний моношар, у якому сусідні клітини стикаються.

Коли культура стане моношаровою, рух клітин припиняється. Нормальні клітини перестають розподілятися, це явище відомо як гальмування проліферації, що залежить від щільності. Якщо такий моношар «поранити» голкою таким чином, щоб на чашці утворилася вільна від клітин смужка, клітини із країв цієї смужки починають просуватися на вільне місце й розподілятися.

За культивування нормальних клітин у суспензії, коли вони не прикріплені до твердої поверхні й тому мають округлу форму, процес розподілу не відбувається (залежність розподілу від прикріплення). Частота розподілу клітин зростає зі збільшенням ступеня розпластування. Можливо, що сильно розпластані клітини можуть уловлювати більше молекул фактора росту й поглинати більше поживних речовин завдяки своїй більшій поверхні.

Зміна ростових властивостей клітин, що культивуються, називається *трансформацією*. Трансформація – процес незворотний і, мабуть, включає генетичні зміни. Зміна ростових властивостей є однією з адаптивних особливостей, що дозволяє клітинам проліферувати в умовах, несприятливих для нетрансформованих клітин.

Культури клітин тварин і людини висувають певні вимоги до рідкої (поживне середовище), газоподібної (концентрація газів) і твердої (поверхня субстрату) фази. Поживне середовище – це розчин певного складу, до якого додаються компоненти нез'ясованого біологічного походження (добавки плазми, сироватки крові, екстракти тканини й т.ін.). Основу поживних середовищ становлять сольові розчини. Мінеральні компоненти в цих розчинах підбрані так, що розчин виконує буферні функції, підтримуючи постійний кислотно-лужний баланс середовища в процесі культивування. Сталість рН середовища є одним з головних вимог умов культивування.

Для приготування поживних середовищ звичайно використовуються *сольові розчини Ерла й Хенкса*. Ці розчини, як і фосфатно-сольовий буфер Дульбекко й Фогта використовуються також для зрошення й промивання клітин за пасажування культур, виділення клітинних ліній та інших маніпуляцій з культурами клітин. Важливою умовою культивування є також осмотичний тиск.

*Стандартні середовища для ведення культур тваринних клітин.* Середовища Ігла *MEM (minimal essential medium)* і *BME (basal medium, Eagle)*. Частіше використовується *MEM*. Воно містить мінеральні речовини, амінокислоти (13 незамінних), 6 водорозчинних вітамінів, холін й інозит, що виконують роль вуглеводного субстрату. *MEM* використовується тільки із сироваткою, тому що в ньому відсутні біотин, вітамін B<sub>12</sub>, йони заліза та мікроелементи. Основою є розчин Ерла.

Нормальні клітини, що зберігають специфічні функції, не розмножуються на стандартних середовищах. Для оптимального росту клітин звичайно додають 5...20% фетальної (ембріональної) сироватки.

Сироватка являє собою надзвичайно складну суміш дрібних і великих молекул, здатних як викликати, так і гальмувати ріст клітин. До головних функцій сироватки належать: забезпечення гормональними факторами, що стимулюють ріст клітин і їхні функції; забезпечення факторами прикріплення й розпластування клітин; забезпечення транспортними білками, що переносять гормони, мінеральні речовини, ліпіди й т.ін. Білки сироватки, що безпосередньо і специфічно беруть участь у стимуляції клітинного розподілу, називаються *факторами росту*.

Для перенесення низькомолекулярних факторів (вітамінів,

амінокислот, ліпідів й інших) необхідні транспортні білки. В цій ролі виступає альбумін. Транспортування заліза забезпечує трансферин, а поверхня більшості клітин, що культивуються, містить рецептори для цього білка. До факторів прикріплення й розпластування клітин належать колаген і фібронектин.

Однак, *культивування клітин за наявності сироватки* має і ряд *недоліків*:

- для більшості тканин сироватка не є фізіологічною рідиною, з якої вони контактували у вихідній тканині (наприклад, сироватка викликає ріст фібробластів, але гальмує ріст епідермальних кератиноцитів);
- сироватка може бути цитотоксичною;
- спостерігається значна варіабельність складу сироваток різних партій;
- сироватки можуть містити недостатню кількість специфічних ростових факторів, що викликає необхідність додаткового їх введення до культур клітин.

Останніми роками розроблено середовища без сироватки для розмноження клітин. Найчастіше ці середовища вузькоспеціалізовані, тобто призначені для певного типу клітин. До базового середовища додається інсулін, трансферин, гідрокортизон або його аналог дексаметазон і т.ін.

*Безсироваткові середовища мають певні переваги:*

- поліпшення відтворюваності результатів досліду внаслідок більшої стабільності складу середовища;
- зниження ризику зараження культури вірусами, грибами, мікоплазмою;
- полегшення очищення продуктів клітинного метаболізму;
- зниження впливу додаткових білків на результати біологічних досліджень;
- відсутність цитотоксичності сироватки.

### **6.2.2. Системи культивування клітин**

Є дві основні системи культивування клітин:

1. *Непротічні культури* – тип культур, у якому клітини вводять у фіксований об'єм середовища. У міру росту клітин відбувається використання поживних речовин і накопичення метаболітів, тому середовище повинно періодично змінюватися, що призводить до зміни клітинного метаболізму, називаного ще і фізіологічною диференціацією. Згодом, у наслідок виснаження середовища відбувається припинення проліферації клітин.

Збільшити тривалість життя непротічних культур можна декількома способами:

- переривчастий (частина культури замінюється рівним об'ємом свіжого середовища);
- постійний (об'єм культури збільшується з постійно низькою швидкістю, а невеликі порції клітин періодично віддаляються);
- перфузійний (здійснюється постійне надходження свіжого середовища до культури й одночасне видалення рівного об'єму

використаного (безклітинного) середовища).

Усі системи непротічних культур характеризуються накопиченням відходів у тій або іншій формі й мінливістю зовнішніх умов.

2. *Протічні культури* забезпечують дійсні гомеостатичні умови без зміни концентрації поживних речовин і метаболітів, а також числа клітин. Гомеостаз обумовлений постійним надходженням середовища до культури й одночасним видаленням рівного об'єму середовища із клітинами. Такі системи придатні для суспензійних культур і моношарових культур на мікроносіях.

Існує два великих напрямки в культивуванні тваринних клітин: моношарові культури й суспензійні культури.

*Глибинне вирощування клітин у моношарі.* Ріст клітин у вигляді моношару залежить від адгезивних білків – фібронектинів (від лат. *fibra* – нитка, *nectere* – зв'язувати або з'єднувати), що забезпечують міжклітинну адгезію, прикріплення клітин до підкладки і спрямовують їх переміщення.

Великомасштабне культивування тваринних клітин у моношарі націлене на одержання найбільшої концентрації клітин у найменшому об'ємі газової фази. Обрані клітини вирощують у суворо асептичних умовах, при цьому застосовують спеціальне устаткування під час повільного обертання ролюєрної системи або погойдування для омивання більшої площі культурального середовища. Клітини почергово занурюються у рідку та в газоподібну фазу. При цьому з надлишком забезпечуються їхні дихальні потреби киснем.

Під час циклу культивування клітин слід враховувати різні параметри. Одні з них належать до числа константних, інші – до числа варіабельних. Константними є якість матеріалу, форма й обсяг культиватора, варіабельними – швидкість обертання або погойдування, якість і обсяг середовища, тип клітин і розмір (величина) посівного матеріалу, рН і температура середовища, постачання кисню і вміст CO<sub>2</sub> у культиваторі, окислювально-відновний потенціал і концентрація основних джерел живлення. Перші три варіабельних показники можна підтримувати постійними, переводячи їх у розряд константних.

Контроль за розвитком клітин здійснюють за допомогою прямих (підрахунок) і непрямих методів (за каламутністю, підрахунком ядер, визначенням загального білка).

Моношарові культури також мають ряд *переваг*:

1. Легко можна провести повну заміну середовища і промити клітини перед додаванням свіжого поживного середовища. Це важливо в тих випадках, коли ріст клітин відбувається в одних умовах, а вироблення продукту в інших умовах, наприклад, за перенесення клітин із середовища з сироваткою в безсироваткове середовище. Можна також повністю видалити небажані компоненти.

2. Дозволяють забезпечити високу щільність клітин.

3. У багатьох клітин експресія необхідного продукту відбувається більш ефективно, якщо клітини прикріплені до субстрату.

4. Моношарові культури можуть бути використані для будь-якого типу клітин, що забезпечує найбільшу гнучкість досліджень.

5. У деяких випадках, наприклад, для розповсюдження вірусів, потрібні тісні міжклітинні контакти.

*Недоліками* моношарових культур є:

- потреба великого простору;
- зростання вартості й трудомісткості за збільшення масштабу;
- недостатньо ефективний контроль, обумовлений труднощами відбору проби;
- труднощі у визначенні й контролюванні рН, концентрації кисню.

Слід зазначити, що застосування мікроносіїв усуває ці недоліки.

*Глибинне вирощування клітин у суспензійних культурах.* Площу вирощуваних клітин можна істотно збільшити, використовуючи мікроносії, що створюють суспензію у поживному середовищі, й на поверхні яких клітини закріплюються, а потім розростаються у вигляді моношару. Такі суспензійні мікроносії із клітинами моделюють глибинні культури, наприклад, мікроорганізмів. Отже, у таких системах сполучаються моношарові й суспензійні культури тваринних клітин.

В якості мікроносіїв застосовують позитивно заряджені ДЕАЕ-сефадекси, сефадекси з колагеновим покриттям, негативно заряджений полістирол, порожні скляні сфери й ін. Так, наприклад, окремі фірми пропонують мікросфери з пористого жувільного скла, які можуть бути використані для іммобілізації клітин ссавців. Пори їх доступні для penetрації (від лат. *penetratio* – проникнення) клітин усередину матрикса. Пористі сфери придатні для іммобілізації суспензійних клітин, що прилипають (наприклад, гібридом).

Глибинне вирощування тваринних клітин можна реалізувати трьома варіантами:

- 1) моношар клітин статичний, а культуральне середовище рухливе;
- 2) середовище культивування статичне, а моношар клітин рухливий;
- 3) клітини (наприклад, на мікроносіях, у мікросферах) і середовище культивування рухливі.

Ці варіанти вирощування клітин слід брати до уваги за вибору або проектування відповідного обладнання.

Можливості перенесення генетичної інформації з еукаріотичних клітин у прокаріотичні зняли проблему масового культивування тваринних клітин для одержання таких продуктів, як інтерферон, гормони, лімфокіни й інших. Тут успішно розвивається рДНК-біотехнологія. Клітинам тварин у глибинних культурах майже у всіх випадках необхідна захисна матриця, функцію якої беруть на себе білки сироватки крові, що додають до середовища культивування. Цим ще раз підтверджується більш висока травмованість клітин тварин порівняно з мікробними й рослинними клітинами. Проте, основні підходи до вибору обладнання й реалізації біотехнологічних процесів з використанням тваринних клітин багато в чому

аналогічні з такими в мікробній біотехнології. Наприклад, системи культивування в обох випадках можуть бути хемостатичними, циклічними, безперервними або напівбезперервними.

### ***Питання для самоперевірки***

1. Що таке «проліферація» клітин?
2. Які культури клітин називають первинними?
3. Що таке «пасирування» клітин?
4. Які клітини є суспендованими?
5. Що таке «моношарова культура» клітин?
6. З чим пов'язана трансформація клітин тварин?
7. Які види поживних середовищ використовують для культивування клітин тварин?
8. З якою метою використовують сироватки при вирощуванні клітин тварин?
9. Які недоліки існують при використанні сироваток для вирощування клітин?
10. В чому полягають переваги безсировоткових середовищ для вирощування клітин тварин?
11. Які системи культивування клітин тварин існують?
12. Яким чином можна збільшити тривалість життя непроточних культур клітин?
13. Вкажіть особливості глибинного вирощування культур клітин в моно шарі.
14. Вкажіть переваги та недоліки глибинного вирощування культур клітин в моно шарі.
15. Вкажіть варіанти глибинного вирощування суспензійних культур клітин тварин.

### **7. Відділення, очищення, модифікація і виділення кінцевих продуктів**

В культуральній рідині після закінчення процесу ферментації містяться мікроорганізми, продукти їх життєдіяльності, залишки поживного середовища, піногасник, розчинні і нерозчинні речовини. Цільовим продуктом біосинтезу можуть бути безпосередньо самі мікроорганізми або їх метаболіти, що розчинені в культуральній рідині або знаходяться всередині клітин мікроорганізмів.

#### ***7.1. Відділення цільового продукту***

Майже у всіх випадках для отримання цільового продукту необхідно відокремити зважену фазу – масу мікроорганізмів – від культуральної рідини.

Культуральні рідини зазвичай є складними сумішами і містять велику кількість компонентів, багато з яких мають близькі фізико-хімічні властивості.

Поряд з розчиненими мінеральними солями, вуглеводами, білками і іншими органічними речовинами культуральні рідини містять в значній

кількості полідисперсні колоїдні часточки і суспензії. Отже, вони є не тільки багатокомпонентними розчинами, а й суспензіями. Дисперсна фаза цих суспензій складається з міцелію або клітин мікроорганізмів, а також з твердих часточок, що містяться в багатьох поживних середовищах: борошні, пластівців із кукурудзяного екстракту і т.п.

Вміст мікроорганізмів в культуральній рідині, як правило, дуже низький. В 1 л міститься зазвичай 5-10 г сухої біомаси. Відділення такої кількості зваженої фази – важка технологічна задача, яку доводиться вирішувати шляхом концентрування різними способами (флотація, сепарування, упарювання).

Способи *відділення клітинної біомаси мікроорганізмів* від культуральної рідини можна розподілити на:

- механічні (відстоювання, фільтрування, центрифугування);
- теплотехнічні (сушка).

Всі методи *виділення продуктів мікробіологічного синтезу* з культуральної рідини ділять на дві групи:

- 1) екстракція, іонний обмін, адсорбція, кристалізація, якщо цільової продукт міститься в розчині;
- 2) осаджування, фільтрування, центрифугування, сепарування, якщо цільової продукт у вигляді твердої фази.

**Осаджування** (седиментація) - це процес розшарування дисперсних систем під дією сили тяжіння і відділення дисперсної фази в вигляді осаду.

Швидкість осаджування біомаси з культуральної рідини незначна і складає близько  $10^{-6}$ - $10^{-7}$  м/с.

**Центрифугування** – це розподіл неоднорідних систем під впливом поля відцентрових сил.

Для центрифугування застосовують центрифуги різних конструкцій.

Центрифуги, що мають високий фактор поділу і оснащені тарілчастим барабаном, називають *сепараторами*. В мікробіологічній промисловості сепаратори є одним з самих розповсюджених типів центрифуг. Сепаратори дозволяють сконцентрувати осад до вологості 60-90%.

**Фільтрування** – це поділ твердої і рідкої фаз суспензії при пропущенні її через пористу перегородку. Кінцева мета фільтрування – отримання твердої або рідкої фази (коли одна з них є відходом), а також одночасне отримання твердої і рідкої фаз.

В якості допоміжних фільтрувальних матеріалів використовуються фільтрувальні порошки, які вносять у рідину, що фільтрується, як наповнювачі або попередньо наносять на робочу поверхню фільтра у вигляді ґрунтового шару.

**Екстракція** – процес розподілу суміші твердих і рідких речовин за допомогою виборчих (селективних) розчинників (екстрагентів).

Фізична сутність екстракції полягає в переході компонента, що вилучається з однієї фази (рідкої або твердої) в фазу рідкого екстрагента при їх взаємному контакті. Компоненти, що екстрагуються, переходять з

вихідного розчину в розчинник внаслідок різниці концентрацій, тому даний процес відноситься до числа дифузійних.

Область застосування екстракції: виділення і очистка антибіотиків, вітамінів і амінокислот.

### **7.2. Очищення цільового продукту**

*Іонообмін* являє собою сорбційний процес.

**Адсорбція** – це процес поглинання одного або декількох компонентів цільового продукту з газової суміші або розчину твердою речовиною – *адсорбентом*.

Процеси адсорбції (як і інші процеси масопередачі) вибагливі і зазвичай зворотні. Завдяки цьому стає можливим виділення поглинених речовин з адсорбенту, тобто проведення процесу *десорбції*.

Найбільш перспективні синтетичні іонообмінні смоли. Іоніти знайшли широке застосування в технології виробництва антибіотиків на етапі їх сорбції з культуральної рідини.

**Кристалізація** – це виділення твердої фази у вигляді кристалів, головним чином з розчинів і розплавів.

Кристалізація антибіотиків та інших біологічно активних речовин заснована на різкому зменшенні їх розчинності в результаті зміни температури розчину (зазвичай зниження, але іноді, наприклад, у випадку еритроміцину – підвищення) або переведення їх в іншу важко розчинну хімічну форму. Останнє досягається зміною рН розчину або додаванням відповідного реагенту, часто з одночасним зниженням температур.

Кристалізація є не тільки способом отримання антибіотиків в твердому вигляді, але і дуже ефективним засобом очищення від супутніх домішок, що є суттєвою перевагою в порівнянні з деякими іншими методами поділу.

Метод кристалізації знайшов застосування в технології отримання антибіотиків (тетрацикліну, еритроміцину та ін.), вітамінів, полісахаридів.

### **7.3. Модифікація і виділення кінцевих продуктів**

**Упарювання** – це процес концентрування рідких розчинів шляхом часткового видалення розчинника випаровуванням при нагріванні рідини. У ряді випадків упарений розчин піддають подальшій кристалізації.

Концентровані розчини та тверді речовини, одержувані в результаті упарювання, легше і дешевше переробляти, зберігати і транспортувати.

Зазвичай виробництво антибіотиків здійснюють при температурі 60-70<sup>0</sup>С під вакуумом, тому метод неприпустимий при переробці термолабільних біологічно активних речовин.

До **мембранних методів** поділу відносяться:

1. Діаліз і електродіаліз.
2. Зворотний осмос.
3. Мікрофільтрація.
4. Ультрафільтрація.

В основі цих методів лежить явище осмосу – дифузія розчинених речовин через напівпроникну перегородку, що представляє собою мембрану



з великою кількістю (до  $10^{10}$ - $10^{11}$  на  $1 \text{ м}^2$ ) дрібних отворів – пор, діаметр яких не перевищує 0,5 мкм.

Під мембраною зазвичай прийнято розуміти високопористу або безпористу плоску або трубчасту перегородку, зроблену з полімерних або неорганічних матеріалів і здатну ефективно розділяти частинки різних видів (іони, молекули, макромолекули і колоїдні частинки), що знаходяться в суміші або розчині. Використання мембран дозволяє створювати економічно високоефективні і маловідходні технології.

До основних мембранних методів поділу рідких систем відносяться зворотний осмос, ультра- і мікрофільтрація. ці методи характеризуються такими загальними рисами, як використання напівпроникних мембран, які різним чинбом пропускають компоненти розчинів і суспензій, застосування в якості рушійної сили процесів надлишкового тиску, способи боротьби з концентраційного поляризацією.

Перспективним напрямком використання мікрофільтрації в біотехнології є метод культивування мікроорганізмів, який поєднує мембранні елементи з ферментаційним обладнанням, що привело до створення *мембранних біореакторів (МБР)*.

Під МБР розуміється звичайний апарат, в якому конструктивно об'єднані біореактор для глибинного культивування клітин і мембранний модуль, що забезпечує виведення потоку безклітинної культуральної рідини.

Застосування мембран в біореакторах засноване на принципі зміщення хімічної рівноваги в бік утворення цільового продукту шляхом видалення цього продукту з системи, в якій здійснюється реакція (принцип Ле-Шательє). Для цього регулюючі компоненти приводять в контакт з напівпроникною мембраною, яка переважно проникна для цільових продуктів.

В МБР здійснюється проведення одночасно двох процесів:

- кероване культивування мікроорганізмів в обсязі біореактора;
- видалення культуральної рідини (або її частини) та заміна її свіжим поживним середовищем.

Завдяки цьому стає можливим створення процесу культивування мікроорганізмів, безперервного по рідкій фазі і періодичного по умовно твердій фазі – біомасі, що дозволяє усунути ряд недоліків, властивих періодичним способам культивування.

Необхідність *стабілізації* матеріалів біологічного походження, що пов'язана з їх надзвичайної нестійкістю, виникла на зорі біологічної науки. Відомо, що в звичайних умовах тривалість збереження більшості біологічних продуктів обмежується кількома днями. У зв'язку з цим розроблялися різні способи консервування біологічних препаратів, які час можна розділити на:

- *консервування* при позитивних температурах за допомогою хімічних сполук (хлороформ, фенол, гліцерин, формалін і т.д.);
- консервування при низьких температурах (заморожування);
- консервування висушуванням.

Висушування є одним з найбільш досконалих процесів стабілізації властивостей продуктів біологічного (рослинного, тваринного, мікробіологічного) походження і дозволяє зберігати дані продукти в звичайних умовах тривалий час. Крім того, істотно зменшена маса дозволяє значно знизити транспортні витрати і витрати на тару.

Необхідно відзначити, що зневоднення – важкий технологічний процес, який часто є вирішальним етапом виробництва, що впливає на якість продукції, що випускається.

Перевагою штучного висушування є значно менші витрати часу на видалення вологи. Процес сушіння – це різноманітний комплекс теплових, дифузійних, часто біологічних і хімічних явищ (особливо коли справа стосується інтенсивної сушки). Препарати біологічного походження зазвичай представляють собою складні об'єкти сушки, які характеризуються рядом показників, найважливішими з яких є початкова, кінцева і рівноважна вологість, термічні, електрофізичні, структурно-механічні та масообмінні характеристики. Різноманітність властивостей продуктів вимагає індивідуального підходу до розробки раціональних методів їх сушки (з урахуванням вимог до якості готового виробу).

В даний час розрізняють *природну сушку* на відкритому повітрі і *штучну*, в спеціальних пристроях з організованим і регульованим підведенням сушильного агента.

Найбільш широкі впровадження на практиці отримали наступні методи сушки:

- сублимаційний (ліофільні);
- конвективний;
- контактний;
- терморадіаційний;
- струмами високої частоти;
- комбінований.

Одним з основних методів консервування біопрепаратів, що дозволяє тривалий час зберігати їх активність, є метод *ліофільного сушіння*. Він дозволяє зберегти практично без зміни первинні властивості живих і рідше інактивованих вакцин – діагностичних і лікувальних сироваток, агентів та інших біологічно активних препаратів, що використовують для профілактики, діагностики та лікування.

Ліофільне висушування складається з двох прийомів консервування: заморожування і висушування. Вологу з заморожених препаратів видаляють з використанням глибокого вакууму, минаючи рідку фазу. В процесі сушки волога переміщується в препараті не у вигляді рідини, а у вигляді пари. В результаті вдається максимально зберегти специфічні властивості білків, звести до мінімуму їх денатурацію, забезпечити живим клітинам і вірусам стан тривалого анабіозу, що дозволяє отримати стандартизовані за активністю біопрепарати.

Консервування біопрепаратів методом ліофільного висушування має ряд переваг перед іншими методами:

- знижується маса біопрепарату;
- тривалий час зберігається вихідна активність: вакцин – до 12-18 міс., сироваток – до 2-3 років;
- припиняється ріст мікробних контамінантів.

Висушені препарати можна зберігати при температурі +4...+8<sup>0</sup>С; допускається короткочасне підвищення температури до +10...+15<sup>0</sup>С (на період транспортування до 7 днів).

Сухий матеріал в ампулах запаюють під вакуумом, у флаконах герметично закупорюють, попередньо заповнивши їх інертним газом (аргоном, неоном, азотом).

*Конвективний метод* висушування є найпоширенішим в біологічній промисловості, на ньому заснована робота переважної більшості сушильних установок. В якості сушильного агента застосовують нагріте повітря, топковий газ або перегріту пару. Сушильний агент передає тепло матеріалу, під дією якого з матеріалу видаляється волога у вигляді пари, яка надходить у навколишнє середовище. Таким чином, сушильний агент при конвективному сушінні є теплоносієм і поглинає вологу. Сушильні установки камерного типу безперервного і періодичної дії мають ряд *недоліків*:

- велика тривалість сушки;
- нерівномірність висушування матеріалу;
- значні втрати тепла при завантаженні і вивантаженні продукту;
- трудомісткість процесу.

У сушильній техніці також використовуються барабанні сушильні установки, що представляють собою порожнистий циліндр з внутрішньої насадкою для безперервного пересипання і переміщення матеріалу, що висушується, до якого подається теплоносієм.

*Контактний метод висушування.* Цей метод сушіння ґрунтується на передачі тепла матеріалу при зіткненні з гарячою поверхнею. В якості гарячого теплоносія використовують найчастіше водяну пару, рідше газу і висококиплячі рідини. Потік повітря (вакуум) при цьому способі служить тільки для видалення водяних парів із сушарки.

Широке застосування отримали вальцеві сушильні установки безперервної дії різних конструктивних модифікацій. В корпусі сушильної установки обертається порожнистий барабан, який обігрівається зсередини тепловим агентом. Вихідний рідкий матеріал безперервно подається на барабан, де за один неповний оборот останнього висушується і зрізується ножами.

Сутність *терморадіаційного методу* сушки полягає в тому, що тепло матеріалу передається за рахунок невидимих теплових (інфрачервоних) променів. Інфрачервоні промені (ІФП) - це промені з довжиною хвилі 0,77...340 мкм.

Чим менше довжина хвилі, тим більше проникаюча здатність інфрачервоних променів. Проникність матеріалів залежить в основному від товщини шару і вологості продукту. Для матеріалів, у яких розмір частинок

більше глибини проникнення інфрачервоних променів, рекомендується переривчасте опромінення. За характером випромінювачів інфрачервоних променів розрізняють терморадіаційні сушарки з електричним і газовим обігрівом. Найбільш широко використовуються на практиці терморадіаційні сушарки з газовими панельними випромінювачами.

При сушінні *струмами високої частоти* (частота коливання 10...3000 МГц) органічний матеріал поміщається між обкладинками конденсатора, до яких подається електричний струм високої частоти. Продукти біологічного походження являють собою діелектрики, що мають деяку провідність, тобто мають властивості напівпровідників. При зміні заряду на обкладинках вони переміщуються в протилежних напрямках, в результаті чого неминуче виникає тертя з виділенням тепла. В електричному полі високої частоти нагрів частинок органічного матеріалу здійснюється за частки секунди. Під дією температурного градієнта волога зсередини переміщується до поверхні частинки. *Переваги* сушіння струмами високої частоти порівняно з конвективною і контактною полягає в можливості регулювання і підтримки певної температури всередині матеріалу та інтенсифікації процесу.

Однак великі витрати електроенергії, складне устаткування і обслуговування, підвищені вимоги техніки безпеки обмежують застосування струмів високої частоти для сушки.

В даний час для висушування термолабільних препаратів, крім розглянутих вище методів, застосовуються їх різні комбінації, які дозволяють досягти високої якості одержуваної продукції, підвищення продуктивності та економічності процесу, зменшення витрат праці. Прикладами комбінованих способів сушіння можуть служити розпилювально-сублімаційні висушування, контактено-сорбційне зневоднення та ін.

**Завдання.** Скласти таблицю «Способи виділення цільового продукту» наступним чином:

Способи виділення	
Клітини	Розчинний метаболіт

### ***Питання для самоперевірки***

1. Що таке дезінтеграція, в яких випадках її здійснюють?
2. Розкажіть про основні методи дезінтеграції клітин.
3. У чому відмінність сепарування від центрифугування?
4. У яких випадках виконується стадія очищення цільового продукту?
5. Що таке сорбція?
7. Що може міститися в культуральній рідині після закінчення процесу ферментації?
8. Які основні способи концентрації біомаси Ви знаєте?

9. Які застосовуються методи виділення продуктів мікробіологічного синтезу з культуральної рідини, якщо цільовий продукт знаходиться в розчині?
10. Які застосовуються методи виділення продуктів мікробіологічного синтезу з культуральної рідини, якщо цільовий продукт знаходиться в твердій фазі?
11. Що таке осадження біомаси і яка його швидкість?
12. Які речовини застосовують для прискорення процесу осадження біомаси?
13. У чому суть центрифугування біомаси?
14. Які технологічні особливості сепарування і до якої вологості вони дозволяють сконцентрувати осад?
15. Які області застосування центрифугування?
16. Що таке фільтрування?
17. Від чого залежить швидкість фільтрування?
18. Що таке екстракція культуральної рідини?
19. Що таке іонообмін, адсорбція, десорбція?
20. Які молекулярні сорбенти Вам відомі?
21. Що таке кристалізація цільового продукту, і якими способами вона досягається?
22. В чому перевага кристалізації, і в яких біотехнологічних процесах вона використовується?
23. Що таке упарювання культуральної рідини, його режим, гідності і недоліки?
24. Що лежить в основі мембранних методів розділення рідких систем?
25. Що об'єднують в собі мембранні біореактори, і в чому їх перевага перед періодичними біореакторами?
26. Які методи консервування біологічних препаратів Вам відомі?
27. У чому суть методів природного та штучного висушування? Які методи штучної сушки Вам відомі?
28. З яких етапів складається ліофільне висушування біопрепаратів, і в чому його переваги?
29. За яких температурах і як довго зберігаються біопрепарати, консервування яких здійснювали методом ліофільної сушки?
30. Які гази використовуються при упаковці біопрепаратів в ампули?
31. У чому суть конвективного методу висушування біоматеріалу?
32. Які недоліки сушильних установок камерного типу?
33. У чому суть контактного методу висушування?
34. У чому суть терморадіаційного методу висушування?
35. Переваги і недоліки методу сушки струмами високої частоти.

## **8. Застосування іммобілізованих ферментів і клітин в біотехнології**

Більш широке використання ферментів до останнього часу стримувалося рядом причин, з яких найважливішими є:

- трудомісткість відділення ферментів від початкових компонентів і продуктів реакції після завершення процесу, в наслідок чого ферменти використовуються, як правило, одноразове;

- нестійкість ферментів при зберіганні, а також при різних впливах (головним чином теплових);

- трудомісткість очищення ферментів і отримання їх в достатньо активному вигляді.

Ефективність ферментативних процесів, використовуваних в самих різних галузях людської діяльності, вдалося збільшити з допомогою іммобілізації ферментів. *Іммобілізація* – це процес прикріплення ферментів до поверхні природних або синтетичних матеріалів, включення їх в полімерні матеріали, порожнисті волокна і мембранні капсули, поперечне хімічне зшивання. Іммобілізацію також можна характеризувати як фізичне розділення каталізатора і розчинника, в ході якого молекули субстрату і продукту легко обмінюються між фазами.

Розділення може бути досягнуте адсорбційним або ковалентним зв'язуванням ферменту з нерозчинними носіями, або скріпленням окремих молекул ферменту з утворенням агрегатів. При іммобілізації ферментів відбувається стабілізація каталітичної активності, оскільки цей процес перешкоджає денатурації білків. Іммобілізований фермент, що має обмежену можливість для внутрішньоклітинних перебудов, швидше розчинного знаходить найкоротший шлях до функціонально активної конформації. Іммобілізовані ферменти набувають, окрім стабільності, окремі властивості, не характерні для їх вільного стану, наприклад, можливість функціонувати в неводному середовищі, ширші зони оптимуму температурі і рН. Іммобілізовані ферменти просторово роз'єднані на носієві. Це означає утруднення міжмолекулярних взаємодій типу агрегації, які можуть викликати інактивацію ферменту. При цьому фермент з розряду гомогенних каталізаторів переходить в розряд гетерогенних, тобто знаходиться у фазі, не пов'язаний ні з початковим субстратом, ні з утворюваним продуктом. Це дозволяє організовувати на базі іммобілізованих ферментів різні ефективніші біотехнологічні процеси багаторазової періодичної, а також безперервної дії з використанням принципу взаємодії рухливої і нерухомої фаз.

Іммобілізовані ферменти виявляють кілька переваг над своїми розчинними аналогами:

- вони можуть бути відокремлені від продукту і використані повторно, що знижує вартість процесу;

- іммобілізовані ферменти часто виявляють підвищену стабільність і довгостроково зберігають активність;

- вони придатні для безперервних процесів, які, в свою чергу, полегшують контроль за якістю і знижують вартість праці;

- час реакції може бути зменшений за рахунок створення більш високого співвідношення ферментів і субстратів;

- можна створювати мультиферментні системи.

Однак застосування ферментів обмежено через їх низьку стабільності, здатність каталізувати лише одну єдину реакцію, високу вартість чистих препаратів. Крім того, для практичних цілей можуть використовуватися тільки ті ферменти, для яких не потрібно регенерації кофакторів. Тому в даний час поряд з іммобілізацією ферментів увагу дослідників все більше привертає іммобілізація клітин та органел. Жива клітина на відміну від ферменту являє собою готовий біотехнологічний реактор, в якому реалізуються не тільки процеси, що призводять до утворення кінцевого продукту, але і багато інших, які сприяють підтримці каталітичної ефективності системи на високому рівні (наприклад, регенерація кофакторів). Оскільки ферменти функціонують у нативному оточенні, їх денатурація в процесі роботи зводиться до мінімуму. Це розширює число застосовуваних ферментів і дозволяє здійснювати як процеси синтезу, так і процеси деградації.

Іммобілізовані клітини ідеально підходять для використання в реакторах з перемішуванням, через які пропускають субстрат. Перевагою таких реакторів є можливість їх багаторазового використання і отримання продукту, вільного від ферменту. Звичайно, використання іммобілізованих клітин не позбавлене недоліків. Наприклад, клітинна стінка або плазматична мембрана можуть перешкоджати проникненню субстрату до ферменту або дифузії продукту з клітки. Крім того, виникає необхідність підтримання цілісності клітин і утримання їх у тій фазі росту, в якій синтезуються необхідні ферменти. Нарешті, через велику кількість присутніх в клітині ферментів (що в ряді випадків розглядається як гідність) можливе протікання небажаних побічних реакцій.

