

**О. І. КАРАТЄЄВА  
О.І. ЮЛЕВИЧ**

# **ЗАГАЛЬНА БІОТЕХНОЛОГІЯ**

*Курс лекцій*



МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
МИКОЛАЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ  
УНІВЕРСИТЕТ

**О. І. Каратєєва**  
**О.І. Юлевич**

## **Загальна біотехнологія**

### *Курс лекцій*

для здобувачів (короткого циклу) рівня вищої освіти ОПП  
«Біотехнології та біоінженерія» спеціальності 162 «Біотехнології та  
біоінженерія» денної форми здобуття вищої освіти

**Миколаїв**  
**2022**

УДК 631.147(075.8)

К21

Автори: О. І. Каратєєва, О.І. Юлевич

Рекомендовано до друку рішенням науково-методичної ради факультету ТВППТСБ Миколаївського НАУ від 16.11.2022р., протокол № 4.

Рецензенти:

І. Ю. Горбатенко д-р біол. наук, професор, професор кафедри біотехнології та біоінженерії, Миколаївський національний аграрний університет;

І. А. Галушка канд. с.-г. наук, доцент, завідувача відділом віварію, Комунальна установа Миколаївський зоопарк.

**Каратєєва О. І., Юлевич О.І.**

К.21 Загальна біотехнологія : курс лекцій для здобувачів (короткого циклу) рівня вищої освіти ОПП «Біотехнології та біоінженерія» спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» денної форми здобуття вищої освіти / О. І. Каратєєва, О.І. Юлевич. – Миколаїв : МНАУ, 2022. – 107 с.

У курсі лекцій викладено зміст дисципліни «Загальна біотехнологія» – науки, яка розглядає результати та перспективи використання біотехнології в сільськогосподарському виробництві з метою підвищення продуктивності, створення нових організмів, визначаються способи отримання цінних харчових білків і біологічно-активних речовин; наводяться методи трансплантації ембріонів, одержання трансгенних тварин; визначається ефективність підвищення генетичного потенціалу та прискорення селекційного прогресу за допомогою методів біотехнології; надаються знання методів біотехнологічної переробки продукції сільського господарства і його відходів в енергетичні та продовольчі ресурси.

УДК 631.147(075.8)

© Миколаївський національний аграрний університет, 2022

© Каратєєва О. І., Юлевич О.І. 2022

## ЗМІСТ

1. Становлення та розвиток біотехнології	5
2. Джерела сировини для біосинтезу продуктів	13
3. Методи культивування клітин	19
4. Генетична інженерія, її методи та задачі	25
5. Виробничий біосинтез	35
6. Біотехнологія отримання продуктів мікробіологічного синтезу	44
7. Контроль і управління біотехнологічними процесами	51
8. Багатотоннажне виробництво амінокислот і органічних кислот	60
9. Медична і екологічна біотехнологія	72
10. Сільськогосподарська біотехнологія і біоенергетика	84
11. Використання біотехнології в харчовій промисловості	96
Список використаних джерел	106

## Лекція 1. «Становлення та розвиток біотехнології»

### План

1. Вступ.
2. Зв'язок біотехнології з іншими дисциплінами
3. Етапи становлення біотехнології
4. Основні розділи біотехнології
5. Біологічні системи та принципи біотехнології
6. Об'єкти та продукти біотехнології

За останні десятиріччя біологія бурхливо розвивається та створює нові наукові напрямки, такі як – фізико-хімічна біологія, яка складається з біохімії, біофізики, молекулярної біології, генетики, біоорганічної хімії, імунології та мікробіології.

В результаті стрімкого прогресу різних складових частин фізико-хімічної біології виникло нове спрямування у науці та виробництві, яке отримало назву – біотехнологія. Це міждисциплінарна галузь науково-технічного прогресу, яка є більш зрілим станом у розвитку біології, яка нині і в майбутньому займатиметься створенням цілого з елементів вивчених раніше.

Біотехнологія є однією з найбільш перспективних і прогресуючих галузей науково-технічної і промислової діяльності. З її розвитком пов'язано вирішення ряду важливих соціальних, сировинних, продовольчих і екологічних проблем. Світовий бізнес в біотехнологічній галузі переживає період підвищення інвестиційної активності в науковій, освітянській та промисловій сферах, стрімко зростає ринок біотехнологічної продукції медичного, сільськогосподарського та харчового призначення.

Вперше термін «біотехнологія» застосував угорський інженер Карл Ереккі у 1917 році. Біотехнологія (від грец. «bios» – життя, «teken» – мистецтво, «logos» – наука).

Згідно визначенню Європейської біотехнологічної федерації (заснована у 1978р.) **Біотехнологія** – це наука, яка застосовує знання у галузі мікробіології, біохімії, генетики, генної інженерії, імунології, хімічній технології, приладо- та машинобудуванні та використовує біологічні об'єкти (мікроорганізми, клітини тканин та рослин) або молекули (нуклеїнові кислоти, білки, ферменти, вуглеводи) для промислового виробництва корисних для людей та тварин речовин та продуктів.

### 2. ЗВ'ЯЗОК З ІНШИМИ ДИСЦИПЛІНАМИ

Фундаментом біотехнології є мікробіологія, вірусологія, генетика, імунологія, хімічна технологія, біохімія, біофізика, молекулярна біологія (рис. 1).

*Біотехнологія* це напрям біології, який вивчає застосування біологічних об'єктів та хіміко-біологічних процесів з метою отримання різноманітної продукції для вирішення народногосподарських проблем.

*Біотехнологія* – це будь-який вид технології, пов'язаний з використанням біологічних систем живих організмів або їх похідних з метою виготовлення або зміни продуктів для конкретного призначення.

*Біотехнологія* це система прийомів керованого використання процесів життєдіяльності живих організмів для отримання промисловим способом цінних продуктів.

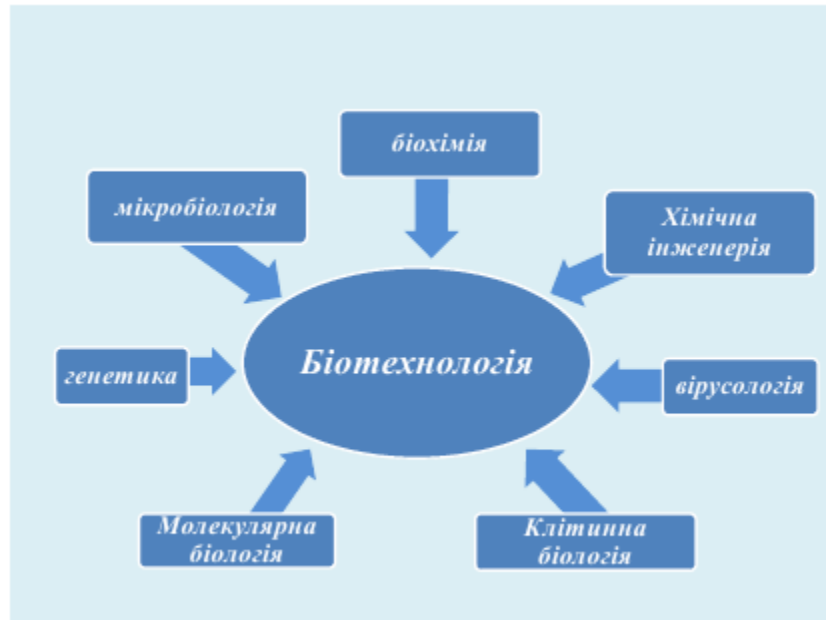


Рис. 1 – зв'язок біотехнології з іншими дисциплінами

### 3. ЕТАПИ СТАНОВЛЕННЯ БІОТЕХНОЛОГІЇ

Хоча біотехнологія як окрема наука та галузь виробництва вважається наймолодшою з усіх відомих, її формування відбувалося разом з розвитком людського суспільства.

Серед етапів розвитку біотехнології можна виділити 4, які широко розкривають сутність становлення цієї науки.

**Перший період**, як і у всіх інших наук – це *емперичний* період від грец. «*empeirikos*» -дослідний) або доісторичний – найдовший (6000 р до н.е. + 2000 р. н.е.).

У цей період відбувається використання методів та способів, які ми зараз відносимо до біотехнологічних:

- Виготовлення хлібу;
- Виготовлення пива (виготовляли шумери – перші жителі Месопотамії сучасної території Іраку. Набутий досвід передавався та розповсюджувався серед ассірійців, вавилонян, єгиптян та індійців);
- Виготовлення оцту;
- Отримання медових алкогольних напоїв;
- Перша дистиляція у виноробстві (12стр);
- Виготовлення горілки з хлібних злаків (16стр);
- Виготовлення шампанського (18 стр);

- Отримання кисломолочних продуктів;
- Отримання квашених овочів та капусти;
- Силосування кормів.

**Другий період** – етіологічний (від грец. «aitia» – причина) Він тривав 1856-1933рр.

Серед досягнень другого періоду слід виділити:

**-1856р.** – Г. Мендель відкрив закони домінування ознак та ввів поняття одиниці спадковості у вигляді дискретних факторів, які передаються від батьків нащадкам, пізніше названих генами.

**-1859р.** – роботи Луї Пастера:

- встановлення мікробної природи бродіння;
- доказ можливості життя у без кисневих умовах;
- виготовлення рідкого поживного середовища.

**-186 р.** – швейцарський біохімік Йоганн Фрідріх Мішер виділив «нуклеїн» (ДНК) з лейкоцитів.

**-1881р.** – роботи Р. Коха:

- метод культивування бактерій на стерильних шматочках картоплі та на агарізованих середовищах внаслідок чого стало можливим отримання чистих культур з наступним цільовим використанням (бродіння, окислення).

**-1883р.** – І. Мечников розробив теорію клітинного імунітету

**-1892р.** – Д. Івановський відкрив віруси.

На цей період припадає зародження капіталізму, тому швидко і активно розвивається виробництво пресованих дріжджів, ацетону, бутанолу, лимонної та молочної кислот. У Франції працюють над виготовленням біоустаткування для мікробіологічного очищення стічних вод.

**Третій період** – біотехнічний 1933-1972рр.

Усі прогресивні досягнення того часу нашли своє застосування у біотехнології.

**-1933р.** – А. Клюйвер та А. Перкін запропонували основні технічні прийоми глибинного культивування пліснявих грибів та методи оцінки продуктів культивування (опублікували роботу «Методи вивчення обміну речовин у пліснявих грибів»). Розпочалося впровадження у біотехнологію великомасштабного герметичного обладнання, яке забезпечує стерильні умови культивування.

**-1936р.** – конструйовано та впроваджено у практику біореактор (ферментер, апарат-культиватор).

**-1939-1945рр.** – розвиток промислового обладнання для виробництва антибіотиків.

**-1943р.** – виготовлення пеніциліну у промислових масштабах.

**-1939р.** – А. Тізеліус – розробив теорію електрофорезу.

**-1942р.** – М. Дельбрюк і Т. Андерсон вперше побачили віруси у електронному мікроскопі.

**-1948р.** – народження теля від штучно заплідненої корови.

**-1949р.** – Дж. Ледерберг відкрив процес кон'югації у *E.coli*.

**-1950р.** – Ж. Моно розробив теоретичні основи безперервного керованого культивування мікробів.

**-1950р.** – відкриття Чаргаффом нуклеотидного складу ДНК

**-1951р.** – У. Хейс описав плазмиду як позахромосомний фактор спадковості.

**-1953р.** – американський біолог Джеймс Уотсон та британський молекулярний біолог Френсіс Крик визначили структуру подвійної спіралі ДНК, що, у свою чергу, привело до нових відкриттів принципів роботи ДНК на молекулярному рівні.

**-1959р.** – японські вчені відкрили плазмиди антибіотикостійкості (R-фактор) у дизентерійної бактерії.

**-1960р.** – С.Очоа і А. Корнберг виділили білки-ферменти які можуть «зшивати» нуклеотиди у полімерні ланцюги. Була виділена ДНК-полімераза з кишкової палички.

**-1961р.** – М.Ніренберг прочитав перші три букви генетичного коду для амінокислоти фенілаланін.

**-1962р.** – Х. Корана синтезував хімічним способом функціональний ген.

**-1969р.** – М.Беквіт і С.Шакіро виділили ген *lac*-операона у *E.coli*.

**-1970р.** – Виділили фермент рестріктазу.

Розпочався **четвертий період** – генотехнічний (від грец. «genesis» – походження).

Цей період характеризується створенням нових методів дослідження:

**-1975р.** – Г.Келер і Ц.Мільштейн описали метод отримання моноклональних антитіл (опублікували у журналі «*Nature*» статтю «Довгоживучі культури гібридних клітин, які секретують антитіла певної специфічності»).

**-1977р.** – М.Максам і У.Гілберт розробили метод аналізу первинної структури ДНК шляхом хімічної деградації, а Дж.Сенгер – шляхом полімеразного копіювання з використанням термінуючи аналогів нуклеотидів.

**-1981р.** – дозволений до використання у США перший діагностичний набір моноклональних антитіл.

**-1982р.** – надійшов у продаж людський інсулін, отриманий від клітин *E.coli*, дозволено застосування рекомбінантних вакцин; розроблені генно-інженерні інтерферони, фактор некротизації пухлин, інтерлейкін-2, соматотропний гормон людини.

**-1986р.** – К.Мюлліс розробив метод полімеразно-ланцюгової реакції (ПЛР).

**-1988р.** – розпочато широкомасштабне виробництво обладнання та діагностичних приладів для ПЛР.

**-1997р.** – отримання клону тварини (вівця Доллі) з диференційованої соматичної клітини.

**Досягнення** біотехнології у четвертому періоді:



- Розробка інтенсивних процесів (замість екстенсивних) з продуцентами антибіотиків, ферментів, амінокислот та вітамінів.

- Отримання суперпродуцентів
- Створення різних продуктів на основі генно-інженерних технологій
- Створення організмів, які раніше не існували у природі.
- Розробка та впровадження у практику спеціальної апаратури біотехнологічних систем.

- Автоматизація та комп'ютеризація біотехнологічних виробничих процесів при максимальному використанні сировини та мінімальному використанні енергії.

#### **4. ОСНОВНІ РОЗДІЛИ БІОТЕХНОЛОГІЇ**

Біотехнологія як наука поділяється на напрямки:

- Генетична інженерія та генотерапія;
- Клітинна інженерія;
- Інженерна ензимологія (отримання та застосування ферментних препаратів);
- Імунобіотехнологія;
- Біоелектроніка;
- Біоелектрохімія;
- Біоніка;
- Нанотехнологія;

У промисловому масштабі біотехнологія це індустрія, яка має галузі:

- Виробництво білка, амінокислот, вітамінів, ферментів;
- Виробництво лікувально-профілактичних та діагностичних препаратів (вакцин, сироваток, антигенів, алергенів, інтерферонів, антибіотиків);
- Отримання гербіцидів та біоінсектицидів;
- Отримання нових порід тварин, сортів рослин;
- Вирощування тканинних та клітинних культур рослинного та тваринного походження;
- Виробництво полімерів та сировини для текстильної промисловості;
- Отримання метанолу, етанолу, біогазу, водню;
- Переробка виробничих та господарських відходів, стічних вод, гною тварин;
- Біоремедіація (утилізація небезпечних викидів нафти, хімікатів, які забруднюють ґрунти та воду);
- Біогеотехнологія (раніше трактувалося як мікробне вилузування металів. Вивчає видобуток металів з руд за допомогою мікроорганізмів).

Біотехнологічну промисловість інколи поділяють на кольорові *спрямування*:

<b>ЧЕРВОНА біотехнологія</b>	Біофармацевтика, медична діагностика
<b>ЗЕЛЕНА біотехнологія</b>	Сільське господарство. Біотехнологія навколишнього природного середовища - біопаливо, біодобрива, біоремедіація, геомікробіологія
<b>БІЛА біотехнологія</b>	Промислова біотехнологія. Біоіндустрія на основі генної інженерії.
<b>ЖОВТА біотехнологія</b>	Харчова біотехнологія.
<b>СИНЯ (БЛАКИТНА) біотехнологія</b>	Аквакультура, морська біотехнологія
<b>КОРИЧНЕВА (БРУНАТНА) біотехнологія</b>	Біотехнологія посушливих зон і пустель
<b>ЧОРНА біотехнологія</b>	Біотероризм, біологічна зброя, біозлочинність, проти врожайні дії
<b>ФІОЛЕТОВА біотехнологія</b>	Патенти, публікації, відкриття, права інтелектуальної власності
<b>ЗОЛОТА біотехнологія</b>	Біоінформатика, нанобіотехнології
<b>СІРА біотехнологія</b>	Класична ферментація і технології біопроцесів

Основні напрямки озвитку іотехнології:

- Виробництво ікробного білка для кормових цілей, незамінних амінокислот (лізин, метіонін, треонін), вітамінів, ферментних препаратів для покращення засвоюваності кормів.
- Виробництво на основі генної інженерії та молекулярної біології вакцин, антибіотиків, моноклональних антитіл, інтерферонів, ферментів, антигенів.
- Створення трансгенних рослин та тварин.
- Створення нових методів переробки та збереження харчових продуктів, отримання харчових добавок (продукція мікроорганізмами полімерів, ферментів та амінокислот).
- Використання ферментів для вдосконалення діагностики, створення біоелектронних імуносенсорів (на їх основі можна створювати дешеві прилади, які здатні визначати та підтримувати на заданому рівні концентрацію речовин у рідинах тіла).
- Розробка нових методів утилізації відходів.

### **5. Біологічні системи та принципи біотехнології**

Знання та технічні можливості дозволяють синтезувати практично усі відомі нам речовини, проте штучно синтезовані речовини та сполуки мають ряд недоліків:

- Великі капіталовкладення для їх отримання
- Велика вартість продукту
- Погана засвоюваність організмом людини чи тварини.

Практично усі біотехнологічні процеси тісно пов'язані з життєдіяльністю різних груп мікроорганізмів – бактерій, вірусів, мікроскопічних грибів, дріжджів.

Мікроорганізми використовують речовини навколишнього середовища, ростуть, розмножуються, виділяють рідкі та газоподібні продукти метаболізму, заради яких проводять процес культивування. Тому мікроорганізми можна розглядати як центральний елемент біотехнологічної системи, якій визначає ефективність її функціонування.

*Система* (від грец. «systema» – ціле, складене з частин) – багато елементів, які пов'язані між собою і утворюють ціле.

*Біологічна система характеризується:*

- наявністю гетерогенних відкритих систем (це живі системи, які обмінюються з навколишнім середовищем речовинами та енергією).
- Поділом біосистеми на підсистеми (структурні елементи), які пов'язані між собою і мають складну організацію.
- Самоуправлінням, саморегулюванням (здатність до обміну інформацією з навколишнім світом для підтримки власної структури та управління процесами метаболізму).
- Самовідтворенням (розмноження живих клітин, мікроорганізмів).

*Біотехнологічний процес складається з п'яти етапів:*

1. Отримання сировини та її обробка для використання поживних речовин мікроорганізмами-мішенями.
2. Підготовка біологічно діючого начала – біооб'єкта.
3. Ферментація та біотрансформація: ріст мікроорганізмів з утворенням необхідного метаболіту
4. Кінцева обробка: очищення необхідної речовини від культурального середовища.
5. Виготовлення товарної форми продукції.

#### **6. Об'єкти біотехнології:**

- віруси
- мікроорганізми
- клітини та тканини рослин, тварин та людини
- речовини біологічного походження (ферменти, нуклеїнові кислоти)
- молекули
- генетично модифіковані організми

Більшість об'єктів біотехнології становлять мікроорганізми. Підставою щодо вибору цих об'єктів для біотехнології є *наступні характеристики:*

- Клітини тварин, людини, рослин та мікроорганізмів виробляють у процесі життєдіяльності різні цінні продукти: протеїни, ліпіди, нуклеїнові кислоти, вітаміни, амінокислоти, антибіотики, гормони, антитіла, антигени, ферменти, продукти метаболізму. Серед цих продуктів є вкрай необхідні, які не можна отримати «не біотехнологічним» шляхом.

- Клітини характеризуються високою швидкістю відтворення. Бактеріальна клітина поділяється кожні 20-60 хв, клітина дріжджів кожні 1,5-

2,0 години, тварин – 24 години. Це дозволяє за відносно короткий час штучно наростити у промислових умовах велику кількість біомаси мікробних, тваринних або рослинних клітин (наприклад, у біореакторі ємністю 100м<sup>3</sup> за 2-3 доби можна виростити 10<sup>16</sup>-10<sup>18</sup> мікробних клітин). У процесі життєдіяльності клітин під час їх вирощування у середовище надходить велика кількість цінних продуктів, а у самих клітинах містяться інші цінні продукти.

- Хімічний синтез таких необхідних продуктів як білки, антибіотики, антигени, антитіла надзвичайно коштовний та технологічно складний ніж біосинтез.
- Можливість проведення біотехнологічного процесу у промислових масштабах.
- Дотримання принципу технологічності (збереження властивостей біооб'єкта протягом багатьох циклів культивування).

#### *Джерело біологічних об'єктів для біотехнології.*

- Племінні заводи тварин донорів
- Сертифіковані віварії лабораторних тварин
- Спеціалізовані банки колекцій мікроорганізмів
- Кріобанки клітин тварин та рослин

#### *Перспективні біологічні об'єкти:*

- Трансгенні організми, отримані методами генетичної інженерії (біологічний об'єкт створюється шляхом змін його генетичної інформації з метою виключити небажані та посилити необхідні якості або надати нові)
- Культури клітин тварин і рослин (КК є продуцентами інтерферону, вірусних вакцин, моноклональних антитіл, поверхневих антигенів, ангіогенних факторів)
- Термофільні мікроорганізми та ферменти (термофільні мікроорганізми продукують ферменти, які характеризуються термостабільністю та високою стійкістю до денатурації у порівнянні з мезофільними).

## Лекція 2

### Сировинна база біотехнології

#### План

1. Джерела сировини для біосинтезу продуктів.
2. Складання рецептур поживних середовищ.
3. Підтримка чистої культури та боротьба з мікробами контамінантами.

1. **Джерела сировини для біосинтезу продуктів.** *Джерела сировини для біосинтезу продуктів.* Серед безлічі компонентів живильного 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.

Основною сировиною для мікробного синтезу є вуглевмісна сировина. Це може бути кристалічна глюкоза, технічна сахароза, технічна лактоза, гідрол, крохмаль, оцтова кислота, етанол, вузька фракція рідкого парафіну. Так, кам'яне вугілля, природний газ і деревина служать сировиною для хімічного синтезу технічних спиртів або оцтової кислоти, які потім дуже широко використовуються в мікробіологічній промисловості. Це так звані традиційні джерела вуглецю.

Для синтезу білка і різних метаболітів широко використовують субстрати синтетичного генезу, відходи сільського господарства та харчової промисловості, особливо оцтову кислоту, мелясу і ін.

В якості сировини широко використовуються побічні продукти виробництва. У недалекому минулому високомолекулярні парафіни спалювали і скидали у водойми. Зараз вони визнані найціннішою сировиною не тільки для хімічної, але і мікробіологічної промисловості. При переробці крохмалю в глюкозу, кукурудзяні зерна замочують у воді. Раніше ця вода не утилізували. Зараз таку воду упарюють і отриманий екстракт додають в поживне середовище.

Сировинна база біотехнології істотно зростає за рахунок побічних продуктів різних виробництв. Так, для виробництва кормових та хлібопекарських дріжджів, антибіотиків, етанолу та ін. застосовуються сульфідні луки, картопляна барда, зернова барда, гідрол, молочна сироватка, депротейнізований сік рослин, картопляний сік, гідролізат відходів деревини, згущений випаруванням гідролізат торфу. Для вирощування дріжджів, бактерій, мікроміцетів використовують солодове сусло, а для виробництва ферментів - пшеничні висівки. Підраховано, що з однієї тонни молочної сироватки можна отримати близько 20 кг повітряно-сухої біомаси дріжджів. З сепарованій бражки, крім цього, виділяють близько 4-х кг протеїну. Широко застосовуються у мікробіологічній промисловості меляса та гідрол - побічний продукт виробництва глюкози з крохмалю. Багато продуцентів

досить ефективно утилізують вуглеводи з м'яса, що містить до 50% сахарози. М'ясо – відхід цукрового виробництва.

Перспективним є використання сировинних ресурсів, що постійно поновлюються – первинних продуктів фотосинтезу, в першу чергу гідролізатів деревини і депротейнізованого соку рослин.

Для росту і розвитку мікроорганізмів необхідно мінеральне живлення. Відомо, що суха біомаса бактеріальних клітин містить до 12%, а міцеліальних грибів - до 10% азоту. Якщо концентрація біомаси при вирощуванні становить 30-40 г/л, то потреба в азотовмісних добавках звичайно становить 0,3 - 0,4% від об'єму середовища. Однак для отримання азотовмісних метаболітів необхідні значно більші кількості азоту. Причому, бактерії більш вимогливі до джерел азоту, ніж мікроміцети, актиноміцети і дріжджі.

Біооб'єкти можуть утилізувати як органічні, так і неорганічні азотовмісні субстрати. Наприклад, дріжджі добре засвоюють аміачні солі: сульфат амонію, фосфат амонію, аміак з водного об'єму, сечовину. В той же час деякі гриби, що виробляють целюлолітичні ферменти, найбільш активні при додаванні в живильне середовище органічного азоту (аспарагін, пептони та ін.).

Важливими компонентами середовища є приблизно 10 макроелементів (фосфор, кальцій, магній, калій і ін.), їх концентрація становить зазвичай  $10^{-3}$ - $10^{-4}$  М. У поживному середовищі повинні бути мікроелементи: цинк, марганець, молібден, селен, мідь, залізо та ін.. Причому, потреба в них виникає особливо тоді, коли цільовий продукт містить мікроелемент. При біосинтезі вітаміну  $B_{12}$  включають кобальт, тіаміну в клітинах бульбочкових бактерій - молібден і бор і т.д. Клітини мікроорганізмів мають негативний потенціал (16-20 мВ). Він може змінитися під впливом мінерального складу поживного середовища. Це, в свою чергу, впливає на фізіологічну діяльність біооб'єкту, селективність клітинної мембрани, флокуляцію і флоотацію клітин.

Для оптимального росту біомаси концентрація кисню повинна становити 50-60% від повного насичення, а для біосинтезу цільових метаболітів - 10-20%. Кисень погано розчинний у середовищі і його розчинність залежить від температури, тиску та концентрації компонентів. При тиску 0,1 МПа ( $1 \text{ кгс/см}^2$ ) і температурі  $30^\circ\text{C}$  в 1 л дистильованої води максимально може розчинитися 7,5 мг кисню. Реально максимальна розчинність кисню становить 2-5 мг/л і запаси його в середовищі забезпечують життєдіяльність аеробного продуцента протягом 0,5-2 хв.

Важливим критерієм є критична концентрація кисню, тобто концентрація при якій спостерігається ліміт дихання клітин. Для аеробних мікроорганізмів, що ростуть в цукорвмісних субстратах критична концентрація кисню дорівнює 0,05-0,10 мг/л або 3-8% від повного насичення середовища киснем. Ріст дріжджів на середовищах з глюкозою лімітується при  $pO_2$  на рівні 20-25% від повного насичення, а на середовищах з парафинами - при 50-60% від повного насичення. У реальних цифрах це

означає, що для біосинтезу 1 кг дріжджової біомаси необхідно 0,74-2,6 кг молекулярного кисню. Якщо субстрат споживається інтенсивно, то продуцент асимілює 0,83-4,0 мг кисню на 1 л середовища в хвилину. У міру збільшення щільності культури вміст розчиненого кисню в культуральній рідині падає. Через низьку розчинність кисню цю проблему не можна вирішити простим продуванням кисню або повітря через середовище, навіть при інтенсивному перемішуванні. При зменшенні концентрації кисню в живильному середовищі експонентний ріст затримується, і культура повільно переходить в стаціонарну фазу, характеризується іншим метаболічним статусом. В результаті цього синтезується безліч протеїназ здатних розщеплювати білок-мішень. Для вирішення цієї складної проблеми створюють мутанти з низькою активністю протеїназ; в *E. coli* вводиться ген, відповідальний за синтез гемоглобінподібної речовини. У результаті цього збільшується кількість кисню в клітині і середовищі, зростає ефективність протонних насосів, збільшується кількість АТФ і т.д.

Вода, яка використовується для приготування поживних середовищ, має бути чистою, безбарвною, без присмаку, запаху і осаду, відповідати вимогам ДСТУ. У воді повинно міститися не більше 50 мг/л хлоридів, не більше 60 мг/л сульфатів; концентрація металів (в мг/л) не повинна перевищувати для свинцю 0,2; миш'яку - 0,05; фтору - 1,5; цинку - 5,0; міді - 3,0.

Для інтенсивного росту мікроорганізмів, крім того, необхідні вітаміни, амінокислоти, цитокініни та інші БАР. Тому в рецептуру середовищ для промислового мікробного синтезу вводять кукурудзяний екстракт, дріжджовий автолізат, дріжджовий екстракт, гідролізат дріжджів, клітинний картопляний сік, молочну сироватку, екстракт пшеничних висівок, екстракт солодових паростків, м'ясний, рибний пептони. При культивуванні клітин тварин застосовують екстракт плаценти і плазму крові тварин. Для вирощування клітин рослин чи міцелію вищих грибів застосовують екстракти гарбуза, листя бавовнику, відвар слив та ін..

Отже, при виробництві продуктів мікробного синтезу особливе місце займає сировина. Сировину можна розділити на:

- Дорогу, харчову: борошно кукурудзяне, соєве, пшеничне, крохмаль, харчовий цукор, глюкоза, лактоза, рослинні олії;
- Відходи харчової промисловості, вони дешевші. Це гідрол, меляса, зелена патока, молочна сироватка, кукурудзяний екстракт, рибно-кісткове борошно, гідролізати кукурудзяних качанів, соломи, соняшникового лушпиння;
- Спеціально одержувана сировина: гідролізати деревини та торфу, парафіни нафти, метан, етанол та ін..

**2. Складання рецептур поживних середовищ.** Основний принцип цього полягає в задоволенні фізіологічних потреб мікроорганізмів. Ці потреби, оптимальні значення рН і температури вказані в спеціальних каталогах культур і визначниках. Так, концентрація основної сировини

визначається з урахуванням коефіцієнта його конверсії. При оптимальних умовах культивування коефіцієнт конверсії в біомасу для метанолу та глюкози дорівнює приблизно 0,5; для етанолу 0,70-0,75; для гексадекан 1,0-1,1; для рідких парафінів 1,2-1,3. Це означає, що в умовах періодичного культивування для вирощування 30 г біомаси в 1 л середовища в субстрат має бути внесено 60 г метанолу, 40 г етанолу, 30 г гексадекану або 24 г рідких парафінів.

Концентрація метанолу вище 1% або етанолу вище 1,5-2,0% токсичні для мікроорганізмів. Глюкоза, сахароза, фруктоза та інші низькомолекулярні цукри в концентраціях більше 7-8% також гальмують ріст більшості мікроорганізмів і повинні вноситися поступово, по мірі їх асиміляції. Кількість необхідних азотовмісних речовин визначають за вмістом азоту в біомасі та передбачуваного її врожаю, при цьому слід мати на увазі, що близько 5% азоту залишається не використаним. Потребу в мінеральному живленні оцінюють, культивуючи мікроорганізми на строго синтетичних середовищах.

Звідси випливає, що для складання рецептур всі компоненти повинні бути взяті у співвідношеннях, пропорційно потребам мікроорганізмів, і з урахуванням передбачуваного врожаю біомаси.

У поживне середовище необхідно вводити різні побічні інгредієнти, які позитивно впливають на процес ферментації (білки, амінокислоти, органічні кислоти, мінеральні речовини та ін.)

Середа для вирощування клітин рослин і тварин, крім багатьох зазначених компонентів, повинна містити специфічні стимулятори росту. Для клітин рослин - це індолицетова кислота, кинетин і гіббереллінова кислота. Клітини тварин потребують ростових речовин і незамінних амінокислот. До ростових речовин відносяться (мг/л) інсулін - 0,1-1,0; глюкагон - 0,05-5,0; простагландини E1-E2 - по 0,01; гідрокортизон - до 0,03; прогестерон - до 0,003 та ін..

**3. Підтримка чистої культури та боротьба з мікробами-контаміантів.** Для біотехнологічних процесів характерна наявність ряду умов і допоміжних стадій. Одні з них абсолютно необхідні для успішного культивування біооб'єктів, інші дозволяють оптимізувати технологічний процес і збільшити вихід цільового продукту. Так, біотехнологічні процеси проводять в асептичних умовах, при обов'язковій стерилізації живильних середовищ, повітря, різних додаткових компонентів, вузлів біореактора, при підтримці на оптимальному рівні теплообміну і масопередачі, використання метаболічних особливостей біооб'єктів і т.д.

*Асептика* (від греч. а – ні, sepsis – гниття) – комплекс заходів, спрямованих на запобігання потрапляння в живильне середовище сторонніх мікроорганізмів, в т.ч. хвороботворних. Причому, якщо в біотехнології використовують функціональну активність певного мікроорганізму і виключають потрапляння в середу інших біооб'єктів, то в хірургії, наприклад, повинна бути дотримана суворая стерильність. Асептика в



біотехнологічних виробництвах включає механічний, фізичний та хімічний захист біооб'єкту, середовища його проживання, а також часто і кінцевого продукту.

*Механічний захист* – це видалення механічних домішок з повітря, герметизація устаткування, ізоляція вузлів і з'єднань, вологе прибирання приміщень.

*Фізичний захист* – обробка повітря і поверхонь приладів і апаратів ультрафіолетовими променями, кип'ятіння, стерилізація парою під тиском, обробка ультрафіолетом.

*Хімічний захист* – обробка різних поверхонь хімічними антисептиками.