Для іммобілізації клітин використовується безліч способів (сорбція інертними і іонообмінними носіями, ковалентне зв'язування з полімерним носієм, включення в гель) і носіїв різних типів (природні та синтетичні полімери та неорганічні речовини).

### ***Завдання 3***

Відчутний внесок процеси іммобілізації ферментів і клітин внесли в тонкий органічний синтез, в аналіз, в медицину, в процеси конверсії енергії, в харчову та фармацевтичну промисловість. Вкажіть:

1. Загальні напрямки та досягнення застосування іммобілізованих ферментів у харчовій промисловості.
2. Загальні напрямки та досягнення застосування іммобілізованих ферментів в медицині.
3. Переваги іммобілізованих клітин перед іммобілізованими ферментами, перед вільними клітинами.
4. Які клітини підходять для іммобілізації? Одностадійні і поліферментні реакції.
5. Хімічні та фізичні методи іммобілізації клітин, можливості застосування.

### ***Завдання 4.***

Ферменти – речовини білкової природи і тому нестійкі при зберіганні. Крім того, ферменти не можуть бути використані багаторазово через труднощі у відділенні їх від реагентів і продуктів реакції. У 1916 році Дж.Нельсон і Е.Гріффін адсорбували на вугіллі інвертазу і показали, що вона зберігає в такому вигляді каталітичну активність.

1. Винахід якого процесу впливу на ферменти з метою підвищення їх стійкості та можливості багаторазового застосування відбувся в 1916 р?
  2. Переваги іммобілізованих ферментів перед нативними.
  3. Основні вимоги до носіїв для отримання іммобілізованих ферментів.
  4. Класифікація носіїв для отримання іммобілізованих ферментів.
  5. Перерахуйте найбільш поширені носії з класу вуглеводів, відомі вам.
- Назвіть основні переваги і недоліки білків, при використанні їх в якості носіїв для іммобілізації ферментів.

### *Питання для самоперевірки*

1. Охарактеризуйте способи іммобілізації клітин і ферментів.
2. Наведіть приклади успішного застосування іммобілізованих клітин і ферментів в практиці.
3. Опишіть переваги та недоліки іммобілізації клітин і ферментів в порівнянні з використанням бактеріальних культур і очищених ферментів.

### **9. Контроль і управління біотехнологічним і процесами**

В даний час в реакторі великої ємності при вирощуванні клітин прокаріотів і еукаріотів контролюється не менше 22 параметрів. Це коефіцієнт заповнення, потужність мішалки, швидкість обертання мішалки, редок-потенціал, кількість розчиненого кисню, кількість розчиненого CO<sub>2</sub>, виявлення піни, регулювання піноутворення, споживання глюкози, азоту, кількість біомаси, температура, швидкість потоку газу, швидкість доповнення поживних речовин, тиск, в'язкість, рН, відбір культуральної рідини, ферментативна та антибіотична активність, визначення ДНК, РНК, АТФ. На невеликих біореакторах число контрольованих параметрів значно менше; в основному це температура, рН, подача стерильного повітря і кількість клітин або метаболіту.

Контроль і управління біотехнологічними процесами істотно залежать від режиму культивування. Наприклад, при культивуванні одноклітинних культур в глибинних умовах періодичного режиму вони пройдуть всі фази свого розвитку. Тому продукція будь-якого вторинного метаболіту буде не рівнозначної в ту чи іншу фазу розвитку продуцента. У безперервному режимі клітини знаходяться в основному в одній певній фазі. Тобто контроль і управління повинно проводитися відповідно за морфо-функціональними особливостями продуцента.



**9.1. Системи GLP, GCP і GMP. GLP – (Good Laboratory Practice) –** добра лабораторна практика – правила організації лабораторних випробувань. **GCP – (Good Clinical Practice) –** добра клінічна практика – правила організації клінічних випробувань. **GMP – (Good Manufacturing Practice) –** добра виробнича практика – правила організації виробництва і контролю якості лікарських засобів, це єдина система вимог до виробництва та контролю.

*GLP - правила організації лабораторних досліджень.*

Новий лікарський засіб спочатку проходить лабораторні випробування, перш ніж приступати до проведення клінічних випробувань.

Лабораторні випробування (в пробірці, в природних умовах) проводяться на клітинах, безклітинних системах і тваринах. При випробуванні на тваринах можна отримати різні результати, тому важлива правильна організація досліджень. Тварини повинні бути гетерогенні (різні), корм повинен бути постійним, однаковим; потрібне певне планування віварію, щоб виключити стрес у тварин; тварини повинні бути життєздатні.

*GCP – правила організації клінічних випробувань.*

Лікарський засіб допускається до клінічних випробувань тільки після проведення лабораторних випробувань.

В правилах GCP викладені права хворих і добровольців:

- піддослідні повинні бути поінформовані про те, що їм вводиться новий лікарський препарат і про його властивості;
- хворі мають право на фінансову винагороду;
- за ходом випробувань здійснюється контроль з боку медиків.

В Європі, Сполучених Штатах Америки (США) і Україні введені громадські комітети з контролю за клінічними випробуваннями лікарських препаратів. У ці комітети входять священики, представники міліції і прокуратури, медичної громадськості, які спостерігають за випробуваннями лікарських препаратів. Мета клінічних випробувань – отримання достовірних результатів: ліки лікують, вони безпечні і т.д.

*GMP – правила організації виробництва –* це єдина система вимог з контролю якості лікарських засобів з початку переробки сировини до виробництва готових препаратів, включаючи загальні вимоги до приміщень, обладнання та персоналу. З 1975 р. ці правила GMP стосуються різних хімічних і біологічних речовин, ветеринарних препаратів, вихідних матеріалів для використання у дозованих формах, а також інформації про безпеку та ефективність перерахованих речовин, матеріалів і препаратів.

Правила GMP мають 8 розділів:

I. Термінологія.

II. Забезпечення якості.

III. Персонал.

IV. Будинки й приміщення.

V. Обладнання.

VI. Процес виробництва.

VII. Відділ технічного контролю (ВТК).

### VIII. Валідація (затвердження).

Дотримання правил GMP забезпечує випуск якісних продуктів і гарантує благополуччя споживачів.

#### **9.2. Біотехнологія та біобезпека**

*Біобезпека* – це захищеність людини і навколишнього середовища від шкідливого впливу різних біологічних сполук, що містяться в природних або генно-інженерно-модифікованих біологічних об'єктах і отриманих з них продуктів. Біобезпека важлива не тільки для людини, але і для рослин, тварин і корисних мікроорганізмів.

Ризики, пов'язані з ГМО або продуктами, що їх містять, повинні розглядатися в контексті ризиків, що існують за використання інтактних реципієнтних організмів у потенційному приймаючому середовищі. Адже потенційно небезпечними для здоров'я людини і навколишнього середовища можуть бути і сорти, породи, штами організмів, виведені за допомогою традиційної селекції. Для того, щоб вичленувати ефект саме генетичної модифікації, необхідно порівнювати генетично модифікований організм з вихідним, звичайним сортом.

Загальна методика оцінки ризиків можливих несприятливих ефектів ГМО передбачає такі етапи:

- виявлення будь-яких нових генотипових і фенотипових характеристик, пов'язаних з присутністю трансгенів, які можуть викликати несприятливу дію ГМО на здоров'я людини і навколишнє середовище;
- оцінювання ймовірності виникнення несприятливих наслідків виходячи з інтенсивності, тривалості і характеру впливу генетично модифікованого організму на людину або на потенційно приймаюче середовище;
- оцінювання наслідків у разі, коли така несприятлива дія дійсно матиме місце;
- оцінювання сукупного ризику, що викликається ГМО, на основі визначення ймовірності виникнення і наслідків виявлених несприятливих ефектів;
- здійснення рекомендацій щодо визначення, чи є ризики припустимими або регульованими, включаючи, якщо це необхідно, визначення стратегій для регулювання таких ризиків.

Можливі такі несприятливі ефекти ГМО на навколишнє середовище:

- руйнівна дія на біологічні співтовариства і втрата цінних біологічних ресурсів внаслідок засмічення місцевих видів генами, що перенесені від генетично модифікованих організмів;
- створення нових паразитів, перш за все бур'янів, і посилення шкідливості тих видів, що вже існують, на основі самих ГМО або в результаті перенесення трансгенів іншим видам;
- утворення речовин – продуктів трансгенів, які можуть бути токсичними для організмів, що живуть або харчуються на генетично

модифікованих організмах, і не є мішенями трансгенних ознак (наприклад, бджіл, інших корисних видів, що охороняються);

– несприятлива дія на екосистеми токсичних речовин, похідних неповного руйнування небезпечних хімікатів, наприклад, гербіцидів (значна кількість ГМО, що створюють на даний час – форми, стійкі до гербіцидів).

### ***Питання для самоперевірки***

1. Які параметри контролюються в реакторі великої ємності при вирощуванні клітин прокаріотів і еукаріотів?
2. Від чого залежить контроль і управління біотехнологічними процесами?
3. Які існують правила організації випробувань?
4. В чому полягають правила організації лабораторних досліджень *GLP*?
5. В чому полягають правила організації клінічних досліджень *GCP*?
6. В чому полягають правила організації виробництва *GMP*?
7. Що таке «біобезпека»?
8. Які етапи передбачає загальна методика оцінки ризиків можливих несприятливих ефектів ГМО?
9. Які можливі несприятливі ефекти ГМО на навколишнє середовище?
10. В чому полягає основна мета Картахенського протоколу з біобезпеки?
11. Яке державне регулювання безпеки генно-інженерної діяльності існує в Україні?

## **10. Виробництво білка одноклітинних. Багатотоннажне мікробіологічне виробництво ферментних препаратів**

Продовольча білкова проблема як у глобальному, так і національному масштабах залишається найбільш актуальною, досить складною. Актуальність розв'язання її зростає не тільки у зв'язку з щорічним ростом чисельності населення на 75 млн чоловік, а й із зростаючими вимогами медичної науки щодо якості харчування. Йдеться про доступність білковмісних продуктів харчування, перш за все, для найменш захищених категорій населення. Жодна країна у світі ще не розв'язала продовольчу білкову проблему в повному обсязі та асортименті. У світі 980 млн людей голодує або недоїдає.

Якщо прийняти середню норму споживання білка однією людиною за 100 г/добу (з коливаннями від 70 до 120 г і більше залежно від віку, роду занять і ін.), то річна потреба в ньому становитиме 36,5 кг. Фактичне споживання білка однією людиною складає: у світі – 27,5 кг (75,3% від норми), в країнах Північної Америки – 36,9 кг (101,1%), Європи – 36,6 кг

(100,3%), Океанії і Австралії – 34,8 кг (95,3%), Південної Америки – 28,1 кг (77%), Азії – 25,5 кг (69,9%), Африки – 22,3 кг (61,1%).

Дефіцит білка в харчуванні населення у середньому у світі становит 56,1 млн т, або 25%, в Україні – 255 тис.т. Виникає дефіцит білка через виробництво і споживання середньо- і низькобілкових джерел його надходження, ліквідується – за рахунок включення до раціону високобілкових. Навіть в економічно розвинених країнах і на тих континентах, де рівень споживання білка досить високий, значна кількість людей недоїдає, має низький рівень його споживання.

Якщо рослини і більшість мікроорганізмів здатні синтезувати всі білкові амінокислоти з вуглекислоти, води, аміаку і мінеральних солей, то людина і тварини не можуть синтезувати деякі амінокислоти (валін, лейцин, ізолейцин, лізин, метіонін, треонін, триптофан і фенілаланін), які називають незамінними.

**10.1. Виробництво білка одноклітинних.** Особливий інтерес представляє використання мікроорганізмів як джерело білка і вітамінів при виробництві харчових продуктів. Перспектива і економічна доцільність використання мікроорганізмів в технології виробництва харчових продуктів диктуються рядом факторів:

- 1) можливістю використання найрізноманітніших хімічних сполук, у тому числі відходів виробництва, для культивування мікроорганізмів;
- 2) високою інтенсивністю синтезу білків;
- 3) нескладною технологією культивування мікроорганізмів, яке можна здійснювати цілодобово і в усі сезони року;
- 4) відносно високим вмістом білка і вітамінів, а також вуглеводів, ліпідів в продуктах на основі мікробів;
- 5) підвищеним вмістом незамінних амінокислот порівняно з рослинними білками (табл. 6);

Таблиця 6

**Вміст незамінних амінокислот в білках деяких мікроорганізмів (г на 100 г білка)**

Амінокислота	Мікроорганізми				
	дріжджі	водорості	бактерії	гриби	актиноміцети
Валін	5-7	5-7	4-6	5-7	5,5
Лейцин	6-9	6-10	5-11	6-9	7,7
Ізолейцин	4-6	4-7	5-7	3-6	5,3
Треонін	4-6	3-6	4-5	3-6	4
Метіонін	1-3	1,5-2,5	2-3	2,5	1,3
Лізин	6-8	5-10	6-7	3-7	6,4
Фенілаланін	3-5	3-5	3-4	3-6	5
Триптофан	1-1,5	до 2	1,5	1,5-2	1,4

б) можливістю спрямованого генетичного впливу на хімічний склад мікроорганізмів з метою вдосконалення білкової і вітамінної цінності продукту.

Використання білка мікробного походження для виготовлення харчових продуктів дозволяє економити високоцінні тваринні і рослинні білки, а також підвищувати біологічну цінність готового продукту.

Найбільш перспективний мікробіологічний синтез, що впливає з представлених нижче даних. Якщо для великої рогатої худоби потрібно 5 років для подвоєння білкової маси, для свиней – 4 міс, для курчат – 1 міс, то для бактерій і дріжджів – 1-6 год. Світове виробництво харчових білкових продуктів за рахунок мікробного синтезу становить більше 15 млн. т на рік.

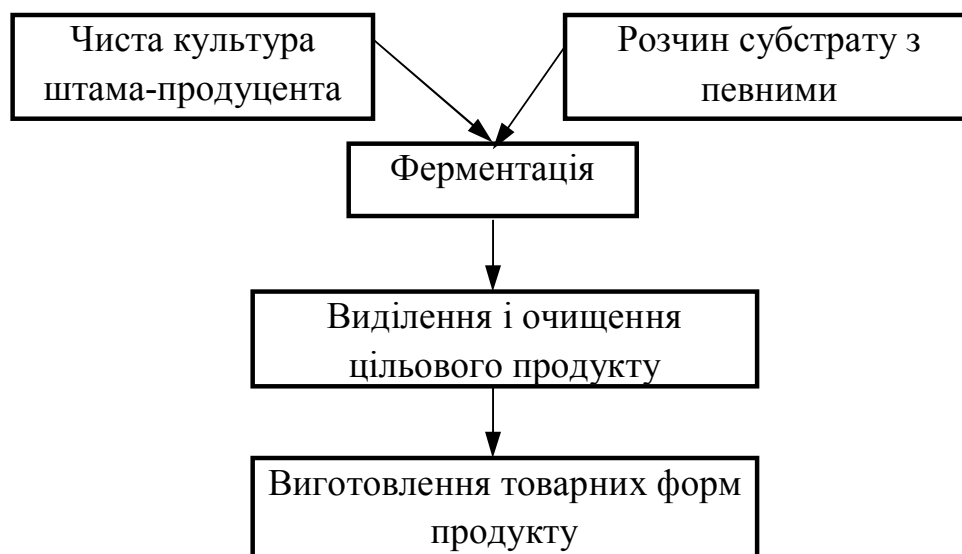
Як джерела кормового білка частіше використовують різні види дріжджів і бактерій, мікроскопічні гриби, одноклітинні водорості, білкові коагуляти трав'янистих рослин.

Мікроорганізми здатні засвоювати різні вуглеводовмісні субстрати, які прийнято підрозділяти на декілька поколінь:

- перше покоління – вуглеводи;
- друге покоління – рідкі вуглеводні;
- третє покоління – оксидати вуглеводнів, газоподібні вуглеводні, вуглекислий газ, включаючи суміші воднем.

Незалежно від виду використаної сировини, типова схема мікробіологічного виробництва білка передбачає п'ять операцій: підготовка сировини, підготовка біологічно діючого першоджерела, стадія ферментації, виділення і очищення цільового продукту, приготування товарних форм продуктів (рис. 10).

Велике значення має якість вихідного посівного матеріалу (інокуляту). Інокулят отримують з музейної культури в декілька стадій із застосуванням принципу масштабування.



**Рис. 10.** Схема біотехнологічного процесу

Підготовлені інокуляти, основний ростовий субстрат і всі необхідні поживні компоненти разом з повітрям додають у ферментер, в якому відбувається основна стадія біотехнологічного процесу – ферментація.

Стадія ферментації проводиться відповідно до технологічного регламенту, розробленого для конкретного процесу, включаючи субстрат і тип продуцента. Вона зводиться до дозованого надходження у ферментер потоків поживних речовин і повітря (або газової суміші), стабілізації основних параметрів процесу на заданих рівнях і своєчасного відведення з апарату відпрацьованого повітря, продуктів, що утворюються, а також тепла.

Максимальні швидкості синтезу білкових речовин мікробними клітинами реалізуються за оптимальних умов середовища, коли питома швидкість росту близька до максимальної. Тому для отримання білка одноклітинних біотехнологічних процесів реалізують в проточному режимі, що дозволяє стабілізувати практично всі параметри стадії ферментації на рівнях, оптимальних для розмноження клітин з швидкостями росту, близькими до максимальних, тобто в режимі білкової спрямованості біосинтезу. За виробництва біомаси як кормового білкового продукту, як правило, здійснюється режим незахищеної ферментації, тобто без дотримання правил стерильності.

Отримувана на стадії ферментації суспензія з 1,0...2,5% вмістом мікробної біомаси за сухою речовиною (АСР), тобто 10...25 кг/м<sup>3</sup>, на стадії постферментації піддається згущуванню у декілька етапів до 12...16% АСР і термообробці, під час якої протягом 10...40 хвилин за температури 75...90°C практично всі клітини штаму-продуцента і супутня мікрофлора гинуть. Після стадії термообробки суспензію у вакуумвипарувальних установках згущують до концентрації 20...25% АСР і далі висушують до залишкової вологості кінцевого продукту близько 10%. Дрібнодисперсний порошок висушених клітин гранулюють. Порошок або грануляти фасують по 25...30 кг і затарюють у багатошарові паперові мішки.

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

### ***10.2. Мікробіологічне виробництво ферментних препаратів.***

Ферменти (ензими) – каталізатори білкової природи, які утворюються і функціонують у всіх живих організмах. Ферменти не змінюються і не витрачаються в процесі реакції, прискорюють тільки ті реакції, які можуть протікати і без них. Швидкість протікання реакції за участю ферментів на кілька порядків вище, ніж під впливом хімічних каталізаторів. Для ферментативних реакцій характерний майже 100% вихід продуктів. Ферменти мають вузьку специфічність, діють тільки на ті ж речовини, перетворення яких вони каталізують. В даний час в природі виявлено понад три тисячі ферментів.

Більшість біотехнологій засновано на використанні біокаталізаторів, потреба в яких постійно зростає. Єдиним, необмеженим джерелом ферментів є мікроорганізми, з яких можна виділити будь-які з відомих нині ферментів. Виняток становить папайн (розм'ягшувач м'яса), який отримують з плодів папайї. Продуктивність штамів мікроорганізмів, які виробляють ферменти, можна збільшити за допомогою мутагенних чинників в 2-5 разів. Пересадкою плазмид отримують кількість ферментів, яка досягає 50% маси білка, що створюється.

Ферменти, що синтезуються мікроорганізмами, підрозділяються на позаклітинні і внутрішньоклітинні. До позаклітинних ферментів відносяться амілаза, целюлаза, лактаза, ліпаза, пектиназа, протеаза, до внутрішньоклітинних – аспарагіназа, каталаза, інвертаза.

Позаклітинні ферменти отримують з культуральної рідини, попередньо обробленої від мікроорганізмів. Для виділення внутрішньоклітинних ферментів руйнують клітинні оболонки за допомогою механічних, фізичних, хімічних (дія кислот, розчинників), ферментативних і біологічних методів.

Склад і кількість синтезованих клітинами ферментів залежить від спадкових властивостей даного організму. Під дією мутагенних факторів (іонізуюче та неіонізуюче випромінювання, ізотопи, антибіотики, хімічні сполуки, що володіють високою перетворюючою здатністю по відношенню до спадкових елементів клітини), отримують промислово цінні штами мутантів.

Продуктивність технологічних процесів по кожному ферменту залежить і від живильного середовища і від речовин, що грають роль індукторів або репресорів біосинтезу даного конкретного ферменту або їх груп. Наприклад, фермент ліпаза майже не синтезується грибом на середовищі без індуктора, внесення кашалотового жиру посилює біосинтез ферменту в сотні разів. Цей же вид гриба при додаванні в середу крохмалю і повному виключенні мінерального фосфору інтенсивно синтезує другий фермент – фосфатазу.

Для інтенсифікації процесу зростання і синтезу ферментів часто додають всілякі витяжки або екстракти, що містять додаткові чинники зростання. До них відносяться, перш за все, амінокислоти. Вони легко проникають всередину клітини і специфічно впливають на утворення ферменту. Механізм їх дії полягає в компенсації відсутніх вільних внутрішньоклітинних амінокислот, необхідних для синтезу ферменту. Факторами зростання є також пуринові основи і їх похідні, РНК і продукти її гідролізу. Усі розглянуті фактори повинні враховуватися при складанні поживних середовищ для культивування продуцентів ферментів. У промислових середовищах в якості джерел органічного вуглецю та азоту найчастіше використовують різні сорти крохмалю (картопляний, кукурудзяний, рисовий), кукурудзяний екстракт, соєве борошно і т.і. Мікроорганізми для свого зростання можуть утилізувати і мінеральні сполуки азоту, які перетворюються в аміак, необхідний для синтезу складних азотовмісних органічних сполук.

Оптимальний склад живильного середовища для кожного продуцента може бути визначений двома способами: методом емпіричного підбору і з використанням математичних методів оптимізації (ЕОМ).

Всі технологічні процеси виробництва ферментних препаратів діляться на дві принципово відмінні групи: в першому випадку ферментація ведеться глибинним методом в рідкому живильному середовищі, у другому використовується поверхнева культура, зростаюча на спеціально підготовленій пухкому і зволоженому живильному середовищі.

*Глибинний метод культивування продуцентів ферментів.* Глибинний метод культивування полягає у вирощуванні мікроорганізмів в рідкому живильному середовищі. Він технічно більш досконалий, ніж поверхневий, так як легко піддається механізації і автоматизації.

Весь процес повинен проводитися в строго асептичних умовах, що з одного боку, є перевагою методу, а з іншого – становить найбільшу технічну трудність, оскільки порушення асептики часто призводить до припинення утворення ферменту.

Концентрація ферменту в середовищі при глибинному культивуванні зазвичай значно нижче, ніж у водних екстрактах поверхневої культури. Фільтрати культуральних рідин містять не більше 3% сухих речовин. Це викликає необхідність попереднього концентрування фільтратів перед тим, як виділяти ферменти будь-яким методом.

При глибинному культивуванні продуцентів ферменти виділяють, як і в будь-якому біотехнологічному процесі, 5 етапів.

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

2. Отримання посівного матеріалу. Для засіву живильного середовища матеріал готують також глибинним методом. Вид його залежить від продуцента: для грибів це міцеліальна вегетативна маса, для бактерій – молода зростаюча культура на початкової стадії спороутворення. Отримання посівного матеріалу полягає в збільшенні маси продуцента в 3...4 стадії. Обсяг посівного матеріалу залежить від фізіологічних особливостей продуцента.

3. Виробниче культивування. Біосинтез ферментів в глибинній культурі протікає протягом 2...4 діб при безперервній подачі повітря і перемішуванні. Висока концентрація поживних речовин на перших етапах може гальмувати ріст біомаси продуцента, тому часто свіжу середу або деякі її компоненти



вводяться в ферментер на стадії активного зростання. Температурний оптимум знаходиться в інтервалі 22...32°C. В сучасних технологічних процесах ведеться безперервне автоматичне визначення вмісту в середовищі вуглеводів, кількості метаболітів, що створилися, і концентрації клітин. Дані надходять в комп'ютер, який визначає стратегію корекції процесу і автоматично регулює його. Цим досягається максимальна продуктивність і найкраща якість продуктів.

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

5. Отримання товарної форми.

*Поверхневий метод культивування продуцентів ферментів.* Культура росте на поверхні твердого зволоженого живильного середовища. Міцелій повністю обволікає і міцно скріплює тверді частинки, клітини отримують живлення за рахунок речовин, що містяться в цих середовищах, і використовують для дихання кисень повітря, тому для їх нормального забезпечення киснем доводиться застосовувати пухкі за своєю структурою середовища з невеликою висотою шару.

Недоліком методу є необхідність великих площ для вирощування. Вирощування виробничої культури відбувається зазвичай в неасептичних умовах. Однак середа та кювети повинні бути надійно стерилізовані. Перед новим завантаженням повинні дезінфікуватися камери для зрошування, а також все дрібне обладнання та інвентар.

Переваги поверхневої культури: значно більш висока кінцева концентрація ферменту на одиницю масу середовища (при оцукрюванні крохмалю 5 кг поверхневої культури замінюють 100 кг культуральної рідини), поверхнева культура відносно легко висушується, легко переводиться в товарну форму.

Посівний матеріал може бути трьох видів:

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

В три етапи отримують і посівну культуру. Спочатку музейну культуру продуцента пересівають на 1,0...1,5 г зволжених стерильних пшеничних висівок в пробірку і вирощують в термостаті до рясного споруутворення. Другий етап – аналогічно, але в колбах, третій – в судинах з 500 г середовища.

Основу живильного середовища становлять пшеничні висівки, як джерело необхідних поживних і ростових речовин. Крім того, вони створюють необхідну структуру середовища. Для підвищення активності ферментів до висівок можна додавати буряковий жом, соєвий шрот, крохмаль, рослинні відходи. Стерилізують середу гострим паром при помішуванні (температура – 105...140°C, час 60...90 хвилин). Після цього

середу засівають і розкладають рівним шаром у стерильних кюветах. Кювети поміщають в камери для зрощування. Культивують протягом 36...48 годин.

Зростання поділяється на три періоди, приблизно рівних за часом. Спочатку відбувається набухання конідій і їх проростання (температура не нижче 28°C), потім зростання міцелію у вигляді пушки сірувато-білого кольору (необхідно відводити тепло, що виділяється) та утворення конідій. Для створення сприятливих умов росту і розвитку продуцента необхідна аерація і підтримання оптимальної вологості (55...70%).

Культура, що зросла в нерухомому шарі при поверхневому культивуванні, представляє корж із набряклих часток середовища, щільно пов'язаних зрошеним міцелієм. Масу роздрібнюють до гранул 5...5 мм. Культуру висушують до 10...12% вологості при температурах не вище 40°C, не довше 30 хвилин. Іноді препарат застосовують прямо в неочищеному вигляді – у шкіряній та спиртової промисловості. У харчовій і особливо медичній промисловості використовуються ферменти тільки високого ступеня очищення.

Схема очищення зводиться до наступного:

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

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

Стандартизація ферментного препарату – доведення активності ферменту до стандартної, відповідної вимогам ДСТУ. Для цього використовуються різні нейтральні наповнювачі – крохмаль, лактоза та ін.

### ***Питання для самоперевірки***

1. Які існують нетрадиційні джерела білка?
2. Вкажіть сировинні джерела для синтезу мікробного білка.
3. Які види сировини крім рослинних гідролізатів використовуються для одержання кормових дріжджів?
4. Чому доцільне використання мікроорганізмів в технології виробництва харчових продуктів?
5. Які розрізняють вуглеводомісні субстрати?
6. В чому полягає принципова технологічна схема вирощування кормової біомаси?
7. Що є джерелом ферментів?
8. Які ферменти належать до позаклітинних?
9. Які ферменти відносяться до внутрішньоклітинних?
10. В чому полягає глибинний метод культивування продуцентів ферментів?

11. Перерахуйте етапи глибинного культивування продуцентів ферментів.
12. На чому заснований поверхневий метод культивування продуцентів ферментів?
13. В чому полягають переваги поверхневої культури продуцентів ферментів?
14. Вкажіть етапи очищення ферментів для харчовій і медичної промисловості.

### **11. Багатотоннажне мікробіологічне виробництво амінокислот і органічних кислот**

Щорічно у світі виробляється більше 800 000 т амінокислот вартістю понад 5 млрд доларів. У промисловому масштабі амінокислоти одержують шляхом екстракції з білкових гідролізатів або як продукти метаболізму бактерій *Corynebacterium* або *Brevibacterium*.

До складу живих організмів входить більш ніж 150 амінокислот, 20 з яких є структурними компонентами білків. Приклади використання амінокислот наведено в табл. 8.

Загалом 66% амінокислот використовують для виготовлення кормів, 31% – у харчовій промисловості, 3% – у медицині, косметології, хімічних синтезах.

Таблиця 8

#### **Застосування амінокислот**

<b>Амінокислота</b>	<b>Застосування</b>
Аланін	Підсилювач смаку й аромату
Аргінін	Лікування захворювань печінки
Аспарагін	Діуретик
Аспарагінова кислота	Синтез заміників цукру, підсилювач смаку
Валін	Розчини для ін'єкцій
Гістидин	Лікування виразок, антиоксидант
Гліцин	Синтез заміників цукру
Глютамін	Лікування виразок
Глютамінова кислота	Розчини для ін'єкцій
Ізолейцин, лейцин	Підсилювач смаку й аромату
Лізин	Кормова і харчова добавки
Метіонін	Кормова добавка
Пролін	Розчини для ін'єкцій
Серин	Косметична промисловість
Тирозин	Розчини для ін'єкцій
Треонін	Кормова добавка
Триптофан	Розчини для ін'єкцій, антиоксидант
Фенілаланін	Синтез заміників цукру
Цистеїн	Антиоксидант, випікання хліба

У найбільшій кількості (60% від загального обсягу одержання амінокислот) виробляються такі амінокислоти: глютамінова кислота, метіонін, лізин і гліцин. Щорічно у світі мікробіологічним способом одержують 500 000 т глютамінової кислоти і 180 000 т лізину.

Незамінні амінокислоти (лізин і метіонін) використовують як добавку до рослинних кормів. У тваринних білках міститься 7...9% лізину, а в білках пшениці – 3%. Додавання до кормів 0,3% лізину скорочує витрати на 20%. Підраховано, що 1 т лізину заміняє 75 т зерна, 5 т рибної муки або 9 т соєвого шроту, що забезпечує додаткове утворення 10 т м'яса.

Основним продуцентом лізину є *Corynebacterium glutamicum*.

На основі *E.coli* був створений промисловий штам мікроорганізмів, що синтезують треонін. Додавання треоніну до рослинних кормів значно підвищує продуктивність сільськогосподарських тварин.

У харчовій промисловості амінокислоти використовують як ароматичні і смакові агенти. Гліцин має солодкий смак, тому його додають у солодкі напої. Також він володіє бактеріостатичною дією. Цистеїн покращує процеси випікання хліба та його якість. На основі глютамінової кислоти одержують глютамат натрію, що використовується як підсилювач смаку під час виготовлення приправ.

У медицині амінокислоти використовують для лікування деяких захворювань. Аргінін у комплексі з аспарагіновою або глютаміновою кислотами, К-Na-аспарат застосовуються під час лікування захворювань печінки. Фенілаланін і дигідроксифенілаланін ефективні при лікуванні хвороби Паркінсона. Цистеїн захищає SH-групи ферментів від окиснення, має детоксикуючу дію. З поліамінокислот отримують шовний матеріал для хірургії.

На основі амінокислот одержують замінник цукру аспартам (метиловий ефір L-аспартил-L-фенілаланіну). Аспартам – дипептид, що складається з аспарагінової кислоти і фенілаланіну. Аспартам у 150 разів солодший за глюкозу.

Ще один замінник цукру містить у своєму складі амінокислоти. Англійські біохіміки з плодів африканського куща *Dioscorephyllum cumminsii* *Diels* виділили білок, що у 100 000 разів солодший за цукор. Уведення гена цього білка у клітини *E.coli* дозволило одержати замінник цукру мікробіологічним шляхом.