Джерелами мікробів-контамінатів у виробничих умовах можуть бути ґрунт, вода, навколишнє повітря, люди. З ґрунту в повітря і в різні етапи біотехнологічних процесів можуть потрапити спороутворюючі бацили, конідії грибів, актиноміцети і т.д. За ступенем забрудненості повітря, приміщення, наприклад, де асептичне виготовляють лікарські засоби, в розрахунку на 1 м<sup>3</sup> поділяють:

- 1 клас чистоти – ламінарний потік стерильного повітря, мікробів не повинно бути, а механічних частинок розміром до 0,5 мкм повинно бути не більше 3500. Такий клас чистоти необхідний для виготовлення стерильних ліків;

- 2 клас чистоти – до 50 мікробних клітин, до 2500 механічних часток розміром 5 мкм і до 350000 часток розміром 0,5 мкм;

- 3 клас чистоти – до 100 мікробних клітин (3А клас - до 200 і 3Б клас - до 500 клітин), до 25000 частинок розміром 5 мкм і до 3500000 частинок розміром 0,5 мкм;

- 4 клас чистоти – за ГОСТ 12.1.005-86.

Залежно від числа мікробів лікарські засоби поділяють на 4 категорії:

- Стерильні препарати для ін'єкцій, приготовані на апірогенної воді;

- Очні ліки, препарати для введення в закриті порожнини тіла, засоби для лікування великих опіків і відкритих ран, також відносяться до стерильних і не повинні містити живих мікроорганізмів;

- Лікарські засоби для зовнішнього застосування і для введення у відкриті порожнини не повинні містити більше 100 живих мікроорганізмів в 1г (мл) препарату і при повній відсутності бактерій сімейств *Enterobacteriaceae*, а також *Pseudomonas aeruginosa* та *Staphylococcus aureus*;

- Всі інші лікарські засоби. Вони можуть містити в 1 г (мл) не більше 1000 життєздатних бактерій-сапрофітів (*мікроорганізми, що використовують як джерела живлення субстрати з неживих об'єктів, на противагу мікробам-паразитам, здатним жити за рахунок продуктів обміну в тканинах живих організмів*) і не більше 100 клітин непатогенних грибів при відсутності хвороботворних і умовно патогенних мікроорганізмів, у т.ч. ентеробактерій, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, аспорогенні дріжджі роду *Candida*.

Працівники біотехнологічних виробництв, в залежності від класності чистоти приміщень, повинні одягати різний технологічний одяг.

Найчистішими є приміщення першого класу, а, наприклад, в приміщеннях четвертого класу чистоти, де вимоги кількка пом'якшені, рекомендується одягати комбінезон, або куртку і штани, або халат, шапочку або косинку з бавовняних або лляних тканин. Люди на таких виробництвах також можуть бути джерелами грамнегативних бактерій, коків, мікоплазм, вірусів і ін.. Відомо, що на шкірі людини знаходяться до  $10^{10}$  мікробних клітин. Найбільш забрудненими є кисті рук, ступні, лікті, шия, груди, пахові області. Вельми різноманітна і численна мікрофлора ротової порожнини. Тільки за одне чхання здорова людина виділяє до 20000 мікроорганізмів, здатних розповсюджуватись до 1,5 м.

З водою в технологічний процес можуть потрапити грамнегативні бактерії з груп ентеробактерій, псевдомонад та ін.. У природних водоймах постійно знаходяться целюлозоруйнуючі, нітрифікуючі, денітрифікуючі бактерії, ціанобактерії, амонійфікатори, залізобактерії та ін.. У цьому відношенні найбільш чистою є вода артезіанських колодязів, глибоких свердловин і джерел.

Джерелами мікробів-контамінантів можуть бути компоненти поживних середовищ, наприклад кукурудзяний екстракт (фаги, дріжджі та ін.). Калюсні культури часто містять рослинні віруси. Сприятливими для мікробів-забруднювачів є культури клітин тварин і людини. Вельми істотно, що контамінація пригнічує розвиток і функції біооб'єкту, дезорганізує середу вирощування; мікроби-забруднювачі здатні продукувати токсичні речовини, які можуть потрапити в цільовий продукт. Виходячи з цього, питання асептики в біотехнології являють собою значну проблему, яка потребує постійної уваги та розробки все більш досконалих заходів щодо профілактики попадання мікробів-контамінантів в різні сфери біотехнологічних процесів.

Постійно працівники підприємств знаходяться під контролем медичної служби, для своєчасного виявлення хворих і носіїв патогенної та умовно патогенної мікрофлори і для профілактики мікробного забруднення або цільових продуктів. Здійснюється контроль за водопостачанням. Разом з тим багато субстратів взагалі не вимагають стерилізації, так як вони самі мають асептичним дією. Це етанол, метанол, міцна оцтова кислота та ін..

## Лекція 3 Методи культивування клітин

### План

1. Методи і принципи селекції мікроорганізмів.
2. Промислові штами мікроорганізмів.
3. Зберігання активності штамів и консервація продуцентів.
4. Селекція продуцентів антибіотиків, органічних кислот и ферментів.

Селекція (від латинського *Selectio* - вибір, добір) – практичні прийоми і методи виведення нових і поліпшення існуючих сортів рослин і порід тварин, і отримання корисних видів мікроорганізмів, що дають при певних умовах найбільшу кількість корисної для людини продукції. Теоретичною основою селекції є генетика. Процес виведення, наприклад, сортів рослин складається з наступних стадій: а) вивчення вихідного матеріалу, б) отримання вихідного матеріалу методом гібридизації; в) виділення з цього матеріалу видатних форм; г) всебічне порівняльне вивчення видатних форм; д) районування сортів.

Методи селекції рослин залежать від: 1. Біології розмноження (вегетативне або статеве). 2. Способів запліднення (самозапліднення або перехресне). 3. Кількості нащадків. 4. Цілей селекції. 5. Способів господарського використання сорту та ін.. Як відомо, швидше за все можна вивести сорти рослин, що розмножуються вегетативними органами. Усяка видатна рослина може бути родоначальником сорту.

Відомо кілька методів селекції. Наприклад, *метод спонтанних мутацій*. Таким методом було відібрано штами пивних, винних, пекарських дріжджів, оцтовокислих, пропіоновокислих бактерій та ін.. Вони тривалий час використовуються в різних галузях харчової і переробної промисловості. Однак частота спонтанних мутацій невелика і це значно гальмує прискорення процесу. Відомо, що ген має подвоїтися в середньому  $10^6$ - $10^8$  разів, щоб виникла мутація. Тим не менш, цей метод широко застосовується і можливості його далеко не вичерпані.

Прискорити селекцію можна за допомогою *індукованого мутагенезу*. Для його проведення використовуються наступні підходи:

- В протоці лімітується кількість якого-небудь субстрату. Наприклад, в середовищі культивування *E. coli* зменшується вміст лактози, що призводить до накопичення мутантів з більш високою активністю  $\beta$ -галактозидази, внаслідок ампліфікації генів лактози;

- Застосовують *фізичні мутагени*: ультрафіолетове, рентгенівське або  $\gamma$ -випромінювання, які здатні пошкоджувати ДНК;

- Використовують *хімічні мутагени*. Ними можуть бути: 1) інгібітори попередників нуклеїнових кислот - азогуанін, азосерін, кофеїн, теобромін; 2)

аналоги азотистих основ нуклеїнових кислот: 5-бромураціл, 5 - хлорураціл, 2-амінопурин та ін; 3) алкілюючі сполуки - диметилсульфат, диетилсульфат , окис пропілену, фенол, формальдегід; супермутагеном є нітрозаміни:

- Використовують *біологічні чинники*, зокрема, фаги.

Після отримання мутацій проводять скринінг отриманих клонів. Відбирають найбільш продуктивні клони, які знову піддають впливу тих чи інших мутагенів і т.д. Іншими словами, проводять ступінчастий відбір за цікавою ознакою. Метод трудомісткий і не дозволяє з достовірністю судити про характер виниклих змін.

У практику селекції впроваджено *метод відбору продуцентів за їх стійкістю до структурних аналогів* цільового продукту. В основі методу лежить можливість регуляції активності ферментів за принципом зворотного зв'язку.

При селекції мікроорганізмів необхідно враховувати ряд їх особливостей:

- Кожна клітина при вирощуванні здатна утворювати *клон*, тобто сукупність генетично однорідних особин. Однак, внаслідок природних мутацій, в клоні розвивається гетерогенність і він перетворюється в *популяцію* - сукупність клітин з різними генотипами;

- У мікроорганізмів внаслідок гаплоїдності немає прихованої мінливості, що є основою селекції вищих організмів;

- Для промислових штамів мікроорганізмів не встановлена здатність до статевого розмноження. Отже, селекцію клітин можна проводити тільки вегетативним шляхом;

- Завдяки швидкій зміні поколінь мікроорганізмів, відбір позитивних мутантів проводиться швидше і ефективніше, ніж при селекції макроорганізмів.

Для селекції мікроорганізмів можна використовувати музейні культури, відомі промислові продуценти або виділяти мікроби з природних субстратів.

Основними принципами селекції мікроорганізмів є, мутаційна мінливість, відбір позитивних мутантів, гібридизація мікроорганізмів.

*Мутаційна мінливість* є природним фактором еволюції. У величезній популяції клітин, незважаючи навіть на відому рідкість мутацій, в кожному поколінні (генерації) по кожному гену виявляється  $10^5$  -  $10^7$  мутантних клітин. Частота мутацій зростає на декілька порядків, після дії мутагенних факторів. Завдяки спонтанним мутаціям мікроорганізми легко пристосовуються до нових умов існування. Індуковані мутації ж дозволяють отримати біооб'єкти з високими корисними продуктивними властивостями.

Мутаційні зміни призводять до фізіологічних і морфологічних змін клітини. Тому у мутанта стають іншими вимоги до поживного середовища і до умов культивування. Завжди у суперпродуцентів позитивні мутанти зустрічаються рідше, оскільки їх геном уже насичений мутаціями.

*Гібридизація мікроорганізмів.* Довгий час цей метод селекції мікроорганізмів застосовувався рідко, тому що світу мікробів, зазвичай невластиве схрещування - сексуальне розмноження. Так, при гібридизації грибів використовують вегетативну гібридизацію, яка аналогічна статевому процесу розмноження. При цьому генетичний матеріал двох вегетативних клітин грибів обмінюється при клітинному злитті (парасексуальний цикл). Спочатку утворюється анастомоз між двома гіфами міцелію і відбувається обмін субклітинних структур. Гетерокаріони на цьому етапі містять генетично не змінені гаплоїдні ядра обох штамів. Потім ядра зливаються і утворюється диплоїдне ядро. Цікаво, що диплоїдизація вже сама підвищує продуктивність клітин. Це, з одного боку. З іншого боку, в результаті сексуального розмноження утворюється рекомбінантний гібрид, геном якого об'єднує генетичну інформацію різних організмів. Вегетативна гібридизація грибів - природний процес, що відбувається в природі. Його можна оптимізувати, використовуючи методи клітинної інженерії.

Ще одним видом гібридизації мікроорганізмів є злиття протопластів. *Протопласти* - це клітини, позбавлені клітинної стінки. Її видаляють таким чином: вирощування клітин в присутності антибіотиків, перешкоджає утворенню клітинної стінки дія ферменту лізоциму, ферментів равликів або комплекси ферментів мікробного генезу ("дрожжелітін"). Злиттю протопластів сприяють деякі стимулятори, наприклад, поліетиленгліколь. У гібридах потім порівняно легко утворюється нормальна клітинна стінка.

## **2. Промислові штами мікроорганізмів.**

Відомо більше 100 тисяч видів мікроорганізмів, однак у промисловості поки використовується не більше 100 видів, які утворюють кілька тисяч штамів.

Промисловий штам повинен відповідати наступним вимогам:

- Рости на дешевих і доступних субстратах;
- Мати високу швидкість росту біомаси ( $\rho$ ), високу продуктивність цільового продукту (DP) при економічному споживанні поживного субстрату ( $Y_x / s$ ;  $Y_p / s$ );
- Проявляти спрямовану біосинтетичну активність при мінімальному утворенні побічних продуктів;
- Бути генетично однорідним, стабільним за продуктивністю і вимогам до живильного субстрату і умов культивування;
- Бути стійким до фагів і іншої сторонньої мікрофлори;
- Бути нешкідливим для людей і для навколишнього середовища;
- Продукти повинні бути термофільними і ацидофільними (або алкалофільними), що дозволяє охороняти субстрат від дії сторонньої мікрофлори;
- Цільовий продукт біосинтезу повинен мати економічну і народногосподарську цінність, легко виділятися із зброженого субстрату.

Здатність до надсинтезу нерідко зустрічається в природі. Такі мікроорганізми часто продукують речовини (органічні кислоти, спирти,

антибактеріальні речовини), які є токсичними для інших видів і служать засобами захисту, або є резервом поживних речовин. Однак більша частина промислових мікроорганізмів отримані штучно шляхом селекції або методами генетичної, або клітинної інженерії.

### 3. Збереження активності штамів і консервація продуцентів.

Мутантні клітини легко реверсують, тобто піддаються зворотної мутації. Тому нові властивості високопродуктивного штаму необхідно закріпити і зберегти. Для цього використовують гени-модифікатори, які поступово адаптують нові властивості до загального метаболізму клітини. Крім того, уповільнення реверсії виявлено у подвійних мутантів. Зберегти цінні ознаки мутантів вдається значно легше, якщо вони мають певні селективні переваги: стійкість до антиметаболітів - аналогів, зниження активності деяких ферментів і т.д. Однак, як правило, зберегти переваги мутантів вдається з великими труднощами і їх доводиться регулярно клонувати, відбираючи активні клони. Однак, при багаторазових пересіву частота реверсії різко зростає.

Для формування банку промислових мутантів і можливості використання їх в міру необхідності слід забезпечити прийнятну консервацію продуцентів. Для цього використовують кілька прийомів:

- *Зниження температури.* Активну форму промислових мікроорганізмів протягом 1-2 місяців вдається підтримувати при температурі 4-6° С. Нерідко мікроорганізми зберігають у замороженому стані, але навіть при температурі від -15° до -30°С спостерігається масова загибель біооб'єктів. Виживаність мікроорганізмів виявляється максимальною при температурі -130°С. При цій температурі через 3-5 років виживаність мікроорганізмів становить 40-70%, а через 10-20 років - 10-20%;

- *Зберігання культур під шаром мінерального масла.* Зазвичай застосовують добре простерилізоване вазелінове масло високої в'язкості (щільність 0,8-0,9). Наприклад, продуцент пеніциліну *Penicillium chrysogenum* зберігає активність і життєздатність навіть після 3-5-річного зберігання під шаром масла;

- *Консервація мікроорганізмів* виявляється успішною при збереженні їх у ґрунті, торфі, кварцовому піску і т.д. Життєздатність, наприклад, мікроміцетів роду *Fusarium* в піску складає 10-15 років;

- Для консервації, зокрема спор мікроміцетів, використовують активне вугілля, висушені живильні субстрати; продуценти пеніциліну добре зберігаються на пшоні і т.д.;

- Використовується також *висушування спор* у вакуумі або висушування живих клітин (наприклад дріжджів) в конвекційної сушарці;

- Останнім часом широко застосовується *ліофілізація*. При цьому методі вода при зниженому атмосферному тиску випаровується із замороженого висушеного зразка, перетворюючись у пар, минаючи рідкий стан. Для ліофілізації мікробних культур зазвичай використовується температура від -45 до -60°С, час експозиції 1-2 години, а атмосферний тиск -

200-500 мм рт. ст. Завдяки ліофілізації більшість спор грибів і вегетативні клітини бактерій зберігають життєздатність протягом 15-20 років.

Зазвичай, після тривалого зберігання позитивні властивості мікроорганізмів кілька знижуються, але після ряду пересівань відновлюються в повному обсязі. Застосовують також антимулагени, які перешкоджають реверсії, використовують подвійні мутанти або створюють умови, які забезпечують продуценту різні переваги і ін..

#### **4. Селекція продуцентів антибіотиків, органічних кислот і ферментів.**

Антибіотики – найбільш значний клас фармацевтичних препаратів, який синтезується мікроорганізмами. Утворення антибіотиків – це довгий послідовний ланцюг ферментативних реакцій, кодується 15-30 генами. Сучасні антибіотики отримані завдяки багатоступінчатому підбору і селекції продуцентів. Біосинтетична активність природних продуцентів пеніциліну, наприклад, не перевищувала спочатку 5-20 мг антибіотика в 1 літрі поживного субстрату. Потім був виявлений мутант *Penicillium chrysogenum*, який виробляв 60 мг/л пеніциліну, що дозволило провести перші клінічні випробування. Після цього була розроблена наступна послідовність методів отримання суперпродуцентів: спонтанна мутація (150 мг/л), радіаційна обробка (300 мг/л), дія ультрафіолетових променів (550 мг/л), комбінований вплив ультрафіолетового опромінення і етиленіміну (5-7г/л ) і т.д. В даний час використовуються продуценти, що виробляють 20-25 г/л пеніциліну, що в 10-12 тисяч разів перевищує продуктивність першої культури.

Використовуючи аналогічні підходи продукцію стрептоміцину *Streptomyces griseus* вдалося збільшити в 60-80 разів; продукцію рибофлавіну – в 2000 разів, а цианкобаламіна - в 5000 разів.

Для отримання нових антибіотиків широко використовується *мутасинтез* – продуцент синтезує тільки частину ліків. Відсутній фрагмент одержують хімічним шляхом, вносять його в середовище культивування, а мутант завершує синтез антибіотика, який набуває нові, часто специфічні риси. Так отримують напівсинтетичні антибіотики.

Продуцентом лимонної кислоти, як відомо, є *Aspergillus niger*. На цій основі після впливу нітрозамінами, іншими алкілуєчими сполуками, ультрафіолетовими променями, іонізуючим випромінюванням був отриманий високопродуктивний штам Р-3. Цей мутант давав вихід лимонної кислоти 98-99% від кількості асимільованої сахарози. Аналогічним шляхом було отримано штам Л-3 *Lactobacillus delbrueckii*. Він дуже стабільний, не потребує штучного мутагенезу, а вихід молочної кислоти складає 95-98% від кількості засвоєної сахарози.

Селекція продуцентів ферментів все ще досить важке завдання. Це обумовлено великою складністю будови ферментів як білків, різноманітням механізмів їх регуляції, значною термолабільністю та ін.. Зазвичай, внаслідок цих особливостей активність біосинтезу ферментів вдається підвищити лише у 3-5 разів, порівняно з вихідними культурами. Однак, якщо поєднувати методи селекції мікроорганізмів з методами генетичної і клітинної інженерії,

то продуктивність біооб'єкту по виробленню ферментів можна підвищити в десятки разів. Використовуючи такі підходи, здатність *E. coli* до біосинтезу  $\alpha$ -амілази, наприклад, була збільшена в 200 разів.



## Лекція 4. Генетична інженерія

### План

1. Генетична інженерія, її методи та завдання
2. рДНК-біотехнологія: отримання фрагментів чужорідної ДНК, їх очистка.
3. Конструювання рДНК та клонування генів.
4. Ампліфікація і експресія рДНК. Геномна бібліотека.
5. Гібридомна технологія

### 1. Генетична інженерія, її методи та завдання.

Генетична інженерія – це методи отримання рекомбінантних ДНК (рДНК), що об'єднують послідовності нуклеотидів різного походження. Генетичну інженерію підрозділяють на генну, геномну і хромосомну інженерію. *Генна інженерія* - цілеспрямована зміна природних генетичних характеристик відомих вірусів і клітин. Таким методом здійснюють перебудову генома *in vivo* або *in vitro*. Наприклад, транслокацією у вірусні геноми вводять клітинні гени, а трансдукцією – за допомогою фагів переміщують клітинні гени донорів в клітини-реципієнта. Генна інженерія служить, в основному, інструментом отримання необхідних білкових продуктів (пептидних гормонів, ферментів та ін.)

*Геномна інженерія* – цілеспрямована глибока перебудова геному акаріот, прокаріот і еукаріот. Геномна інженерія вирішує проблему цілеспрямованої перебудови, що успадковується, якогось генома з тим, щоб сформувався організм, що істотно відрізняється за набором ознак від вихідного, аж до віднесення його до нового виду. Стосовно плазмід і вірусів мова йде про їх прояви в клітині. Геномну перебудову можливо здійснити такими способами: 1) внесенням в геном значної кількості додаткової генетичної інформації; 2) заміною істотної частини геному на функціонально гомологічну частину іншого геному; 3) модифікацією ключових генів з метою перешкодити схрещуванню з одновидовими партнерами (для організмів, що володіють статевим способом розмноження). Оскільки маються на увазі випадки, коли внесена інформація стабільно успадковується і виявляється фенотипове на рівні організму, то роботи по отриманню соматичних гібридних клітин, створенню химерних рослин і тварин в аспекті геномної інженерії розглядаються лише як етапні або модельні експерименти. Цілеспрямоване конструювання нових геномів вимагає знання їх структури, розуміння принципів їх організації, а також врахування механізмів взаємодії генів і їх продуктів. У свою чергу одним з методів дослідження цих аспектів може служити геномна інженерія.

Природі також не чужа стратегія геномного конструювання. Так, результатом природної геномної інженерії вірусів, що викликають грип, є його сильні епідемії, що відбуваються приблизно кожні вісім років. Справа в

тому, що геном цих вірусів складається з восьми різних фрагментів РНК, що тримають по одному гену. При спільному внутрішньоклітинному розвитку віруси можуть обмінюватися подібними фрагментами. Якщо цей обмін відбувається між вірусами грипу людини і тварин, то виникають віруси з новою антигенною структурою, що обумовлює поширення епідемії.

*Хромосомна інженерія* – перенесення ізольованих хромосом від клітини-донора одного організму в клітину-реципієнт іншого організму. Хромосомну інженерію використовують для одержання біологічно активних речовин (БАР), для лікування спадкових захворювань, селекції порід домашніх тварин і різних видів рослин.

Основою *клітинної інженерії* є гібридизація соматичних клітин. Причому, злиття клітин може бути повним або ж клітина-донор набуває лише окремі субклітинні структури клітини-реципієнта: цитоплазму, мітохондрії, хлоропласти, ядро. Клітинна інженерія дозволяє широко схрещувати філогенетичне віддалені організми, створювати асоціації клітин різних організмів з метою отримання штучних симбіозів (наприклад, створення симбіозів рослин і азотфіксуючих ціанобактерій), отримувати цінні продуценти як на організменному, так і на тканинному і клітинному рівнях.

Генетична інженерія дозволяє вирішувати такі основні завдання:

- Модифікувати продуцент і покращувати його ефективність без введення нової генетичної інформації;
- Виділяти заданий ген і отримувати мутації, що сприяють інтенсифікації біосинтезу продукту;
- Розширювати спектр дешевих субстратів (молочна сироватка, целюлозовмісні відходи тощо);
- Створювати штами мікроорганізмів, здатні утилізувати ксенобіотики, продукти переробки нафти і інші забруднювачі навколишнього середовища;
- Вносити в мікроорганізми статеві плазмідні, які забезпечують можливість схрещування;
- Вносити гени інших груп організмів і отримувати продукти цих генів, конструювати нові гени і отримувати раніше невідомі білки.

## ***2. р-ДНК-біотехнологія: отримання фрагментів чужорідної ДНК і їх очищення.***

Для виконання завдань генетичної інженерії необхідно створити рекомбінантні ДНК (рДНК). У цій технології виділяють такі операції:

- Отримання чужорідної ДНК;
- Розрізання отриманої ДНК на фрагменти і їх очищення;
- Включення фрагмента чужорідної ДНК у векторну плазмідну отримання рДНК;
- Введення рДНК в компетентні клітини і клонування генів;
- Ампліфікація та експресія рДНК.

Конструювання рекомбінантних молекул можливо лише за умов використання великої кількості ферментів, які є обов'язковими та незамінними інструментами у процесі отримання рекомбінантних ДНК.

До основних ферментів генної інженерії належать: ДНК-полімерази, РНК-полімерази, лігази, нуклеази, рестриктази і зворотна транскриптаза, або ревертаза.

**ДНК-полімерази.** В основі реплікації ДНК (створення копії, само подвоєння) лежить принцип компліментарності – спарування певних нуклеотидних основ (гуанін до цитозину, аденін до тиміну) і матричний спосіб синтезу дочірній ДНК. Реплікація починається з певної ділянки дволанцюгової молекули ДНК (*реплікаційної вилки*) і здійснюється одночасно у двох ланцюгах, які поступово роз'єднуються. Дочірній ланцюг синтезується на основі ферментів – ДНК-полімераз.

**РНК-полімерази.** Незважаючи на високу ферментативну активність ДНК-полімераз, вони не здатні ініціювати синтез дочірніх полінуклеотидних ланцюгів. Цю роль виконують РНК-полімерази. Фермент РНК-полімераза знаходить промотори, активує матрицю ДНК і відбувається локальне розплітання подвійної спіралі ДНК. Однак, основна роль РНК-полімераз полягає у каталізі процесу транскрипції (тобто створенні РНК на підставі ланцюгу ДНК).

**Лігази** – це ферменти, які здатні лігірувати (зшивати, з'єднувати) між собою різні фрагменти ДНК.

**Рестриктази** це група ферментів, які розрізають дволанцюгову молекулу ДНК. Назва рестриктаз складається з начальних букв латинської назви виду бактерій, з якого був виділений фрагмент, і додаткового позначення, оскільки з бактерій одного виду може бути виділено декілька різних рестриктаз.

**Зворотна транскриптаза (ревертаза).** Під час досліджень інфекційних часточок вірусу саркоми Рауса було встановлено, що в них міститься фермент, аналогічний ДНК-полімеразі, але синтезуючий ДНК не на підставі ланцюгу ДНК, а на ланцюгу РНК. В цьому випадку інформація передається у зворотному напрямку, тобто від РНК до ДНК.

Необхідно підкреслити, що процеси, які відбуваються у ретровірусах, не сперечаються з головною догмою молекулярної генетики, яка полягає в тому, що принципова схема передачі генетичної інформації здійснюється шляхом ДНК → РНК → білок, оскільки початкова РНК руйнується, а створення вірусних білків відповідає головної догмі.

Обробка ДНК певною рестриктазою завжди дає один той самий набір фрагментів – за умовою, що розщеплення відбувається по всіх сайтах узнавання. Як що використовувати декілька рестриктаз і спочатку обробити ДНК кожною з них окремо, а потім їх комбінаціями, можна побудувати фізичну карту даної ДНК, або *рестрикційну карту*, тобто встановити порядок розташування сайтів рестрикції вздовж молекули. Чим більше використовується рестриктаз для картирування, тим більш докладна карта.

*Секвенування* – визначення нуклеотидної послідовності. Методи, що надали можливість ідентифікувати генетично важливі ділянки ДНК, мають велике значення. Існують два основні методи секвенування: хімічний і ферментативний.

*Хімічне секвенування* засновано на вибірковій хімічній деградації нуклеотидів. Для цього методу необхідно отримати одноланцюгову молекулу ДНК, на одному з кінців якої роблять радіоактивну мітку за допомогою ізотопу фосфору  $^{32}\text{P}$ , препарат міченої ДНК поділяють на чотири порції і кожен обробляють реагентом, який специфічно руйнує одну або дві з чотирьох основ. Необхідно підібрати умови реакції таким чином, щоб на одну молекулу припадало лише декілька пошкоджень. При обробці піперидином в ДНК утворюється розрив в тому місті, де знаходилася зруйнована основа.

За допомогою цього методу вдалося встановити багато послідовностей різноманітних ДНК, але він має ряд недоліків, що пов'язані з тривалістю і трудомісткістю процедур.

В наш час найбільш широко використовується *метод ферментативного секвенування, або метод секвенування шляхом термінації* (зупинки синтезу) ланцюгу, запропонований Ф.Сенгером у 1977р. В основі методу Сенгера лежить принцип реплікації комплементарного ланцюгу ДНК на одноланцюгової матриці, при тому що під час реплікації відбувається термінація - припинення синтезу дочірнього ланцюгу у різних місцях, а наступний ланцюг знов починає синтезуватися від початку матриці до наступної термінації. Основним моментом ферментативного секвенування є термінація синтезу ланцюгу, що будується. Агентами термінації, які викликають зупинку реплікації, є дидезоксинуклеотиди (ддАТФ, ддГТФ, ддТТФ, ддЦТФ) – це нуклеотиди позбавлені 2'- і 3'-гидроксильної груп при вуглеводних атомах цукрового кільця і тому подовження ланцюгу, яке відбувається за рахунок приєднання чергового нуклеозидтрифосфату до гідроксильної групи, припиняється.

Оскільки метод секвенування заснований на процесі реплікації ДНК, то основним ферментом є ДНК-полімераза. В присутності одноланцюгової ДНК-матриці, короткого полінуклеотидного праймеру і нуклеотидів за принципом компліментарності буде відбуватися синтез другого ланцюгу ДНК. При цьому подовження ланцюгу здійснюється до того часу, коли замість дезоксинуклеотиду приєднається дидезоксинуклеотид. Приєднання останнього викликає зупинку синтезу.

Фрагменти ДНК, що були отримані розділяють у поліакриламідному гелі (з точністю до одного нуклеотиду), проводять радіографію і на підставі картини розподілу фрагментів у чотирьох пробірках встановлюють нуклеотидну послідовність.

**3. Конструювання рДНК та клонування генів.** Введення у клітину і стабільна підтримка генетичної інформації, що міститься у рекомбінантних молекулах ДНК, досягається за допомогою векторних

молекул, або векторів. *Векторами називають молекули ДНК, які здатні акцептувати (включати в себе) чужорідну ДНК і забезпечувати її реплікацію, експресію і/або трансформацію (переніс у інші організми).* Таким чином, вектор дозволяє здійснити введення у клітину додаткової генетичної інформації. В якості векторів використовують, як правило, плазміди, бактеріофаги, мобільні елементи, віруси тварин. В наш час створено значна кількість векторів, які розрізняють за профілем їх використання на декілька 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 і YAC*).

2. Вектори експресії. Їх використовують для аналізу певних послідовностей генів і білкових продуктів, а також для наробітки певного білку.

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. Часто у складі векторів існує маркерний ген, який після проникнення вектора у клітину надає неї фенотип, який свідчить про наявність у клітині вектору. Тобто бажано щоб вектор мав селективний генетичний признак. Такими признаками буває стійкість до антибіотиків, до іонів важких металів, температурна стійкість.

У цілому до векторних молекул надають наступні основні вимоги:

1) вектор повинен мати унікальні сайти рестрикції для декількох рестриктаз (в найкращому випадку по одному для кожної), що надає можливість вбудувати в нього фрагмент чужорідної ДНК;

2) вектор повинен володіти певною ємністю і не виключати вбудований фрагмент;

3) вектор повинен бути репліконом, тобто здатним до реплікації, в певних клітинах за рахунок послідовності початку реплікації або власної, або клітини-хазяїна;

4) вектор повинен містити послідовність маркерного гену, за допомогою якої можливо здійснити селекцію клітин з векторної конструкцією.

Векторні конструкції з чужорідним геном, що отримані, використовують для трансформації бактеріальних клітин спеціальних штамів *E.coli*.

*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 *криотрансформація*. 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.).

В даний час успішне клонування генів і отримання їх продуктів виразно вдається в *E. coli*. В той же час отримання продуктів генів введених з інших груп організмів, особливо з еукаріот, клітинами *E. coli* обмежена. Це пов'язано з двома основними моментами. По-перше, в *E. coli* відсутній процесинг, в результаті синтезується мРНК, що містить інтрони, що не дозволяє отримати «чистий» ген. По-друге, для бактеріальних клітин не характерно глікозилірування білків, а значить, не можна отримати білки повноцінні у функціональному відношенні.

Більш перспективними для клонування генів вважаються дріжджі. Хоча у них процесинг відрізняється від такого вищих організмів і в клітини дріжджів необхідно вносити гени без інтронів, але в дріжджах досить ефективно здійснюється глікозилірування синтезованих білків.

**4. Ампліфікація і експресія рДНК. Геномна бібліотека.** Завдяки генетичної інженерії можна істотно підвищити ефективність біооб'єктів, використовуваних у виробництві. Найпоширенішим способом для цього служить ампліфікація генів. Ампліфікація – це утворення додаткових копій хромосомних послідовностей.

Чисельні (ампліфіковані у мільйон разів) копії певних фрагментів ДНК отримують *in vitro* за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), яку поширено використовують у наш час. ПЛР високо специфічна і чутлива, за її допомогою можна виявити, розмножити і дослідити навіть одиничну копію гена у вихідному матеріалі. Зазвичай 30 циклів ампліфікації протікає протягом трьох годин.

Для здійснення ПЛР необхідне:

- два синтетичних олігонуклеотидних *праймери* (короткі олігонуклеотиди, які гібридизуються із матрицею і слугують запалом при її копіюванні), довжиною приблизно 20 нуклеотидів, комплементарні ділянкам ДНК з протилежних ланцюгів, що *фланкують* (оточують) послідовність-мішень, яку розмножують; їх 3'-гідроксильні кінці після *відпалу* (процес утворення дволанцюгових молекул (ДНК-ДНК або ДНК-РНК) з одностанцюгових полінуклеотидних комплементарних ланцюгів) з ДНК повинні бути орієнтовані назустріч один одному;
- ДНК-мішень довжиною від 100 до ~ 35 000 п.н.;
- термостабільна ДНК-полімераза, яка не втрачає активність при температурі 95°C і вище;
- чотири дезоксирибонуклеотиди.

Типова ПЛР-ампліфікація складається з багаторазового повторення наступних реакцій.

1. *Денатурація*. Перший етап ПЛР полягає в теплової денатурації зразка ДНК витримуванням його при температурі 95°C протягом по крайній мірі 1 хв. Крім ДНК, в реакційної суміші міститься надлишок двох праймерів, термостабільна ДНК-полімераза *Taq*, що виділена з бактерій *Thermus aquaticus*, і чотири дезоксирибонуклеотида.

2. *Ренатурація*. Температуру суміші повільно знижують ~ до 55°C, при цьому праймери спаровуються із комплементарними послідовностями ДНК.

3. *Синтез*. Температуру підвищують до ~ 75°C - величини, оптимальної для ДНК-полімерази *Taq*. Починається синтез комплементарного ланцюгу ДНК, що ініціюється 3'-гідроксильною групою праймера (рис. 16).

В першому циклі після денатурації ДНК і зв'язування із нею праймерів ДНК-полімераза створює дволанцюгові структури, в яких батьківські ланцюги ДНК поєднані із знов синтезованими комплементарними ланцюгами різної довжини, але із фіксованим 5'-закінченням. Уже у другому циклі створюються два ланцюги специфічної послідовності, що мають задані розміри. У третьому циклі ці ланцюги дають начало дволанцюговим детермінованим за розміром фрагментам ДНК. У кожному наступному циклі їх кількість подвоюється, і теоретично досягає у 22 циклі, а на практиці у 30 циклі більше мільйона копій. Вихідні молекули ДНК і структури, що створилися у першому циклі, присутні в реакційної суміші наприкінці ПЛР у незначній кількості.