### **11.1. Виробництво амінокислот**

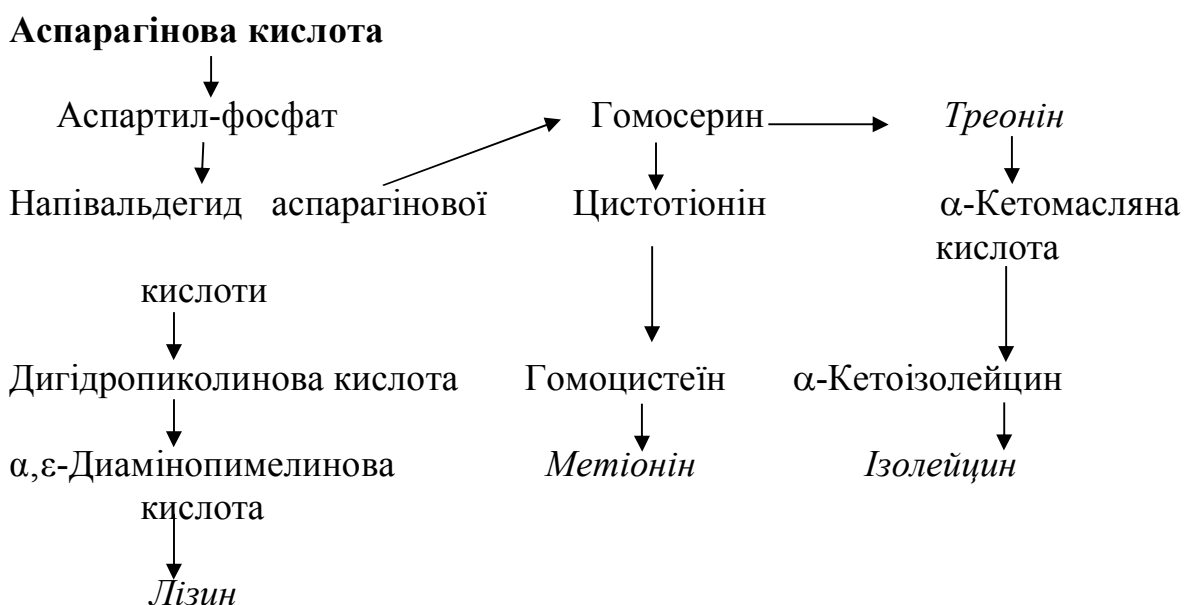
*Треонін*, а також лізин і метіонін відносяться до сімейства аспарагінової кислоти. У клітинах бактерій спочатку синтезується аспарагінова кислота, а потім на її основі синтезуються треонін, метіонін і лізин (тому вони і об'єднані в сімейство аспарагінової кислоти).

Синтез кожної з цих амінокислот здійснюється в кілька етапів з утворенням проміжних сполук. Кожен з цих етапів каталізується білком-ферментом, синтез якого контролюється (кодується) відповідним геном, в нуклеотидної послідовності якого записана структура цього білка.

Перша реакція синтезу цих амінокислот – перетворення аспарагінової кислоти в аспартил-фосфат (АФ) під впливом ферменту аспартокінази (АК).

Наступний етап – перетворення аспартил-фосфату (АФ) в напівальдегід аспарагінової кислоти (НААК-проміжна сполука). Цю реакцію каталізує фермент дегідрогеназа напівальдегіда аспарагінової кислоти (ДГГ). Ген, що контролює синтез цього ферменту, локалізується в іншій ділянці хромосоми і називається ASD. Під впливом ферменту гомосериндегідрогенази (ГСДГГ), що кодується геном треонін А-2, синтезується гомосерин (ГС), який є попередником для синтезу треоніну і метіоніну. В свою чергу гомосерин під впливом ферменту гомосеринкінази (ГСК) перетворюється в гомосерин-фосфат (ГСФ) (ген, який кодує цю реакцію, – треонін В). І, нарешті, гомосерин-фосфат під впливом ферменту треонін-синтетази (ТС) перетворюється в треонін. Ген, який кодує утворення (синтез) цього ферменту, – треонін С.

При додаванні в середу пирувату з треоніну утворюється ізолейцин. Всі структурні гени в хромосомі кишкової палички розташовані в певній послідовності в загальній регуляторній області, яка включає промотор і так званий аттенуатор – регуляторний елемент, який сприймає сигнали зворотного зв'язку.



Необхідно підкреслити, що синтез треоніну відбувається одночасно з ростом біомаси і після зупинки її росту синтез треоніну сповільнюється і поступово припиняється.

Регулюється біосинтез треоніну в клітинах кишкової палички таким чином: коли треонін в клітинах бактерій накопичується в кількості більшій, ніж його потрібно для метаболічних процесів і синтезу білка, і з'являється у вільному стані, – він пригнічує активність ферменту аспартокінази.

Фермент аспартокіназа – алостеричний фермент, що має крім активного центру ще один, так званий алостеричний центр, який може взаємодіяти з низькомолекулярними ефекторами. І таким ефектором в

даному випадку є треонін. Приєднання до алостеричного центру треоніну змінює конформацію аспартокінази, в результаті чого активний центр стає недоступним для субстрату, і фермент втрачає активність.

В свою чергу пригнічення активності аспартокінази веде до припинення синтезу аспартил-фосфату і, відповідно, припиняється синтез усіх проміжних сполук шляху біосинтезу треоніну.

Коли одного механізму виявляється недостатньо і треонін продовжує накопичуватися в надлишку, у кишкової палички включається ще один механізм регуляції біосинтезу – репресія. При цьому, якщо треонін накопичується в надлишку, він перетворюється в ізолейцин, який, в свою чергу, також накопичується в надлишку. В той момент, коли треонін і ізолейцин накопичуються в надлишку одночасно, вони опосередковано взаємодіють з атенюатором і пригнічують транскрипцію, викликаючи її термінацію. В цьому випадку синтез усіх білків-ферментів даного синтетичного шляху припиняється.



**Рис. 11. Схема біосинтезу лізину, метіоніну і треоніну в клітинах мікроорганізмів (за Т.А.Єгорової та ін., 2003). Пунктир вказує інгибування за принципом зворотного зв'язку.**

У промисловому виробництві лізину в даний час використовується штам-суперпродуцент коринебактерій. Тривалість ферментації 2...3 доби. Рівень накопичення цільового продукту становить 50..100 г/л. Коринебактерії є грамозитивними, більш давніми в еволюційному відношенні мікроорганізмами, відрізняються від грамнегативної кишкової палички також тим, що у них дуже низька активність внутрішньоклітинних протеїназ, тому синтезовані клітиною білки-ферменти довго залишаються в активному стані.

У штамі коринебактерії існує тільки один механізм регуляції біосинтезу за принципом зворотного зв'язку – спільне (узгоджене)

ретроінгибування активності аспартокінази. Це єдиний фермент, активність якого регулюється спільно треоніном і лізином. Коли треонін і лізин одночасно надлишкове накопичуються в клітині, вони разом приєднуються до алостерічного центру; в результаті, активність аспартокінази пригнічується, і цей біосинтетичний шлях блокується.

Отже, синтез лізину контролюється треоніном і лізином, а щоб отримати штам-суперпродуцент лізину, потрібно «вилучити» треонін, так як треонін і лізин, перебуваючи в надлишку, пригнічують активність аспартокінази. Тому потрібно блокувати синтез треоніну. Для цього необхідно отримати мутацію, що блокує цей ген, але в цьому випадку в живильне середовище необхідно додавати чистий треонін (так як більшість продуцентів лізину нездатні синтезувати гомосерин або треонін – вони є «ауксотрофами» по цих амінокислотах).

Якщо блокувати в іншому місці ланцюга біосинтезу, то мутант потребує метіонін і треонін, тоді в середовище додають гомосерин. Якщо додати в середу треонін і метіонін в обмеженій кількості, то штам буде рости доти, поки вони не будуть витрачені, але в клітинах цього штаму будуть присутні також ферменти, необхідні для синтезу лізину, які тривало зберігаються в клітинах коринебактерій в активному стані. І штам почне синтезувати лізин, тобто синтез лізину штамом коринебактерії здійснюватиметься, тільки коли вичерпано треонін. Експериментально підбирають таку кількість треоніну і метіоніну, яка при внесенні в живильне середовище забезпечує максимальний синтез лізину. Як тільки треонін зникає з середовища і зростання біомаси припиняється, починається активний синтез лізину. Таким чином, даний процес має дві стадії розвитку: зростання біомаси і синтез лізину.

### **11.2. Отримання харчових кислот за допомогою мікроорганізмів.**

Харчовими прийнято називати 4 органічні кислоти: лимонну, молочну, оцтову і винну. Іноді до них зараховують яблучну і глютамінову. Перші три харчові кислоти отримують за допомогою мікробного синтезу. Винну кислоту також можна отримувати цим способом, проте до цих пір цю органічну кислоту вигідно отримувати хімічним шляхом з винного каменю.

Отримання органічних кислот за допомогою мікроорганізмів почалося в 20-30 рр. ХХ століття. Харчові кислоти до цього виділяли в обмеженій кількості з природних джерел. Лимонну кислоту – з соку лимонів, винну – з винного каменю (відходу виноробного виробництва).

Сучасне виробництво органічних кислот, існуюче в більшості розвинених країн, засноване на використанні як продуцентів різних штамів цвілевих грибів, найчастіше роду *Aspergillus*. За допомогою мікроорганізмів можливе отримання більше 50 різних органічних кислот: лимонної, оцтової, ітаконової, глюконової (аеробною ферментацією), молочної та пропіонової (анаеробним способом). Всі органічні кислоти є проміжними або кінцевими продуктами катаболізму вуглеводів. Основним механізмом регуляції їх утворення є лімітування росту продуцента факторами середовища.

*Отримання лимонної кислоти.* Лимонна кислота ( $C_6H_8O_7$ ) – триосновна оксикислота, широко поширена в природі, відносно багато її міститься в деяких ягодах, фруктах, особливо в цитрусових (в лимоні 5-10%), в листках і стеблах деяких рослин.

Раніше лимонну кислоту виділяли у вигляді лимоннокислого кальцію з продуктів переробки листя бавовнику, стебел махорки, хвої ялини і в значних кількостях з плодів лимонів. Однак це виробництво є вкрай дорогим і невеликим за обсягом. Тому лимонна кислота була дефіцитним і дорогим продуктом.

В даний час лимонна кислота за обсягом виробництва є одним з головних продуктів мікробного синтезу, її загальний випуск в різних країнах сягає до 400 тис. тонн на рік.

На початку ХХ століття рядом дослідників було відмічено, що деякі цвілеві гриби мають здатність утворювати помітні кількості органічних кислот. В подальшому шляхом відбору і спрямованої селекції були виділені активні продуценти органічних кислот.

Для отримання лимонної кислоти використовують мікроскопічні гриби родів *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Ustina* та ін. В даний час основними продуцентами лимонної кислоти є різні штами гриба *Aspergillus niger*, які відрізняються великою швидкістю росту, легкістю культивування та високим виходом лимонної кислоти по відношенню до маси вуглеводу, що окислюється, стійкістю до зовнішніх впливів. Спори грибів для отримання лимонної кислоти зберігають тільки в сухому вигляді.

Утворення лимонної кислоти здійснюється в циклі трикарбонових кислот в результаті конденсації оксалоацетату і ацетил КоА за участю ферменту цитрат-синтетази (рис. 12).

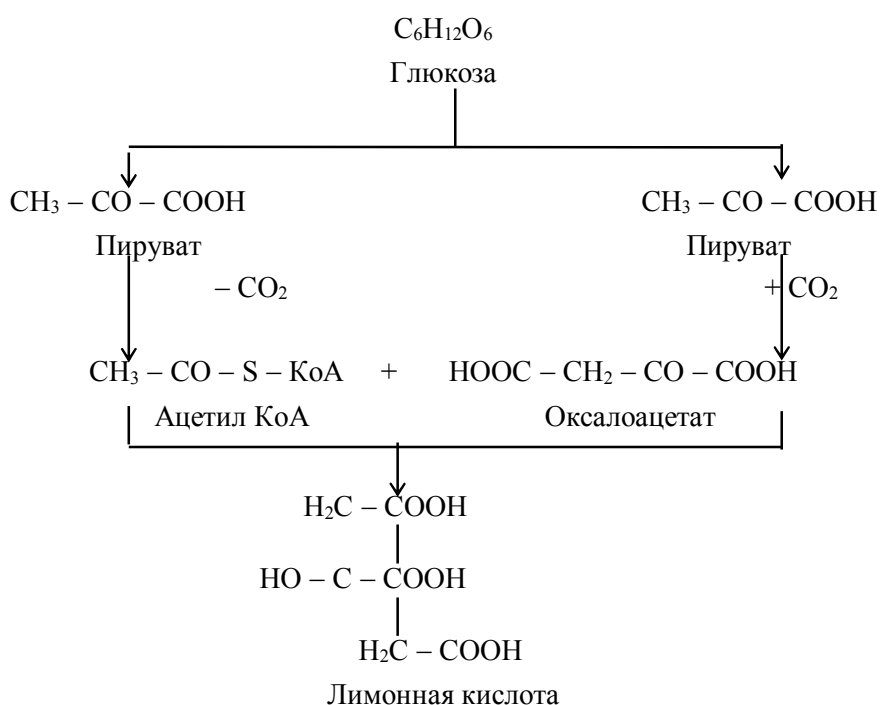


Рис. 12. Схема синтезу лимонної кислоти



Необхідні для реакції оксалоацетат і ацетил КоА утворюються з двох молекул пирувату: одна молекула пирувату піддається декарбоксилуванню з утворенням ацетил КоА, друга – карбоксилується, даючи оксалоацетат. Пируват утворюється фруктозо-біфосфатним шляхом. Всі ферменти цього шляху, а також пируватдегідрогеназа, пируваткарбоксилази і цитратсинтетаза виявлені у *A. niger*. В результаті розглянутої реакції одна молекула цукру ( $C_6H_{12}O_6$ ) перетворюється на одну молекулу лимонної кислоти ( $C_6H_8O_7$ ).

Надсинтез лимонної кислоти відбувається за лімітування росту грибів-продуцентів мінеральними компонентами середовища і одночасним надмірним вмістом джерела вуглецю. В умовах лімітування росту гриба нестачею заліза і марганцю після повного поглинання з середовища дефіцитного елемента він припиняє рости, проте продовжує споживати наявне в середовищі джерело вуглецю. При цьому в клітинах гриба починає накопичуватися лимонна кислота, яка в подальшому виділяється в середовище.

Загальна технологічна схема виробництва лимонної кислоти включає наступні етапи:

1. Підготовка живильного середовища. Мелясу завантажують у варильний котел, розбавляють водою до певної концентрації вуглеводів (16%), додають джерела азоту, фосфору і мікроелементи. Встановлюють необхідне значення рН середовища (6,8-7,2) додаванням кислоти або лугу. Для осадження солей важких металів (заліза, магнію і т.д.), що знаходяться в мелясі, її розчин обробляють жовтої кров'яної сіллю. Потім середу стерилізують і охолоджують до температури ферментації.

2. В окремому цеху вирощують посівний матеріал у вигляді спор (конідій) *Aspergillus niger*. Потім розмножують його в три стадії: в пробірках, колбах і алюмінієвих кюветах. Тривалість кожної стадії – 2-4 діб при 32°C. Для вирощування в пробірках використовують тверде агаризоване живильне середовище, а в колбах і кюветах – рідке.

3. Ферментація може здійснюватися поверхневим або глибинним способом. Заводи невеликої або середньої потужності використовують поверхневий спосіб. Глибинний спосіб економічно вигідний тоді, коли потужність заводу перевищує 2500 т лимонної кислоти на рік.

- 3.1. При поверхневому способі ферментація проводиться на відкритих металевих кислотостійких кюветах висотою 7-20 см, в яких міцелій продуцента розвивається на поверхні середовища. Кювети розміщуються на багатоярусних стелажах у спеціальних камерах при температурі 34-36°C. У камери подають стерильне кондиційоване повітря. Цикл бродіння закінчується через 8-9 діб.

- 3.2. При глибинному способі міцелій гриба занурений в живильне середовище в ферментаторах, туди ж подається стерильне повітря. Тривалість культивування - 5-9 діб.

4. Після закінчення ферментації міцелій відділяють від культуральної рідини. При глибинній ферментації – фільтруванням на фільтрах, при поверхневій – вручну, попередньо зливши рідину з кювет.

5. Міцелій промивають, висушують і направляють для використання в якості добавки до кормів для тварин. Фільтрована культуральна рідина (фільтрат) являє собою водний розчин лимонної кислоти. В 1 літрі фільтрату міститься 40-50 г лимонної кислоти.

6. Лимонну кислоту виділяють з культуральної рідини у вигляді погано розчинної солі – цитрату кальцію, яка утворюється при додаванні крейди. Переведення лимонної кислоти у вільний стан досягається при додаванні строго певної кількості  $H_2SO_4$ .

Гіпс видаляють фільтруванням. Розчин лимонної кислоти освітлюють активованим вугіллям, упарюють, зливають в кристалізатори, в яких поступово знижують температуру. Кристали, що виділилися, центрифугують, промивають водою, сушать, фасують.

Вид джерела вуглецю та його концентрація мають великий вплив на вихід лимонної кислоти. Зазвичай, лимонну кислоту виготовляють шляхом ферментації з використанням дешевої та неочищеної природної сировини, такої як гідролізат крохмалю, бульйон цукрової тростини, меляси, рослинних відходів сільського господарства і механічного перероблення деревини. Переважно як джерело вуглецю для мікробного виробництва лимонної кислоти використовують мелясу завдяки її низькій вартості та високому вмісту цукру (40-55%), достатньої кількості мікроелементів, амінокислот та вітамінів, необхідних для нормальної життєдіяльності продуцента. Меляса - побічний продукт цукрового виробництва, що утворюється внаслідок відділення кристалів сахарози на центрифугах під час її кристалізації.

Лимонна кислота використовується в кондитерській промисловості для підкислення карамелі, пастили, вафель, так як вона добре підкреслює фруктовий смак. Дану органічну кислоту в цілях підкислення додають в морозиво, харчові концентрати, маргарин, деякі сорти ковбас і сиру.

Лимонну кислоту застосовують для гальмування утворення меланоїдинів у згущеному молоці з цукром, розчином її промивають і дезодорують жирову сировину, обробляють перед холодним зберіганням свіже м'ясо, рибу, фрукти з метою стабілізації їх кольору, смаку і запаху. Солі лимонної кислоти використовують для виготовлення шампунів і інших миючих засобів, оскільки вони стимулюють спінювання і забезпечують механічну стійкість пін.

*Отримання молочної кислоти.* Молочна кислота з 1881 р виробляється промисловим способом за допомогою молочнокислих бактерій. В СРСР було організовано виробництво молочної кислоти у 1923 р. Для промислового виготовлення молочної кислоти придатні тільки гомоферментні молочнокислі бактерії, що утворюють до 98% молочної кислоти. Застосовувані штами *Lactobacillus delbrueckii* (Дельбрюкк), *L. bulgaricus* не пред'являють високих вимог до живильного середовища і за короткий час дають високий вихід молочної кислоти.

Молочнокислі бактерії перетворюють на молочну кислоту самі різні вуглеводи, тому для промислового отримання цієї кислоти використовують мелясу, молочну сироватку, глюкозу, мальтозу, сахарозу, лактозу, оцукрений крохмаль та ін. В кожному випадку підбирають найбільш підходящий продуцент. Для зброджування глюкози або мальтози зазвичай застосовують штами *Lactobacillus delbrueckii*, *L. leichmannii* або *L. bulgaricus*. Для зброджування оцукреного крохмалю використовують суміш молочнокислих бактерій *L. delbrueckii* або з *L. bulgaricus*, або зі *Streptococcus lactis*. При зброджуванні мальтози вихід молочної кислоти вище при використанні *L. bulgaricus* або *L. casei*.

В якості основної сировини використовують мелясу, картопляний оцукрений затор, які розбавляють водою до певної концентрації (12%), вносять додаткові джерела амінного азоту (вільні амінокислоти), вітамінів та інших біологічно активних речовин у вигляді кукурудзяного або дріжджового екстракту, або витяжку солодових паростків (оскільки біологічно активні речовини позитивно впливають на молочнокисле бродіння).

Молочну кислоту в промислових умовах отримують методом анаеробної глибинної ферментації. Концентрація цукру в середовищі повинна бути 5...20%, температура 44...50°C, рН 6,3...6,5. Під час ферментації рН середовища підтримують, додаючи крейду. Через 6...7 діб культивування в середовищі залишається 0,5...0,1% цукрів і 11...14% лактату кальцію. З 100 г цукрів отримують 80...90 г лактату. Осад крейди і колоїди відокремлюють фільтрацією. Фільтрат упарюють до концентрації 27...30%, потім охолоджують до 25...30°C і витримують в кристалізаторах 36...48 год. Кристали лактату відокремлюють центрифугуванням. Молочну кислоту з лактату отримують за допомогою сірчаної кислоти.

Для відділення іонів заліза молочну кислоту (сирець) при температурі 65°C обробляють жовтої кров'яної сіллю. Важкі метали осаджують сульфатом натрію. Молочну кислоту обробляють активованим вугіллям, фільтрують і фасують. Кінцевий продукт - у вигляді рідкого концентрату молочної кислоти.

Молочну кислоту застосовують для приготування джемів, в яких вона сприяє гарній консистенції. Молочна кислота як регулятор рН, поліпшувач смаку застосовується у виробництві багатьох сирів, квашеної капусти, в сухому концентраті квасу. В хлібобулочному виробництві молочна кислота і лактати збільшують обсяг м'якушки і покращують скоринку хліба при використанні борошна низької якості. Здатність лактатів утримувати вологу застосовують у виробництві ковбас, сирів, дитячого харчування. Молочну кислоту також використовують для прискорення отримання молочно-білкового згустку при виробництві сиру.

*Одержання оцтової кислоти.* Продуцентами оцтової кислоти є оцтовокислі бактерії роду *Acetobacter*. Ці бактерії пристосовані до цукристих і спиртових субстратів, ростуть у сильно кислих умовах (рН 4,0). До швидкоокислюючих бактерій відносять високовиробничий штам *Acetobacter*

*curvum* (курвум). Недоліком цього продуцента є те, що він може втрачати властивість утворювати оцтову кислоту, тому його постійно підтримують в середовищі з високою концентрацією спирту і оцтової кислоти і низькою концентрацією поживних речовин.

В якості сировини для отримання харчового оцту використовують виноградне вино, пивне сусло, мед, соки різних фруктів і ягід після спиртового бродіння або водний розчин етилового спирту для отримання білого оцту. Оцтова кислота служить джерелом вуглецю та енергії для бактерій.

Оцтова кислота стала першим мікробіологічним продуктом, отриманим за допомогою іммобілізованих клітин. Цей спосіб може бути безперервним і періодичним. Протягом тривалого часу застосовується адсорбція оцтовокислих бактерій на деревній стружці, деревному вугіллі, коксі і інших субстратах. Пропускаючи розчин етанолу через генератори з іммобілізованими бактеріями, отримують 10...15% розчин оцтової кислоти. З 100 л безводного спирту теоретично можна отримати 103 л оцтової кислоти. На практиці вихід оцту зі 100 л етанолу рідко перевищує 90 л, що пов'язано з переокисленням і неповним окисленням етанолу бактеріями, а також з його випаровуванням.

У столовому оцті міститься 5...9% оцтової кислоти. Оцет з концентрацією кислоти 20...30% отримують шляхом виморожування вихідного розчину. Шляхом перегонки отримують 70...80% оцтову кислоту, так звану оцтову есенцію. Крижана оцтова кислота містить 98,0...99,8% кислоти.

Оцет, отриманий під час бродіння, має приємні аромат і смак, які обумовлюють побічні продукти бродіння: складні ефіри (етилацетат та інші), вищі спирти, органічні кислоти.

Оцтову кислоту або оцет широко використовують у харчовій промисловості. Оцет, отриманий мікробіологічним шляхом (харчова оцтова кислота, столовий оцет), розрізняється по сортах в залежності від характеру зброджуваного субстрату. Відомий яблучний, виноградний, грушевий і інші сорти оцту.

Оцет також застосовують для розчинення органічних барвників, при отриманні медикаментів, пластмас і т.д.

**Завдання.** На підставі наданих схем (рис.13) пояснить як відбувається регулювання біосинтезу амінокислот в клітинах *E.coli*. Вкажіть механізми *ретроінгибування* і *репресії* і пояснить з чим пов'язано припинення синтезу треоніну.

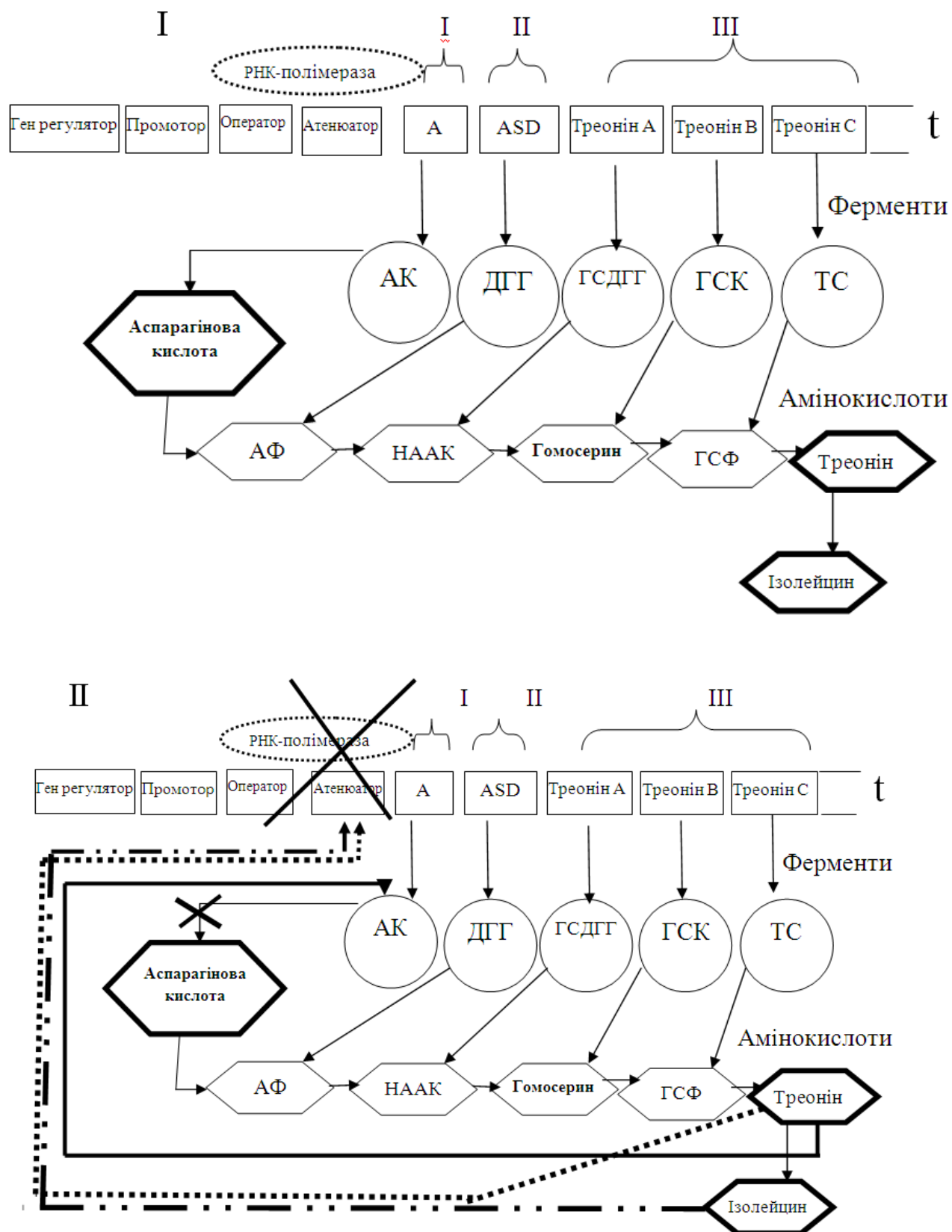


Рис.13. Схема регулювання біосинтезу треоніну в клітинах *E.coli*

Завдання. Скласти таблицю за наступним зразком:

## Отримання та застосування органічних кислот

Органічна кислота	Субстрат	Продуцент	Вид ферментації	Напрями застосування
Лимонна кислота				
Оцтова кислота				
Молочна кислота				
Пропіонова кислота				
Глюконова кислота				
Ітаконова кислота				
Яблучна кислота				

**Питання для самоперевірки**

1. Пояснить значення незамінних амінокислот та їх застосування.
2. Вкажіть методи отримання амінокислот.
3. Коли є сенс застосовувати біологічний метод отримання амінокислот?
4. Які проблеми виникають при хімічному способі отримання амінокислот?
5. Які амінокислоти отримують хіміко-ензиматичним шляхом? З чим пов'язана недоцільність його використання для синтезу інших амінокислот?
6. Які мікроорганізми називають ауксотрофами?
7. Які існують рівні механізму регуляції біосинтезу кінцевого продукту?
8. Чому треонін, лізин і метіонін відносяться до сімейства аспарагінової кислоти?
9. За яких умов біосинтезу з треоніну утворюється ізолейцин?
10. Який механізм регуляції біосинтезу лізину існує у штамі коринебактерії?
11. За яких умов можна отримати штам-суперпродуцент лізину?
12. Як пов'язані синтез треоніну і лізину з ростом біомаси?

13. Які методи генетичної інженерії дозволяють збільшити ефективність використання субстрату при біосинтезі цільової амінокислоти?
14. Чому корисно отримання амінокислот за допомогою іммобілізованих ферментів і клітин?
15. В чому різниця між гомоферментативними і гетероферментативними молочнокислими бактеріями?
16. Які існують способи ферментації для виробництва лимонної кислоти?
17. В чому полягає особливість отримання оцтової кислоти?
18. Вкажіть найбільш ефективний спосіб виробництва яблучної кислоти.

## 12. Медична біотехнологія

### 12.1. Схема промислового біотехнологічного виробництва антибіотиків

Процес промислового виробництва антибіотиків включає наступні стадії:

1) *Підготовка поживного середовища*: в технології отримання антибіотиків застосовують тверді поживні середовища - агаризовані або сипучі субстрати (пшоно, ячмінь, пшеничні висівки і т.п.) і рідкі поживні середовища.

*Умови синтезу антибіотиків:*

Стерильність. Відсутність сторонньої мікрофлори при культивуванні продуцентів антибіотиків - найважливіший фактор біотехнологічного процесу. Для забезпечення стерильності процесу вся апаратура і комунікації герметизуються, стерилізуються і тримаються під тиском. Живильне середовище і повітря для аерації також стерилізуються. Засівання ферментера, відбір проб на аналіз проводиться в асептичних умовах.

Живильне середовище. Умови синтезу антибіотиків полягають в тому, що в живильному середовищі повинні бути присутніми джерела азоту, вуглецю, фосфору, попередники антибіотиків і вітаміни.

До джерел азоту відносяться: амінокислоти, амонійні солі та нітрати; до джерел вуглецю - глюкоза і лактоза; також у живильному середовищі повинні бути присутніми сірка, магній, марганець, залізо, цинк, кобальт. Крім того, при виробництві антибіотиків до складу живильного середовища повинні входити соєве борошно, кукурудзяний екстракт і макуха олійних культур.

pH. Для бактерій pH живильного середовища становить 7, для грибів - 4,5...5, для актиноміцетів - 6,7...7,5. Для більшості відомих антибіотиків оптимальна величина pH близька до нейтральної. При значному закисленні або залуженні середовища процес біосинтезу гальмується. Для регулювання pH в поживні середовища для отримання антибіотиків часто додають деяку кількість крейди, яка вступає в реакцію з виникаючими в ході процесу

метаболізму кислотами, утворюючи при цьому нейтральні солі і вуглекислий газ, який згодом видаляється з середовища.

Температура. Для біосинтезу антибіотика потрібна певна температура: для біосинтезу пеніциліну грибом роду пеніциліум оптимальною температурою є 25...26°C, у той час як при утворенні антибіотиків актиноміцетами зазвичай підтримують більш високу температуру 27...29°C.

Перемішування і аерація: оскільки продуценти антибіотиків є аеробами, при їх синтезі потрібна добра аерація. В цілому потреба в кисні залежить від концентрації біомаси та її метаболічної активності. Призначення аерації і перемішування - забезпечення культури киснем, але водночас вони сприяють підтримці міцелію в підвішеному стані і вирівнюванню концентрації поживних речовин і продуктів обміну в культуральній рідині.

Спіювання. Поживні середовища, що застосовують при отриманні антибіотиків, містять речовини, здатні утворювати досить стійкі піни. Аерація і перемішування середовища викликають утворення шару піни на поверхні рідини, що погіршує умови розвитку продуцента. У зв'язку з інтенсивним піноутворенням, супроводжуваним процесом синтезу антибіотиків, до складу середовища вводять піногасники (рослинні і тваринні жири, мінеральні масла, ПАР).

2) *Підготовка посівного матеріалу* (продуценти-мутанти → колба на гоїдалке → перший інокулятор (10 л) → другий інокулятор (100...500 л) → ферментер).

3) *Ферментація:* для отримання антибіотиків використовують методи поверхневого і глибинного культивування. У промисловому виробництві антибіотиків використовують апарати різної ємності. У ході ферментації культура безперервно аерується стерильним підігрітим повітрям. Температура середовища, рН і ряд ін. параметрів автоматично регулюються відповідно до регламенту виробництва антибіотика. Процес ферментації здійснюється в строго стерильної, глибинної, аеробної, періодичної культурі і носить виражений двофазний характер.

4) *Виділення антибіотиків.* Локалізація антибіотика, сфера його застосування визначають специфіку прийомів постферментаційної стадії. Якщо антибіотик знаходиться в клітинах, на першому етапі обробки біомасу виділяють з культуральної рідини (фільтрацією або центрифугуванням); після руйнування клітин антибіотик екстрагують і переводять в розчинну фазу. Потім даний розчин і культуральні середовища (якщо антибіотик виділяється з клітин у середу) піддають різним методам екстракції, розділення, очищення та концентрування для отримання готового продукту. Мета всіх процедур постферментаційної стадії - отримання стерильних препаратів високого ступеня чистоти.

5) *Очищення антибіотиків.* Дана стадія технологічного процесу включає в себе: осадження, сорбцію, сушку. Крім традиційних екстракційних та сорбційних методів при виділенні і очищенні антибіотиків все більшого значення набуває комплекс прийомів, що об'єднуються назвою *мембранні*



технології. При зневодненні препаратів антибіотиків в залежності від властивостей використовують ліофільну або розпилюючу сушку. Потім препарат фасують у стерильні флакони з дотриманням умов, що гарантують стерильність.