*Експресія генів.* Як відомо, функціональна активність генів проявляється під час транскрипції і трансляції та називається *експресією генів*. Технологічна схема клонування і експресії генів наступна:

- Сортування хромосом і отримання ДНК;
- Введення ДНК у вектор;
- Трансформація, трансфекція, трансдукція та ін;
- Виявлення та накопичення клону клітин;
- Виділення рДНК (плазмід);
- Визначення нуклеотидної послідовності в клонованому фрагменті ДНК;
- Конструювання і побудова плазмід для експресії її функцій;
- Виявлення та накопичення клону;
- Виділення плазмід і перевірка нуклеотидної послідовності в рДНК;
- Трансформація;
- Вирощування культури, що експресує, для отримання білка;
- Виділення білка.

**Геномна бібліотека (банк генів)** - це клонований у складі векторів повний набір послідовностей ДНК даного організму. Така фрагментація генома полегшує всі генно-інженерні маніпуляції, дозволяє аналізувати окремі послідовності, виділяти і працювати з індивідуальними генами. Фрагменти геномної ДНК отримують за допомогою рестриктаз. Причому, отримані фрагменти перекриваються один з одним по деякій частині нуклеотидної послідовності, а їх розмір відповідає ємності вектора. Фрагменти ДНК пов'язують з плечима фага і упаковують в головки фагових часток. Виходить геномна бібліотека, яка під хлороформом, при температурі  $-70^{\circ}\text{C}$  може зберігатися десятки років. Пошук потрібного гена проводять, заражаючи фаговою бібліотекою бактеріальні клітини і, висіваючи їх на чашки Петра з агаризованим середовищем.

При скринінгу кДНК, геномних бібліотек і для аналізу геномної ДНК використовують метод блот-гібридизації. За допомогою цього методу визначають чужорідний ген у геномі трансгенних рослин, копійність гена, зміни в нуклеотидній послідовності гена і т.д. Метод блот-гібридизації включає наступні етапи:

- Рестрикція ДНК;
- Перенесення рестрикованих фрагментів з гелю на нейлоновий фільтр і їх іммобілізація;
- Гібридизація з міченим зондом.

Для виконання цього методу фрагменти розрізаної рестриктазами ДНК розподіляють за допомогою електрофорезу в агарозному гелі. Потім гель денатурують  $0,4\text{ M NaOH}$  і покривають його листом нейлонового фільтра. Фільтр покривають шарами фільтрувального паперу. Під дією капілярних сил ДНК-фрагменти перпендикулярно переносяться на фільтр і зв'язуються з ним, тобто іммобілізують. Таке перенесення називається блот (від англійського *blot* - промокати). При цьому на фільтрі виходить репліка з



гелю. Фільтр поміщають в розчин з радіоактивно міченим одноланцюговим зондом і гібридизують з розташованими на фільтрі фрагментами ДНК. Природно, що зонд гібридується тільки з тими фрагментами, які містять комплементарну йому послідовність ДНК. Потім фрагменти, з якими зв'язався мічений зонд виявляє радіоавтографія. За радіоавтографією судять про присутність потрібного фрагмента в геномі, зміни нуклеотидної послідовності, а також про кількість копій гена в геномі.

**5. Гібридомні технології.** У 1960 р. Барському та ін. (Франція) при спільному культивуванні вдалося злити дві лінії пухлинних клітин миші і отримати новий тип клітин. Ці клітини відрізнялися від батьківських за морфологічними характеристиками, особливостям росту, мали сумарне число хромосом і хромосомні маркери батьківських клітин. Частота злиття була дуже низькою, приблизно  $10^{-4}$  -  $10^{-6}$ , але Окада збільшив ефективність злиття за допомогою японського гемаглютиніруючого вірусу (ЛДУ). Потім з цією метою почали використовувати інактивованій вірус Сендай, поліетиленгліколь та ін.. Однак, якщо зливали клітини філогенетично віддалених організмів (миша - людина, миша - мавпа), то хромосоми людини і мавпи в основному втрачалися.

Переворот в гібридизації клітин здійснили Г. Келер і Ц. Мілштейн. Вони створили метод отримання однорідних антитіл шляхом злиття злоякісних клітин кісткового мозку (мієломи) і лімфоцитів з селезінки миші, імунізованих еритроцитами барана. Отримані шляхом злиття антитілоутворюючих і пухлинних клітин, клітини-химери назвали гібридомами. Вони наслідували здатність до необмеженого росту в культурі як пухлинні клітини і в той же час до продукції антитіл певної специфічності (моноклональних антитіл). Для отримання ж антитіл, які використовуються при визначенні груп крові АВО, необхідно близько 1200 л сироватки, отриманої з крові 6000 донорів. Схема гібридної технології наступна:

- Отримання мієломних клітин, що гинуть при подальшій селекції гібридомних клітин;
- Отримання з селезінки імунізованих лімфоцитів-продуцентів антитіл до заданих антигенів;
- Злиття мієломних клітин з лімфоцитами: вірус Сендай, поліетиленгліколь, лізолецитін, електричний імпульс; скринінг гібридомних клітин;
- Перевірка гібридом на здатність продукувати МКА,
- Клонування гібридних клітин, що пройшли перевірку на освіту МКА;
- Отримання масових культур гібридомних клітин.

Гібридоми застосовують для різноманітної діагностики (ідентифікація певного гормону, вірусних або бактеріальних антигенів, антигенів групи крові і тканинних антигенів), точного визначення дози ліків, розпізнавання злоякісних пухлин різної локалізації, виділення біологічно активних речовин (білків, гормонів, токсинів) зі складних сумішей, очищення препаратів, зокрема інтерферонів, вивчення взаємодії спеціалізованих клітин, наприклад,

нейронів, клітинних мембран, виготовлення високо специфічних вакцин, особливо проти певних вірусних штамів і різних паразитів (шистосоми), для нейтралізації дії лімфоцитів, відповідальних за відторгнення трансплантата і аутоантитіл, що утворюються при аутоімунних захворюваннях (деякі форми цукрового діабету, розсіяний склероз, ревматичні хвороби).

## Лекція 5

### Виробничий біосинтез

#### План

1. Відділення біомаси та методи руйнування клітин.
2. Відділення, очищення та розділення продуктів.
3. Концентрування, зневоднення, модифікація і стабілізація продуктів.
4. Технологічні схеми виділення продуктів з клітинної біомаси та культуральної рідини.
5. Отримання товарних форм препаратів.

1. **Виділення та очистка продуктів ферментації** – самостійний розділ біотехнології інженерного, а не біологічного характеру. Ця завершальна стадія біотехнологічного процесу істотно залежить від того, накопичується продукт в клітині, виділяється в культуральну рідину або ж продуктом є сама клітинна маса. Складніше всього виділити продукт, якщо він накопичується в клітині, легше всього, якщо продукт виділяється в культуральну рідину. Технологія виділення та очищення залежить також від природи кінцевого продукту. Так, деякі біотехнологічні процеси не передбачають етапу відділення продукту. Окремі ферменти (протеази, целюлази та ін.) виділяють шляхом осадження органічними розчинниками, сульфатом амонію або не піддають повної очистки. У той же час інші ферменти (ендо- і екзонуклеази, лігази) вимагають складного багатоетапного очищення із застосуванням тонких методів препаративного розділення.

Важливим етапом відділення продукту є фракціонування культуральної рідини. Вона являє собою двофазну систему, де твердою фазою є біомаса, а рідкої - вода з розчиненими осадами поживного середовища і позаклітинними продуктами біосинтезу. Кожна з фаз – це складні багатоконпонентні системи; виділення будь-якого кінцевого продукту в чистому вигляді вимагає застосування різних методів хімічної технології.

#### *Відділення біомаси та методи руйнування клітин.*

При накопиченні цільового продукту в клітинах необхідно:

1. відокремити клітини від культуральної рідини,
2. зруйнувати клітини,
3. кінцевий продукт очистити від маси компонентів зруйнованих клітин.

Розподіл культуральної рідини і біомаси називається *сепарацією*. Нерідко перед сепарацією проводять попередню обробку культури:

- зміна рН,

- нагрівання,
- введення коагулянтів,
- білків або флокулянтів.

При освітленні і розподілі фаз застосовують органічні полікатіонні флокулянти. Для обробки питної води використовують катіонний поліакриламід і т.д. Це сприяє більш ефективному відділенню біомаси та стабілізації продуктів.

Існують різні *методи сепарації*: флотація, фільтрація, ультрацентрифугування.

*Флотація* застосовується, якщо клітини через низьке змочування накопичуються в поверхневих шарах рідини біореактора. Основою флотації є спливаючі бульбашки газу, вони захоплюють клітини і виносять їх на поверхню. Використовують флотатори різних конструкцій, вони здатні зціджувати, відкачувати або зішкрібати піну, в якій знаходяться клітини. Метод економічний, високо продуктивний, його можна застосовувати в умовах безперервного процесу. Флотація, як перший етап, широко використовується для освітлення культуральної рідини за рахунок відділення дріжджової маси. Таким методом вдається збільшити концентрацію дріжджів у 4-6 разів.

*Фільтрація*. В даний час застосовують барабанні, дискові, стрічкові, тарілчасті, карусельні вакуум-фільтри, фільтри-преси, мембранні фільтри і т.д. У всіх фільтрах використовується один і той же принцип - затримання біомаси на пористої фільтруючій перегородці.

Діаметр пор може перевищувати розміри клітин, однак це не знижує ефективність фільтрації. Справа в тому, що в міру проходження рідини діаметр капілярних каналів звужується через прилипання частинок і це перешкоджає проскакуванню біомаси через фільтр. Якщо фільтри діють в безперервному режимі, то передбачають автоматичне видалення шару біомаси стислим повітрям або за допомогою спеціального ножа. Для цього, зокрема використовуються барабанні вакуум-фільтри, які являють собою порожній циліндр, занурений в культуральну рідину. Внутрішній об'єм барабана відділений від рідини фільтруючим дрібнопористим матеріалом. Струм рідини через фільтруючий шар створюється шляхом відкачування повітря зсередини барабана вакуумним насосом. Суспензія налипає на барабан і її зрізують ножом. Широко використовують для процесів періодичного режиму мембранні (тефлонові) фільтри, особливо тоді, коли є сильно розбавлена клітинна суспензія. Однак такі фільтри часто закупорюються клітинами, білками, колоїдними частками. Зрізання або здування матеріалу тут малоприматні, бо ушкоджують фільтри. Для

подолання цієї проблеми мембрани покривають гідрофільним шаром, що перешкоджає контакту білків з мембраною.

*Центрифугування.* Метод заснований на осадженні зважених в рідині частинок із застосуванням відцентрової сили. З економічної точки зору цей метод менш вигідний і виправдовує себе, якщо:

- Суспензія фільтрується повільно;
- Необхідно максимальне звільнення культуральної рідини від частинок, що містяться;
- Необхідний безперервний процес сепарації в умовах, коли фільтри розраховані тільки на періодичне дію.

У деяких виробничих процесах використовують одночасно центрифугування і фільтрацію – фільтраційні центрифуги.

*Методи руйнування клітин.* Дезінтеграцію клітин проводять фізичним, хімічним і хіміко-ферментативним методами. Найчастіше використовуються *фізичні методи* руйнування клітин: ультразвуком, за допомогою обертових лопатей або вібраторів, струшуванням зі скляними бусами, продавлюванням через вузький отвір під високим тиском, роздавлюванням замороженої клітинної маси, розтиранням в ступці, осмотичним шоком, заморожуванням-розморожуванням, стисненням клітинної суспензії з подальшим різким зниженням тиску (декомпресія). Ці методи прості і економічні, але іноді обробка може справити негативний вплив на якість продукту.

Більш м'яке руйнування клітинної стінки можна досягти *хімічними і хіміко-ферментативними* методами. Так, для отримання дріжджового автолізу і деяких ферментів (інвертази, пеніцилінамідаз) мікроорганізми обробляють толуолом або бутанолом. Клітини грам-негативних бактерій обробляють лізоцимом в присутності ЕДТА, а клітини дріжджів - зимоліазой равлики або ферментами грибів, актиноміцетів. Лізис клітин викликають також антибіотики, поліміксини, деякі ПАР (поверхнево активні речовини), гліцин.

Після руйнування клітин настає етап *відділення фрагментів клітинних стінок*. Використовують ті ж самі методи: центрифугування або фільтрацію, однак, потрібні більш високошвидкісні центрифуги та фільтри з меншим діаметром пор. Як правило, у більшості біотехнологічних процесів клітинні стінки відкидають, хоча іноді компоненти клітинних стінок можуть бути цільовим продуктом.

**2. Відділення, очищення та розподілення продуктів.** Для відділення продуктів використовують осадження, екстракцію або адсорбцію.

*Осадження.* Застосовуються *фізичні* (нагрівання, охолодження, розрідження або концентрування розчину) або *хімічні* (перетворення в

малорозчинні сполуки) методи впливу. Так, пеніцилін переводять в кристалічний осад у присутності сполук калію. Білки відокремлюють додаванням сульфату амонію або органічних розчинників (етанолу, ацетону). Нуклеїнові кислоти осаджують за допомогою поліімінів.

**Екстракція.** Розрізняють твердо-рідиннофазну, коли продукт з твердої фази переходить у рідку, і рідко-рідиннофазну - продукт з однієї рідкої фази переходить в іншу, екстракції. Прикладами твердо-рідиннофазної екстракції є: вилучення солей металів з руд, підданих бактеріальної обробці, витяг продуктів з маси субстрату (соломи), екстракція клітинної маси ацетоном і переведення в розчин ліпідних і білкових компонентів. Рідко-рідиннофазна екстракція органічним розчинником застосовується для вилучення з культуральної рідини антибіотиків, вітамінів, каротиноїдів, ліпідів, деяких гідрофобних білків.

**Адсорбція.** Вона є окремим випадком екстракції. При цьому агентом, що екстрагує, служить тверде тіло. Адсорбція полягає у зв'язуванні речовини поверхнею твердого тіла з рідкої чи газової фази. Традиційними адсорбентами є деревне вугілля, глини з пористою поверхнею. Методом адсорбції з культуральної рідини виділяють антибіотики та вітаміни.

**Сучасні методи розділення речовин.** Вони засновані на принципах екстракції й адсорбції. *Хроматографія* – це поділ речовин, заснована на неоднаковому розподілі між двома не змішуваними фазами. Розрізняють хроматографію на папері, платівках, колонках. Сучасні методи розділення речовин включають хроматографію, електрофорез і їх модифікації.

*Колонкова хроматографія* допускає масштабування, застосовується в промислових умовах і має кілька різновидів:

- іонобінна хроматографія – гранули адсорбенту, наприклад, карбоксиметилцелюлози несуть катіонні (-NH<sub>3</sub>) або аніонні (-SO<sub>3</sub>) групи, які захоплюють іони з протилежним зарядом або служать для очищення нейтральних сполук від домішок іонів. Так, в промислових масштабах використовуються колонки з природним іонообмінником цеолітом для пом'якшення води, тобто видалення з неї Ca і Mg. Колонки з амберлітом служать для відділення вітаміну B<sub>12</sub>;
- гель-фільтрація використовується для розподілення речовин з різною молекулярною масою і діаметром;
- афінная хроматографія, при цьому затримується компонент, який утворює міцний комплекс з лігандом, фіксованим на частинках носія (фермент-субстрат, антиген-антитіло та ін.) Цей вид хроматографії має кілька варіантів: афінна преципітація (*преципітація* – від лат. *швидке падіння*, полягає у взаємодії

розчинного антигену з антитілом з наступним випаданням дрібнодисперсного осаду) і афінний поділ.

**Електрофорез** дозволяє в електричному полі просторово розподілити компоненти суміші, що розрізняються за електрофоретичною рухливістю. Для проведення електрофорезу використовують пластинки або колонки з наповнювачем (агарози, поліакриламід), що утворює гель. В даний час застосовують кілька модифікацій класичного електрофорезу:

- Двовимірний електрофорез - на суміш, що розподіляють, діють одночасно два електричних поля, спрямовані перпендикулярно один одному;

- Електрофорез в неоднорідному електричному полі. При цьому напруженість струму зменшується в напрямку руху іонів за рахунок застосування гелів клиноподібної форми. Цей метод широко застосовується в генетичній інженерії.

- Ізоелектричне фокусування. У цьому варіанті електрофорезу використовують розчин, що містить сполуки з кислотно-основними групами. Вони, під впливом електричного поля, змінюють ступінь іонізації і утворюють градієнт рН в напрямку електричного поля. Розподілена суміш, що рухається по градієнту рН, поступово втрачає заряд, і компоненти її зупиняються в ізоелектричній точці. При цьому кожен компонент фокусується в певній зоні гелю;

- Імуноелектрофорез – (ракетний, перехресний або двовимірний) заснований на взаємодіях антигену з антитілом;

- Ізоахофорез – це *рух (форез) з однаковою (ізо) швидкістю (тахо)*, заснований на поділі іонних компонентів суміші з різною електрофоретичною рухливістю. Зазвичай використовують два електроліти. Аніони одного з них, мають більшу рухливість, ніж катіони. Суміш, що розподіляють вносять в гель на межі розподілу двох електролітів. В електричному полі високої напруженості компоненти суміші утворюють в гелі чітко розділені зони. Причому, швидкість їх руху співпадає із швидкістю переміщення іонів електролітів.

**3. Концентрування, зневоднення, модифікація і стабілізація продуктів.** Після відділення продукту його, як правило, слід концентрувати. Для цього використовують *зворотний осмос, ультрафільтрацію і випарювання*. Як відомо, при прямому осмосі, завдяки дифузії речовин через мембрану, відбувається їх поділ. Якщо до розчину прикласти зовнішнє тиск, який перевищує осмотичний тиск, то розчинник витікає через напівпроникну мембрану проти градієнту концентрації розчиненої речовини, тобто відбувається концентрування розчину. Це *зворотний осмос*.

При *ультрафільтрації* відбувається відділення речовин за допомогою мембранних фільтрів. Одні фільтри призначені для відділення великих частинок: імуноглобулінів, колоїдних агрегатів, вірусів; інші мембрани, з більш дрібними порами, затримують молекули органічних кислот. Методом ультрафільтрації концентрують у т.ч. і малостабільні продукти: молочну і глютамінову кислоти, деякі антибіотики та ферменти.

При *випаровуванні* для видалення води або іншого розчинника розчин необхідно нагрівати, це основний недолік методу. Для того, щоб послабити негативний вплив нагрівання використовують вакуум-випарні апарати. Вони можуть бути періодично і безперервно діючі, з одноразовою і багаторазовою циркуляцією киплячого розчину. Використовують також дискові та плівкові випарні апарати, в них випаровування посилюється через розтікання рідини тонким шаром по нагрітій поверхні. Найчастіше нагріваючим агентом служить водяна пара. Якщо випарювання обмежують на стадії отримання густого сиропоподібного продукту, то вся процедура називається *упарювання*.

Повне видалення вологи, що залишилася після упарювання, зворотного осмосу, ультрафільтрації призводить до отримання сухого продукту і виділяється в особливу стадію – *зневоднення продукту (сушка)*. Вибір методу сушки залежить від фізико-хімічних властивостей продукту, зокрема, від в'язкості розчину, стабільності або життєздатності біооб'єкту при підвищених температурах. Одним із старих способів є сушіння на підносах. Зараз використовують його модифікацію – стрічкову сушку для зневоднення антибіотиків і амінокислот. Іншим методом є сушка в киплячому шарі. При цьому пара, повітря, діоксид вуглецю, димові або топкові гази подаються в сушильний апарат знизу, а частинки продукту, що зневоднюються, парять в газовому потоці. В принципі цей метод збігається за дією з газофазним біореактором. Сушка в киплячому шарі має ряд переваг: можливість регулювання процесу, інтенсивності масопередачі і теплообміну, процес можна вести безперервно. Метод використовується для сушки антибіотиків, амінокислот, крохмалю, але не суспензій клітин.

Отриманий сухий продукт надходить на зберігання після додання йому товарного вигляду або продукт піддається *модифікації*. Хімічна модифікація необхідна тоді, коли біооб'єкт представляє лише "заготовку" кінцевого продукту. Наприклад, пеніцилін G, який виробляє *Penicillium notatum*, модифікують і отримують ампіцилін, метицилін та інші напівсинтетичні антибіотики. Далі, якщо біооб'єкт продукує незавершений продукт, то його можна перетворити в кінцевий продукт, вводячи хімічним шляхом необхідні групи.



Завдяки модифікації продукту можна надати необхідну оптичну асиметрію, що дуже складно зробити хімічним шляхом. Провівши скринінг, вдається знайти біооб'єкт, який здатний споживати лише один з ізомерів (наприклад, тільки L-амінокислоти), а в середовищі залишається його оптичний антипод. В даному випадку біооб'єкт уподібнюється реактиву. Для отримання ряду ферментів, гормонів, медичних препаратів також необхідна модифікація. Так, в інсуліні бика видаляють деякі залишки амінокислот, і він стає аналогічним інсуліну людини. Таким же прийомом, видаляючи баластні амінокислоти отримують потрібні генно-інженерні білки і т.д.

Важливим етапом біотехнологічного процесу є *стабілізація* продукту. Для цього використовують різні фізико-хімічні впливи:

- сушка значно підвищує стійкість продукту до зовнішніх впливів: так зневоднені ферменти, хоча і дещо знижують свою активність, але у них підвищується стабільність і стійкість до нагрівання. Наприклад, панкреатична ліпаза свині втрачає активність при 100°C якщо вона знаходиться у водному середовищі, але при цій же температурі активна в суміші з гептаном і трибутіріном;
- різні наповнювачі (грибний міцелій, пшеничні висівки, кукурудзяна мука, гліцерин, вуглеводи та ін.) стабілізують цільові продукти, в т.ч. і кормової мікробний білок;
- неорганічні іони Co, Mg, Na підвищують стабільність пектинази, а 0,2% розчин формаліну і антибіотик низин - глюкоамілази.
- термолабільність лізоциму фага *T4 E. coli* досягається методом білкової інженерії. Для цього в положенні 3 поліпептидного ланцюга лізоцима ізoleyцин змінюють на цистеїн, що призводить до утворення нового дисульфідного зв'язку і різко підвищує термостабільність ферменту.
- яскравим прикладом є біотехнологічний спосіб стабілізації меланжу при зберіганні. Меланж отримують з яечних жовтків, це цінний харчовий продукт. Однак, через кілька місяців він темніє, а його органолептичні властивості погіршуються. Щоб цього не відбувалося з меланжу треба видалити вуглеводи. З цією метою на продукті вирощують пропіонові бактерії, які утилізують вуглеводи. При цьому термін зберігання меланжу продовжується, і він виявляється збагаченим органічними кислотами і вітаміном B<sub>12</sub> - продуктами життєдіяльності мікроорганізмів.

**4. Технологічні схеми виділення продуктів з клітинної біомаси та культуральної рідини.** Як уже підкреслювалося виділення продуктів з культуральної рідини більш просто і дешево. Спочатку відокремлюють біомасу продуцента. Потім, в залежності від властивостей продукту, вибирають методи виділення, концентрування і очищення одержуваного речовини. Ці операції затратні. Так, у виробництві ферментів вартість

виділення і очищення складає до 70% загальних витрат, у виробництві органічних кислот – 30-40%, у виробництві етанолу – 15-20%.

Для ізолювання продуктів з культуральної рідини широко використовують такі методи виділення і очищення:

- дистиляція: перетворення продукту в пароподібний стан і виведення з системи з подальшою конденсацією продукту. Так отримують розчинники (етанол, ацетон, бутанол);
- зневоднення, отримують концентрати: кормовий концентрат лізину, основні антибіотики;
- ліофілізація: заморожування розчину або суспензії клітин і подальша сублимація у вакуумі; метод служить для отримання заквасок, вакцин, гормонів та ін.;
- виморожування: перетворення води в кристалічний стан - лід, який потім відділяють механічним шляхом (фільтрація, центрифугування); використовується для отримання ферментів;
- осадження у вигляді нерозчинних солей шляхом додавання хімічного осаджувача в еквімолярних кількостях; так отримують лимонну і молочну кислоти;
- кристалізація: служить для отримання ітаконової, глутамінової та ін. кислот.
- сорбція: іонообмінна, афінна хроматографія; метод застосовується для виділення амінокислот, ферментів, антибіотиків та ін.
- екстракція: додавання до розчину розчинника, який поглинає продукт, потім емульсію розподіляють і виділяють цільову речовину. Цей метод використовують для отримання антибіотиків, вітамінів та ін.
- ультрафільтрація: обробка розчину на мембранних фільтрах з певними розмірами пор, тобто фракціонування речовин за розмірами їх молекул; так отримують ферменти та інші білки.

При виділенні цільового продукту слід пам'ятати, що термічне зневоднення завжди обходиться дорожче механічного; концентрування культуральної рідини за допомогою мембран дешевше згущення шляхом упарювання; часто вигідно випускати продукцію у вигляді рідких концентратів і пр.

**5. Отримання товарних форм препаратів.** Це остання стадія технологічного циклу в мікробіологічному синтезі. Товарні форми являють собою або складну суміш, де кількість основної речовини визначається технічними умовами або ДСТУ, або високоочищений препарат, який відповідає ряду спеціальних вимог, наприклад, асептики.

Через складність поділу багатокomпонентних розріджених розчинів і суспензій, нерідко доводиться відмовитися від виділення основного компонента. Це виправдано ще й тим, що культуральна рідина містить багато

цінних БАР. За існуючої технології лише 60-75% рідкої фази відділяється при сепарації, інша вода видаляється шляхом випарювання і розпилювальної сушки. Тому кінцеву суху суміш клітин і метаболітів називають білково-вітамінним концентратом (БВК), який має велику кормову цінність. Така технологія в інших виробництвах є вимушеним заходом і недостатньо ефективна – наприклад, виробництво бактеріальних ентомопатогенних препаратів, оскільки побічні продукти знижують вміст діючої речовини і не сприяють збереженню активності препарату при транспортуванні і зберіганні.

Це питання особливо важливе у виробництві лізину, яке є великотоннажним. Кристалічний лізин отримати важко, тому промисловість випускає також рідкий і кормовий концентрат лізину (ЖКЛ і ККЛ). ЖКЛ - упаріна безклітинна культуральна рідина, з концентрацією СВ до 40%. ККЛ - після випарювання до рідкої фази додають який-небудь кормовий наповнювач наприклад висівки, а отриману пасту сушать на стрічкових сушарках.

Стадія фасування БВК, ККЛ, ферментів технічного призначення полягає в поміщенні їх у тару (мішки, барабани і т.д.) У той же час біохімічні реактиви та особливо медичні препарати повинні мати задану ступінь чистоти і часто абсолютну стерильність. Для них використовують спеціальну технологію, де основна речовина має значення, визначені ДСТУ і Державної Фармакопеї, а кінцевий продукт повинен бути стерильним, поміщатися в спеціальну тару, наповнення та закупорювання якої проводять в асептичних умовах.

## Лекція 6

### Біотехнологія отримання продуктів мікробіологічного синтезу

#### План

1. Переваги іммобілізованих ферментів.
2. Методи фізичної іммобілізація ферментів.
3. Хімічна іммобілізація ферментів.
4. Джерела ферментів.
5. Іммобілізовані клітини і органели.

**Переваги ІФ.** Ферменти та ферментні системи застосовуються в самих різних областях: харчової, фармацевтичної, текстильної, шкіряної та інших галузях промисловості, в медицині, сільському господарстві, органічному синтезі, хімічному аналізі і т.д. Проте *можливості застосування нативних ферментів обмежені*, внаслідок

- їх нестійкості при зберіганні і різних, особливо теплових, впливах.
- використання ферментів утруднено через складності їх відділення від реагентів і продуктів реакції.

*ІФ володіють рядом особливостей і переваг:*

1 Гетерогенний каталізатор легко відокремити від реакційного середовища. Це дає можливість: зупинити реакцію в потрібний момент, використовувати каталізатор повторно, отримувати продукт не забруднений ферментом, що важливо для харчовій та фармацевтичній промисловості;

2. Застосування ІФ дозволяє проводити процес безперервно, регулювати швидкість реакції, що каталізується і вихід цільового продукту;

3. Іммобілізація спрямовано змінює властивості каталізатора, в тому числі його специфічність, залежність від рН, іонного складу середовища, дії агентів денатурації;

4. Іммобілізація дозволяє регулювати каталітичну активність ферментів, шляхом зміни властивостей носія, наприклад під дією світла або звуку. Це дозволяє створити механо- і звукочутливі датчики, підсилювачі слабких сигналів та ін..

Для іммобілізації ферментів необхідні носії, їх дуже багато. Всі *носії повинні відповідати таким основним вимогам:*

1. Мати високу хімічну і біологічну стійкість; механічну міцність і гідрофільність;
2. Мати достатню проникність для ферментів і субстратів, велику питому поверхню, високу місткість і пористість;
3. Носії повинні мати зручні технологічні форми - гранули, мембрани, труби, листи, волокна та ін..;
4. Носії повинні легко переводитися в реакційно-здатну форму;
5. Мати низьку вартість.

Носії можуть бути органічними і неорганічними. Органічні полімерні носії, в свою чергу, поділяють на два класи: *природні полімери і синтетичні* полімерні носії. До *природних* відносять полісахаридні, білкові і ліпідні носії.

## 2. *Методи фізичної іммобілізації ферментів.*

Під фізичною іммобілізацією розуміють включення ферменту в яку-небудь ізольовану фазу, яка відокремлена від фази вільного розчину, але здатна обмінюватися з розташованими в останньому молекулами субстрату. На цій підставі всі методи фізичної ІФ, тобто іммобілізації, при якій фермент не з'єднаний з носієм ковалентними зв'язками, ділять на чотири групи:

- Адсорбція на нерозчинних носіях;
- Включення в пори гелю;
- Відділення ферменту від решти середовища напівпроникною перегородкою (мембраною);
- Включення в двофазну реакційну середу, де фермент розчинний і може знаходитися тільки в одній з фаз.

*ІФ шляхом адсорбції* досягається при контакті водного розчину ферменту з носієм. Після відмивання ферменту, що не адсорбувався, препарат можна використовувати. На практиці застосовують такі прийоми:

1. Статичний - носій і водний розчин ферменту змішують і залишають на деякий час. Іммобілізація досягається за рахунок мимовільної дифузії ферменту до носія з подальшою його адсорбцією, зазвичай для цього потрібна доба або більше.
2. Перемішування розчину ферменту і носія за допомогою магнітної мішалки або на шутгель - апараті.
3. Метод електроосадження - в розчин ферменту занурюють два електроди, на один з яких завдано носій і пропускають електричний струм.
4. Метод нанесення в колонці - через колонку з носієм прокачують розчин ферменту.

Утримання ферменту на носії відбувається за рахунок ван-дер-ваальсових взаємодій, електростатичних сил, водневих зв'язків і гідрофобних взаємодій між носієм і поверхневими групами білка. Основними *факторами, що впливають на адсорбцію ферменту, є:*

- питома поверхня і пористість носія,
- значення рН та іонної сили розчину ферменту,
- його концентрація і температура проведення адсорбції.

Для підвищення ефективності адсорбції, носій і фермент попередньо модифікують:

- витримування носія в буферному розчині,
- обробка надлишком розчину, що містить іони відповідного металу або речовинами, молекули яких містять велику кількість функціональних груп, наприклад, альбуміном,
- обробка гідрофобними сполуками і т.д.

Для модифікації ферменту його обробляють сполуками, що містять іоногенні групи - полікислоти, карбоксиметилцелюлозу, залишки янтарної кислоти та ін.; для додаткового утримання ферменту на носії можна використовувати електроутримання. При цьому фермент утримується за рахунок електростатичних сил і диполь-дипольних взаємодій між поляризованими частинками носія і молекулами білка.

*Переваги* адсорбційної іммобілізації обумовлені доступністю і дешевизною сорбентів, простотою методики. Однак при цьому способі іммобілізації фермент утримується на носії недостатньо міцно.

*ІФ шляхом включення в гелі.* Тут молекули ферменту включаються в тривимірну сітку з тісно переплетених ланцюгів, що утворюють гель. Відстань між сусідніми ланцюгами менше молекули ферменту. Тому фермент не може перейти в навколишній розчин. Для такої іммобілізації існує два основних способи:

1. Фермент вводять у водний розчин мономеру, а потім проводять полімеризацію. У реакційну суміш додають зшиваючі агенти, які надають полімеру структуру тривимірної сітки. Таким шляхом іммобілізують трипсин, рибонуклеазу і  $\beta$ -амілазу.
2. Фермент поміщають в розчин вже готового полімеру, який потім переводять у гелеподібний стан.

Гелі утворюють з крохмалю, агар-агару або агарози. Іноді колагенові мембрани обробляють глутаровим альдегідом і отримують зшиті мембрани. Зшиті гелі можна отримати діючи на водні розчини полівінілового спирту або полівінілпіролідону гамма-випромінюванням або потоком електронів. Останнім часом використовують включення ферментів у матрицю з смол, що здатні до фотополімеризації. Вони містять фоточутливі функціональні групи і при дії ультрафіолетового опромінення утворюють між собою ковалентні зв'язки і тривимірну сітку.

Для отримання неорганічних гелів використовують полікремнієві кислоти (силікагель) або фосфат кальцію.

На активність ферментів, включених в гель, впливає: зміст ферменту, розміри гелієвих частинок і природа полімерної матриці.

*Переваги* цього способу іммобілізації полягають у:

- простоті методики,
- можливості створити іммобілізовані препарати будь-якої геометричної конфігурації (сферичні частинки, плівки),
- висока хімічна, механічна і теплова стійкість,
- неодноразовість використання.
- Метод універсальний, тому що можна застосовувати для іммобілізації практично будь-яких ферментів, а також поліферментних систем, клітинних фрагментів і цілих клітин.

Ферменти надійно захищені від бактеріального забруднення.

Разом з тим метод має і *недоліки*:

- полімерна матриця створює перешкоди для дифузії субстрату до ферменту, що знижує його каталітичну активність;
- якщо субстратом є ВМС (високо молекулярна сполука), то метод взагалі не застосуємо.