б) *Отримання готового продукту*: оскільки біосинтез антибіотиків ведеться в асептичних умовах, то при виділенні, очищенні та отриманні ЛФ (лікарських форм) також дотримуються максимально можливих заходів проти контамінації. Тим не менше, проблема стерильності ін'єкційних препаратів і обсіменіння препаратів для зовнішнього застосування залишається однією з найскладніших для виробництва як антибіотиків, так і лікарських засобів в цілому, тому при виявленні розфасованих, нестерильних серій препаратів іноді застосовують методи радіаційної та термічної стерилізації, а також стерилізацію мембранної фільтрації.

Готовий продукт піддається біологічному і фармакологічному контролю. Біологічний контроль визначає ступінь стерильності препарату. При фармакологічному контролі проводять всебічні випробування препарату на токсичність, пірогенність (*наявність пірогенних речовин - сполук лінополісахаридної природи. При потраплянні пірогенів у кров'яне русло людини спостерігається швидке підвищення температури тіла до 40°C, прискорення пульсу, лихоманка, підвищене потовиділення, нудота, головний біль. В особливо тяжких випадках можлива смерть.*), токсикогенність та ін., оцінюють антимікробний спектр препарату, дію на лейкоцити крові, встановлюють максимально стерпну дозу антибіотика, дози, що викликають повну і 50% загибель експериментальних тварин.

Готова форма лікарського препарату антибіотичної речовини надходить до споживача із зазначенням біологічної активності і дати випуску.

## **12.2. Удосконалення виробництва антибіотиків**

Внаслідок поганої розчинності кисню у воді і високої щільності культури *Streptomyces spp.* його часто виявляється недостатньо, ріст клітин сповільнюється і вихід антибіотика знижується.

Одна із стратегій, яку використовують деякі аеробні мікроорганізми для виживання в умовах нестачі кисню, полягає в синтезі гемоглобінподібного продукту, здатного акумулювати кисень і доставляти його в клітини (аеробна бактерія *Vitreoscilla sp.* синтезує гомодімерний гемвмістний білок, функціонально подібний еукаріотичному гемоглобіну). Ген «гемоглобіну» *Vitreoscilla* виділений, вбудований в плазмідний вектор *Streptomyces* і введений в клітини цього мікроорганізму. Після його експресії на частку гемоглобіну *Vitreoscilla* припадає приблизно 0,1% всіх клітинних білків *Strept. coelicolor* навіть у тому випадку, коли експресія здійснювалася під контролем власного промотора гена гемоглобіну *Vitreoscilla*, а не промотора *Streptomyces*. Трансформовані клітини *Streptomyces coelicolor*, що росли при низькому вмісті розчиненого кисню (5% від концентрації, що насичує), синтезували в 10 разів більше *актінородіна* на 1 г сухої клітинної маси, ніж нетрансформовані. Цей підхід можна застосовувати для

забезпечення киснем інших мікроорганізмів, що ростуть в умовах нестачі кисню.

### **12.3. Основні способи отримання інтерферонів (ІНФ)**

Отримання  $\alpha$ -інтерферону засноване на здатності лейкоцитів утворювати інтерферон під дією вірусу. Лейкоцити з периферичної крові людини культивують при 37°C протягом 16...20 год. На спеціальному живильному середовищі, що містить сироватку крові людини і вірус-інтерфероногени (вірус Сендай). Потім лейкоцити відокремлюють центрифугуванням, вірус інактивують зниженням рН до 2,5. Нативний інтерферон, що знаходиться в надосадової рідини, осаджують сульфатом амонію, очищають і концентрують хроматографією на сефадексе. Отримання  $\alpha$ -інтерферону з лейкоцитів людини має суттєве обмеження, обумовлене необхідністю використання великої кількості донорської крові (з 1 л крові можна виділити всього 1 мкг інтерферону, тобто приблизно на одну дозу для ін'єкції).

$\beta$ -інтерферон отримують з культур фібробластів, вирощених в моношорі *in vitro*. Фібробласти вдається підтримувати в культурі, тому вони придатні для масового виробництва інтерферону. Даний спосіб отримання ІНФ значно простіше, порівняно з його отриманням з лейкоцитів.

Вихід  $\gamma$ -інтерферону, синтезованого в культурах імунних Т-або В-лімфоцитів, ще менше, ніж  $\alpha$ - і  $\beta$ -інтерферонів. Однак  $\gamma$ -інтерферон має високу протипухлинну та імуномодельюючу активність.

В цілому методи отримання інтерферонів трьох класів, синтезованих лейкоцитами, лімфобластоїдними клітинами, фібробластами і лімфоцитами характеризуються:

- низькими виходами;
- високою вартістю продукції;
- низькою чистотою препарату (хоча у випадку лімфобластного інтерферону її вдалося підвищити з 0,1...10 до 50%).

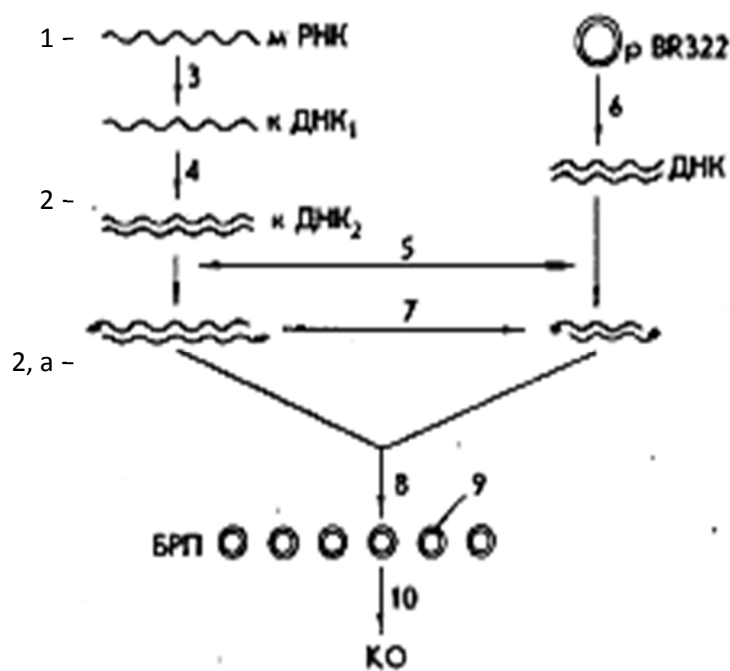
У цьому зв'язку, дуже великі надії покладалися на способи отримання інтерферонів, засновані на технології рДНК.

В якості рекомбінантних продуцентів спочатку використовували клітини *E.coli*, які накопичують продукт внутрішньоклітинне, що ускладнює його виділення та очищення. Більш перспективними виявилися бактерії *Bacillus subtilis* і *Pseudomonas aeruginosa*, що здатні секретувати рекомбінантні білки в навколишнє середовище. З еукаріот хорошим продуцентом генно-інженерного інтерферону є дріжджі *Saccharomyces cervisiae*, які ростуть на дешевих середовищах, легше відокремлюються від культуральної рідини і не піддаються дії бактеріофагів. При використанні даного виду дріжджів виробництво інтерферону зросла в 10 разів.

**Технологічна схема одержання генно-інженерних інтерферонів** (як одна з можливих; рис.14) принципово зводиться до такого:

- 1) індукція синтезу й виділення інтерференової мРНК із клітин;
- 2) одержання кДНК, комплементарної інтерференової мРНК із лейкоцитів;

- 3) вбудовування кДНК у плазмиду;
- 4) уведення реконструйованої плазмиди в клітини *E. coli*;
- 5) розмноження бактерій, що містять реконструйовану плазмиду, у культуральному середовищі;
- 6) сепарування клітин *E. coli*;
- 7) дезінтеграція й екстракція клітин *E. coli*;
- 8) осадження (наприклад, поліетиленаміном) з наступним центрифугуванням;
- 9) висолювання інтерферону із супернатанта сульфатом амонію;
- 10) діаліз осаду інтерферону;
- 11) розчинення інтерферону, пропущення розчину через колонку з імуносорбентом (пришитими моноклональними антитілами, рис 15);
- 12) елюїрування інтерферону з наступною хроматографією на целюлозному катіонообміннику.



**Рис. 14. Етапи клонування гена інтерферону:**

- 1 – мРНК інтерферону з індукованих клітин;
- 2 – кДНК<sub>1</sub> комплементарна одноланцюгова ДНК;
- 2, а – кДНК<sub>2</sub> комплементарна дволанцюгова ДНК;
- 3 – зворотна транскриптаза;
- 4 – синтез дволанцюгової ДНК;
- 5 – кінцева трансфераза;
- 6 – рестрикція;
- 7 – кДНК з липкими кінцями;
- 8 – відпалювання;
- 9 – ДНК інтерферону;
- 10 – введення в клітини *E. coli* рекомбінантної плазмиди;
- КО – клонування і відбір колоній;
- БРП – «бібліотека» рекомбінантних плазмід

Підвищення ступеня очищення інтерферонів було досягнуто застосуванням моноклональних антитіл, які можна використовувати для афінної хроматографії (при цьому необхідні білки затримуються у колонці з антитілами, рис. 15).

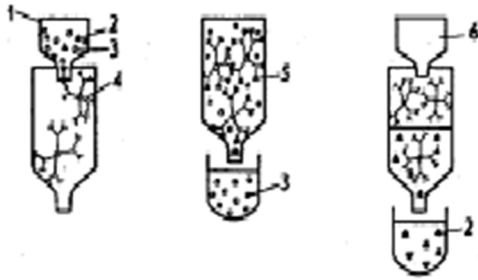


Рис. 15. Схема очищення рекомбінантних інтерферонів за допомогою моноклональних антитіл: 1 – діаліз із інтерфероном та іншими бактеріальними білками; 2 – інтерферон; 3 – баластні білки; 4 – моноклональні антитіла (МкАТ); 5 – інтерферон, що зв'язався з МкАТ; 6 – слабка кислота

Інтерферони  $\alpha$  (ІФа) кодуються родиною генів, що складається, приблизно, з 20 ніалельних генів. Підтипи ІФа виявляють різну специфічність і мають свої особливості. Поєднати ці особливості в одній молекулі ІФа можливо за рахунок створення комбінованого гібридного гена.

**Соматотропін.** Синтез соматотропіна, що складається з 191 амінокислотного залишку, був здійснений в США Г.В. Гедделем із співробітниками у 1979 р. (компанія «Генентек»). За хіміко-ферментного синтезу ДНК створюється ген, що кодує попередник соматотропіну, тому було вибрано спеціальний шлях клонування. На першому етапі клонували дволанцюгову ДНК-копію мРНК і розщеплюванням рестриктазами отримували послідовність, що кодує всю амінокислотну послідовність гормону, окрім перших 23 амінокислот. Далі клонували синтетичний полінуклеотид, відповідний цим 23 амінокислотам із стартовим кодоном AUG на початку. Два отримані фрагменти з'єднували і приладнували до пари *lac*-промоторів і ділянки скріплення рибосом. Зконструйований ген трансплантували в *E. coli*. Синтезований у бактеріях гормон володів необхідною молекулярною масою, не був пов'язаний з якимось білком; його вихід становив близько 100000 молекул на клітину.

Соматотропін – гормон росту (ГР) є складним поліфункціональним білком, що бере участь у процесах стимуляції росту (соматогенна активність), посиленні діяльності молочних залоз (лактогенна активність), впливає на обмін вуглеводів та ліпідів. Це означає, що ГР в різних типах клітин здатний зв'язуватися як з рецепторами, які відповідають за збільшення синтезу білка, розвиток м'язів і скелету та ін., так і з пролактиновими рецепторами. Використання одного з активних центрів гормону (центру росту, центру діяльності молочних залоз, центру інсуліноподібної дії та центру антиінсулінової дії) дасть можливість вибірково впливати на функціонування організму. Це, тим більш важливо, що проведені дослідження виявляють інколи за використання ГР одночасне збільшення росту тварини і виникнення в неї діабету. Вирішити цю проблему можна двома шляхами. Оскільки ген ГР має складну структуру і містить інтрони, то процедура клонування починається з отримання кДНК на підставі мРНК за допомогою ревертази. Створюються гомогенні фрагменти ДНК завдовжки 531 п.н., до яких потім ферментативним шляхом приєднують регуляторні елементи для забезпечення експресії цього рекомбінантного гена у клітині – реципієнті. На етапі створення кДНК можливо за допомогою

рестриктаз відокремити певні центри активності і в подальшому використовувати міні-гени ГР із спрямованою дією. Другий шлях полягає в тому, щоб зменшити зв'язування гормону з рецепторами тих клітин, стимуляція яких не бажана. Для цього в отриманих фрагментах кДНК здійснюють *сайт-специфічний мутагенез* (мутацію на певних ділянках ДНК), внаслідок якого відбувається заміна одних амінокислот на інші, завдяки цьому високоспецифічні рецептори певних клітин не розпізнають гормону, зв'язування не відбувається і модифікований гормон росту зв'язується лише зі «своїм» рецептором.

### 12.5. Отримання інсуліну.

Інсулін, який був синтезований з інсуліну свині за рахунок заміни одного амінокислотного залишку на інший, не завжди є задовільним, оскільки іноді викликає алергію і не може використатися для лікування дитини. Тому виникла потреба у виробництві інсуліну людини, що продукується бактеріями. Нуклеотидна послідовність кожного з ланцюгів інсуліну була розроблена штучно на основі відомої амінокислотної послідовності і генетичного коду з урахуванням частоти використання різних кодонів в бактеріальній ДНК. Кожна ділянка гену була введена у векторну плазмиду і рекомбінантна клітина синтезувала химерний білок, який складався з А- і В-пептидів інсуліну, однак з'єднання цих ланцюгів не завжди відбувалось так, як необхідно для утворення біологічно активної речовини, і тому цей спосіб отримання інсуліну був не дуже ефективним (рис.16).

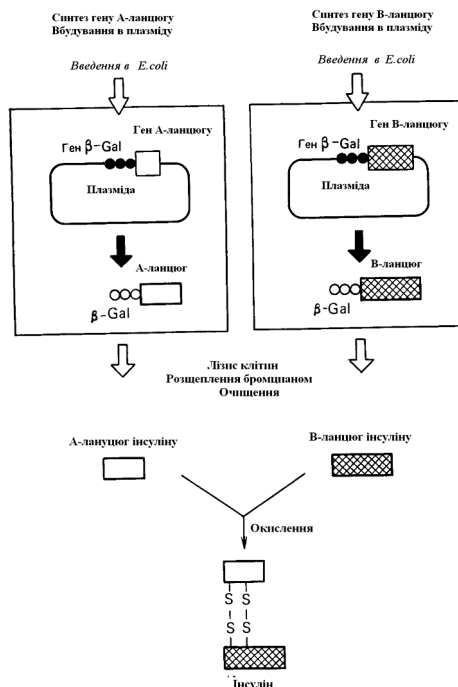


Рис. 16. Отримання інсуліну людини на основі рекомбінантних ДНК (Miller, Baxter, 1980)

Дослідження продовжилися в напрямку отримання проінсуліну людини і в 1981 році був здійснений синтез гену-аналога проінсуліну – міні-С-проінсулін, в якому С-пептид з 35 ланок замінювався на сегмент з 6 амінокислот. Як і в першому випадку міні-С-проінсулін синтезувався в бактеріальній клітині, однак і цей спосіб не дав результату, що очікували.

В цей період було розроблено *ще два шляхи синтезу* інсуліну:

1. В США з тканини людини була виділена мРНК інсуліну, на підставі якої за допомогою ревертази синтезована кДНК і клонований ген проінсуліну людини (рис. 17);

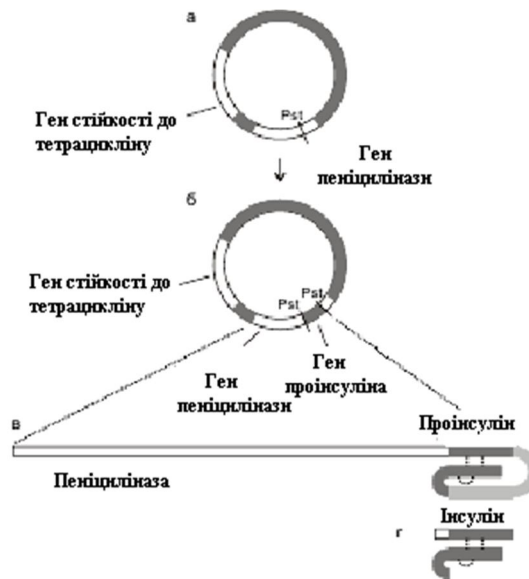
2. Другий шлях полягав в тому, що ген проінсуліну був синтезований хіміко-ферментативним способом.

Цей підхід має декілька *переваг*.

- По-перше, необхідну структуру ДНК можна отримати з урахуванням експресії в різних організмах, тобто ввести в певні місця необхідні сайти рестрикції,

- По-друге, хімічний синтез виключає найбільш складний етап – виділення з природного джерела відповідної мРНК або геномної ДНК.

- У третій, він спрощує модифікацію гену і білку, який з нього отримують. Загальна конструкція гену передбачала також проведення його клонування і експресії у складі бактеріальної плазміди.



**Рис. 17. Біосинтез інсуліну пацюка у клітинах *E.coli*, що були сконструйовані** (за Gilbert e.a., 1980): а) карта плазміди *pBR322* із двома генами – пеніцилінази і стійкості до тетрацикліну; б) карта, що отримана під час визначення послідовності кДНК рекомбінантної плазміди у клоні *E.coli*, який продукує інсулін; в) гібридний білок; г) біологічно активний інсулін після видалення пеніцилінази і сегменту проінсуліну

В структуру синтетичного полінуклеотиду крім триплетів, що кодують амінокислоти проінсуліну, були введені кодони ініціації і термінації трансляції, а також "ліпкі кінці" для введення гену у векторну молекулу. Експресія гену відбувалась за допомогою регуляторних елементів.

Синтез гену включає декілька етапів.

1 – це синтез більш ніж 40 олігонуклеотидів – сегментів, з яких складається весь ген.

2 – це ферментативна зборка синтезованих сегментів за допомогою ДНК-лігази.

3 – дволанцюгові полінуклеотиди довжиною 286 пар основ, що були отримані, вбудовувались в плазмідні вектори.

4 – після добування і корекції регуляторних ділянок ДНК, що забезпечують експресію генетичного матеріалу, гени були введені в бактеріальні клітини.

Штами, що отримані, є продуцентами проінсуліну, який може бути перетворений в активний інсулін. В наш час такий інсулін широко використовується в медичній практиці для лікування цукрового діабету.

**12.6. Фактори згортання крові.** Біореакторами називають організми, продуценти лікарських білків. Біореакторами можуть бути будь-які живі організми – бактерії, гриби, рослини, тварини і, навіть, клітинні культури. У кожного з таких організмів-біореакторів є переваги й недоліки.

Найбільший прогрес у виробництві трансгенних продуктів був досягнутий у цілеспрямованій трансгенній експресії в епітеліальній клітині молочної залози і синтезі білків поряд з молоком.

Одним з основних етапів у отриманні трансгенних тварин, які продукують гетерогенний білок з молоком, є ідентифікація промотору, що буде спрямовувати експресію у секреторній епітелій молочної залози. В наш час виділені промотори  $\alpha$ S1-казеїну,  $\beta$ -казеїну,  $\alpha$ -лактоальбуміну,  $\beta$ -лактоглобуліну і сироваткового кислого протеїну (*WAP*).

Стратегія цих робіт така: отримати трансгенну тварину, в якій чужий ген експресується в клітинах молочної залози й продукт роботи цього гена виділяється в молоко. Тоді одержання лікарського білка зведеться до процесу, що відомий людині вже багато тисяч років, – до доїння. Апаратами механічного доїння, звичайно, користуються, але є апарати, що дають можливість подоїти козу, вівцю, свиню, кролика й навіть мишу. Трансгенні тварини дозволять вирішити й ще одну проблему – проблему очищення лікарських білків. Навіть якщо після очищення в препараті залишаться домішки, це будуть нетоксичні для людини білки молока.

Сьогодні більша частина тварин, що виділяє трансгенні продукти в молоко, – це миші. Миші з їхнім коротким терміном вагітності й росту – зручний об'єкт для аналізу експресії введеної генної конструкції, на них відпрацьовують ті методики, які потім використовують для одержання великих трансгенних тварин. Список трансгенних ссавців, що виділяють продукт активності чужорідного білка в молоко, є такий: кролі – інтерлейкін-2 (нг/мол) і тканинний активатор плазміногену (мкг/мол), вівці –

1-антитрипсин (мг/мол) і фактор зсідання крові ІХ (нг/мол), кози – тканинний активатор плазміногену (мкг/мол). У цей час активно ведуться роботи з одержання тварин-продуцентів рекомбінантних імуноглобулінів людини – вони з'являться в найближчі роки, і галузь їхнього застосування майже безмежна.

Яку ж кількість трансгенних тварин необхідно отримати, щоб забезпечити потребу в лікарських білках людини? Коли намагаються співвіднести можливу продукцію білка людини й потребу в ньому, то результати аналізу дивують. Так, для того, щоб забезпечити всю світову потребу у факторі зсідання крові ІХ, потрібно отримувати за рік до 85 кг цього білка, а для фактора зсідання крові VIII ця кількість і того менша – до 7 кг. При рівні продукції трансгена в 1 мг на 1 мл молока (а сьогодні це цілком реальний рівень) корова, що виробляє до 6 тис. л молока за рік, може зробити до 6 кг лікарського білка. Всю потребу в факторі VIII зможе забезпечити одна або дві корови-біореактори, а для одержання фактора ІХ у кількості, достатній для всіх хворих на гемофілію у світі, необхідно всього лише маленьке стадо з 15...20 трансгенних корів. Потреба медицини в інших білках, одержуваних із крові людини, більша. Так, для фібриногену це до 3 т. Таку кількість зможе забезпечити стадо в 500 трансгенних корів – одна тваринницька ферма.

Серед рекомбінантних білків, отриманих з молока трансгенних тварин, відомі такі: білок С людини, що запобігає утворенню тромбів; VIII і ІХ фактори зсідання крові проти гемофілії; тканинний плазміно-генний активатор, що використовується для лікування венозних тромбів і емболії легеневої артерії; лактоферин; інтерлейкін-2; альфа-1-антитрипсин для лікування емфіземи легень; моноклональні антитіла для лікування різних форм раку.

**12.7. Створення вакцин.** Як правило, сучасні вакцини створюють на основі вбитих (інактивованих) патогенних мікроорганізмів або живих, але невірулентних (*атенуйованих*) штамів. Для цього штам дикого типу вирощують у культурі, очищують, а далі інактивують або модифікують таким чином, щоб він викликав імунну відповідь, досить ефективну до вірулентного штаму. Незважаючи на значні успіхи у створенні вакцин проти таких захворювань як краснуха, дифтерія, коклюш, правець, віспа й поліомієліт, виробництво сучасних вакцин стикається з рядом обмежень:

- не всі патогенні мікроорганізми вдається культивувати, тому для багатьох захворювань вакцини не створені;
- для одержання вірусів тварин і людей необхідна дорога культура тваринних клітин;
- титр вірусів тварин і людей в культурі й швидкість їхнього розмноження часто бувають дуже низькими, що робить виробництво вакцин дорогим;
- необхідно суворо дотримуватися запобіжних заходів, щоб не допустити інфікування персоналу;
- за порушення виробничого процесу в деякі партії вакцини



можуть потрапити живі або недостатньо ослаблені вірулентні мікроорганізми, що може спричинити ненавмисне поширення інфекції;

– атенуйовані штами можуть ревертирувати до вихідного штаму, тому необхідно постійно контролювати вірулентність;

– деякі захворювання (наприклад, СНІД) не можна попереджати за допомогою традиційних вакцин;

– більшість сучасних вакцин мають обмежений термін придатності й зберігають активність тільки за зниженої температури, що ускладнює їх використання в країнах, що розвиваються.

Останнім десятиріччям, з розвитком технології рекомбінантних ДНК, з'явилася можливість створення нового покоління вакцин, що позбавлені недоліків традиційних вакцин. Для їх розробки використовують такі методи генної інженерії:

1. *Модифікація патогенного мікроорганізму за рахунок делеції* (вилучення) з генома ділянки гена, що відповідає за вірулентність. Такий вірус можна використовувати як живу вакцину, оскільки вирощування в культурі виключає імовірність спонтанного відновлення цілого гена.

2. *Створення живої непатогенної системи*, що містить окремі антигенні детермінанти неспорідненого патогенного організму. Така система здатна викликати імунну відповідь на патогенний мікроорганізм.

3. *Створення субдиничних вакцин*, які використовують у разі, коли патогенний мікроорганізм не здатний рости в культурі. Тоді ділянки генів цього мікроорганізму, що відповідають за синтез білків антигенних детермінант, вилучають, клонують і здійснюють їх експресію (процес реалізації генетичної інформації) у клітинах-господарях, наприклад, в *E. coli*.

4. *Створення системи специфічного руйнування клітин-мішеней*. Деякі патогенні мікроорганізми діють не безпосередньо на організм, а на окремі його клітини, які після інфікування починають виробляти речовини, що небезпечні для організму. Для таких захворювань можна сконструювати ген, що відповідає за синтез химерного білка, одна частина якого зв'язується з інфікованою клітиною, а друга – руйнує її. Ця система не є дійсною вакциною, хоча вона і діє лише на інфіковані клітини.

**12.8. Моноклональні антитіла.** Під впливом на організм тварини антигена, що містить значну кількість *epitopes* (антигенних детермінант, ділянок поверхні антигена, до яких створюються антитіла), клітини імунної системи продукують антитіла до кожного з них, завдяки наявності величезної кількості клонів лімфоцитів, що виробляють антитіла одного типу з вузькою специфічністю. Створюється суміш антитіл, тобто поліклональна сироватка. Спектр антитіл, що створюються, змінюється під час імунної відповіді, а також за використання різних тварин.

Багато дослідників намагалися знайти способи отримання антитіл з вузькою специфічністю. У 1975 році Д. Келер і Ц. Мільштейн запропонували принципово новий метод створення гомогенних антитіл. Внаслідок соматичної гібридизації (злиття) мієломних клітин (пухлинних клітин лімфоцитарної системи) і В-лімфоцитів, які продукують антитіла після

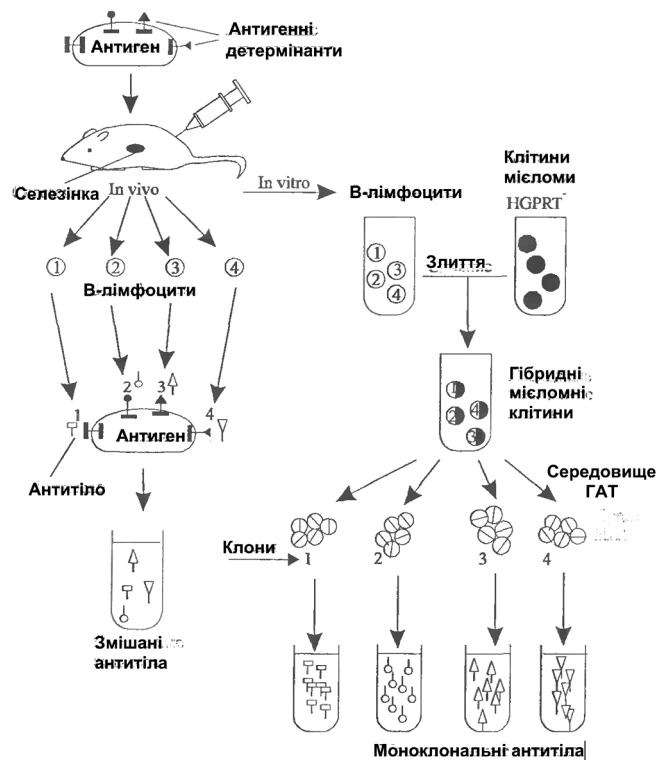
імунізації тварин відповідним антигеном, було отримано клони гібридних клітин – гібридами, що синтезують моноклональні антитіла (*моноАТ*, або *моноанти*).

Злиття клітин лімфоцитів з міеломами може здійснюватися і спонтанно, однак вихід гібрида зростає в присутності 40...50% розчину поліетиленгліколю (ПЕГ) або в апараті для електрозлиття (рис. 18).

Найважливішою властивістю гібридом, яку вони успадкували від міеломних клітин, є їх здатність створювати асцитні пухлини за введення мишам і синтезувати при цьому до 15 мг антитіл на 1 мл асцитної рідини.

Таким чином, *процес отримання гібридом*, що синтезують певні моноклональні антитіла, складається з таких етапів:

1. Імунізація мишей, що відбувається в три (якнайменше) етапи:
  - внутрішньочеревне введення антигена з повним ад'ювантом Фрейнда (*ад'юванти* – це сполуки, які при введенні в організм викликають неспецифічне збільшення імунної відповіді і тим самим підвищують здатність організму реагувати на будь-який імуноген). Повний ад'ювант Фрейнда, що дуже широко використовується в наш час для імунізації, складається з суміші мінеральних масел, емульгатора і вбитих мікобактерій (за відсутності бактерій ад'ювант називається неповним);



**Рис. 18. Схема отримання моноклональних антитіл**

- повторне введення антигена через 4...5 тижнів з неповним ад'ювантом Фрейнда;
- внутрішньочеревне і внутрішньовенне введення антигена за 3...4 дні до злиття без ад'юванта.

2. Злиття клітин. Селезінку імунізованої миші подрібнюють у гомогенізаторі. У наступному клітини селезінки і мієломні клітини центрифугують і додають розчин ПЕГ, що полегшує процес злиття клітин. До суміші додають ГАТ-середовище і розносять по лунках. Через 7...10 днів відбирають культуральну рідину з кожної лунки і тестують на наявність антитіл.

3. Тестування гібридом. Тестування проводять за допомогою методів імуноферментного аналізу (ІФА), при цьому одночасно визначають ферментативну активність антитіл, що створилися.

4. Клонування гібридом проводять або в напіврідкому агарі, або методом граничних розріджень. Вміст лунок, у яких отримали позитивний результат при тестуванні, оцінюють під мікроскопом для оцінки числа гібридом. У подальшому розріджують до концентрації 3 клітини/мл і розподіляють по лунках. Через 10 днів окремі клони знов тестують методом ІФА.

5. Нарощування гібридом. Клон, що виявився позитивним, нарощують, доки вони не займуть 2/3 поверхні лунки 96-лункової плати. Потім їх переносять до лунки 24-лункової плати, а за декілька днів їх об'єднують і пересаджують у 50 мл флакони для культивування. За необхідності клітини можуть бути перенесені в судини для культивування об'ємом 250 мл і більше.

6. Нарощування гібридом у вигляді асцитної рідини. Мишам внутрішньочеревно вводять  $10^6 \dots 10^7$  клонованих гібридомних клітин у розчині для підтримки їх росту. На 14...21 добу відбирають 4...5 мл асцитної рідини.

7. Заморожування гібридомних клітин. Заморожування необхідно здійснювати на всіх стадіях отримання гібридом. Швидкість зниження температури  $1^\circ\text{C}$  за 1 хв. Клітини вносять у спеціальні ампули, які розміщують у холодильнику ( $-70^\circ\text{C}$ ), а далі переносять у рідкий азот. Розморозжують клітини швидко, поміщають ампули у водяну баню за температури  $37^\circ\text{C}$ . Розморозжені клітини розріджують гібридомним середовищем, центрифугують і осад розміщують у лунках плат з розчином для росту клітин.

8. Зберігання моноклональних антитіл. Культуральна рідина з моноклональними антитілами добре зберігається протягом одного року за температури  $4^\circ\text{C}$  у присутності 0,1% азиду натрію. Вона може зберігатися невизначено довго за температури  $-70^\circ\text{C}$ ; при цьому необхідно запобігати повторного заморожування-відтаювання. Асцитна рідина повністю стабільна при зберіганні у стерильному стані за температури  $4^\circ\text{C}$ .

### ***Питання для самоперевірки***

1. Що таке антибіотики і на які групи їх поділяють?
2. За рахунок порушення яких процесів здійснюється механізми дії антибіотиків?
3. Де у медицині використовують антибіотики?

4. Вкажіть причини пошуку нових антибіотиків.
5. Вкажіть основні напрямки пошуку нових антибіотиків.
6. В чому полягають особливості біосинтезу антибіотиків?
7. Вкажіть основні групи продуцентів антибіотиків.
8. Вкажіть способи отримання антибіотиків.
9. Які існують шляхи підвищення виходу антибіотиків?
10. Вкажіть стадії процесу промислового виробництва антибіотиків.
11. Що включає підготовка поживного середовища в технології отримання антибіотиків?
12. Які існують способи отримання інтерферонів?
13. Які функції інтерферони виконують для організму?
14. Які види інтерферонів розрізняють?
15. З яких етапів складається технологічна схема одержання генно-інженерних інтерферонів?
16. Як відбувається очищення інтерферонів за допомогою моноклональних антитіл?
17. Яку функцію в організмі грає гормон соматотропні?
18. Які центри активності існують в гені гормону росту?
19. Що таке сайт-специфічний мутагенез?
20. Які існують способи отримання інсуліну?
21. Які генно-інженерні способи отримання інсуліну застосовують?
22. Вкажіть етапи синтезу генно-інженерного інсуліну.
23. Чому для синтезу певних білків не можливо використовувати клітини прокариот?
24. Яких тварин називають тваринами біофармінгу?
25. Які існують промотори, що спрямовують синтез білку у молочній залозі?
26. Які існують види вакцин?
27. З якими проблемами стикається виробництво сучасних вакцин?
28. Які існують методи створення генно-інженерних вакцин?
29. Що таке епітоп?
30. Яким чином отримують гібридами?
31. Вкажіть етапи процесу створення моноатів.
32. Які існують напрями застосування моноатів в медицині?