*ІФ з використанням мембран.* Існує декілька способів:

- Мікрокапсулювання. Метод розроблений в 1964 р. Т. Чангом. Виготовляються мікрокапсули розміром від декількох десятків до декількох сотень мікрометрів, товщина мембран становить десяти - соті частки мкм, при діаметрі пір - кілька нм. Усередині цих мікрокапсул знаходяться ферменти, наприклад, аспарагіназа.

- Подвійне емульгування. Готують емульсію водного розчину ферменту в органічному розчині полімеру. Її знову диспергують, але у воді. У результаті виходить водна емульсія з крапель органічного розчину полімеру, що містять ще більш дрібні включені краплі водного розчину ферменту. Через деякий час органічний розчин твердне, утворюючи полімерні сферичні частинки з включеним в них ферментом.

- Включення у волокна. Водний розчин ферменту в органічному розчині волокноутворюючого полімеру (целюлоза, полівінілхлорид і ін.) продавлюють через фільтри в рідину (толуол), що викликає коагуляцію полімеру. Таким способом виготовляють, наприклад тканини, що володіють ферментативною активністю (хірургічні серветки з іммобілізованим трипсином).

- Включення в ліпосоми. Ферменти, іммобілізовані цим методом, застосовуються, головним чином, в медичних цілях, а також для проведення фундаментальних досліджень, бо ліпосоми за своєю природою близькі до природних біомембранам.

*Переваги ІФ із застосуванням мембран:* простота і універсальність, високий вміст включеного ферменту, збереження його каталітичної активності. Однак при іммобілізації за допомогою мембран ускладнене ферментативне перетворення ВМС.

*Використання систем двофазного типу.* При цьому субстрат під дією ферменту переробляється у водній фазі, а продукт екстрагується у фазу органічного розчинника. Подібним чином можна гідролізувати крохмаль під дією суміші  $\alpha$ -амілази і амілоглюкозидози в двофазній системі з водних розчинів крохмалю і поліетиленгліколю. Цей метод застосовується порівняно рідко, так як для нього характерна низька швидкість процесу, інактивація ферменту при його адсорбції на межі розділу фаз, забруднення продукту і ін..

### **3. Хімічна іммобілізація ферментів.**

Принциповим є те, що шляхом хімічного впливу на структуру ферменту, в його молекулі створюються нові ковалентні зв'язки, зокрема між білком і носієм. Такі препарати володіють двома властивостями:

- Ковалентний зв'язок ферменту з носієм забезпечує високу міцність кон'югату.

- Істотно змінюється субстратна специфічність, каталітична активність і стабільність ферменту.

При хімічній іммобілізації використовуються різні носії, від яких фермент віддалений завдяки «ніжці». Для цього застосовують зшиваючі агенти різної довжини, найчастіше це глутаровий альдегід:  $\text{HOOC-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CHO}$ .

Вони можуть бути простими біфункціональними і складними поліфункціональними. Завдяки «ніжці» немає тісного контакту ферменту з носієм, в результаті зберігається нативна конформація біокаталізатора. У процесі ковалентної іммобілізації повинні брати участь тільки ті групи молекули ферменту, які несуттєві для його функції. Ці групи повинні бути високореакційноздатними, їх потрібно багато для забезпечення широких можливостей введення нових хімічних зв'язків в білкову молекулу. Найбільш реакційноздатними групами в білках є SH-групи цистеїну. Вони беруть участь в реакціях окислення, ацилювання, алкілювання і т.д. Однак в білках вільних SH-груп або ні, оскільки вони беруть участь в утворенні дисульфідних містків, або вони необхідні для каталітичної активності ферменту. Виходячи з цього для іммобілізації, часто використовують аміногрупи ферменту, їх багато, вони досить реакційноздатні, зазвичай відіграють другорядну роль у підтриманні структури і функції ферментів. Якщо аміногрупи потрібні для каталізу, то їх легко захистити, нарешті, для аміногруп розроблено велику кількість підходящих носіїв і зшиваючих реагентів. В реакціях модифікації можуть також брати участь імідазольні, гуанідинові і гідроксильні групи. Завжди слід пам'ятати, що білок дуже лабільний, тому умови проведення іммобілізації повинні бути м'якими і не викликати денатурацію.

В даний час використовуються наступні *основні прийоми хімічної ІФ*:

- Реакція утворення амідного зв'язку.

Характерною особливістю є легке руйнування в кислих середовищах з регенерацією вихідних речовин.

В даний час поширена *іммобілізація цілих клітин або субклітинних структур*: мітохондрій, хлоропластів і ін.. Така іммобілізація має *наступні переваги*: збереження природного мікрооточення, що забезпечує ферментам підвищену стабільність, відтворення ферментів природним шляхом та ін.. Однак кінетика іммобілізованих клітин розроблена недостатньо.

Збереження стабільності ферментів є важливим завданням. Інактивація ферментів може бути фізичної і хімічної. Молекулярні механізми інактивації ферментів можна представити у вигляді двох стадій:



де N, D і I відповідно нативна, зворотне денатурована і незворотне інактивована форми білка. Перша стадія - це найчастіше зворотне конформаційна зміна. Особливий інтерес представляє друга стадія  $D \rightarrow I$ . Тут діють наступні основні умови і інактивуючі механізми. При тривалій інкубації, високій температурі, екстремальних значеннях рН, в присутності



хімічних денатурантів і т.д. білки агрегують, тобто інактивація ферментів підсилюється. Інактивація білків (ферментів) може супроводжуватися зміною первинної структури за рахунок розриву поліпептидного ланцюга або хімічної модифікації окремих функціональних груп. Крім того, можлива рацемізації амінокислот (*утворення суміші оптичних ізомерів*), дезамінування аспарагіну, десорбція кофакторів з активного центру, сорбція білка на стінках реактора, інактивація в потоці і ін.

Для ІФ число можливих інактиваційних механізмів значно менше, ніж для нативних ферментів. Так, іммобілізація пригнічує агрегацію та автоліз (*саморуїнування, розпад*), для ІФ виключений механізм сорбції на стінках реактора, стеричні обмеження навколо ферменту нівелюють дію протеаз, фосфорілаз і фосфатаз. Носій механічно захищає молекули ферментів від деформацій в потоці, виконуючи роль своєрідного демпфера (*глушитель, амортизатор*).

**4. Джерела ферментів.** Ферменти можна отримувати з рослинних, тваринних тканин чи шляхом мікробного синтезу.

Отримання ферментів з рослинної і тваринної сировини має такі *недоліки*: в рослинах, як правило, відзначається низький вміст ферментів, для рослин характерна сезонність, тобто сировину можна використовувати лише в певну пору року. Ферменти з тваринної сировини рентабельно вилучати відразу на м'ясокомбінатах, отже, виділення ферментів «прив'язане» до місць розташування м'ясокомбінатів. Важливою є проблема консервації та зберігання м'ясних субпродуктів.

Всі ці труднощі відпадають, якщо ферменти отримувати мікробним синтезом. Крім того, методами генетичної інженерії можна цілеспрямовано збільшити вихід ферменту. Провести скринінг і отримати біооб'єкт, який продукує ферменти з покращеними властивостями (термостабільні, осмостійкі, кислото-і лугостійкі та ін.) Багато мікроорганізмів виділяють ферменти в поживне середовище: гідролази, амілази, протеази, целюлази, рибонуклеази, ДНК-ази і т. д., що полегшує їх виділення.

В наш час вже налагоджено великомасштабне виробництво наступних ферментів мікробіологічними шляхом: протеаза,  $\alpha$ -амілаза, глюкоамілаза, глюкоізомераза і пектиназа.

Звернемо ще раз увагу на методи, які використовують для іммобілізації. Промислові процеси з використанням ІФ та клітин широко застосовуються для виробництва глюкозо-фруктозних сиропів, L-амінокислот, L-яблучної кислоти, а також для отримання безлактозного молока, цукрів з молочної сироватки, 6-амінопеніциланової кислоти та ін..

**5. Іммобілізовані клітини і органели.** Найбільш ефективними в цьому відношенні клітини, що знаходяться у спокої. Нерідко іммобілізацію доповнюють системою заходів, спрямованих на підвищення проникності клітинної стінки (пермеабілізація - *це створення в цитоплазматичній мембрані мікроскопічних отворів за допомогою хімічних речовин, наприклад, сапонінів, або електричного розряду. При цьому сама клітина залишається*

практично інтактною. Дозволяє вводити генетичні вектори, або різні речовини всередину клітини або її ядра, минаючи бар'єр - цитоплазматичну мембрану.). За таких умов клітини виділяють в культуральну рідину максимальну кількість цільового продукту, і не накопичують його всередині клітини. Імобілізація сама сприяє підвищенню проникності клітинної стінки. Цьому ж сприяє обробка клітин органічними розчинниками, зміна рН, введення фітогормонів та ін. Радикальним є видалення клітинної стінки, тобто, використання іммобілізованих протопластів.

Ізольовані клітинні органели (хлоропласти, мітохондрії, мікросоми, лізосоми, пероксисома та ін.) містять ферменти або поліферментні комплекси і в той же час вільні від інших компонентів клітини. На відміну від клітин, ізольовані органели не ростуть і не подвоюються. Хлоропласти та мітохондрії, володіючи власною ДНК, розмножуються в складі цілої клітини, але не *in vitro*.

Варіантом іммобілізації є соіммобілізація. Під нею розуміють спільну іммобілізацію різних біокаталізаторів: двох або більше ферментів, видів клітин, комбінацій ферментів і клітин і т.д. Соіммобілізація дозволяє здійснювати багатостадійні процеси *in vitro*. Тут важливою стає проблема функціональної сумісності біокаталітичних систем. Наприклад, перетворення крохмалю у фруктозу із застосуванням соіммобілізованих глюкоамілази та бактеріальних клітин з глюкоізомеразною активністю не вдається [крохмаль (глюкоамілаза) → глюкоза (клітини з глюкоізомеразною активністю) → фруктоза], що пояснюється відмінністю оптимумів рН для двох біокаталізаторів.

У той же час технологія ІФ та біокаталітичних систем, як правило, виявляється економічно ефективною. Так, отримання фруктози з глюкози із застосуванням глюкоізомерази стало дешевше майже вдвічі в результаті переходу на технологію, засновану на іммобілізованих ферментних препаратах.

## Лекція 7

### Контроль і управління біотехнологічним і процесами

#### План

1. Основні принципи та рівні управління. Системи GLP і GMP.
2. Ресурсо-енергозберігаючі технології та маловідходні виробництва.
3. Біотехнологія та біобезпека.

#### 1. Основні принципи та рівні управління.

Всі біотехнологічні процеси є керованими, хоча ступінь управління різна і змінюється з часом. Некеровані процеси можуть бути в природних умовах, при цьому їх не можна віднести суворо до біотехнологічних процесів, оскільки вони базуються на саморегулюванні біооб'єкту. Так, до числа некерованих процесів можна віднести компостування щільних відходів у тваринницьких комплексах і фермах, що відбувається спонтанно. Однак абсолютно некерованих біотехнологічних процесів не існує. Наприклад, в мікробіотехнології слід враховувати наступні особливості, що відображають управління процесом:

- Необхідність забезпечення стерильності на всіх етапах біотехнологічного процесу,
- Проведення культивування аеробів і анаеробів при низьких швидкостях біохімічних процесів і багатокомпонентності складу поживних середовищ;
- Складність механізмів регуляції біосинтезу БАР або нарощування біомаси клітин в умовах змін фізико-хімічних показників культуральної рідини;
- Висока чутливість біооб'єкту до різних складових біотехнологічного процесу (перемішування, масопередачі і теплообміну, дефіциту елементів живлення і т.д.).

Найважливішими складовими біотехнологічного процесу є чистота і стерильність. Порушення цих складових біотехнологічного процесу призводить до появи мікробів-забруднювачів. Це можуть бути навіть поодинокі клітини, наприклад, в бактеріальних вакцинах або грибах при отриманні ферментів. До нашого часу методи виявлення сторонньої мікрофлори недостатньо чутливі. Через велику складність метаболічних процесів біооб'єкт не піддається опису єдиною математичною моделлю в термінах хімічної кінетики.

Біотехнологічні процеси можуть супроводжуватися непередбачуваними змінами.

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, редох-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. У цьому відношенні важливі особливості мають нитчасті гриби. Вони ростуть повільніше, ніж прокариоти і не експоненціальне. У глибинних процесах, наприклад, продуцент антибіотика цефалоспорину С має три морфологічні форми: артроспоральную, фрагментарно-гіфальную і гіфальную; вони можуть перетворюватися друг у друга при зміні середовища культивування. Однак антибіотик утворюється в основному фрагментарно-гіфальної форми. Звідси контроль і управління повинно проводитися відповідно за морфофункціональними особливостями продуцента.

*Рівні управління.* Вони залежать від режиму проведення біотехнологічного процесу. Періодичні процеси використовуються в основному для отримання мегаболітов (амінокислот, етанолу, оцтової кислоти і т.д.), а напівбезперервні і безперервні - для напрацювання клітинної біомаси (дріжджі). У цих умовах *важливими параметрами біотехнологічних процесів є загальне зростання (Н) і швидкість росту (Н<sub>v</sub>)* біооб'єкта.

При безперервних процесах треба прагнути, щоб шлях від початкового, стартового періоду до стаціонарного був би якомога коротшим, а стаціонарний стан як можна довше. Цього домагаються за допомогою ЕОМ. Вони виявляються необхідними у випадках одночасного контролю і обліку багатьох параметрів.

**Системи GLP і GMP.** Ці системи використовуються для організації доклінічних випробувань лікарських препаратів та інших біологічно активних речовин (харчових добавок, агрохімікатів та ін.) Головні дії в єдиних правилах системи GLP (*Good Laboratory Practice*) полягають у наступному:

- Завчасна розробка стандартної методики проведення випробувань на всіх етапах;
- Призначення керівників і відповідальних за кожен вид випробувань;
- Кожному відповідальному виконавцю доручається суворо виконувати всі операції у відведених йому межах,
- Результати виконання операцій повинні бути внесені в спеціальний протокол, датовані й підписані;

- У випадках виконання складних операцій, рекомендується вдаватися до подвійної перевірки;
- Виконавець постійно інформує керівника про хід випробувань;
- Фактичні дані, записи та препарати повинні зберігатися таким чином, щоб завжди можна було відшукати необхідну;
- Складання докладного остаточного звіту; на звіті проставляються дата і підпис;
- Необхідно створити службу якісної оцінки випробувань; проводити внутрішню інспекцію і видавати рекомендації, спрямовані на вдосконалення процесів проведення випробувань.

Система GLP необхідна при випробуванні речовин: на мікробну забрудненість, пірогенність, гостру, підгостру і хронічну токсичність, канцерогенність, антигенність, лікарську залежність, пошкодження зародкових клітин, подразнення слизових оболонок шкіри в місці введення речовини, мутагенність, цитотоксичність, безпека для макроорганізмів при введенні *in vivo* (абсорбція, розподіл, швидкість виділення, метаболізм). Необхідно оцінювати фармакокінетику (дія ліків на організм) і фармакодинаміку (трансформація ліків в організмі).

Для проведення названих випробувань створюють спеціальні групи: загальну, мікробіологічну, метаболізму, загальних фармакологічних випробувань, загальних клінічних випробувань, патологоанатомічну, проведення експериментів на тваринах, обробки даних, з приготування проб, аналітичну, по управлінню дослідженням та ін.. На чолі кожен групи затверджується керівник .

Лише після лабораторних передклінічних випробувань по GLP і подальшої клінічної перевірки препарат дозволяється до випуску в умовах промислового виробництва.

GMP (*Good Manufacturing Practice*) - 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.

З 1991 р на спеціальній конференції у Москві був переглянутий проект вимог GMP, який включає три частини:

- Управління якістю в промисловому виробництві лікарських засобів; філософія та основні складові;
- Практика якісного виробництва та контроль якості;
- Додаткові і допоміжні напрямки.

У першій частині 12 розділів; вони стосуються організації контролю за якістю виробництва, санітарії та гігієни, укладання контрактів, стандартних робочих методик, оформлення необхідної документації та ін.

Друга частина містить два розділи - виробництво лікарських засобів: дотримання технології, методик і інструкцій, обмеження доступу в приміщення сторонніх осіб, слід уникати виготовлення немедичної продукції, не допускати попадання мікробів - контамінантів, пилу, сторонніх домішок, треба домагатися правильності і надійності роботи всього технологічного устаткування, дотримуватися всі пункти НТД. Необхідно залишати проби для зберігання на термін не менше року, що перевищує термін придатності.

Третя частина вимог GMP включає розділи про стерильні фармацевтичні продукти і практику якісного виробництва основної маси лікарських субстанцій.

## ***2. Ресурсо-енергозберігаючі технології та маловідходні виробництва.***

Для вирішення сучасних проблем господарської діяльності людини, охорони здоров'я і науки особливу роль грають біотехнологічні розробки. Так, для задоволення харчових потреб слід різко збільшити ефективність рослинництва і тваринництва. Біотехнологія успішно вирішує ці проблеми, крім того, в якості джерела кормового і харчового білка рекомендує клітинну масу бактерій, грибів та водоростей. Такий підхід зберігає природні традиційні ресурси і є прикладом енергозберігаючих технологій.