### **13. Біоенергетика**

Традиційні джерела енергії сьогодні не задовольняють зростаючі потреби сучасного суспільства. Необхідно знайти нові масштабні, легко відновлювальні екологічні і дешеві джерела енергії. Їх трансформація в технічно зручні види палива має декілька шляхів. Одним з них є біологічна конверсія органічних відходів і біомаси в цілому як продукту фотосинтезу в тверді, рідкі, газоподібні види палив та електроенергію.

**13.1. Біогаз як екологічне паливо.** Одним з пріоритетних механізмів у світі стали сучасні біотехнологічні підходи утилізації відходів у біогаз та добрива.

Біогаз складається з метану і водню до 40...90% і на 60...10% з вуглекислого газу. Визначено, що в якості сировини для виробництва біогазу може використовуватись будь-який біологічний продукт: органічні добрива (гній, пташиний послід, змивка від тварин), відходи землеробства (солота, кукурудзяний силос, бурякове і картопляне бадилля, листя), агропромислові відходи (яблучна та кукурудзяна барда, відходи від виробництва спирту, очистки овочів, фруктів тощо), відходи від забою свійських тварин, а також комунальні біовідходи.

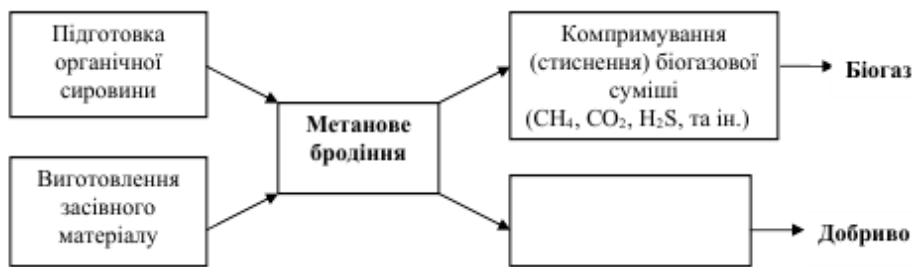
В основі роботи біогазових установок (БГУ) закладені біологічні процеси бродіння та розкладання органічних речовин під впливом метаноутворювальних бактерій в анаеробних умовах, які характеризуються відсутністю вільного кисню, високої вологості і температурного середовища 15–20°C для психрофільних, 30–40°C для мезофільних і 50–70°C для термофільних бактерій (рис. 19).

*Продуцентами* метанового бродіння є складні мікробні асоціації, що включають такі групи: *аеробні бактерії*, які перетворюють продукти деструкції целюлози; *анаеробні ацетогенні бактерії* *Clostridium aceticum*, *Clostridium thermoaceticum*, *Acetobacterium woodii*, які ферментують утворені первинні метаболіти бродіння; *метанотвірні бактерії* *Methanobacterium formicicum*, *Methanospirillum hungati*, для яких вищеназвані сполуки є подальшими поживними субстратами). Усі метанові бактерії належать до анаеробів. Отже, природний процес розкладання органічних речовин субстрату за їх участю можливий лише без доступу кисню.

*Субстратами* для життєдіяльності кожної групи бактерій слугують певні органічні речовини, а саме: для бактерій-аеробів – полісахариди (целюлоза, геміцелюлоза); для ацетогенів – продукти деструкції целюлози (янтарна, пропіонова, масляна, молочна, оцтова кислоти, спирти, CO<sub>2</sub> і H<sub>2</sub>); для метаногенів – ацетат (оцтова), форміат (мурашина) кислоти, CO<sub>2</sub> та H<sub>2</sub>.

На останньому етапі продукти життєдіяльності метанових бактерій – ацетат, діоксид вуглецю та водень, перетворюються переважно на метан (90% цього газу утворюється саме в цей момент).

Слід зазначити, що попередній третій етап біосинтезу оцтової кислоти – найбільш важливий, бо зумовлює швидкість процесу метаноутворення. Оптимальний рівень рН при цьому підтримується на рівні 7 (коливання можуть відбуватися в діапазоні 6,6...8).

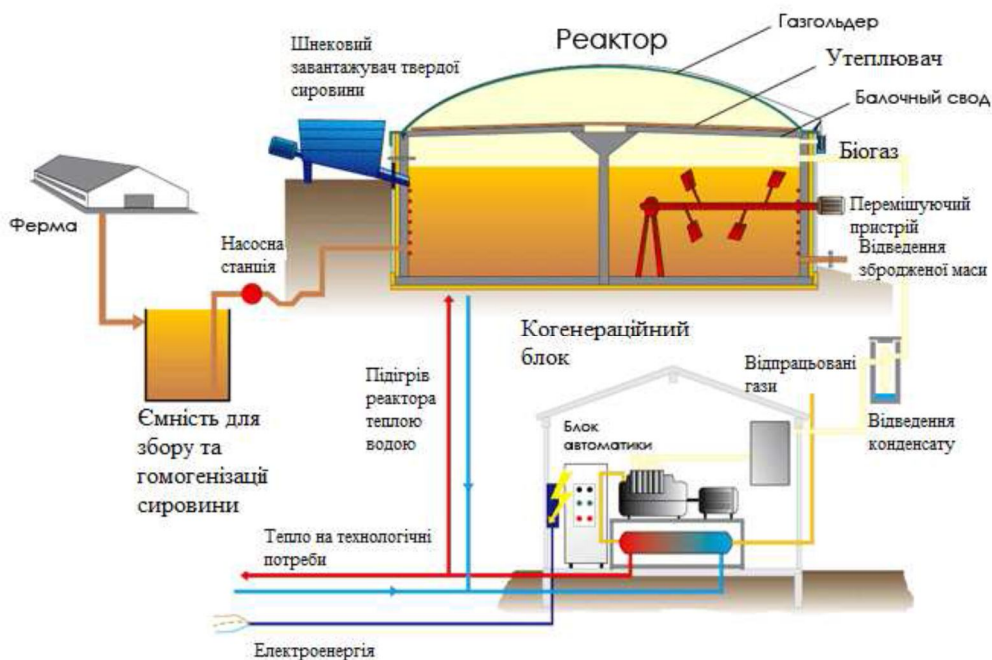


**Рис. 19. Блок-схема виробництва біогазу на основі органічного субстрату**

Анаеробне бродіння здійснюється в герметичній ємності – реакторі звичайної циліндричної форми горизонтального або вертикального розташування. Для ефективного бродіння в порожнині реактора необхідно підтримувати постійну температуру відповідно до прийнятого режиму бродіння: мезофільного або термофільного і здійснювати регулярне перемішування збродженої сировини.

Найбільш ефективними вважаються біореактори, що працюють у термофільному режимі. На таких установках з триденною ферментацією гною вихід біогазу становить 4,5 л на кожен літр корисного об'єму реактора. Об'ємна теплота згоряння біогазу складає 22 МДж/м<sup>3</sup>.

Перероблені анаеробними методами органічні відходи є цінним біодобривом, здатним підвищувати родючість ґрунтів – одного з найбільш цінних ресурсів держави, а також підвищувати конкурентоспроможність сільськогосподарської продукції (рис. 20).



**Рис. 20. Технологічна схема отримання біогазу, добрива та електроенергії з тваринницьких відходів у сільському господарстві**

Одна свиноматка із 20...24 поросятами дає у рік приблизно 25 м<sup>3</sup> гною. У газовому еквіваленті це становить у середньому 1000 м<sup>3</sup> біогазу. Економічно вигідно встановлювати біогазову установку на свинокомплексах з поголів'ям не менше 10...12 тис. свиней (650 свиноматок). Одна дійна корова щодня дає від 30 до 70 кг гною, що у середньому на рік дорівнює 20м<sup>3</sup>, а це 800 м<sup>3</sup> біогазу. БГУ буде економічно ефективною для ферм із поголів'ям від 800 дійних корів.

Біогазова установка приносить "доходи з відходів" або "гроші з гною". БГУ - це найактивніша система очищення, яка дуже швидко самоокуповується і дає прибуток. Сировиною може бути гній великої рогатої худоби, свиней, пташиний послід, відходи боєнь (кров, жир, кишки), рештки рослин, силос, прогниле зерно, каналізаційні стоки, жири, біосміття, відходи харчової промисловості, садові відходи, солодовий осад, вичавки, буряковий жом, технічний гліцерин (від виробництва біодизеля). Більшість видів сировини можна змішувати з іншими видами. Отже, БГУ одночасно та у великих кількостях може: утилізувати біовідходи, виробити біогаз, електроенергію, тепло, добрива, заощадити капітальні витрати (при будівництві нових комплексів).

Усе наведене вище виробляється за мінімальної собівартості, адже за біосміття не потрібно платити, а сама установка для власних потреб використовує лише 10-15 % виробленої енергії.

Якщо на підприємстві утворюється 1 т гною щодня, то за рік на ньому можна отримати як мінімум 60...70 тис. грн, тобто окупність установки гною вражає: 2...3 роки, а для деяких інших видів сировини - 1 рік. Біогаз може використовуватись як газ для опалення та вироблення електроенергії, і, порівняно з використанням звичайного природного газу, він низьковартісний.

З 1м<sup>3</sup> біогазу в генераторі можна виробити 2 кВт електроенергії, яка постачатиметься без перепадів. Тепло від охолодження генератора або від згоряння біогазу можна використовувати для опалення, сушіння насіння, дров, кип'ятіння води для утримання худоби. Тепло отримують під час спалювання газу спеціально, а також відбирають його при охолодженні електрогенератора. Поряд з БГУ можна встановлювати теплиці. Тепло також може використовуватись для приведення в дію випарників рефрижераторів (при охолодженні свіжого молока на молочних фермах або для зберігання м'яса, яєць тощо).

Технологічні схеми БГУ бувають різними, залежно від виду і кількості перероблюваних субстратів, від виду та якості кінцевих цільових продуктів і ряду інших чинників. Найбільш поширеними на сьогоднішній день є схеми з одноступеневим зброджуванням декількох видів субстратів, одним з яких, зазвичай, є гній. У випадку технологічної необхідності ефективною переробки окремих видів субстратів і підвищення загальної ефективності використання робочого об'єму біореакторів застосовують дво- або тріступеневі схеми.

Україна має значний потенціал біологічних ресурсів для виробництва біогазу, використання якого дасть змогу забезпечити 4...7% річних

енергетичних потреб країни. За даними Агентства з відновлюваної енергетики, у 2000 р. обсяг використання біогазу в Україні склав 0,02 ТВт·год, причому в перспективі прогнозується суттєве зростання даного показника: в 2030 р. – до 10,2 ТВт·год/рік, у 2050 р. – до 17,4 ТВт·год/рік.

В Україні є поодинокі приклади впровадження біогазових технологій. Перша установка була побудована у 1993 році на свинофермі “Запоріжсталь”. Наступними стали компанії “Агро-Овен” (Дніпропетровська обл.), “Еліта” (Київська обл.), “Українська молочна компанія” (“УМК”).

На даний час в Україні побудовано та на стадії завершення будівництва знаходиться 7 об’єктів із виробництва біогазу з відходів тваринництва у Дніпропетровській, Івано-Франківській, Київській, Одеській, Харківській, Херсонській областях.

Працюють також біогазові установки на полігонах твердих побутових відходів у Львові, Маріуполі, Кременчуці, Луганську, Києві, а також у Бортицькій станції очищення стічних вод (м. Київ).

**13.2. Виробництво етанолу.** Серед існуючих в наш час способів утилізації біомаси найбільш розроблена на комерційному рівні біотехнологія виробництва етанолу. Етанол вироблений з біомаси біотехнологічним шляхом потім використовується в якості палива для двигунів внутрішнього згорання.

Основною сировиною для виробництва етанолу був крохмаль. Організація великотоннажного виробництва етилового спирту потребує більш доступних джерел сировини. Найперспективніший є целюлоза, щорічне виробництво якої за потенційним вмістом енергії перебільшує кількість палива, що добувають. Складність у використанні целюлози для отримання етанолу полягає в процесі розділення целюлози і лігніну, з яких побудована рослинна клітина. Гідроліз лігноцелюлози за допомогою кислот або луг – дуже коштовний; ферментативний шлях ускладнюється із-за міцного зв’язку між ними. Деякі надії покладають на обробку сировини, що містить целюлозу, і розщеплення лігноцелюлози при температурі 200...300°C і тиску 30...40 атм. В результаті такої обробки (“паровий вибух”) отримують лігнін, целюлозу, до 10% олігосахаридів і деякі інші речовини. Маса, що одержана, може бути використана для біотехнологічного виробництва етанолу.

Принципова схема біотехнологічного отримання етанолу наведена на рис.21.

Спиртове бродіння здійснюють дріжджі-сахароміцети, деякі міцеліальні гриби (*Aspergillus oryzae*) і бактерії (*Ervinia amylovora*, *Sarcina ventricula*, *Zyotomonas mobilis*, *Z. anaerobia*). Найбільше значення в отриманні етанолу мають дріжджі (*Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* і *S. octosporus*).





Рис. 21. Схема біотехнологічного отримання етанолу

В якості сировини для виробництва етилового спирту використовують зерно, картоплю, мелясу бурякову та очерету, рис і т.д., а також целюлозу хвойних дерев, соломку, торф, сульфитні луки - відходи целюлозно-паперової промисловості та ін. Із 1 т старого картону можна отримати 150 л етанолу.

Для отримання етанолу використовують картопляний, кукурудзяний, пшеничний, рисовий крохмаль. Його дроблять, клейстеризують при розварюванні, потім крохмаль гідролізують до нижчих цукрів (моноз, біоз), застосовуючи ферментні препарати з нитчастих грибів або солоду (рис. 22).

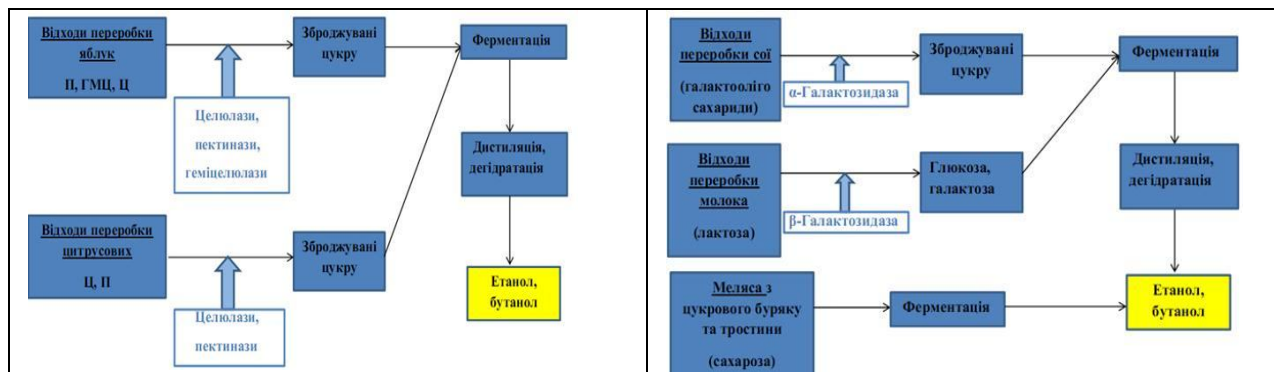


Рис. 22. Варіанти технологій одержання біоетанолу

Виробництво етилового спирту є багатотоннажним. Етанол широко використовується в різних галузях господарства як розчинник, сировина для хімічного синтезу, в медицині і т.д. Етанол можна використовувати як екстрагент і антифриз. Він служить субстратом для багатьох барвників, фармацевтичних препаратів, мастильних матеріалів, клеїв, миючих засобів, пластифікаторів, вибухових речовин і смол для виробництва синтетичних волокон. Зроблені спроби використовувати етанол в якості автомобільного палива. У 1980 р. в США в продаж надійшла суміш з 6...9 частин бензину і 1 частини етанолу («газохол»); це одне з перспективних напрямів використання етанолу.

Підкреслимо, що все більшу економічну і практичну значимість набуває отримання етанолу при зброджуванні гідролізатів деревних і трав'янистих рослин; в них зазвичай міститься 2...3% редуруючих цукрів. Так, при сумісному виробництві спирту та кормових дріжджів із 1 т абсолютно сухої деревини можна отримати: етанол (абс.) 175...182 л., метанол 2 кг, сивушні масла - 0,3 кг, фурфурол (94%) - 3,6 кг, діоксид вуглецю (рідкий) - 70 кг, дріжджі із залишковою вологістю 10% - 32 кг, лігнін (абс. сухий) - 380кг, гіпс - 225 кг.

Нерозчинний лігнін, що залишається після гідролізу, видаляється з реакційної суміші і використовується або для отримання фенол-формальдегідних пластмас, або як паливо для виробництва.

Рідкі відходи після ферментації використовуються на корм великій рогатій худобі, або, після упарювання, концентрований розчин моносахаридів, що не перетворюються дріжджами, слугують комерційним продуктом під назвою "кормові меляси", а діоксид вуглецю - в харчовій промисловості.

Таким чином, в цьому процесі досягається утилізація всіх компонентів деревини – целюлози, геміцелюлози і лігніну, що робить цей процес економічно корисним і доцільним.

Найбільш ефективним є безперервний процес ферментації. Його переваги полягають у наступному:

- а) процес здійснюється протягом усього часу в оптимальних умовах, які не потребують змін;
- б) продуктивність і склад продуктів цього процесу постійні;
- в) глюкоза, хімікати, пар і електроенергія витрачаються рівномірно;
- г) контроль за процесом полегшений і просто здійснюється його автоматизація.

Безперервний процес відбувається, як правило, в проточних ферментерах, принцип дії яких полягає у наступному. Розчин моносахаридів подається знизу. У нижній частині ферментеру створюється щільний шар з суспензії клітин дріжджів, в основному іммобілізованих шляхом адсорбції на нерозчинному носії. У верхній частині концентрація клітин менш висока. Використовують розчини цукрів 8...10% концентрації, при 95% конверсії. Продуктивність за етанолом досягає 80 г/л·год., час затримання реакційної суміші у ферментері складає чотири години, строк безперервної дії ферментеру – до одного року.

*Збільшити виробництво етанолу можна наступними шляхами:*

- Використовувати безперервну ферментацію замість періодичної. Це підвищує продуктивність системи більш ніж в 2 рази. Крім того, вихід етанолу збільшується при використанні флокулюючих рас дріжджів, рециркуляції біомаси і іммобілізації клітин;

- Проведення вакуумної ферментації при розрідженні 32...35 мм рт. ст. для видалення етанолу;

- Здійснення флеш-ферментації, при якій частина культуральної рідини періодично потрапляє в вакуумну камеру для видалення етанолу;

- Селекція етанолтолерантних штамів мікроорганізмів, здатних утворювати високі концентрації спирту.

Технологія змішування біоетанолу з бензином існує в Україні понад 10 років. Так, розроблене вітчизняними технологами на цьому принципі паливо моторне БЮ-100 може бути альтернативою бензину. Воно має високий показник октанового числа; може працювати в двигунах внутрішнього згоряння з іскровим запалюванням, причому модифікація останніх не потрібна. Суміш біоетанолу з дизельним паливом БЮ-100 протягом тривалого терміну зберігає активність, а також суттєво скорочує шкідливі автомобільні викиди в навколишнє середовище. Такий вид палива визнано екологічним, відповідним європейським стандартам, у Європі він відомий під назвою E-85.

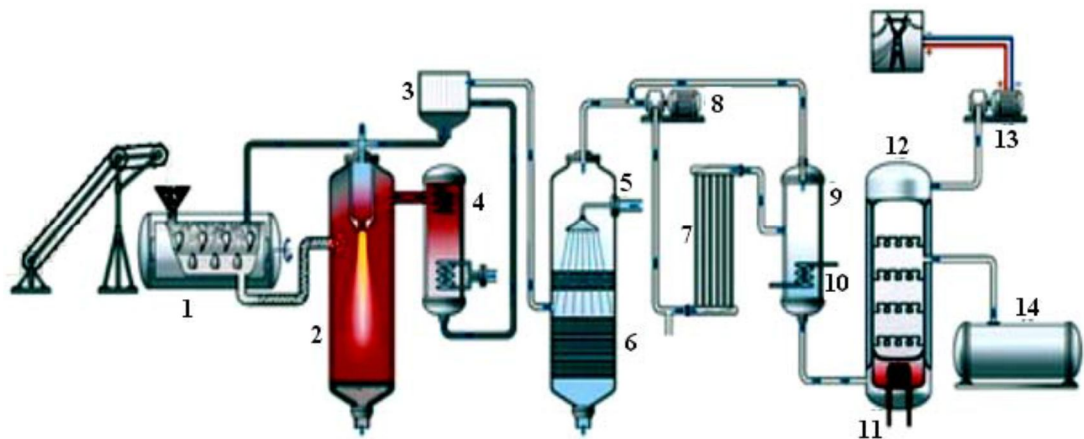
Важливою для виробництва біоетанолу зерновою культурою в Україні є кукурудза. Її зерно – це високоенергетична конкурентоспроможна сировина. Із 10 млн т кукурудзи можна одержати 3,5 млн т добавки до бензину.

Найдешевший біоетанол можна виготовити з патоки – побічного продукту переробки цукрового буряку. Так, зібраний з одного гектара цукровий буряк дає 4 тис. л біоетанолу.

**13.3. Біодизельне паливо.** Біодизельним називають паливо, виготовлене на основі рослинних або тваринних жирів, а також суміші продуктів їх етерифікації (зокрема метилових ефірів ненасичених та насичених вищих жирних кислот: олеїнової, лінолевої, ерукової, пальмітинової). Рослинні олії етерифікуються метанолом, іноді етанолом або ізопропанолом (з цією метою додають одну масову одиницю метанолу до 9–10 масових одиниць рослинної олії за наявності невеликої кількості лужного каталізатора КОН або NaOH та в умовах нормального тиску й температури 60°C). Метилові ефіри жирних кислот очищуються від залишкових продуктів омилення сорбційними методами. Утворюваний при цьому побічний продукт гліцерин можна використовувати у фармацевтичній і лакофарбовій промисловості (рис.23).

Для виготовлення біодизельного палива деякі виробники застосовують соняшникову (Іспанія, Італія, Греція) та рапсову (решта європейських країн) олію. Лідером використання цього продукту є Німеччина, там щорічно виготовляють і реалізують понад 2 млн тонн біопалива, а більше тисячі АЗС ним торгують.

Практика свідчить, що суміш метилових ефірів триацилгліцеролів характеризується доброю здатністю до запалювання, зумовленою високим цетановим числом. Наприклад, даний показник мінерального дизпалива становить 50...52%, а метилового – 56...58%. Ця характеристика дозволяє використовувати згаданий продукт у дизельних двигунах без будь-яких інших речовин, які стимулюють процес запалювання. Біодизельне паливо має високу температуру запалювання (перевищує 100°C), що позитивно оцінюється в організаціях, які транспортують і зберігають паливно-мастильні матеріали.



**Рис. 23. Схема процесу виготовлення біодизельного палива:**

1 – низькотемпературний газовий генератор; 2 – високотемпературний реактор; 3 – пиловий фільтр; 4 – теплообмінник; 5 – подача води; 6 – сепаратор; 7 – багатотрубчастий реактор; 8 – газовий компресор; 9 – конденсор; 10 – система охолодження; 11 – нагрівач; 12 – дистиляційний резервуар; 13 – газовий електрогенератор; 14 – резервуар із готовим паливом

Крім відносно високого цетанового числа, біопаливо має також деякі інші переваги. Так, під час його горіння виділяється  $\text{CO}_2$ , кількість якого не перевищує концентрації вуглекислого газу, засвоєного рослинами з атмосфери.

Біопаливо не завдає шкоди рослинам, тваринам, а при потраплянні у воду не забруднює її. Цей продукт піддається практично повній біологічній переробці. Наприклад, помічено, що в ґрунті та воді мікроорганізми протягом 28 днів здатні переробити 99% біодизельного палива, чого не скажеш про його мінеральний аналог.

Взагалі, у світі відомо понад 150 культур, здатних продукувати олію. Перш за все до них відносять рапс, соняшник, гірчицю та ін.

Забезпечення необхідної кількості сировини для виробництва біопалива, наприклад, зернових (виготовлення біоспиртів) та олійних культур (отримання на їх основі біодизельного палива), може бути реалізовано за рахунок покращення селекційних характеристик вирощуваних сортів рослин та шляхом застосування інтенсивних агротехнологій.

Відомо, що кількість рапсу, вирощена на 1 гектарі при відповідній агротехнології, може забезпечити отримання 20 т зелених кормів, 20 т зелених добрив, 100 кг меду, 3,0...3,5 тонн насіння, 13 ц олії, 16 ц макухи, 500 кг паперу.

Рапсова макуха має низький вміст мононенасиченої ерукової кислоти та глюкозинолату, які негативно впливають на кормову цінність, також в її складі 37% протеїну. Це робить даний продукт повноцінною добавкою до будь-якої кормосуміші для тварин як заміну соєвого та соняшникового шроту (в 1 кг такої макухи міститься 14...16 г незамінних амінокислот,

зокрема лізину, а для порівняння, в зерні ячменю, вівса, кукурудзи й пшениці – 5 г).

Однак економічна привабливість рапсу в Україні й підвищення рентабельності його культивування повинні обов'язково сполучатися з еколого-біологічними особливостями вирощування цієї олійної культури, зокрема з тим, що необхідно дотримуватись вимог сівозміни (бо ця рослина дуже сильно знижує кількість поживних речовин у ґрунтах), мати на увазі значну залежність врожайності рапсу від кількості опадів, а головне, не скорочувати посівні площі під основні сільськогосподарські культури (цукровий буряк, ячмінь, соняшник тощо).

Потужності виробництва біодизельного палива складають 250 тис. т в рік. Потужних виробників нараховується близько десяти. Найбільші серед них „Оріана-Галев” (м. Калуш, Івано-Франківська обл. потужність 180 тис. тон біодизелю в рік), „Лібер” (м. Херсон потужність 10 тис. т), „ВАТ Стирол” (м. Горлівка, Донецька обл., потужність – 10 тис.т) та „АТП1062” (Дніпропетровська обл., 10 тис. т.). Жоден з заводів сьогодні повноцінно не працює. В 2009 р. лише „ВАТ Стирол” випустив декілька сотень тон продукції для власних потреб. Решта заводів випустили продукцію в невеликій кількості, необхідній для сертифікації. Також в Україні в фермерських господарствах встановлено біля 300 дрібних біодизельних установок, які мають потужності від 50 до 500 т в рік.

Силами спеціалістів Української академії аграрних наук було створено науково-технічну програму „Біосировина”, виконання якої має на меті перспективне забезпечення поновлюваними джерелами рослинної сировини та розробку технології її багатоцільового використання.

У рамках цієї програми в Україні запроваджено введення в дію 20 заводів з виробництва біодизельного палива потужністю від 5 до 100 тис. т на рік, що дозволить щорічно виробляти його не менше 623 тис. т.

**13.4. Отримання біоводню.** З біомаси також можна отримувати біоводень. Хімічним шляхом біомаса може безпосередньо перероблятися на водень: з 20 т біомаси можна отримати 2,2 т біоводню. Після його виділення залишається багато мінеральної речовини, яку можна використовувати як добриво. Отже, альтернативою звичайному паливу у майбутньому стане енергія біоводню. Сьогодні науковці ЄС покладають велику надію на те, що будуть розвиватися також програми розвитку біоводню, і енергетичні потреби будуть забезпечуватися за допомогою цього виду палива.

З погляду екології, водень, одержаний шляхом переробки органічних сполук рослинного походження, є ідеальним паливом, що має високу теплотворну здатність (12,8 кДж/м<sup>3</sup>) і згорає без утворення будь-яких шкідливих домішок. Існують фототрофні бактерії, здатні виділяти водень під дією світла. Поки що вони працюють досить повільно, але мають такий біохімічний механізм і містять такі ферменти, які дозволяють каталізувати утворення водню з води. Деякі ферменти паралельно з воднем утворюють і кисень, тобто відбувається фотоліз води. Прикладом може бути система, що включає хлоропласти або хлорофіл і фермент гідрогеназу.

### Продуценти водню

Здатність виділяти водень властива аеробним і анаеробним, хемотрофним (бактерії, що використовують диоксид вуглецю як єдине джерело вуглецю) бактеріям, пурпурним і зеленим фототрофним бактеріям, ціанобактеріям, різним водоростям і деяким найпростішим. Отже, продуцентами водню, потенційно, є:

- водневі бактерії - *Hydrogenomonas*, *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*;
- хемотрофи - *Clostridium butyricum*, *Clostridium perfringens*, *E. coli*, *Citronobacter*, *Ruminococcus*;
- зелені водорості - *Chlorella*, *Spirulina platensis*, *Spirulina maxima*, *Scenedesmus*;
- пурпурні бактерії - *Rhodobacter capsulatus*, *Botryococcus braunii*, *Tiocapsa roreopersiana*, *Dunaliella bavduwi*;
- ціанобактерії - *Anabaena cylindrical*, *Anabaena variabilis*, *Mastigocladis thermophilus*, *Mastigocladis laminosus*;
- галобактерії (морська водорість) - *Halobacterium halobium*.

Для отримання фотоводню розробляються різні біосистеми :

- однокомпонентні - фототрофи;
- двокомпонентні (рослини та бактерії) - симбіотична система бобових рослин, що мають бульби з азотфіксуючими бактеріями *Rhizobium*; симбіотичний комплекс з водної папороті *Azolla* і ціанобактерій;
- багатокомпонентні - системи, що містять ліофілізовані клітини ціанобактерій і пурпурних бактерій; системи, що містять ціанобактерії і водорості тощо.

Особливо привабливим є спосіб використання мікроорганізмів, а саме хемотрофних аеробів, синьо-зелених водоростей чи ціанобактерій.

Ці системи, незалежно від природи складових її компонентів, повинні мати два елементи:

1. Електрон-транспортну систему фотосинтезу, що включає систему розкладання води:

- хлоропласти рослин, ферредоксин і бактерійні гідрогенази;
- хлоропласти з медіатором (низькомолекулярний переносник електронів) і бактерійні гідрогенази;
- фотосинтезуючі водорості.

2. Каталізатори утворення водню:

- неорганічні каталізатори (металева платина);
- ферментативні (гідрогенази), здатні функціонувати як в розчинному, так в іммобілізованому стані.

*Біофотоліз* – біологічне утворення газоподібного водню внаслідок фоторозкладу води біохімічними системами, що здатні здійснювати фотоліз води на водень та кисень в однофазному та двофазному режимах.

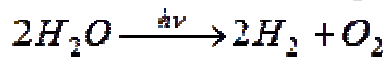
*Загальна схема фотолізу води:*

- поглинання кванта світла водою;
- робота електронно-транспортної системи ;

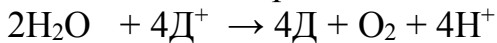
- утворення та накопичення водню;
- виділення кисню в довкілля.

*Типи модельних біосистем водню:*

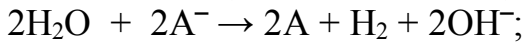
- біохімічні системи прямого біофотолізу води - ґрунтується на реакції:



- двостадійний процес - світловий (виділення кисню):



та темновий (виділення водню):



- одностадійний процес - одночасне виділення кисню та водню з подальшим розподіленням їх через напівпроникні мембрани;
- система біокаталітичного виробництва водню - одностадійний процес у видимих променях Сонця.

Енергія з біомаси представлена на планеті чи не у найбільшому асортименті. За даними ФАО (Продовольчої і сільськогосподарської організації ООН), більшість країн світу просто не використовують свій потенціал біомаси. Шляхом поліпшення системи управління та менеджменту (дотримання технологій, правильне внесення добрива тощо) урожаї сільськогосподарських культур можна підвищити.

Отже, перед ученими всього світу стоїть завдання пошуку енергоресурсів поновлюваної енергії, яку накопичують живі організми завдяки фотосинтезу. Це завдання успішно вирішуються, тому існує думка, що в найближчій перспективі за рахунок використання продуктів фотосинтезу буде забезпечуватися до 10 % всіх енергозатрат.

**Завдання:** Заповнить таблицю за наданим зразком.

*Таблиця 10*

### Види біопалива та його використання

Паливо	Продуценти	Субстрати	Побічні продукти виробництва, їх використання	Напрями використання
Біогаз				
Біоетанол				
Біодизель				
Біоводень				

### *Питання для самоперевірки*

1. Які види біопалива розрізняють?
2. Які види біомаси розглядають в якості джерела енергії?
3. Вкажіть етапи процесу метаногенезу.
4. В чому полягає перевага використання переробленої після метаногенезу біомаси в якості добрив?
5. Як в Україні розвивається виробництво біогазу?

6. З яких етапів складається процес біотехнологічного виробництва біоетанолу?
7. Що таке «газохол», де він використовується?
8. В чому полягають переваги використання біоетанолу?
9. Вкажіть переваги використання біодизельного палива.
10. Які існують обмеження при використанні біодизелю?
11. Як в Україні розвивається виробництво біодизелю?
12. Які існують способи отримання біоводню?
13. Чому біоводень вважають «ідеальним» паливом?
14. В чому полягає процес фотосинтезу водню?
15. В чому полягає процес отримання водню за рахунок фотолізу води?

## 14. Біотехнологія і харчова промисловість

### 14.1. Мікроорганізми і виробництво молока і молочних продуктів

Молочнокислі бактерії широко поширені в природі і використовуються в багатьох біотехнологічних процесах, пов'язаних з виробництвом молока та кисломолочних продуктів. Середовищем проживання цих бактерій є молоко, молочні продукти. Разом з рослинами молочнокислі бактерії потрапляють в шлунково-кишковий тракт людини і тварин, складаючи його мікрофлору. Бактерії роду *Bifidobacterium* переважають у кишечнику грудних дітей, особливо тих, що годуються грудним молоком, оскільки ці бактерії потребують вуглеводи, що містять N-ацетилглюкозамін, який знайдений тільки у жіночому молоці. Виявлено вони і в кишковій флорі дорослих людей, а також в гниючому мулі.

Основною властивістю молочнокислих бактерій, за якою їх об'єднують в окрему велику групу мікроорганізмів, є здатність утворювати в якості головного продукту бродіння молочну кислоту. Молочнокисле бродіння здійснюють бактеріальні організми, гетерогенні за морфологією, що належать до родин *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Bifidobacterium*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*.

Молочнокислі бактерії за характером продуктів зброджування гексоз (глюкоза, фруктоза, маноза, галактоза), дисахаридів (лактоза, мальтоза, сахароза) і полісахаридів (декстрин, крохмаль) відносять до гомоферментативних і гетероферментативних.

В основному молочнокислі бактерії культивують на середовищах з шостівуглеводними цукрами, але вони можуть також зброджувати деякі п'ятиуглеводні цукри, сахароспирти, органічні кислоти і полісахариди.

Відмітною ознакою молочнокислих бактерій є висока потреба в складних поживних середовищах, певних амінокислотах, вітамінах, особливо групи B. Найбільш важливим джерелом енергії для молочнокислих бактерій є моно- і дисахариди – глюкоза, лактоза, сахароза, мальтоза. В якості джерела енергії і в конструктивному обміні використовують також органічні кислоти: лимонну, яблучну, пировиноградну, фумарову та ін. Властивість зброджувати різні цукри і органічні кислоти, зокрема рибозу, цитрат або



ацетат, лежить в основі тестів для ідентифікації молочнокислих бактерій (табл.11).

Фізіологічною особливістю молочнокислих бактерій є їх кислотостійкість як наслідок характерного для них енергетичного обміну. Розмноження всіх молочнокислих бактерій продовжується до тих пір, поки в процесі бродіння вуглеводів рН в середовищі не знизиться до 5,0 і нижче. В результаті життєдіяльності гомоферментативних лактококів накопичується до 1% молочної кислоти, а *Lactobacillus bulgaricus* – до 3,5%.

Таблиця 11

Функціональна роль деяких бактерій, використовуваних при переробці  
молока

Культура	Функція	Використання
<i>Propionibacterium</i> <i>P. shermanii</i> <i>P. petersonii</i>	Формування смаку	Виготовлення сиру
<i>Lactobacillus</i> <i>L. easei</i> <i>L. helveticus</i> <i>L. bulgaricus</i> <i>L. lactis</i>	Утворення молочної кислоти	Дозрівання, закваска, для виготовлення сирів
<i>Leuconostoc</i> <i>L. dextranicum</i> <i>L. citrouorum</i>	Утворення смакових речовин з лимонної кислоти (в основному з діацетилу)	Виробництво сметани, вершкового масла, заквасок
<i>Streptococcus</i> <i>S. thermophilus</i> <i>S. lactis</i> <i>S. cremoris</i>	Утворення молочної кислоти	Виробництво йогурту і сиру, закваски для сирів

Найбільш широке застосування молочнокислі бактерії знайшли в виробництві кисломолочних продуктів в харчовій промисловості. Гомо- та гетероферментативні молочнокислі бактерії давно використовуються в хлібопеченні. Їх асоціації з дріжджами, сприятливі для створення аромату, смаку, пористості, забарвлення і свіжості, називаються заквасками.

Молочнокисле бродіння є основою силосування кормів і квашення овочів (капусти, огірків), плодів, ягід (маслин, яблук) і т. д. Ці процеси протікають за рахунок природних мікроорганізмів, що знаходяться на об'єкті, що заквашують. Останнім часом використовують спеціальні закваски, що забезпечують проведення процесів в прогнозованих режимах і з очікуваними результатами.

Молочнокислими продуктами є різні сири, одержувані з знежиреного або незбираного молока. Відомі найрізноманітніші сири – від дуже м'яких до

твердих. Різниця між ними визначається тим, що всі натуральні м'які сири містять багато води (50-60%), а тверді – усього лише 13-34%. Хоча властивості сирів різноманітні, у процесі виробництва всіх їх є багато загального.

Перший етап – це підготовка культури молочнокислих бактерій і засів нею молока.

Потім здійснюють зсідання молока, для чого звичайно застосовують фермент ренін (хімозин, або сичужний фермент). До відкриття ролі сичугу, що містить хімозин, кочівники для зберігання і транспортування молока використовували шлунки овець. При цьому воно нагрівається на сонці і скисало під дією бактерій. Додаткова дія ферментів шлункового соку приводила до зміни молока, воно поділялося на тверду частину і сироватку.

Тверда частина потім висушувалася, солилася і могла довго зберігатися, що є прикладом ранньої розробки технології для збереження продукту харчування.

Відразу ж після внесення в молоко ферменту, виділеного з тварин або мікроорганізмів, відбувається обмежений протеоліз казеїну. Коагульованої казеїн утворює желеподібну масу і з'єднується з жиром, після чого сироватку фільтрують, віджимають залишкову воду і висушують загортанням в тканину.

Наступним етапом технології є дозрівання сиру. Виробництво сиру з молока - дегідратаційний процес, при якому відбувається концентрування казеїну і жиру в 6-12 разів. У процесі дозрівання деяких сирів практикується штучне розмноження мікроорганізмів (бактерії і гриби) для додання сиру специфічного смаку та аромату.

Приблизно 100 років тому виробництво сиру досягло такого рівня і комерційних масштабів, що виробники перестали довіряти процесу спонтанного розмноження молочнокислих бактерій і почали застосовувати чисті бактеріальні культури. Різноманіття бактерій викликало значне розширення асортименту сирів.

Кислоту на початку заквашування утворюють в основному *Streptococcus thermophilus*. Змішані закваски потрібно часто обновляти, оскільки повторні пересівання несприятливо позначаються на співвідношенні видів і штамів бактерій.

З молочних продуктів найпростіше одержувати масло. Залежно від сорту виробленого масла використовують вершки з концентрацією від 30 до 40 %. При їхньому збиванні утворюється масло. При виробництві масла для поліпшення смаку й кращої тривалості зберігання використовують особливі культури бактерій. Поліпшення смаку досягають шляхом створення спеціальних штамів бактерій, відібраних за здатністю синтезувати потрібні речовини, що впливають на смак. Першими для цієї мети були використані штами *Streptococcus lactis* і близьких видів, а потім – змішані культури.

Молочнокислі бактерії включають в різні композиції профілактичних і лікувальних препаратів: біфідумбактерин, біфікол, колібактерин, лактобактерин. Перший з них складається з живих висушених біфідобактерій

певного штаму, другий – з живих біфідобактерій і кишкової палички, третій містить живі кишкові палички, четвертий являє собою поєднання ліофільне висушених лактобацил (*L. fermenti* і *L. plantarum*). За кордоном виготовляють так званий пробіотик «Ферлак», що містить молочнокислі бактерії з добавками вітамінів А, D<sub>3</sub> та Е. Його змішують з кормом і рекомендують поросяттям, телятам і птахам. За допомогою молочнокислих бактерій у промисловості досить широко використовують отримання молочної кислоти.

*Визначення кількості молочної кислоти в кисломолочних продуктах.*  
Утворення молочної кислоти є найважливішою ознакою, за якою можна судити про ефективність молочнокислого бродіння і відповідно про якість одержуваного кисломолочного продукту. Кількість молочної кислоти в досліджуваній пробі визначають методом титрування розчином NaOH. Кислотність молока або кисломолочного продукту виражають у градусах Тернера (°Т) або відсотках молочної кислоти. Так, 1°Т відповідає 1 мл 0,1 н. розчину NaOH, який пішов на титрування 100 мл досліджуваного середовища.

Для кожного з вироблених молочною промисловістю продуктів існують норми кислотності, що затверджені Міністерством охорони здоров'я, і свідчать про якість продукту.

Допустимі норми кислотності в °Т продуктів молочної промисловості наведено в табл. 12.

Таблиця 12

### Показники якості кисломолочних продуктів

Продукт	Кислотність (в °Т)
Молоко	16–18
Ацидофілін	75–130
Ряжанка	85–150
Варениць	75–120
Йогурт	85–150
Мацоні	75–120
Кефір	70–120
Сир м'який	240
Сметана	60–100
Сливки	17–18
Кумис	60–120

#### 14.2. Використання мікроорганізмів у хлібопеченні

Хліб є одним з основних продуктів харчування. Виготовлення його являє собою складний цикл мікробіологічних і біохімічних процесів, що відбуваються в тесті з моменту змішування борошна з водою і закінчуючи його випічкою. До складу борошна, що використовують для випічки пшеничного і житнього хліба, входять компоненти, необхідні для розвитку багатьох мікроорганізмів. Крім крохмалю в борошні міститься до 2% цукрів,

що зброджуються – глюкози, фруктози, мальтози, сахарози, рафинози. Борошно хороших сортів пшениці містить до 14% білка. Його азотовмісні речовини представлені різноманітними групами білків – альбумінами, глобулінами та ін. Борошно містить до 2% жирів і жироподібних речовин, а також до 2% мінеральних речовин, у тому числі мікроелементи.

Вирішальну роль у приготуванні хліба поряд з ферментами борошна грає життєдіяльність мікроорганізмів. Борошно завжди містить значну кількість різних мікроорганізмів. Їх число залежить від ступеня забрудненості зерна та способів його очищення. Вносять мікроорганізми і з добавками до тесту в процесі приготування хліба. Однак з усього розмаїття мікроорганізмів тіста найбільш важливе значення мають дріжджі та молочнокислі бактерії, для розвитку яких в тесті є всі необхідні умови – вологість 40...50%, незначний вміст молекулярного кисню і наявність поживних речовин.

Провідна роль у формуванні якості хліба належить дріжджам. Їх головна функція полягає у заквашуванні тіста, в результаті чого воно піднімається під дією вуглекислого газу, що виділяється при бродінні. Мікробіологічні процеси і пов'язані з ними біохімічні зміни в тесті визначають пористість, забарвлення і збереження свіжості хліба, надають йому смак і аромат, дещо підвищують його поживну цінність.

Дріжджі *Saccharomyces cerevisiae* різних рас є головними розпушувачами тіста. Для хлібопечення особливо важливі такі властивості дріжджів, як висока потенційна активність гліколітичних ферментів, стійкість їх зберігання, здатність переносити високі концентрації цукрів і NaCl в середовищі. У хлібопеченні найчастіше використовують швидкорослі раси сахароміцетів верхового бродіння. У повноцінних рас дріжджів підйомна сила, тобто тривалість підйому тесту на стандартну висоту 70 мм в стандартній формі, повинна бути не більше 45 хв. Дріжджі повинні мати 100%-ю стійкість до меляси і швидкість росту не менше 0,2 год<sup>-1</sup>. На хлібозаводах застосовують пресовані та сухі дріжджі.

У пшеничних і житніх заквасках переважають молочнокислі бактерії, а не дріжджі.

### **14.3. Бродильні виробництва**

Зброджування здійснюється дріжджами роду *Saccharomyces*. В одних випадках використовується природний цукор (наприклад той, що міститься у винограді, з якого роблять вино), та інші цукри, що одержують із крохмалю (наприклад, при переробці зернових культур у пивоварстві). Наявність вільних цукрів обов'язкова для спиртового бродіння за участю *Saccharomyces*, тому що ці види дріжджів не можуть гідролізувати полісахариди. Сахароміцети інтенсивно засвоюють різні моносахариди: глюкозу, фруктозу, галактозу; дисахариди: сахарозу, мальтозу, зброджуючи їх в етиловий спирт.

Встановлено, що сахароміцети, порівняно з іншим дріжджами, виявляють високу толерантність до етилового спирту. Після закінчення процесу бродіння етиловий спирт накопичується в кількості 14...16%.

Цікаво, що в середовищі, що зброджується, така концентрація спирту пригнічує розмноження дріжджів; до цього моменту відмітною якістю середовища є підвищення кислотності за рахунок новоутворених органічних кислот. Саме таке поєднання визначає біологічні якості зброженого водного розчину спирту, що відрізняє його від розчину чистого спирту тієї ж концентрації.

Наступним процесом технологічного циклу є дистиляція. Вона являє собою концентрування етилового спирту і виділення чистої фракції, що значним чином визначає якість алкогольних напоїв.

Іноді з метою поліпшення органолептичних якостей готових напоїв вдаються до настоювання концентрованого етилового спирту на різних ароматичних речовинах.

Як правило, концентрація спирту в міцних напоях коливається в межах 20-50%. При виробництві тонізуючих напоїв і лікерів використовують ароматичні сполуки, виділені з квітів, листя і плодів рослин, а також отримані синтетичним шляхом.

*Вино.* Ще не так давно бродіння виноградного соку відбувалося спонтанно, за рахунок природної мікрофлори.

Сьогодні підхід до процесу спиртового бродіння істотно змінився. Для стабільного виробництва високоякісного вина необхідно здійснювати бродіння чистими культурами дріжджів, заздалегідь виділеними, бажано адаптованими до місцевих умов. Для цього до виноградного соку додають одну з чистих культур бактерій. Бродіння проводиться в певних умовах: у спеціальних посудинах великої ємності, при температурі 7...14°C.

Про завершення бродіння судять за різними параметрами. Серед них найважливішими є: залишковий цукор, кількість етилового спирту, гліцерину, летючих кислот. Після закінчення бродіння процентний вміст етилового спирту в різних типах вин становить 10...14%. Крім цього, під час бродіння часто відбувається спонтанне, бактеріальне бродіння, при якому первинна яблучна кислота перетворюється в молочну.

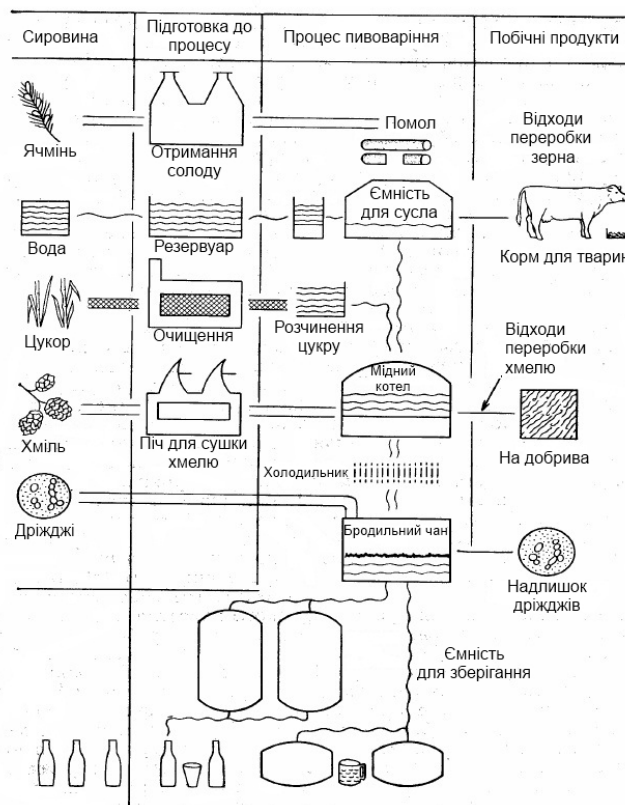
Після завершення спиртового бродіння молоде вино зберігають в особливих умовах, щоб воно не зіпсувалося. Якщо вино не передбачається піддавати додатковому яблучно-молочнокислому доброджуванню, його обробляють сірчистим газом, що придушує окисні процеси, які викликають його потемніння. До цього з вина видаляють дріжджі, щоб припинити бродіння. Першосортні вина піддають витримці різного роду залежно від типу вина, а більш дешеві розливають, як правило, у той же рік, коли його отримали. Труднощі при виробництві дешевих вин зазвичай пов'язані з їхньою схильністю до вторинного, яблучно - молочнокислого бродіння, що розвивається після розливу. Якщо вино схильне до такого бродіння, його (бродіння) штучно викликають до розливу, а якщо ні, то придушують. При виробництві першосортних червоних вин таке бродіння навіть бажане. Воно становить природну частину процесу й відбувається при зберіганні. Цей тип бродіння здійснюється молочнокислими бактеріями. Деякі особливі сорти вин одержують при участі гриба *Botrytis cinerea*. Його розвиток на ягодах

приводить до їхнього зневоднювання й підвищення змісту цукру, що визначає солодкий смак вина. При цьому зараження повинне відбуватися тільки перед збором винограду.

*Пиво* виробляється за такою технологічною схемою.

Сухий ячмінь замочують у воді для отримання паростків, що містять ферменти (амілаза і протеаза). Амілаза сприяє розкладанню крохмалю на олігодекстрини, за рахунок яких в основному визначається в'язкість пива і характерна здатність до піноутворення, протеаза каталізує гідроліз білків до амінокислот, які необхідні для розмноження дріжджів і формування специфічного аромату пива. Після проростання паростки солоду дроблять і поміщають у воду при температурі 60...65°C. В результаті інкубування в цих умовах паростки втрачають здатність до подальшого зростання (відмирають), а ферменти (амілаза, протеаза) зберігають свою активність. Водний розчин паростків солоду наливають у чан з субстратом і настоюють протягом декількох годин. За цей час протікають основні ферментативні процеси, при яких відбувається гідроліз крохмалю та білків. Водний розчин, або, як його називають, пивне сусло, відокремлюють від осаду і варять з хмелем для додання аромату і антисептичних властивостей, характерних для пива. Після цього хміль видаляють фільтрацією і отриманий розчин готовий для зброджування.

Ферментація або бродіння протікає в спеціальній посудині - біореакторі, де до розчину додається чиста культура дріжджів. З цією метою традиційно використовували селективне відібрані протягом сотень років дріжджі (рис. 24).



**Рис. 24. Операції, що лежать в основі пивоваріння**

#### 14.4. Використання мікроорганізмів у виробництві білкових продуктів

При виробництві даних продуктів за допомогою мікробів відбувається глибока зміна властивостей білоквмісної сировини. У результаті одержують харчові продукти, які можна довше зберігати (сир). Мікроби відіграють роль й у виробництві деяких м'ясних продуктів, призначених для зберігання. Наприклад, при виготовленні деяких сортів ковбаси (*salami*) використовується кислотне бродіння, за участю молочнокислих бактерій. Кислота, що утворилася, сприяє збереженню продукту й вносить вклад у формування його особливого смаку. Кислотоутворюючі бактерії використовуються й при засоленні м'яса. Ряд блюд східної кухні одержують шляхом ферментації риби. Для цього застосовують цвілеві гриби й дріжджі. У цілому використання мікроорганізмів у переробці білків обмежене. Виключенням є сироваріння й вирощування мікробної маси, що переробляється в харчові продукти.

Для мікробного білка придумана спеціальна назва - білок одноклітинних організмів (БОО). Державні установи, що контролюють якість харчових продуктів, вимагають, щоб виходу на ринок БОО передували випробування на безпеку нового продукту. Такі випробування завжди дорого вартісні, і це стримує розвиток виробництва, зокрема виробництва продуктів на основі БОО, особливо призначених у їжу. Із цієї причини ухил у розвитку виробництва БОО був зроблений у бік виробітку кормів для тварин, а не білків, що безпосередньо йдуть у їжу.

Єдиний офіційно дозволений вид білкової їжі мікробного походження - це *мікопротеїн* (мукопротеїн). Мікопротеїн - це харчовий продукт, що складається в основному з міцелія гриба. При його виробництві використовується штам *Fusarium graminearum*, виділений із ґрунту (рис. 25).

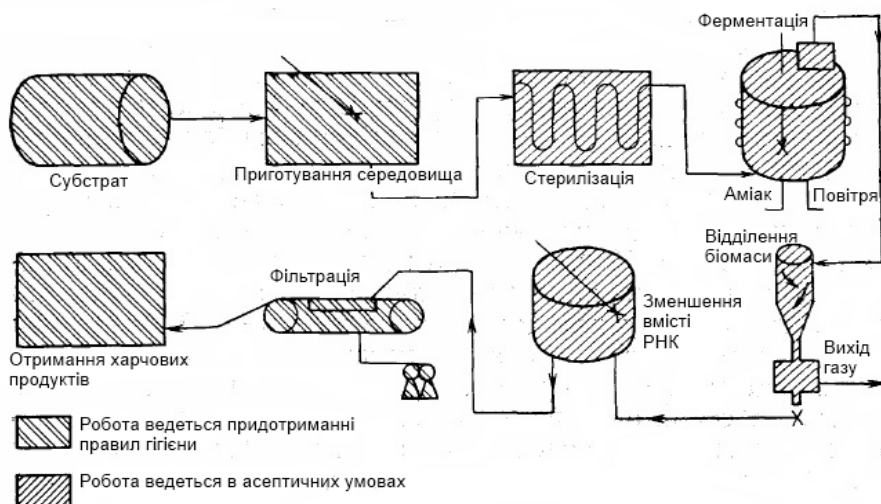


Рис. 25. Схематичне зображення виробництва мікопротеїну

**Завдання.** Вкажіть, які існують «хвороби» хліба, та мікроорганізми, що їх викликають.

### *Питання для самоперевірки*

1. Яку їжу називають «функціональною»?
2. Які продукти харчовій промисловості отримують за рахунок багатотоннажного біотехнологічного виробництва?
3. Які продукти харчовій промисловості отримують за рахунок малотоннажного біотехнологічного виробництва?
4. Яким чином біотехнологія може використовуватися в харчовій промисловості?
5. Які переваги має технологія з використанням молочнокислих бактерій?
6. Які бактеріальні організми здійснюють молочнокисле бродіння?
7. Опишіть особливості фізіолого-біохімічних властивостей молочнокислих бактерій.
8. Вкажіть у виробництві яких харчових і кормових продуктів використовується молочнокисле бродіння?
9. Вкажіть етапи процесу виробництва сиру.
10. Які існують способи отримання сичужного ферменту?
11. В чому виражають кислотність молока або кисломолочного продукту?
12. Опишіть властивості, які необхідно враховувати при визначенні якості молока та кисломолочних продуктів.
13. Чому провідна роль у формуванні якості хліба належить дріжджам?
14. Опишіть властивості дріжджів, важливі для хлібопечення.
15. Які субстрати застосовуються для отримання алкогольних напоїв?
16. За якими ознаками можуть бути класифіковані алкогольні напої?
17. За якими параметрами судять про завершення бродіння?
18. В чому полягає різниця у виробництві дешевих і першосортних вин?
19. Які корисні властивості вина відомі?
20. Вкажіть етапи технологічної схеми виробництва пива.
21. На які категорії розподіляється чай за ступенем ферментації?
22. На якому етапі виробництва кави застосовується процес ферментації?
23. У виробництві яких білкових продуктів використовуються мікроорганізми?
24. За яких причин становить інтерес вирощування мікробів у харчових цілях?
25. Що таке БОО і в чому полягає його особливість?
26. Які відомі харчові добавки, що отримують біотехнологічним шляхом?
27. На які групи можуть бути розділені сполуки, що володіють солодким смаком?
28. Які види замінників цукру використовуються?



## 15. Екологічна біотехнологія

Екологічна біотехнологія – це специфічне застосування біотехнології для рішення проблем захисту навколишнього середовища від забруднень антропогенного характеру. Значення біотехнології в рішенні екологічних проблем у доступному для огляду майбутньому буде зберігатися і навіть зростати в зв'язку з технічним прогресом і збільшенням масштабів промислового виробництва, наслідком яких є посилення негативного тиску людини на рослинний і тваринний світ планети.

Розвиток екологічної біотехнології як науки йде в напрямках удосконалювання і створення нових методів, технологічних схем, устаткування і систем контролю та керування. Розробляються нові штами мікроорганізмів на основі методів генної інженерії. Поступово знаходяться рішення проблеми негативного впливу мінливості якості вхідного сировинного потоку на життєдіяльність мікроорганізмів в очисних реакторах. Конструктивне удосконалювання й оформлення реакційних пристроїв повинне сполучатися зі створенням оптимального якісного і кількісного складу мікробного співтовариства в них. Для видалення з промислових стоків азоту і фосфору потрібна розробка спеціальних типів біомаси фотосинтезуючих мікроорганізмів.

Існує проблема виділення металів з активного мулу біологічного очищення стічних вод. Чекає рішення проблема використання технології рекомбінатних плазмід в очищенні ґрунтів від хлорзаміщених пестицидів. Одержує розвиток технологія біопестицидів. Приладобудування повинне розглядатися як інтегральна частина екологічної біотехнології.

Потрібні дешеві і надійні датчики контролю біопроцесів, прості в обслуговуванні. Моделювання біотехнологічних апаратів багато в чому сприяє оптимізації біотехнологічних процесів, воно спрямоване на досягнення позитивних результатів при мінімальних витратах сировини, енергії і робочої сили.

Екологічну технологію людство використовує в таких напрямках:

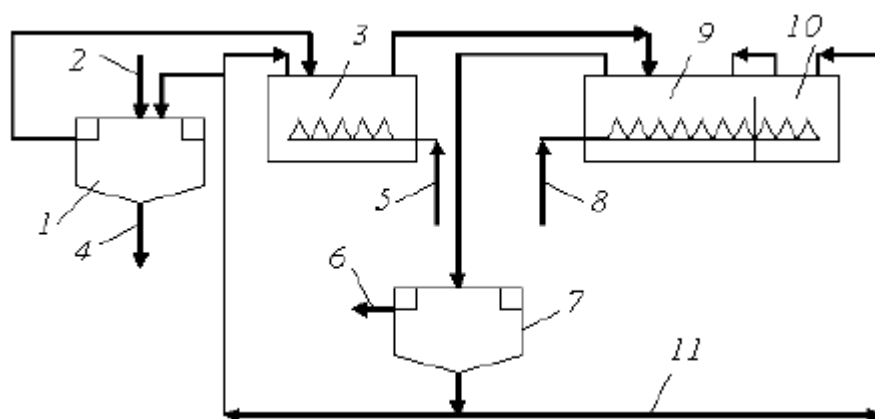
- біологічне очищення води, у тому числі очищення стічних вод;
- утилізація і поховання твердих і рідких відходів промислового і сільськогосподарського виробництва;
- захист від забруднень і поліпшення родючості ґрунту;
- захист від забруднень атмосферного повітря.

### 15.1 Очищення стічних вод

Біологічне очищення стічних вод – добре освоєний процес. Однак цей процес у його теперішньому стані дозволяє руйнувати тільки відносно прості органічні й амонійні сполуки. Неорганічні сполуки, токсини, комплексні сполуки і складні органічні сполуки (які також можуть бути токсичними) зв'язуються з біомасою, частково руйнуються, але ступінь очищення від них набагато нижче. Наприклад, використання очищення за допомогою активного мулу не гарантує видалення іонів важких металів

(кадмій, хром, нікель, свинець, ртуть). Хоча концентрація таких неконтрольованих забруднень у комунальних стоках повинна бути обмежена, вони усе ще являють загрозу для навколишнього середовища при їхньому проскакуванні у вихідний стік. Якщо ж вони сорбуються в активному мулі, то при внесенні цього мулу в ґрунт можуть виникати серйозні проблеми.

Процес очищення стічних вод може здійснюватися за допомогою звичайних очисних споруджень (аеротенк, біофільтр), штучно іммобілізованої біомаси за допомогою іммобілізованих ферментів (рис. 26). Успіхи в створенні і використанні нових видів біомаси і ферментів допоможуть вирішити багато складних проблем.



**Рис. 26. Схема установки для біологічного очищення стічних вод:**  
 1 - первинний відстійник; 2 - вхідні стічні води на очищення; 3 - преаератор; 4 - осад; 5, 8 - повітря; 6 - очищені стічні води; 7 - вторинний відстійник; 9 - аеротенк; 10 - регенератор; 11 - активний мул.

Біохімічні процеси, що протікають в аеротенку, можуть бути розділені на два етапи:

- адсорбція поверхнею активного мулу органічних речовин і мінералізація легко окислюваних речовин при інтенсивному споживанні кисню;

- доокислення органічних речовин, які повільно окисляються, регенерація активного мулу. На цьому етапі кисень витрачається повільніше.

Як правило, аеротенк розділений на дві частини: регенератор (25% від загального обсягу) і власне аеротенк, у якому йде основний процес очищення.

Наявність регенератора дає можливість очищати більш концентровані стічні води і збільшити продуктивність агрегату.

Аеротенки підрозділяються за наступними основними ознакам:

- 1) за гідродинамічним режимом – на аеротенки-витискувачі, аеротенки-змішувачі й аеротенки проміжного типу (з розосередженою подачею стічних вод);

- 2) за способом регенерації активного мулу – на аеротенки з окремою регенерацією й аеротенки без окремої регенерації;

3) за навантаженням на активний мул – на високонавантажні (для неповного очищення), звичайні, і низьконавантажні (із продовженою аерацією);

4) за кількістю ступенів – на одно-, двох-, і багатоступінчасті;

5) за режимом введення стічних вод – на проточні, напівпроточні, з перемінним робочим рівнем, і контактні;

б) за конструктивними ознаками.

Відомі такі конструкції аеротенків:

- Коридорний - працює за принципом витіснення, малоінтенсивний, відкритий;

- Системи Кессенера - поверхневий аератор з обмеженою глибиною, відкритий;

- Системи «Симплекс» - турбінний аератор, відкритий;

- Пневматичний з керамічними повітророзподільниками - інтенсивна аерація за допомогою компресора, відкритий;

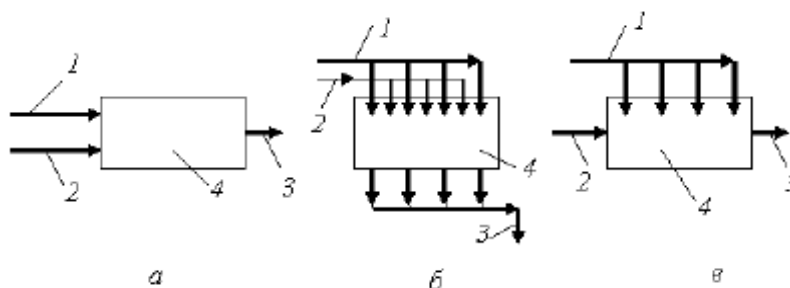
- Колонний, баштовий або ерліфтний низька турбидізація середовища (вимагається компресор), закритий;

- Інжекційний з рециркуляцією мулу і спалюванням органічних речовин, що містяться у відпрацьованому газі - інтенсивна аерація (вимагається компресор), закритий.

Найбільш поширені коридорні аеротенки, що працюють як витискувачі, змішувачі, і з комбінованими режимами.

Схеми аеротенків з різною структурою потоків стічної води і поворотного активного мулу показані на рис. 27.

В аеротенках-витискувачах воду й мул подають у початок спорудження, а суміш відводять наприкінці його. Аеротенк має 1-4 коридори. Теоретично режим потоку поршневий, без подовжнього перемішування. На практиці існує значне подовжене перемішування. Підвищена концентрація забруднень на початку спорудження забезпечує збільшення швидкості окислювання. Зміна складу води по довжині аеротенка утруднює адаптацію мулу і знижує його активність. Такі аеротенки застосовують для окислювання мало концентрованих вод (до 300 мг/л по БПКполн).

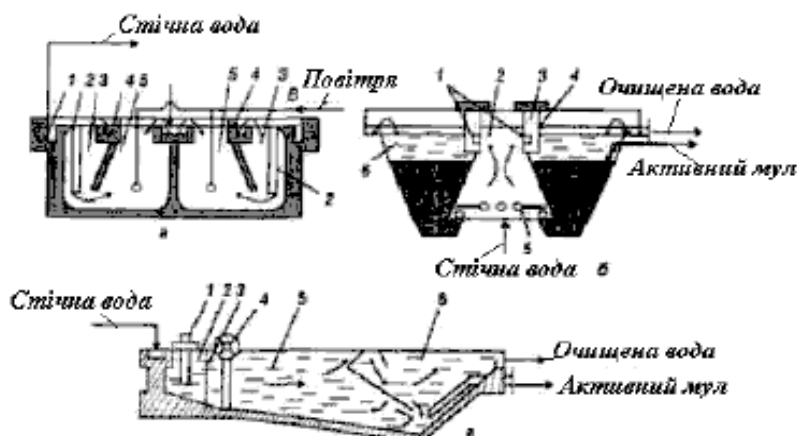


**Рис. 27. Аеротенки з різною структурою потоків стічної води і поворотного активного мулу: а - аеротенк-витискувач; б - аеротенк-змішувач; в - аеротенк із розосередженою подачею стічної води: 1 - стічні води на очищення; 2 - активний мул; 3 - мулова суміш; 4 - аеротенк**

На рис. 28-а показана схема аеротенка-відстійника, об'єднаного з вторинним відстійником. Зона аерації відділена від зони відстоювання. Стічну воду подають у центрі, а відводять по лотку. У зоні відстоювання утворюється шар зваженого активного мулу, через який фільтрується стічна вода. Надлишковий активний мул відводять із зони зваженого шару по трубах, а зворотний активний мул надходить у зону аерації.

В аеротенку-освітлювачі (рис. 28-б) стічна вода надходить у зону аерації, де змішується з активним мулом і аерується. Потім суміш через вікна попадає в зону освітлення і зону дегазації. У зоні освітлення виникає завислий шар активного мулу, через який фільтрується мулова суміш. Очищена вода через лотки віддаляється з аеротенка.

Двокамерні аеротенки-відстійники (рис. 28-в) є різновидом аеротенків-освітлювачів. У них зона аерації розділена вертикальною перфорованою перегородкою на дві камери. У першій камері відбувається насичення мулової суміші киснем і сорбція забруднень активним мулом, у другий - окислювання сорбованих забруднень і стабілізація активного мулу. Надлишковий мул віддаляється з зони освітлення.



**Рис. 28. Аеротенки:**

а - аеротенк-відстійник: 1- лоток, 2 - мулососи, 3- зона відстоювання, 4 - водозливи, 5 - зона аерації;

б - аеротенк-освітлювач: 1-переливні вікна, 2 - зона аерації, 3 - зона дегазації, 4 - направляюча перегородка, 5 - аератор, 6 - зона освітлення;

в - двокамерний аеротенк-відстійник: 1- імперлерний аератор, 2 - зона попереднього збагачення, 3 - перегородка, 4 - роторний аератор, 5 - зона ферментації, 6 - зона освітлення.

Інша область, у якій успіхи біотехнології будуть сприяти поліпшенню очищення стічних вод, – це видалення важких металів. Звичайно іони важких металів видаляють з розчинів адсорбцією на полісахаридах. Однак сучасний рівень розвитку знань у цій області не дозволяє оптимізувати процес видалення іонів металів та керувати цим процесом у звичайних системах біоочистки стічних вод.

## **15.2. Біохімічні методи очищення стічних вод**

Біохімічний метод застосовують для очищення господарсько-побутових і промислових стічних вод від багатьох розчинених органічних і деяких неорганічних речовин (фенолу, сірководню, сульфідів, аміаку, нітритів і нітратів). Процес очищення заснований на здатності мікроорганізмів використовувати ці речовини для свого харчування в процесі життєдіяльності - органічні речовини для мікроорганізмів є джерелом вуглецю й інших елементів.

*Основні показники якості стічних вод.*

*Біологічне споживання кисню (БСК)* - кількість кисню, витрачена на аеробне біохімічне окислення під дією мікроорганізмів і розкладання нестійких органічних сполук, що містяться в досліджуваній воді.

БСК є одним з найважливіших критеріїв рівня забруднення водою органічними речовинами, він визначає кількість легкоокислювальних органічних забруднюючих речовин у воді.

При аналізі визначається кількість кисню, що пішла за встановлений час (зазвичай 5 діб - БСК<sub>5</sub>) без доступу світла при 20°C на окислення забруднюючих речовин, що містяться в одиниці об'єму води. Обчислюється різниця між концентраціями розчиненого кисню в пробі води безпосередньо після відбору і після інкубації проби.

Як правило, протягом 5 діб за нормальних умов відбувається окислення ~ 70% легкоокислювальних органічних речовин. Практично повне окислення (БСК<sub>полн.</sub> або БСК<sub>20</sub>) досягається протягом 20 діб. При вимірюванні БСК особливе значення має кількість і якість мікрофлори.

Оптимальним є використання мікрофлори з уже працюючих біологічних систем, адаптованих до даного спектру забруднень. Причому кількість мікрофлори, що вноситься, повинна відповідати її концентрації в працюючих очисних спорудах.

ХСК – хімічне споживання кисню. ХСК також виражають у мг О<sub>2</sub> на 1 мг речовини.

Контактуючи з органічними речовинами, мікроорганізми частково руйнують їх, перетворюючи у воду, диоксид вуглецю, нітрит- і сульфат-іони й ін. Інша частина речовини йде на утворення біомаси. Руйнування органічних речовин називають біохімічним окислюванням. Певні органічні речовини здатні легко окислюватися, деякі окислюються дуже повільно, або зовсім не окислюються .

Для визначення можливості подачі промислових стічних вод на біохімічні очисні спорудження встановлюють максимальні концентрації токсичних речовин, що не впливають на процеси біохімічного окислювання (МКб) і на роботу очисних споруджень (МКб.ос.). При відсутності таких даних можливість біохімічного окислювання встановлюють по відношенню БСК<sub>повн.</sub> і ХСК.

При відношенні (БСК/ХСК) 100÷50% речовини піддаються біохімічному окислюванню. При цьому необхідно, щоб стічні води не містили отруйних речовин і домішок солей важких металів.

Для неорганічних речовин, що практично не піддаються окислюванню, також встановлюють максимальні концентрації. Якщо такі концентрації перевищені, воду не можна піддавати біохімічному очищенню. Наприклад, МКБ у мг/л для: міді - 0,5; ртуті - 0,02; свинцю - 0,1; хлору - 0,3; бору - 0,05; сірководню - 1; хлориду заліза - 5.

Відомі аеробні й анаеробні методи біохімічного очищення стічних вод.

*Аеробний* метод заснований на використанні аеробних груп організмів, для життєдіяльності яких необхідний постійний приплив кисню і температура 20...40°C. При зміні кисневого і температурного режиму склад і число мікроорганізмів міняються.

Очищення стічних вод в аеробних умовах проводиться за допомогою біофільтрів або шляхом культивування мікроорганізмів в активному мулі, біоценоз якого складається з різних груп живих організмів (бактерій, черв'яків, грибів, водоростей, рачків). Активний мул є амфотерним колоїдом, у якому показник рН 4...9, а до складу його сухої речовини входить 70...90% органічних і 10–30 % неорганічних речовин. Живі організми разом з твердим носієм, до якого вони прикріплені, утворюють зооглею (*лат. zoogloea, от др.-греч. ζῷον — «животное» и γλοιός — «липкое вещество»*) — слиз, що утворюється при життєдіяльності бактерій) - симбіоз популяцій організмів, вкритий загальною слизовою оболонкою. Співвідношення капсульних і безкапсульних форм клітин в мулі називається коефіцієнтом зооглейності оскільки мікроорганізми, виділені з активного мулу, відносяться до різних родів: *Actinomyces, Arthrobacter, Bacillus, Bacterium, Corynebacterium, Micrococcus, Pseudomonas, Sarcina* та ін. Найбільш численні псевдомонади. Ці мікроорганізми окислюють спирти, жирні кислоти, парафіні, ароматичні вуглеводні, вуглеводи та ін. Мікроорганізми роду *Bacterium* здійснюють деградацію нафти, парафінів, нафтенів, фенолів, альдегідів, жирних кислот. Аліфатичні вуглеводні окислюються представниками роду *Bacillus*. Суттєва роль у створенні та функціонуванні консорціуму клітин належить найпростішим: саркодовим, джгутиковим інфузоріям, вільчастим інфузоріям і інфузоріям, що смокчуть.

В активних мулах високої якості на 1 млн бактеріальних клітин має бути 10...15 найпростіших організмів. Це співвідношення називається коефіцієнтом протозойності Кр. Швидкість біохімічного окислення зростає із збільшенням значення коефіцієнтів зооглейності і протозойності.

Основною метою аеробних методів очищення є окисна мінералізація вуглецевмісних органічних сполук і перетворення відновлених форм нітрогену в окиснені (нітрифікація нітрогену з утворенням нітрит- і нітрат-іонів).

Аеробне біохімічне очищення стічних вод від органічних сполук здійснюється за участю гетеротрофних мікроорганізмів, для яких джерелом живлення є органічний вуглець (білки, жири, вуглеводи та ін.). Поживна цінність вуглецю проявляється по-різному і залежить як від фізико-хімічних властивостей вищезначених органічних речовин стічних вод, так і від

фізіологічних особливостей мікроорганізмів. У процесі життєдіяльності мікробів частина атомів вуглецю окислюється спочатку до карбонових кислот ( $-COOH$ ), а потім до вуглекислого газу. Частина атомів вуглецю відновлюється до радикалів  $CH_3 - CH = CH-$ , що входять у склад клітини.

Біохімічне руйнування органічних речовин відбувається завдяки перебігу послідовних реакцій, під час яких первинна структура речовини поступово спрощується. Наприклад, при окисленні вуглеводів, жирів і деяких амінокислот, хоча й різними шляхами, утворюється однакова сполука – так званий "універсальний метаболіт" – ацетил-*КоА*, продуктами повного окиснення якого надалі є діоксид вуглецю й вода. Таким чином, механізм очищення стічних вод пов'язаний із перетворенням наявних там компонентів в екологічно безпечні метаболічні сполуки. Енергетичний обмін в організмах бактерій, що вимірюється інтенсивністю споживання кисню, значно перевищує обмін у клітинах вищих тварин і рослин. Бактерії легше за інші організми адаптуються до споживання нових органічних субстратів. Крім того, мікроорганізми відрізняються від макроорганізмів високою пристосованістю до умов навколишнього середовища.

Аеробні методи прийнято також розподіляти типом резервуара, у якому проходить окиснення речовин-забруднювачів. Резервуарами можуть бути біоінженерні споруди (БІС) у вигляді біологічних ставків – (так званих біоплато, полів фільтрації), а також використовують спеціальні апарати – біофільтри й аеротенки.

Анаеробні методи очищення протікають без доступу кисню; їх використовують, головним чином, для знешкодження осадів.

З цією метою використовують **метанове бродіння**. Перевага такого методу – високий рівень перетворення речовин-забруднювачів з утворенням додаткового продукту – біогазу. Анаеробний процес розкладання основних органічних домішок у стічних водах (жирів, білків і вуглеводів) можна уявити у вигляді принципової схеми (рис. 29).

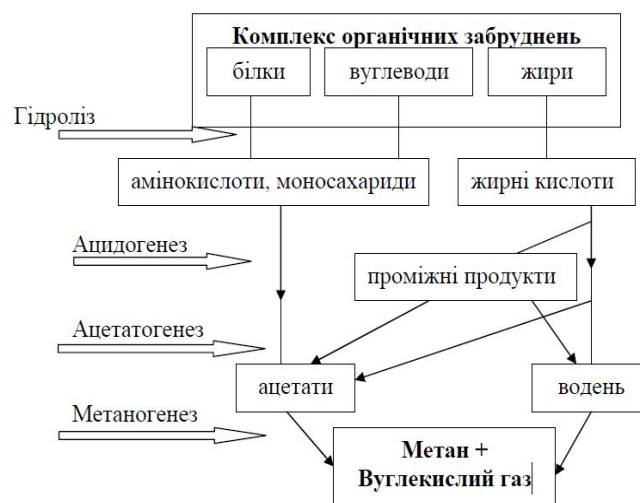


Рис. 29. Схема анаеробного розкладання органічних речовин у стічних водах

Метанове бродіння дешевих органічних целюлозовмісних матеріалів дозволяє виробляти повноцінне альтернативне біологічне паливо (біогаз).

Очищення промислових і побутових стічних вод – це досить актуальна екологічна проблема. Тому з метою її вирішення на практиці використовуються багатоступеневі процеси аеробного та анаеробного біохімічного окиснення забруднюючих речовин у стічних водах (рис. 30).

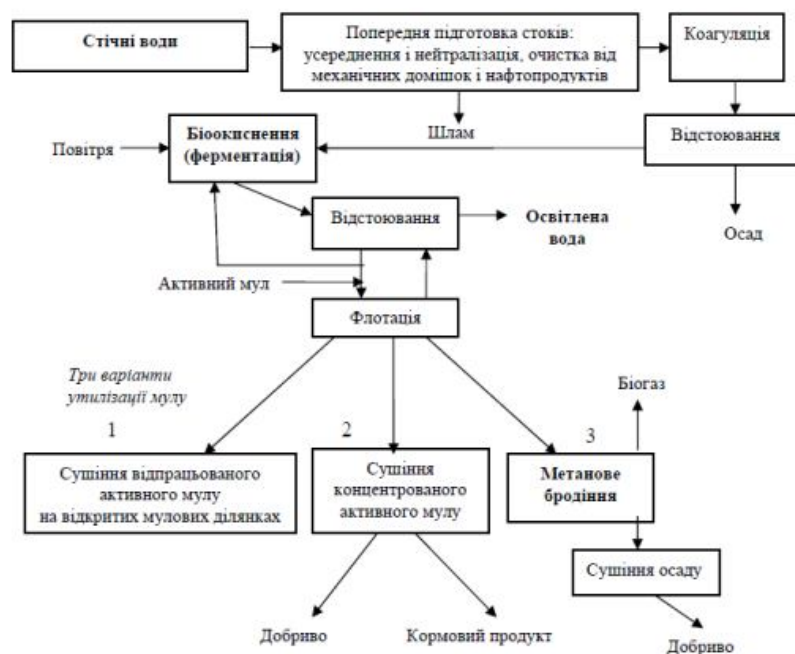


Рис. 30. Блок-схема біотехнологічного очищення стічних вод

Як показує схема, підготовлені стоки проходять стадію біоокиснення, де відбувається сорбція та перетворення органічних речовин ферментним комплексом активного мулу. Це аеробний процес, який відбувається в біореакторах-аеротенках, куди подається повітря. Далі мулові маси відділяються від рідини відстоюванням, а очищена вода надходить у водоймище. Згущений активний мул частково повертається на стадію біоокиснення, а його надлишок утилізується одним з трьох зображених на схемі способів.

**15.3. Мікробіотехнологічне очищення ґрунту від нафтового забруднення.** Як відомо, при експлуатації нафтових родовищ технологічні процеси добування й підготовки вуглеводневої продукції дуже негативно впливають на природне середовище. І тут основними забруднювачами довкілля виступають нафта, природний газ, газові конденсати тощо. Маючи підвищену міграційну активність, нафта й нафтопродукти не локалізуються, а розтікаються на поверхні землі чи води у вигляді плівки, потрапляючи всередину ґрунту, водоймища. Доведено, що наявність смолистих нафтових речовин у гумусовому шарі ґрунту призводить до його ущільнення, порушення в ньому повітряного обміну, а відтак зменшення кількості кисню, необхідного для функціонування мікробіоценозу.



Згідно зі схемою (рис. 31) спочатку ґрунт на забрудненій ділянці розпушують, далі вносять добриво й біопрепарат (бактерії-нафтодеструктори), які беруть участь у біокомпостуванні. Унаслідок життєдіяльності названих бактерій, для яких нафтопродукти – поживні речовини, останні руйнуються до безпечних сполук (діоксиду вуглецю і води). Використання біотехнологічного методу виявилось ефективним у рекультиваційному відновленні техногенно порушених ґрунтів.



**Рис. 31. Блок-схема мікробіотехнологічного очищення ґрунту від нафтового забруднення**

#### **15.4. Освоєння екологічно чистих матеріалів**

У світі щорічно виробляється близько 180 млн т полімерів і обсяг їх зростає приблизно на 25 млн. При цьому основна частина складається на звалищах, так як повторній переробці в розвинених країнах піддається не більше 16...20%. Близько 60% всіх пластиків, що використовуються в даний час для упаковки - це поліетилен, головним чином завдяки його низькій вартості, але також завдяки його відмінним властивостям для багатьох областей застосування. Найбільшим напрямком переробки пластмас є виробництво тари і упаковки.

Біодеструкцію більшості технічних полімерів ініціюють процеси небіологічного характеру, такі як термічне і фотоокислення, термоліз, механічна деградація і т.і.

Можливі шляхи скорочення гігантських відходів синтетичних пластиків - це *утилізація*, яку можна розділити на ряд головних напрямків: спалювання, піроліз, рециклізація і переробка.

Однак як спалювання, так і піроліз відходів тари та упаковки і взагалі пластмас кардинально не покращують екологічну обстановку. Більше того, спалювання - це дорогий процес, до того ж ще й приводить до утворення високотоксичних, а також супертоксичних (таких, як фурані і діоксини) сполук. Повторна переробка пластмас певною мірою вирішує це питання, але це вимагає значних трудових і енергетичних витрат, так як для цього необхідні наступні дії:

- відбір з побутового сміття пластичної тари і упаковки,
- поділ зібраних відходів по виду пластиків,
- мийка,

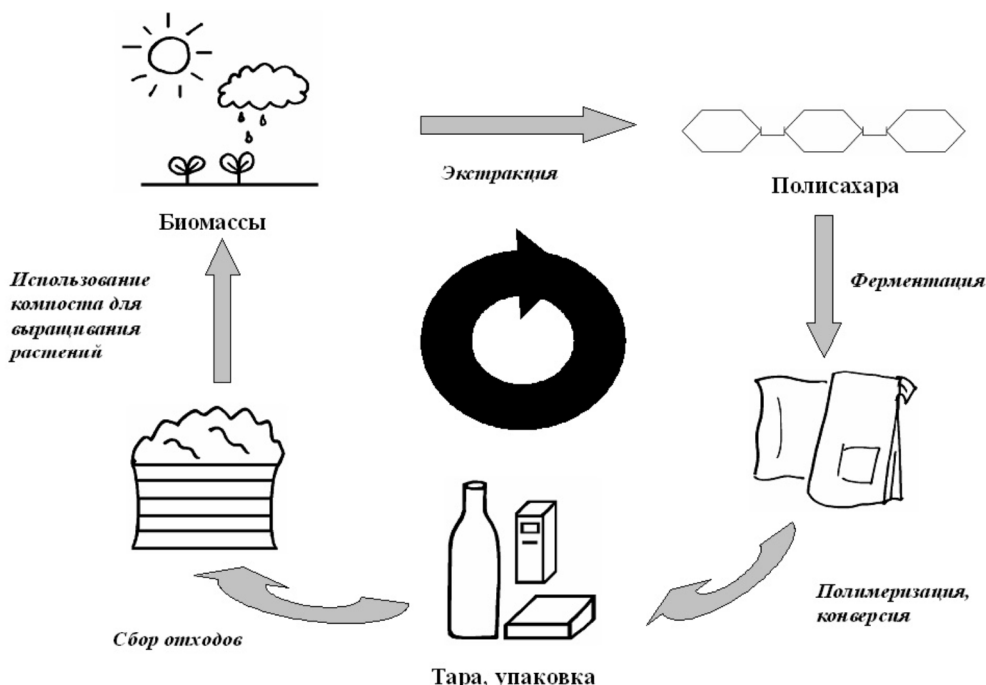
- сушка,
- подрібнення
- і тільки потім переробка в новий полімерний виріб.

Не можна не відзначити, що збір і повторна переробка полімерної тари та упаковки незмінно призводить до її подорожчання, а якість рецикльованого полімеру і виробів при цьому знижується. Якщо припустити, що значна частина тари і упаковки буде в майбутньому використана повторно, для цього необхідно знати, яка кратність переробки є допустимою і коли неминуче вироби потраплять на звалище.

За прогнозами, зростання споживання пластиків неминуче, при цьому найбільший приріст обсягів випуску, як вважають, припадає на новий вид пластиків – біопластики, що руйнуються.

Перехід на нові типи матеріалів, які руйнуються в природному середовищі природним шляхом до нешкідливих продуктів, стає нагальною проблемою. Полімери, одержувані з природної сировини або синтезуються мікроорганізмами (так звані біополімери, або біопластики), на відміну від нафтопродуктів, практично не вносять вклад у збільшення парникових газів і глобальне потепління.

Цикл процесів від збору врожаю до повернення продуктів перетворення полімерів в землю для вирощування нової біомаси і до наступного збору врожаю відноситься до процесу «від колиски до колиски» (рис. 32).



**Рис.32. Схема виробництва, споживання та утилізації біополімерів, отриманих з відновлюваних джерел, що включає стадію компостування: 1) шлях від збору врожаю до отримання продукту; 2)**

шлях від збору врожаю до утилізації біополімерів; 3) шлях від збору врожаю до збору врожаю

Компостування - переважно аеробний процес і може розглядатися як природний шлях переробки відходів. Компост може проводитися не тільки у великих масштабах на комерційних потужностях, а й у малому масштабі, наприклад на задньому дворі невеликої ферми.

Не можна не відзначити також, що, крім глобальної екологічної проблеми, пов'язаної з накопиченням полімерних відходів, необхідність переходу на пластики, що руйнуються, одержувані з поновлюваних джерел, диктується економічною ситуацією. Пов'язано це з тим, що до 98% світового обсягу полімерних матеріалів проводиться з невідновлюваної викопної сировини - нафти, газу, продуктів переробки вугілля, запаси яких виснажуються.

Біополімери являють собою продукти синтезу на основі цукру, крохмалю, целюлози, лігніну і рослинних олій. Протягом «життєвого циклу» біополімерів (від синтезу до повної деструкції) утворюється значно менше вуглекислого газу, ніж у синтетичних пластмас з нафтохімічної сировини.

Так, для отримання біоруйнованої водорозчинної плівки з суміші крохмалю і пектину до складу композиції вводять як пластифікатори гліцерин або поліоксиетиленгліколь.

Водостійкі біорозкладні композиції отримують з суміші ефірів крохмалю і поліоксиетиленгліколь. Біорозкладані підгузники, гігієнічні подушечки, що добре вбирають рідину, виходять на основі гідрофільної композиції, що містить деструктурований крохмаль.

В якості поновлюваної природної біоруйнованої основи при отриманні термопластів активно розробляються й інші композити, - целюлоза/ хітин або целюлоза/крохмаль. На їх основі формуванням отримують бутлі, разову посуд, плівки для мульчування.

Останнім часом особливу увагу розробників привертають композиції, що містять хітозан і целюлозу. З них отримують біорозкладні пластики, плівку з хорошою міцністю і водостійкістю, Природні білки або протеїни також використовуються для отримання біоруйнованих пластиків, призначених для упаковки сухої та вологої їжі та ін. Для отримання біорозкладаного пакувального матеріалу харчових продуктів, парфумерії та лікарських препаратів використовують метакрілірований желатин, казеїн, похідні серину, кератиновмістні натуральні продукти. В цілому, даний напрямок по використанню природних полімерів з метою створення біоруйнованих пластиків цікавий насамперед тим, що ресурси вихідної сировини поновлювані.

Роботи з біополімерам в даний час стають все більш актуальними. Біополімери поділяються на дві категорії: це полімери, що продукуються біологічними системами (наприклад, мікроорганізмами) і полімери, синтезовані хімічно, але на основі вихідної сировини біологічного походження (амінокислот, цукрів, жирів). В першу чергу пропонується їх

використовувати у пакувальній індустрії, де термін служби більшості виробів обчислюється лише кількома місяцями або навіть днями. До того ж, як показують результати численних досліджень, саме полімерна упаковка - пляшки, контейнери, коробки, блістери і пакети - становить основну частку твердих побутових відходів.

Сьогодні за багатьма фізичними і технічними характеристиками біопластики не поступаються традиційним пластмасам і разом з тим безпечні для навколишнього середовища. Але так як ця індустрія перебуває на етапі становлення, то все ще існує безліч помилок. Так, помилково вважають, що всі полімери, отримані з рослинного матеріалу, здатні до біодеградації, - це не так: здатність до розкладання в природних умовах залежить не тільки від «натуральності» сировини, а від цілого ряду властивостей, зокрема, від молекулярної структури матеріалу. Також невірно думати, що всі полімери, здатні до біоруйнування, отримують з природних компонентів: основою для їх виробництва може служити і синтетична сировина.

Повністю біоруйновані пластики виробляють також із природної цукровмісної сировини. В ході численних експериментів з їх виробництва використовували самі різні рослини - від картоплі, пшениці, бобових, соняшнику, цукрових буряків до деревини тополі і осики. Одні виявилися непридатними, а інші, такі як пшениця, кукурудза, цукрові буряки, - вельми перспективними. В даний час використовуються такі природні полімери, як целюлоза, натуральний каучук, полісахариди, поліпептиди, хітин, епоксидовані масла, лігнін, складні полієфіри та ін.

Лідером за обсягами випуску серед біопластиків, що руйнуються, до теперішнього часу залишався полілактид (полімер молочної кислоти – ПМК). Полілактид застосовують для виробництва як одноразового посуду, так і різноманітної упаковки, оскільки він не шкідливий для здоров'я людини.

Однак ПМК поступається звичайним полімерним матеріалів за теплостійкістю, тому упаковка з цього матеріалу не може бути заповнена вмістом з температурою 50°C і вище, так як вона починає деформуватися. Крім того, бар'єрні характеристики ПМК стосовно кисню гірше (нижче в 10 разів), ніж у поліетилентерефталату (ПЕТ), поліпропілену, полівінілхлориду (ПВХ). Тому тара з ПМК найчастіше використовується для пакування сухих і деяких заморожених продуктів, а також рідин з невеликим терміном зберігання. Високий коефіцієнт дифузії CO<sub>2</sub> не дозволяє застосовувати пляшки з ПМК для розливу газованих напоїв і обмежує області їх використання розливом молока, фруктових соків, води, рослинного масла.

Крім полілактиду, перспективними біопластиками, що руйнуються, є полієфіри алканових кислот, так звані полігідроксіалканоати (ПГА). ПГА на відміну від ПМК, отримують методом прямої ферментації, їх виробництво не вимагає серії технологічних етапів (синтез мономерів, полімеризація, додавання пластифікаторів і модифікуючих компонентів).

Сировиною для синтезу ПГА можуть бути цукри, органічні кислоти, спирти, суміші CO<sub>2</sub> і H<sub>2</sub>, продукти гідролізу рослинної сировини, промислові

відходи виробництва цукру, пальмової олії, продукти переробки бурого вугілля і гідролізного лігніну, що містять водень.

Властивостями ПГА (кристалічність, механічна міцність, температурні характеристики, швидкості біорозпаду) можна управляти, варіюючи в процесі ферментації склад середовища і задаючи ту чи іншу хімічну структуру.

ПГА піддаються переробці з різних фазових станів (порошки, розчини, гелі, розплави) загальноприйнятими методами.

З ПГА пов'язані великі надії, тому що крім термопластичності аналогічно поліпропілену і поліетилену, ці біопластики володіють антиоксидантними та оптичними властивостями, п'єзоелектричним ефектом і характеризуються високою біосумісністю.

### ***Питання для самоперевірки***

1. Вкажіть напрями розвитку екологічної біотехнології.
2. Вкажіть напрями використання екологічної технології.
3. Які способи очистки використовують для стічних вод?
4. Вкажіть основні ознаки, за якими розрізняють аеротенки.
5. Вкажіть основні показники якості стічних вод.
6. На чому засновані аеробні та анаеробні способи очищення стічних вод.
7. Що таке «зоогля» і які мікроорганізми входять до її складу?
8. Яка сполука утворюється при окисненні вуглеводів, жирів і деяких амінокислот?
9. За яким типом резервуарів розподіляють аеробні методи очистки стічних вод?
10. Яким чином може утилізуватися надлишок згущеного активного мулу?
11. Як відбувається мікробіотехнологічне очищення ґрунту від нафтового забруднення?
12. Які існують способи біодеструкції полімерних матеріалів?
13. Які проблеми, пов'язані з накопиченням полімерних відходів?
14. Які існують напрями розробки та освоєння біодеградуємих пластиків?
15. Які відновлювані рослинні матеріали використовують для синтезу біодеградуємих пластиків?
16. Які існують способи отримання біопластика?
17. Які недоліки здатні для полілактиду – ПМК?
18. Які існують перспективи розвитку упаковки на основі біопластика?

## **16. Сільськогосподарська біотехнологія**

Біотехнологія вносить великий внесок у підвищення ефективності сільськогосподарського виробництва. Розроблені й успішно застосовуються

біотехнологічні методи захисту рослин від шкідників і збудників хвороб корисної біоти. Це різні підходи включають:

- 1) виведення сортів рослин, стійких до несприятливих факторів;
- 2) хімічні засоби боротьби (пестициди) з бур'янами (гербіциди), гризунами (ратицидів), комахами (інсектициди), нематодами (нематоциди), фітопатогенними грибами (фунгіциди), бактеріями, вірусами;
- 3) біологічні засоби боротьби зі шкідниками, використання їхніх природних ворогів і паразитів, а також токсичних продуктів, утворених живими організмами.

Біотехнологія вирішує завдання підвищення продуктивності сільськогосподарських культур, їх харчовій (кормовій) цінності, завдання створення сортів рослин, що ростуть на засолених ґрунтах, у посушливих і заболочених районах.

Рослини-регенеранти, вирощені з клітин або тканин меристеми, використовують нині для розведення спаржі, суниці, брусельської та цвітної капусти, гвоздик, папоротей, персиків, ананасів, бананів. З клонуванням клітин пов'язують надії на усунення вірусних захворювань рослин.

Клонування клітин – перспективний метод отримання не тільки нових сортів, але і промислово важливих продуктів. При правильному підборі умов культивування, зокрема при оптимальному співвідношенні фітогормонів, ізольовані клітини більш продуктивні, ніж цілі рослини. Імобілізація рослинних клітин або протопластів нерідко веде до підвищення їх синтетичної активності.

Біологічні добрива застосовують для збагачення ґрунту зв'язаним азотом. Великого поширення набули препарати нітрагін і азотобактерин – клітини бульбочкових бактерій і азотобактера, до яких додають стабілізатори (меясу, тіосечовину) і наповнювач (бентоніт, ґрунт). Азотобактерин збагачує ґрунт не тільки азотом, але і вітамінами і фітогормонами, гібереліни і гетероауксином. Препарат фосфобактерин з *Bacillus megaterium* перетворює складні органічні сполуки фосфору в прості, легко засвоювані рослинами. Фосфобактерин також збагачує ґрунт вітамінами і покращує азотне живлення рослин.

Велике значення біотехнологія приділяє профілактиці інфекційних захворювань сільськогосподарських тварин із застосуванням рекомбінантних живих вакцин і генно-інженерних вакцин-антигенів, ранній діагностиці цих захворювань за допомогою моноклональних антитіл і ДНК/РНК-проб.

Величезна роль біотехнології у виробництві кормів різного походження. У сучасному світі тільки за допомогою цієї науки можливо ліквідувати постійно існуючий дефіцит кормів для с.г тварин та птиці.

### **16.1. Промислове одержання кормових добавок.**

За джерелами отримання все корми поділяють:

- ◆ корми рослинного походження;
- ◆ корми тваринного походження;
- ◆ мінеральні корми;

- ◆ продукти мікробіологічного походження;
- ◆ продукти харчової промисловості;
- ◆ продукти хімічного синтезу.

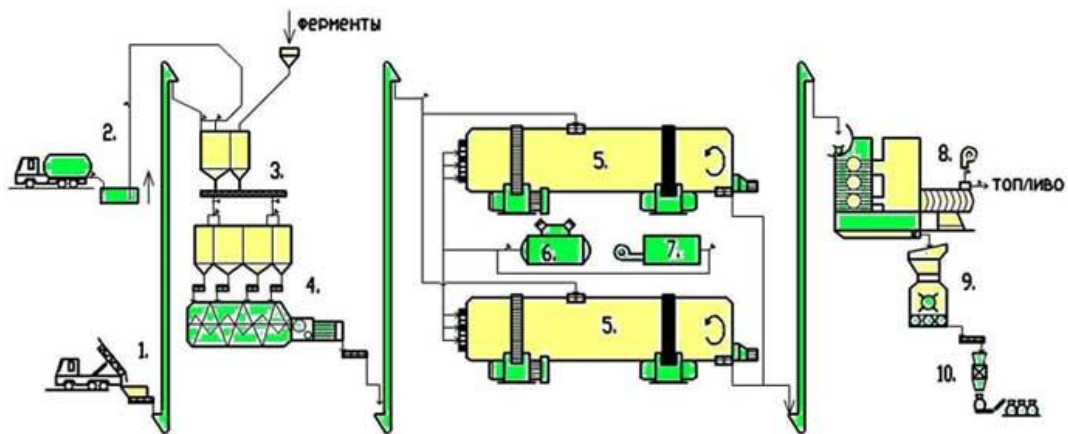
Важливою складовою кормів є кормові добавки - це будь-які добавки до раціону, що регулюють кількість і співвідношення в ньому поживних і біологічно активних речовин, а також забезпечують здоров'я і найвищу продуктивність тварин.

Біотехнологічним шляхом отримано кілька кормових продуктів рослинного походження: гідролізна патока, тонкоподрібнена і технологічно оброблена деревина, РУК-1 і РУК-2.

Сировину для гідролізу (джерела біомаси) умовно можна поділити на групи:

- 1) в залежності від їх походження:
  - відходи лісопильних й деревообробних підприємств (відходи деревини: тирса, стружки, тріска, кора);
  - відходи сільськогосподарського виробництва (кукурудзяний качан, бавовняне лушпиння, соняшникова лузга, стебло бавовнику тощо);
  - спеціально вирощувані високоврожайні агрокультури й рослини;
  - відходи життєдіяльності людей, включаючи виробничу діяльність (тверді побутові відходи, лігнін та ін.);
- 2) в залежності від складу:
  - сировина, що характеризується високим вмістом пентозанів (однорічні рослини і листяна деревина);
  - сировина, що насичена гексозанами (головним чином хвойна деревина).

Широка гама різноманітних продуктів, що є результатами переробки біомаси на основі її гідролізу, створює сприятливі умови для організації комплексного виробництва, яке дозволить найбільш повно й раціонально використовувати всі складові компоненти рослинної тканини. На цій основі базуються процеси переробки відходів рослинної сировини на гідролізних заводах. Залежно від виду сировини застосовується та або інша схема комплексного виробництва (рис. 33).



**Рис. 33. Технологічна схема мікробіологічної переробки рослинних відходів у корми:** 1 – прийом сипучої й вологої сировини; 2 – прийом рідкої сировини; 3 – бункери-дозатори; 4 – змішувач; 5 – біо-реактор; 6 – компресор; 7 – парогенератор; 8 – сушарка; 9 – подрібнювач; 10 – відвантаження в мішки.

При переробці рослинної сировини, яка насичена пентозанами, сировина (біомаса) спочатку піддається м'якому гідролізу розведеною сірчаною кислотою. При цій обробці гідролізуються головним чином пентозани з утворенням пентозних цукрів (ксилоза, арабіноза). Утворений пентозний гідролізат в подальшому використовується для одержання кормових дріжджів, фурфуролу, кристалічної ксилози, ксиліту або інших хімічних продуктів.

При роботі за такою схемою з 1 т абсолютно сухого бавовняного лушпиння, що містить 20...25% пентозанів, може бути отримано: 60...90 л спирту етилового, 28...38 кг рідкої вуглекислоти, 300...320 кг лігнінових брикетів вологістю 20%, 70 кг кристалічної ксилози, або 70...80 кг фурфуролу, або 80...110 кг кормових дріжджів сухих.

Подальші дослідження з удосконалення технології переробки деревини в кормові продукти привели до розробки методів селективного кислотного гідролізу. Спочатку проводиться неповний гідроліз полімерів деревини. При цьому деполімеризується лише геміцелюлоза, 19-20% якої міститься в осиковій тирсі.

Отриманий кормовий продукт містив у своєму складі моно- і олігосахариди і був названий *РУК-1*. Він виробляється по безвідходній технології. Частина целюлози, що важко гідролізується, разом з лігніном утворює лігноцелюлозний комплекс. Він підлягає подальшому гідролізу і може потім використовуватися як другий кормовий продукт - *РУК-2*. Рідка частина, що отримана після першого гідролізу використовується для вирощування кормових дріжджів. Показано, що при подачі в біореактор такого гідролізату в кількості 26-30 м<sup>3</sup>/год концентрація дріжджів досягає 29-33 г/л, а вихід дріжджів становить 53,7% від використаних редуруючих речовин. З однієї тонни абсолютно сухої деревини можна одержати 700 кг *РУК-2* і до 120 кг дріжджів.

### **16.2. Біотехнологічна модифікація рослинних кормів.**

В даний час запропоновано ряд методів отримання протеїнових концентратів: віджимання соку, коагуляція протеїну з подальшим центрифугуванням і сушкою. Ці методи досить складні, дорогі, вимагають значних енерговитрат. Велику привабливість має технологія анаеробної ферментації рослинного соку і коагуляція білка хіміко-біологічним шляхом, а також силосування жому.

Процес ферментації соку реалізується за періодичною і безперервною (напівбезперервною) технологіями. У першому випадку ферментатор-коагулятор поступово заповнюють свіжовіджатим соком. Коли рН знижується до 4,2-4,5, сік вже можна згодовувати тваринам (свиням, молодняку великої рогатої худоби), не відокремлюючи коагулят або



відділяючи частину протеїну з коагулятом. При безперервному або напівбезперервному процесі (другий спосіб) в центральну частину ферментатора-коагулятора безперервно або порціями подають свіжий сік, який витісняє з апарату ферментований сік. Періодично з нижньої частини випускають коагулят. При такій технології і внаслідок повного заповнення ферментатора-коагулятора рідиною в ньому створюються анаеробні умови і не розвивається цвіль. Апарат може працювати тижнями без зупинки і чищення. Перед початком ферментації в чистий апарат необхідно ввести близько 10% соку, що активно бродить, або суспензію закваски кислотоутворюючих бактерій.

Збереженню поживних речовин в кормі, пригніченню розвитку гнильних і маслянокислих бактерій сприяє хімічне консервування. В даний час відомо більше 1000 консервантів кормів. За способом дії вони підрозділяються:

- ◆ неорганічні кислоти: сірчана, соляна, фосфорна та їх солі;
- ◆ антибактеріальні кислоти: мурашина, пропіонова, бензойна та їх суміші;
- ◆ антибактеріальні солі: нітрит натрію, бензоат натрію;
- ◆ антибіотики: стрептоміцин, бацитрацин.

Прикладами консервантів кормів, які використовуються, є: ВІК-1, що складається з мурашиної кислоти (27%), оцтової кислоти (27%), пропіонової кислоти (26%), води (20%), а також ВІК-2, який складається з 80% мурашиної кислоти, 9% оцтової і 11% пропіонової кислоти. Для консервування кукурудзи застосовують сульфідні луги і т.д.

Сучасним біотехнологічним прийомом стабілізації та біоконверсії кормів є застосування ферментних препаратів мікробного або грибного походження.

В даний час використовується безліч ферментів, наприклад, пектафоегідін П10х, амилосубтилін Г3х. Доза очищених ферментних препаратів зазвичай складає 0,02...0,005%, а неочищених - 0,5...1% від маси сировини. Х означає, що ферментний препарат без попереднього очищення. Цифри характеризують ступінь активності по відношенню до нативної культури, П поверхневе, а Г - глибинне культивування культури.

В результаті переробки рослинної маси можна одержати три види кормів: білковий коагулят, з якого отримують білково-вітамінну пасту; ферментований сік, який утворюється після відділення білкового коагуляту; залишки рослинного матеріалу після віджимання соку у вигляді жому.

Білковий коагулят містить 15...22% білків на суху масу і зазвичай згодовується тваринам в зимовий період. Вміст білка в білково-вітамінній пасті може складати до 50%. Для отримання такої пасту використовують листя люцерни, конюшини цукрових буряків. Ферментативний коричневий сік містить 7...12% сухої речовини, 1...3% білків, 1...1,5% органічних кислот, 4...5% безазотистих екстрактивних речовин (сума легкозасвоюваних вуглеводів), 1...2% зольних речовин, 40...50 мг/кг каротину. Сік

використовується для додавання в корм тваринам, зокрема, свиням (1,5 л на голову на добу) або переробляється в кормові дріжджі.

Процесом силосування можна керувати шляхом штучного збагачення зеленої маси спеціальними культурами молочнокислих бактерій, здатними активно розмножуватися в ній і вести процес дозрівання силосу в потрібному напрямку. З цією метою вирощують біомасу, яку потім переводять у анабіотичний стан.

Закваски молочнокислих бактерій отримують методом глибинної ферментації з наступним відділенням клітинної маси та її висушуванням.

Добрим живильним середовищем є стерильне знежирене молоко з підвищеним вмістом сухих речовин (до 16%). Для цього в закваски додають сухе молоко і 0,1%-й розчин лимоннокислого натрію. Засівний матеріал становить 1% від об'єму середовища. Розмноження бактерій здійснюється без аерації. При температурі 30°C протягом 12...16 год. розмножують молочнокислі стрептококи і при 40°C протягом 6 год. молочнокислі палички. Потім культуральну рідину нейтралізують 20%-м розчином гідроксиду натрію до вихідної кислотності стерильного молока. Рідку закваску висушують в розпилювальній сушарці при температурі повітря, що надходить, 130...140°C. У зоні розпилення температура не повинна перевищувати 48...50°C. Залишкова вологість сухої закваски дорівнює 5...7%. Виживаність стрептококів при сушінні в цих умовах складає 18...33%, а ацидофільних паличок – 7...8%.

Використовуючи бактеріальні закваски, виготовлюють концентрат, який має пастоподібну консистенцію. Один грам такого концентрату містить 52...100 млрд життєздатних молочнокислих паличок. Його залишкова вологість складає 70...72%, оптимум рН - 4,5...4,7. Концентрат зберігають при 4...6°C, додаючи 0,003% бромиду калію. Для тривалого зберігання пастоподібного концентрату його висушують, заморожують або біомасу ліофілізують із застосуванням спеціальних захисних середовищ.

Технологічний процес одержання білково-ферментного препарату складається з двох стадій: приготування посівного матеріалу і головної ферментації.

Так, при вирощуванні дріжджеподібної культури *Enolomycopsis fibulgera R-574* поживне середовище повинне містити (у %): меляси - 5,0 або різного фуражного борошна - 10;  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  - 0,3;  $\text{CaCl}_2$  - 0,04. Початкове значення рН середовища - 6,8...7,2; температура вирощування – 30...32°C. У ферментаторі інокулянт розмножується на м'ясному середовищі. У культуральну рідину його вводять з розрахунку 1%. Вирощування посівного матеріалу триває 13...16 год.

### **16.3. Премікси та пробіотики в тваринництві**

Пробіотики - це препарати, до складу яких входять речовини мікробного і немікробного походження, які надають при природному способі введення сприятливу дію на фізіологічні функції організму тварини шляхом оптимізації його мікроекологічного статусу. До пробіотиків, по суті, відносяться будь-які живі, інактивовані мікроорганізми, їх структурні

компоненти, метаболіти, речовини іншого походження, які надають позитивний вплив на функціонування мікрофлори господаря.

Переваги, які мають пробіотики перед антибіотиками:

- відсутність кумуляції в організмі;
- вони не викликають формування L-форм бактерій і стійких рас мікробів;
- є екологічно чистими і біологічно нешкідливими;
- є утилізаторами нітратів;
- підсилюють захисну функцію організму і стимулюють його імунну реактивність;
- виробляють бактерицидні та бактериостатичні речовини;
- володіють вітамінутворючою і кислотоутворюючою активністю;
- нормалізують травлення;
- володіють властивостями адгезії і високої репродуктивної активністю.

Сприятлива дія пробіотиків заснована на модифікації мікрофлори кишечника.

Спосіб дії пробіотичних препаратів заснований на трьох принципах:

1. конкурентне виключення;
2. бактеріальний антагонізм;
3. імунна модуляція.

*Конкурентне виключення* полягає в тому, що корисні мікроорганізми, додані в корм, змагаються з потенційно шкідливими бактеріями за місце прикріплення до кишечника і органічні субстрати (джерела вуглецю і енергії). Пробіотики можуть колонізуватися і розмножуватися в кишечнику, таким чином блокуючи рецептори і запобігаючи приєднання інших бактерій, включаючи такі шкідливі види, як ентеропатогени *E. coli* або *Salmonella*. Крім того, мікроорганізмам, які присутні в кишечнику, необхідні поживні речовини, що надходять з корму. Отже, сприятлива мікрофлора буде пригнічувати патогени в процесі боротьби за доступні поживні речовини.

*Бактеріальний антагонізм* заснований на тому, що пробіотичні організми, влаштувавшись в кишечнику, можуть виводити субстанції з бактерицидними або бактериостатичними властивостями (бактеріоцини). До таких речовин відносять: лізоцим, пероксид водню, а також деякі органічні кислоти. Ці субстанції надають згубний вплив на шкідливі бактерії, що відбувається завдяки зниженню рівня рН в кишечнику.

*Імунна модуляція* заснована на розумінні того факту, що кишечник у ссавців являє собою найбільший імунний орган, і існує певна взаємодія між кишковою мікрофлорою і імунною системою. На розвиток і стимуляцію гуморальної та клітинної імунної системи, пов'язаної з кишечником, сильно впливає розвиток кишечної мікрофлори. Мікробні колонії здатні підтримати захисну реакцію тварини проти патогенних і умовно-патогенних бактерій шляхом стимулювання шлунково-кишкової імунної відповіді. Відомо також,

що клітинні стінки дріжджів або особливих бактерій можуть сприяти активізації макрофагів або викликати соматичну імунну відповідь.

Пробіотики здатні підтримувати і стабілізувати добре збалансовану, сприятливу кишкову мікрофлору, що є позитивною альтернативою антибіотичним стимуляторам росту.

### ***Питання для самоперевірки***

1. Які існують біотехнологічні методи захисту рослин від шкідників і збудників хвороб?
2. Як поділяють корми за джерелами отримання?
3. На які групи можна поділити сировину для гідролізу?
4. Надайте характеристику кормових продуктів рослинного походження отриманих біотехнологічним шляхом.
5. Які існують методи отримання протеїнових концентратів?
6. Як поділяються консерванти кормів за способом дії?
7. В чому полягає процес силосування кормів?
8. В чому полягає процес сенажірування кормів?
9. У чому полягає ефект використання біодобавок у силосуванні?
10. Які основні групи молочнокислих бактерій, що беруть участь у процесі силосування?
11. Які властивості притаманні селекційним мікробним штамам, що застосовують у силосуванні?
12. Що таке премікси для чого їх використовують?
13. Що таке пробіотики?
14. В чому полягає перевага пробіотиків над антибіотиками?
15. На чому заснована дія пробіотичних препаратів?

## Перелік навчальної літератури

1. Бекер М. Е. Введение в биотехнологию / М. Е. Бекер ; [пер. с лат.]. — Рига : Пищевая промышленность, 1978. — 232 с.
2. Биотехнология / [отв. ред. А. А. Баев]. — М. : Наука, 1984. — 318 с.
3. Биотехнология ферментативного превращения целлюлозы / [А. П. Сеницын, А. А. Клесов, М. Л. Рабинович и др.]. — М., 1998. — 156 с. (Биотехнология. Итоги науки и техники ВИНТИ АН ; Т. 12).
4. Биотехнология. Принципы и применение / под ред. И. Хиггенса, Д. Беста, Дж. Джонса ; [пер. с англ.]. — М. : Мир, 1998. — 480 с.
5. Биотехнология: учеб. пособ. для вузов . - в 8 кн. / под ред. Н. С. Егорова, В. Д. Самуилова. — М. : Высш. шк., 1987.
6. Біотехнологія: підруч. / [В. Г. Герасименко, М. О. Герасименко, М. І. Цвіліховський та ін.] ; за заг. ред. В. Г. Герасименка. — К. : Фірма «ІНКОС», 2006. — 647 с.
7. Волова Т. Г. Биотехнология / Т. Г. Волова. — Новосибирск : Сибир. отдел. РАН, 1999. — 252 с.
8. Герасименко В. Г. Биотехнология: учеб. пособ. / В. Г. Герасименко. — К. : Вища шк., 1989. — 343 с.
9. Глик Б. Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Б. Глик, Дж. Пастернак. — М. : Мир, 2002. — 589 с.
10. Евтушенко А.Н. Введение в биотехнологию: курс лекций / А. Н. Евтушенко, Ю. К. Фомичев. — Минск. : БГУ, 2002. — 105 с.
11. Елинов Н. П. Основы биотехнологии / Н. П. Елинов. — СПб. : Наука, 1995. — 600 с.
12. Ефимова М. В. Введение в прикладную биотехнологию : учеб. пособ. / М. В. Ефимова. — Петропавловск-Камчатский : Камчат. ГТУ, 2004. — 95 с.
13. Клесов А. А. Инженерная энзимология на промышленном уровне. Биотехнология / А. А. Клесов. — М., 1989. — 184 с. — (Итоги науки и техники ВИНТИ АН СССР).
14. Муромцев Г. С. Основы сельскохозяйственной биотехнологии / Г. С. Муромцев, Р. Г. Бутенко, М. И. Прокофьев. — М. : Агропромиздат, 1990. — 384 с.
15. Сассон А. Биотехнология: свершения и надежды / А. Сассон ; под ред. В. Г. Дебабова ; [пер. с англ.]. — М. : Мир, 1987. — 411 с.
16. Шевелуха В. С. Сельскохозяйственная биотехнология / В. С. Шевелуха. — М. : Высш. шк., 2003. — 470 с.
17. Щелкунов С. Н. Генетическая инженерия : учеб.-справ. пособ. / С. Н. Щелкунов. — 2-е изд. испр. и доп. — Новосибирск : Сиб. унив., 2004. — 496 с.

## ДОДАТОК

### *Відповіді на завдання*

#### **Завдання 1.**

Існує 6 стадій біотехнологічного виробництва:

1. Приготування і стерилізацію поживних середовищ;
2. Приготування посівного матеріалу;
3. Культивування;
4. Обробку культуральної рідини;
5. Виділення та очистку біопрепарату;
6. Отримання готової продукції.

Дві початкові стадії включають підготовку сировини та біологічно діючого начала. У процесах інженерної ензимології вони зазвичай складаються з приготування розчину субстрату із заданими властивостями (рН, температура, концентрація) та підготовки партії ферментного препарату даного типу, ферментного або іммобілізованого. При здійсненні мікробіологічного синтезу необхідні стадії приготування поживного середовища і підтримання чистої культури, яка могла б постійно або по мірі необхідності використовуватися в процесі.

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

Третя стадія – стадія ферментації, на якій відбувається утворення цільового продукту. На цієї стадії йде мікробіологічне перетворення компонентів поживного середовища спочатку в біомасу, потім, якщо це необхідно, в цільової метаболіт.

На четвертому й п'ятому етапі з культуральної рідини виділяють і очищають цільові продукти. Для промислових мікробіологічних процесів характерно, як правило, утворення дуже розріджених розчинів і суспензій, що містять, крім цільового, велику кількість інших речовин. При цьому доводиться розподіляти суміші речовин дуже близької природи, що знаходяться в розчині в порівнюваних концентраціях, дуже лабільних, що легко піддаються термічній деструкції.

Заключна стадія біотехнологічного виробництва – приготування товарних форм продуктів. Загальною властивістю більшості продуктів мікробіологічного синтезу є їх недостатня стійкість до зберігання, оскільки вони схильні до розкладання і в такому вигляді представляють прекрасне середовище для розвитку сторонньої мікрофлори. Це змушує технологів приймати спеціальні заходи для підвищення зберігання препаратів промислової біотехнології. Крім того, препарати для медичних цілей вимагають спеціальних рішень на стадії фасування та закупорки, оскільки повинні бути стерильними.

2. Технологія приготування поживних середовищ для біосинтезу. Основу поживних середовищ для культивування мікроорганізмів складають

джерела вуглецю. Крім вуглецю клітини мікроорганізмів в процесі росту відчують потребу в азоті, фосфорі, макро-та мікроелементах. Всі подібні речовини знаходяться в поживних середовищах у вигляді солей, за винятком середовищ, де азот і фосфор можуть засвоюватися зростаючими культурами з органічних джерел, наприклад автолізатів або гідролізатів мікробного або тваринного походження.

Рідкі і тверді джерела вуглецю звичайно вводять у вже готове поживне середовище безпосередньо перед ферментацією, це усуває небезпеку зараження сторонньою мікрофлорою, ймовірність якої зростає при зберіганні готової поживної суміші. При періодичній ферментації на початку процесу інокулянт (засівна доза мікроорганізмів) вноситься у вже готове поживне середовище, що містить всі компоненти. Тому джерела вуглецю вводять безпосередньо перед засівом або окремі компоненти середовища вводять в міру споживання їх культурою, підтримуючи у ферментері деяку оптимальну їх концентрацію, яка на різних етапах ферментації може змінюватися за певним законом.

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

Для стерилізації газових потоків (в першу чергу повітря) використовують процес фільтрації через спеціальні волокнисті фільтри з послідовно розташованими фільтруючими елементами. Фільтруючий матеріал періодично стерилізується подачею гострого пара у відключений фільтр через задані проміжки часу.

Метод фільтрації базується на здатності напівпроникних мембран з великими порами пропускати рідку фазу і концентрувати клітини мікроорганізмів. В принципі цей метод є ідеальним для стерилізації термічно нестійких рідких і газових речовин, оскільки може здійснюватися при низькій температурі і вимагає лише градієнта тиску по різні сторони мембрани. Основна трудність – наявність термостійких мембран, здатних витримувати багаторазову стерилізацію їх самих. В даний час ця проблема вирішується шляхом застосування термостійких полімерів у виробництві мембран.

Рідинні потоки стерилізують різними методами, з яких практичний інтерес представляють термічний, радіаційний, фільтраційний і хімічний. Термічний – найпоширеніший, при температурах порядку 120-150°C. Радіаційний – випромінювання, застосовується рідко через труднощі створення та експлуатації потужних джерел цього випромінювання. В окремих випадках застосовують хімічні агенти стерилізації. Основна проблема в цьому випадку – необхідність усунення агента стерилізації з поживного середовища після загибелі мікрофлори до внесення інокулянту. Хімічні антисептики повинні бути не тільки високоефективні, але і легко розчинятися при зміні умов після завершення стерилізації. До числа кращих

відноситься пропіолактон, що володіє сильною бактерицидною дією і легко гідролізується в молочну кислоту.

4. Ні, метанол, етанол, концентрована оцтова кислота не вимагають стерилізації, так як вони самі мають асептичну дію. У цьому випадку обмежуються стерилізацією інших елементів поживного середовища.

5. Підтримка чистої культури та отримання засівної дози. У технологічному процесі використовуються корисні властивості штаму, отже, необхідно зберігати і, якщо можливо, покращувати його виробничі якості. Тому в біотехнологічному виробництві є відділення чистої культури, завданням якого є постійне і надійне відтворення корисних властивостей продуцента, знайдених або досягнутих у свій час в ході лабораторних досліджень. У міру необхідності з відділення чистої культури надходить задана маса інокулята, що йде у виробництво.

Посівні дози вирощуються послідовно в колбах і бутлях на 10-20 літрів, що знаходяться на гойдалках або просто в приміщенні, що термостатується, і далі в послідовності ферментерів об'ємом (за необхідністю) 10, 100, 500 і 1000 літрів, в яких здійснюється перемішування, аерація і термостатування культуральної рідини із клітинами.

При періодичному процесі культивування (при виробництві метаболітів) у відділенні чистої культури готують засівну дозу клітин для кожної з операцій основного виробництва. При безперервному виробництві кормового білка цього не потрібно, однак для підвищення якості продукту вважають за необхідне час від часу вводити клітини штаму-продуцента з відділення чистої культури. Для цього в відділенні є ферментаційна частина, де виробляється вирощування досить великих партій мікроорганізму продуцента.

## ***Завдання 2***

1. Найбільш поширеним методом генної інженерії є метод отримання рекомбінантних плазмід, які являють собою кільцеві, дволанцюгові молекули ДНК, що складаються з декількох пар нуклеотидів. Кожна бактерія окрім основної, не покидає клітину молекули ДНК ( $5 \cdot 10^6$  пар нуклеотидів), може містити кілька різних плазмід, якими вона обмінюється з іншими бактеріями.

Плазміди є автономними генетичними елементами, що реплікуються в бактеріальній клітині не в той же час, що основна молекула ДНК. Плазміди несуть важливі для бактерії гени, як гени лікарської стійкості. Різні плазміди містять різні гени стійкості до антибактеріальних препаратів. При дії певного антибіотика на бактерійні клітини плазміди, що додають стійкість до нього, швидко поширюються серед бактерій, зберігаючи їм життя.

2. Бактеріальні клітини виробляють рестриктази для руйнування чужорідної (фагової) ДНК, що необхідно для обмеження вірусної інфекції. Рестриктази дізнаються певної послідовності нуклеотидів (сайти - ділянки пізнавання) і вносять симетричні, розташовані навскіс один від одного розриви в ланцюгах ДНК на рівних відстанях від центру сайту. В результаті



на кінцях кожного фрагмента рестрикованої ДНК утворюються короткі одноланцюгові «хвости», які називають липкими кінцями.

3. Для отримання рекомбінантної плазмиди ДНК однієї з плазмід розщеплюється вибраною рестриктазою. Ген, який потрібно ввести в бактеріальну клітину, розщеплюють з ДНК хромосом людини за допомогою рестриктази, тому його «липкі» кінці є комплементарними нуклеотидної послідовності на кінцях плазмід. Ферментом лігази «склеюють» обидва шматки ДНК в результаті виходить рекомбінантна кільцева плазміда, яку вводять в бактерію, наприклад, *E. coli*. Всі нащадки цієї бактерії (клони) містять в плазмідах чужорідний ген. Весь цей процес називають клонуванням.

4. Як продуцентів різних рекомбінантних білків використовують:

*Escherichia coli* (кишкова паличка) - грамнегативна умовно-патогенна паличка, у якої в даний час детально вивчені геном і механізми експресії генів, має плазмиду, так званий власний вектор, на основі якої створено химерні плазмиди, які містять гени-маркери стійкості до антибіотиків.

*Bacillus subtilis* (сінна паличка) - грампозитивний спороутворюючий непатогенний мікроорганізм, здатний адсорбувати і поглинати молекули ДНК із зовнішнього середовища і секретувати з клітин в культуральну рідину великі кількості білків.

*Pseudomonas* (псевдомонади) - грамнегативні умовно-патогенні і патогенні палички, здатні до накопичення рекомбінантних білків, на відміну від кишкової палички, в розчиненому стані за рахунок специфічних окисно-відновних потенціалів цитоплазми клітин.

Сахароміцети (пекарські дріжджі - *Saccharomyces cerevisiae* та пивні дріжджі - *Saccharomyces carlsbergensis*) - еукаріотичні клітини, здатні до посттрансляційної модифікації білків і містять другу мікронну дріжджову плазмиду з селективним геном-маркером, що кодує синтез лейцину.

Сахароміцети здатні до ферментативної модифікації білків та екскреції рекомбінантних продуктів з клітки. Крім сахароміцетів використовують інші види дріжджів. Найбільш ефективними продуцентами повноцінних білків є метилотрофні дріжджі *Pichia pastoris* та *Hansenula polymorpha*, здатні використовувати метанол як єдине джерело вуглецю та енергії.

Культури клітин тваринної тканини, які на відміну від культур мікроорганізмів, здатні здійснювати більш детальну модифікацію білків. Використовуються такі культури клітин:

культура клітин китайського хом'ячка *CCL-2 (CHT)*;

МК-2 - культура клітин нирки мавпи;

*HLM*-культура клітин печінки ембріона людини;

*LM*-культура клітин сполучної тканини м'язів.

5. Вектор - молекула ДНК, що здатна до самореплікації (наприклад, бактеріальна плазміда), яка використовується в генній інженерії для переносу генів від організму донора до організму реципієнта, а також, для клонування нуклеотидних послідовностей.

### **Завдання 3**

1. У харчовій промисловості за участю іммобілізованих ферментів йдуть процеси отримання глюкозо-фруктових сиропів, глюкози, яблучної та аспарагінової кислоти, оптично активних L-амінокислот, дієтичного безлактозною молока, цукрів з молочної сироватки та ін..

2. У медицині іммобілізовані ферменти відкрили шлях до створення лікарських препаратів пролонгованої дії зі зниженою токсичністю і алергенністю. Іммобілізаційному підходи сприяють вирішенню проблеми спрямованого транспорту ліків в організмі. У медицині іммобілізовані ферменти використовуються також як лікарські препарати, особливо в тих випадках, коли необхідно локальне вплив. Крім того, біокаталізатори широко використовуються в різних апаратах для перфузійної очищення різних біологічних рідин. Можливості та перспективи використання в медицині ферментів в іммобілізованому стані набагато ширше, ніж досягнуті на сьогоднішній день, саме на цьому шляху медицину чекає створення нових високоефективних методів лікування.

3. Іммобілізовані клітини мають ряд переваг, як перед іммобілізованими ферментами, так і перед вільними клітинами:

- відсутність витрат на виділення та очистку ферментів;
- зниження витрат на виділення та очистку продуктів реакції;
- більш висока активність і стабільність;
- можливість створення безперервних і напівперервних автоматизованих процесів;
- здатність до тривалого функціонуванню поліферментних систем без екзогенних кофакторів.

4. Для іммобілізації можуть бути використані клітини в різному стані: живі та пошкоджені в різній мірі. Одностадійні реакції можуть здійснювати і живі, і пошкоджені клітини. Поліферментні реакції проводять із застосуванням живих клітин, які можуть тривалий час регенерувати АТФ і коферменти (НАДФ, НАД). Іммобілізувати можна не тільки клітини мікроорганізмів, але й клітини рослинних і тваринних тканин, використовуючи їх для синтезу фізіологічно активних сполук. Цікаві можливості відкриваються і при іммобілізації клітинних органел як активних Поліферментні систем. Все це свідчить про перспективність розвитку одного з напрямків біотехнології, пов'язаного з вивченням і застосуванням іммобілізованих клітин.

5. Хімічний метод заснований на утворенні ковалентних зв'язків з активованим носієм, на поперечній зшиванню клітин за рахунок активних груп в клітинній оболонці з біфункціональних реагентами (наприклад, глутарового альдегіду)

До фізичних методів відносяться адсорбція і агрегація. Іммобілізація клітин шляхом включення в різні гелі, мембрани, волокна заснована на хімічних і фізичних взаємодіях.

Хімічні методи використовуються рідше в порівнянні з іншими методами і малоприсади для іммобілізації живих клітин. Набагато більшого

поширення набуло включення клітин до складу гелів, мембран і волокон. При такому способі іммобілізації клітини можуть зберігати життєздатність і в присутності живильного середовища розмножуватися в приповерхневих шарах гелів.

#### **Завдання 4.**

1. Вирішити ці проблеми допомагає створення в 1916р іммобілізованих ферментів.

2. Переваги іммобілізованих ферментів перед нативними попередниками:

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

- Ферментативний процес з використанням іммобілізованих ферментів можна проводити безперервно, регулюючи швидкість реакції, що каталізується, і вихід продукту.

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

- Можна регулювати каталітичну активність іммобілізованих ферментів шляхом зміни властивостей носія дією фізичних факторів, таких як світло і звук. Іммобілізувати ферменти можна як шляхом зв'язування на нерозчинних носіях, так і шляхом внутрішньомолекулярної або міжмолекулярної зшивки білкових молекул низькомолекулярними біфункціональними сполуками, а також шляхом приєднання

3. До носіїв пред'являються наступні вимоги (Дж.Порат, 1974):

- Висока хімічна та біологічна стійкість;
- Висока хімічна міцність;
- Достатня проникність для ферменту і субстратів, пористість, велика питома поверхня;

- Можливість отримання зручних в технологічному відношенні форм (гранул, мембран);

- Легка активація;
- Висока гідрофільність;
- Невисока вартість.

4. Класифікація носіїв для іммобілізованих ферментів

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

полісахаридні, білкові і ліпідні.

Синтетичні полімери також можна розділити на групи за хімічною будовою зв'язку основного ланцюга макромолекул: поліметиленового, поліамідні, поліефірні.

5. Найбільш часто для іммобілізації використовуються такі полісахариди, як целюлоза, декстран, агарози та їх похідні. Для збільшення механічної міцності целюлозу гранулюють шляхом часткового гідролізу, в результаті якого руйнуються аморфні ділянки. На їх місце для збереження пористості між кристалічними ділянками вводять хімічні зшивки. Гранульовану целюлозу досить легко перетворити в різні іонообмінні похідні, такі як ДЕАЕ-целюлоза, КМЦ і т.д.

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

6. Хорошим носієм вважається агар. Його властивості поліпшуються після хімічної зшивки, наприклад, диєпоксидними сполуками. Такий агар стає стійкий до нагрівання, міцний, легко модифікується.

7. Білки в якості носіїв володіють рядом переваг: місткі, здатні до біодеградації, можуть застосовуватися в якості тонкої (товщиною 80 мкм) мембрани. Іммобілізацію ферментів на білкових носіях можна проводити як у відсутності, так і в присутності зшиваючих агентів.

До недоліків білків в якості носіїв відносять їх високу імуногенність (за винятком колагену і фібрину). Найчастіше для іммобілізації використовуються структурні (кератин, фібрин, колаген), рухові (міозин) і транспортні (альбумін) білки.

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Алмагамбетов К. Х. Медицинская біотехнологія. Астана : ЕНУ им. Л. Н. Гумилева. 2009. 236 с.
2. Бабський А., О. Іккерт, В. Манько Основи біоенергетики : підручник. Львів : ЛНУ імені Івана Франка, 2019. 312 с
3. Бейсембаева Р. У. Карпенюк Т. А., Гончарова А. В. Медицинская биотехнология: учебное пособие. Казахстан : Казак Университет. 2017. 316 с.
4. Біотехнологія з основами екології : навчальний посібник [І. Трохимчук, Н. Плюта, І. Логвиненко, Р. Сачук]. К. : Видавничій дім Кондор, 2019. 304 с.
5. Клещев Н. Ф., Бенько М. П. Основы промышленной биотехнологии. Биотехнологические основы производства кисломолочных продуктов и сыров. Харьков: НТУ «ХПИ». 2010. 80 с.
6. Краснопольский Ю. М., Северина Л. В. Фармацевтическая биотехнология: Основы лабораторных исследований. Практикум. Харьков : НТУ «ХПИ». 2017. 208 с.
7. Лобова О. В., Гончар Л. М. Біотехнологія в сільському господарстві: Навч. посібник 2-ге видання допов. Київ : видавництво НУБІП України. 2019 543 с.
8. Мельничук М. Д., Кляченко О. Л. Біотехнологія в агросфері. Навчальний посібник для студентів вищих навчальних закладів. Київ. 2014. 247 с.
9. Пирог Т. П., Ігнатова О. А. Загальна біотехнологія : підручник. К. : НУХТ, 2009. 336 с.
10. Сметана О. Ю. Сільськогосподарська біотехнологія : курс лекцій з дисципліни для здобувачів вищої освіти ступеня «бакалавр» спеціальності 162 «Біотехнологія та біоінженерія» денної форми навчання. Миколаїв : МНАУ, 2017. 132 с
11. Харчова біотехнологія : підручник. [Т. П. Пирог, М. М. Антонюк, О. І. Скроцька, Н. Ф. Кігель]. К. : Ліра-К. 2016. 408 с.
12. Юлевич О. І. Біотехнологія: курс лекцій. Миколаїв : МДАУ, 2007. 156 с.
13. Юлевич О. І., Ковтун С. І., Гиль М. І. Біотехнологія : навч. посіб. Миколаїв : МДАУ, 2012. 477 с.

Навчальне видання

## **ЗАГАЛЬНА БІОТЕХНОЛОГІЯ**

Методичні рекомендації

Укладачі: **Юлевич** Олена Іванівна  
**Каратєєва** Олена Іванівна

Формат 60x84,1/16. Ум.друк.арк.7,06

Тираж 30 прим. Зам.№ \_\_\_\_\_

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

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