Поступове вичерпання звичайних джерел енергії, таких як нафта, природний газ, вугілля, уран, змушує розвивати альтернативні шляхи отримання енергії. У цьому відношенні можливості біотехнології практично невичерпні, бо є реальні можливості використання цінних поновлюваних енергетичних джерел: спиртів, біогенних вуглеводнів, водню. Ці екологічно чисті види палива одержують шляхом біоконверсії відходів промислового і сільськогосподарського виробництва. Дуже значна роль біотехнології в охороні здоров'я, тому крім отримання лікарських засобів (інсуліну, гормону росту, інтерферонів, факторів згортання крові та імунної системи, тромболітичних ферментів і т.д.), біотехнологічні прийоми дозволяють розробляти підходи для ранньої діагностики інфекційних захворювань і злоякісних новоутворень. Біотехнологія може бути основним інструментом в різкому зменшенні забруднення Землі промисловими, сільськогосподарськими та побутовими відходами, токсичними автомобільними вихлопами та ін. Вона націлена на створення безвідходних технологій, на отримання полімерів, що легко руйнуються, і пошук нових активних мікроорганізмів-руйнівників полімерів (поліетилену, поліпропілену, поліхлорвінілу) .

Основне завдання полягає в тому, щоб на основі сучасних технологій, використовуючи малоцінну сировину, відходи промисловості і сільського господарства, легко поновлювану (рослинну) сировину отримувати необхідні кінцеві продукти крупно- і малотоннажного виробництва з незначним обсягом відходів на основі ресурсо- і енергозберігаючих принципів. У сільському господарстві зазначеним запитам відповідає безвідходний

тваринницький комплекс, заснований на принципах біоконверсії окремих видів рослинної сировини і відходів:

- Навколо комплексу необхідно обробляти сільськогосподарські культури, які здатні забезпечити тварин високоякісними кормами;

- Для збереження родючості ґрунту слід дотримуватися оптимального співвідношення посівів зернових, овочевих культур і багаторічних трав;

- Доцільна комбінована переробка зернових і трав для раціонального використання відходів. Так, солому, як основний відхід виробництва зерна, консервують і збагачують поживними речовинами відходів фракціонування зеленої маси - коричневого соку або сироватки. У результаті отримують силос соломи без застосування дефіцитних джерел вуглеводів - меляси, борошна, свіжої трави. Крім того, залишки соломи можна використовувати для приготування компостів або отримання біогазу;

- Раціональна переробка рідких відходів ферм. Тут метанове бродіння забезпечує деструкцію органічних відходів, отримання високоякісних органічних добрив, біогазу та двоокису вуглецю, що міститься в ньому. Останній можна використовувати як консервант кормів, в т.ч. протеїнового коагулята, зерна, жому та ін..

- В безвідходному тваринницькому комплексі ферма великої рогатої худоби і свиноферма повинні бути розташовані недалеко одна від одної. При цьому зерно та продукти переробки соку зеленої маси рослин використовуються для приготування корму для свиней, а жом зеленої маси і соку - для жуйних.

Подібний безвідходний тваринницький комплекс є прикладом єдиної біотехнологічної системи, яка забезпечує високу економічну ефективність виробництва і не порушує екологічні закони.

**3. Біотехнологія та біобезпека.** Біологічна технологія докорінно змінює фундаментальні властивості організмів: спадковість, мінливість, енерго- і масообмін, адаптацію і стійкість, продуктивність і якість. Таке штучне втручання в строго запрограмовані генетичні структури не дозволяють завжди точно прогнозувати можливі наслідки. Це, природно, викликає велике занепокоєння людей у багатьох країнах, що може серйозно загальмувати розвиток біотехнології і особливо біоінженерії.

Однак підстав для цього немає, про що, зокрема, свідчить розвиток новітньої біотехнології вже впродовж п'ятдесяти років. На людину і середовище її проживання постійно діють природні, техногенні та інші фактори. Якщо вони діють негативно, то наука, суспільство і держава повинні їм ефективно протидіяти, тобто забезпечити безпеку людини - стан захищеності життєво важливих інтересів особистості і самого життя. Безпека людини не може бути забезпечена без захисту середовища її проживання і життєдіяльності. Безпека може бути біологічної, екологічної, економічної, продовольчої, військової і т.д.

Найважливішою складовою частиною безпеки є біобезпека. *Біобезпека* - це захищеність людини і навколишнього середовища від шкідливого впливу

різних біологічних сполук, що містяться в природних або генно-інженерно-модифікованих біологічних об'єктів і отриманих з них продуктів. Біобезпека важлива не тільки для людини, але і для рослин, тварин і корисних мікроорганізмів. Дійсно, біологічно небезпечні організми і продукти їх життєдіяльності можуть позбавити людину продовольчих та інших джерел і можливостей існування. Тому розроблені різні методи контролю за технологічними процесами і якістю біологічних речовин, які знов включаються в сферу використання людиною. Особливу небезпеку для здоров'я та життя людей являє алкогольна інтоксикація, наркоманія та отруйні гриби.

Біотехнологічні процеси потрібно безперервно контролювати і своєчасно виявляти можливі відхилення від норми основних параметрів і якості продукції. Показано, що при роботі з тваринними тканинами і клітинами можливе накопичення токсичних речовин, незвичайних продуктів метаболізму, в т.ч. при їх зберіганні. Вважають, що клітинна біотехнологія рослин (селекція сортів, отримання продуктів для фармацевтичної і харчової промисловості) більш безпечна, ніж використання клітинних і тканинних технологій у тваринництві, де потрібен більш жорсткий контроль і управління.

При проведенні рДНК-біотехнології важливою проблемою є можливість отримання мутантів з вмістом токсичних або алергенних для людини білків або інших небезпечних сполук. Не виключено, що при трансгенозі можуть активуватися "мовчазні" гени, тому імовірна поява генотипів, небезпечних для здоров'я і життя людини. Можливість появи таких мутантів значно зростає при використанні штучних, синтетичних генів для трансгенних рослин, тварин і мікроорганізмів з поліпшеними і принципово новими властивостями. Не виключено також взаємодія отриманих модифікованих генів з генами третіх генотипів, що може призвести до становлення нових генотипів з небезпечними властивостями для людей і навколишнього середовища.

Вивчають ділянки ДНК, вбудовані в геном рослин, перевіряють можливість транслокації зміненого гена в інші організми, оцінюється вплив нового гена на ураженість рослин хворобами і пошкоджуваність шкідниками, на ґрунтову мікрофлору і ін.. У 2000 р. розроблені та затверджені методичні вказівки "Медико-біологічна оцінка харчової продукції з генетично модифікованих джерел ". У них встановлено порядок гігієнічної експертизи та державної реєстрації харчової продукції, отриманої з генетично модифікованих джерел. Затверджені методики медико-гігієнічної, медико-біологічної оцінки і клінічних випробувань всіх видів харчової продукції, отриманої за допомогою ГМО. Ці вказівки повинні виконуватися і суворо контролюватися.

В Україні прийнято в новій редакції Закон «Про безпечність санітарного та епідеміологічного благополуччя населення» № 3037-III від 07.02.2002 р., в якому визначено фактори середовища життєдіяльності



людини, в тому числі генетично модифіковані організми і продукти біотехнології.

Постановою Кабінету Міністрів України № 1217 від 19.08.2002 р. затверджено «Положення про державний санітарно-епідеміологічний нагляд». Одним з пріоритетних завдань санітарно-епідеміологічної служби є видача дозволів на розроблення та виробництво нових видів продуктів харчування, а також на право роботи із рекомбінантними молекулами ДНК і на виробництво, зберігання, транспортування, використання, захоронення, знищення і утилізацію продуктів біотехнології та інших біологічних агентів.

Закон України «Про внесення змін до Закону України «Про якість та безпеку харчових продуктів і продовольчої сировини» № 191-IV від 24.10.2002 р. дає визначення нового продукту і нової продовольчої сировини, в тому числі виготовлених методами генної інженерії. У цьому законі зазначається, що обіг нового харчового продукту, що вміщує генетично модифіковані організми, складається або виробляється з них, регулюється положеннями спеціального законодавства.

31 травня 2007 р. Президент України підписав Закон України «Про державну систему біобезпеки при створенні, випробуванні, транспортуванні та використанні генетично модифікованих організмів», регулюванню яким підлягають:

- генетично-інженерна діяльність, що здійснюється у замкненій системі (замкнена система – це здійснення генетично-інженерної діяльності, що запобігає контакту з населенням та навколишнім середовищем, наприклад, дослідження організмів з науковою метою);
- генетично-інженерна діяльність, що здійснюється у відкритій системі (відкрита система – це здійснення генетично-інженерної діяльності, що передбачає контакт генетично модифікованих організмів з населенням та навколишнім середовищем, при запланованому вивільненні їх у навколишнє середовище, застосуванні у сільськогосподарській практиці, промисловості, медицині та в природоохоронних цілях, передачі технологій та інших сфер обігу генетично модифікованих організмів;
- державна реєстрація генетично модифікованих організмів та продукції, виробленої з її використанням;
- уведення в обіг генетично модифікованих організмів та продукції, виробленої з їх використанням;
- експорт, імпорт та транзит генетично модифікованих організмів.

З метою забезпечення виконання закону визначено повноваження Кабінету Міністрів України, центральних органів виконавчої влади з питань освіти і науки, екології та природних ресурсів, охорони здоров'я, аграрної політики.

Увезення та транзит генетично модифікованих організмів повинно суворо контролюватися; дозвіл на ввезення, порядок увезення встановлюється Кабінетом Міністрів України, а дозвіл на транзитне переміщення незареєстрованих в Україні генетично модифікованих

організмів надається центральним органом виконавчої влади з питань екології та природних ресурсів у порядку, встановленому Кабінетом Міністрів України.

Пріоритетним напрямком в області нормативного забезпечення є розробка "Концепції стандартизації генно-модифікованих продуктів", внесення змін до чинної нормативної документації на харчову продукцію, продовольчу сировину і методи випробування, зокрема включення додаткових вимог щодо генетичної чистоти, ідентифікації і маркування генно-модифікованих продуктів харчування; на порогові рівні споживання для людини ГМ-продуктів харчування. Необхідно розробити правила і порядок оцінки відповідності ГМ-продуктів харчування вимогам генетичної безпеки; нормативних документів по державному контролю і нагляду за виробництвом, зберіганням, реалізацією та обігом ГМ-продуктів харчування.

Найважливішими завданнями в галузі біотехнології для України є:

- Створення і реалізація, затвердженої державним законом наукової програми з біотехнології, біоінженерії і біобезпеки;
- Визнання найважливішим пріоритетом ХХІ в. ядерної біології, стратегічної частини біотехнології;
- Пріоритетне фінансове забезпечення розвитку біотехнології, біоінженерії і біобезпеки;
- Оснащення біоінженерних наукових установ сучасним науковим обладнанням,
- Залучення для виконання цієї програми молодих дослідників;
- Об'єктивне інформування населення країни про зміст і результати досліджень з біотехнології, біоінженерії і біобезпеки;
- Вдосконалення законодавчої та іншої нормативно-правової бази з біотехнології, біоінженерії і біобезпеки та ін.

Україна поки відстає від багатьох країн в галузі біотехнології і біоінженерії. У нашій країні досі не зареєстровано жодного генно-інженерно-модифікованого сорту гібриду сільськогосподарських культур вітчизняного виробництва. Вирішення цієї важливої проблеми можливе на шляхах швидкого розвитку сільського господарства та виведення його з глибокої економічної кризи, створення та виконання всіх нормативних документів з біотехнології і біоінженерії, розвиток міжнародного співробітництва з виконання спільних проектів по біотехнології і біоінженерії.

Перш ніж перейти до більш приватних питань біотехнології підкреслимо, що в даний час промислова біологічна технологія являє собою вже біоіндустрію. Причому, в деяких галузях біотехнологія з успіхом замінює традиційні методи. У галузі хімічної промисловості це синтез штучних приправ, полімерів і сировини; в галузі енергетики - отримання метанолу, етанолу, біогазу та водню; в області біометалургії - вилучення деяких металів і т.д. В інших галузях біотехнологія відіграє провідну роль. Наприклад, у галузі виробництва продовольства, збільшення

продуктивності сільського господарства, захисту навколишнього середовища, фармацевтичної промисловості та ін.

## Лекція 8

### Багатотоннажне мікробіологічних виробництв амінокислот і органічних кислот

#### План

1. Виробництво амінокислот.
2. Виробництво органічних кислот: молочної, лимонної і оцтової.
3. Інші органічні кислоти.

**1. Виробництво амінокислот** Амінокислоти стають в даний час одним з найважливіших факторів виживання населення Землі. Всі 20 амінокислот добре вивчені (методи їх синтезу давно докладно описані) і є складовими елементами білків або мономерами для побудови природних поліпептидів. Відомо також, що ці сполуки існують у вигляді оптичних ізомерів. При цьому треба відзначити, що амінокислоти в білках знаходяться в L- і D-формах (L, D-стереоізомери), причому біологічно активні в основному L-форми, а D-стереоізомери можуть бути навіть токсичними. Все амінокислоти діляться на незамінні і замінні, залежно від того, синтезуються вони в організмі людини чи ні. Приблизно половина з 20 амінокислот є незамінними, а решта, відповідно, замінними.

Незамінні амінокислоти мають широкий спектр застосування як в сільському господарстві (кормові балансуєчі добавки), так в харчовій (біологічно активні добавки) та медичній (лікарські препарати та суміші для парентерального харчування (*спосіб потрапляння речовин в організм оминаючи шлунково-кишковий тракт, харчування що вводиться прямо у вени.*) промисловості.

В сільському господарстві амінокислоти використовуються для балансування кормів за амінокислотним складом, щоб в організм тварин і птахів вони надходили в тому співвідношенні, в якому вони знаходяться в білках цих тварин і птахів. Введення амінокислот в корми забезпечує максимальну швидкість синтезу білка і, відповідно, зростання біомаси тваринного. Це дуже важливо у випадку «скоростиглого» тваринництва, свинарства і птахівництва.

В продукти для людини також можна додавати незамінні амінокислоти. Це доцільно робити або за медичними показаннями, або в силу якихось міркувань, коли людина харчується лише рослинною їжею (рослинними білками). Цю їжу можна оптимізувати і поліпшити її поживні властивості, збалансувавши її за амінокислотним складом шляхом додавання туди лізину, треоніну, метіоніну (наприклад, в їжу для вегетаріанців). Крім того, що амінокислоти мають величезне значення для нашої їжі, вони також широко використовуються і в традиційній клінічній практиці.

Тенденція сьогоdnішнього дня – використання препаратів, що містять весь комплекс амінокислот (або, щонайменше, 18 з них), тобто в оптимальному для людського організму співвідношенні, оскільки в організмі людини залежно від віку синтезуються білки відповідного складу,

амінокислотний склад цих препаратів для дітей наближається до складу грудного молока матері, для дорослих він дещо іншою.

Встановлено, що в будь-якому органі і тканині є свої пептиди – сполуки, що складаються з невеликої кількості амінокислотних залишків, які утворюються і виділяються при їх руйнуванні, стимулюють, як правило, і процеси їх регенерації. Відповідно до цього з того чи іншого органа тварин готують екстракти і на їх основі – лікарські препарати, які використовують для терапії захворювань цих органів. Амінокислоти також входять до складу комплексних препаратів, що застосовуються в косметології.

Існують так звані космецевтичні медичні препарати (*косметичні продукти із біологічно активними складниками, що ймовірно мають медичну або медикаментозну користь*), для отримання яких використовується фармацевтична сировина, до чистоти якої пред'являють підвищені вимоги. При цьому відомо, що особливо чистими є речовини, отримані біотехнологічними методами, наприклад за допомогою спеціально виведених штамів-мікроорганізмів.

В даний час амінокислоти отримують наступними методами:

- біологічним (застосування гідролізу білоквмістних субстратів);
- хімічним (тонкий органічний синтез);
- хіміко-ензиматичним (ензиматична трансформація хімічно синтезованих попередників амінокислот з утворенням біологічно активних L-ізомерів);
- мікробіологічними (одержання L-амінокислот).

Найдавніший спосіб отримання амінокислот – **кислотний, лужний або ферментативний гідроліз** білоквмістних субстратів (м'ясо, молоко і т.д.). При високій температурі білок розщеплюється на відповідні амінокислоти або фрагменти, з кількох амінокислот. При цьому утворюється суміш амінокислот і пептидів. Витяг з цієї суміші будь-якої певної амінокислоти – досить складне, але можливе завдання.

Сама по собі сировина (м'ясо і білок молока – казеїн) – дорогий продукт, і цей метод застосовується, коли мають справу з «непридатною» сировиною, тобто з відходами виробництва (такою сировиною є роги, копита, волосся, пір'я і пух, що складаються з кератину, в якому міститься дуже багато сірковмісної кислоти цистеїну, і – в невеликих кількостях – інших амінокислот).

Наступний спосіб отримання чистих амінокислот – **хімічний синтез**. Їх синтезують подібно іншим органічним кислотам, це не складно. Однак в процесі хімічного синтезу виходить суміш D- і L-стереоізомерів (іноді виходить і більша кількість ізомерів), а як відомо, в білках людини біологічно активні тільки L-стереоізомери амінокислот, тому існують труднощі розподілу цих ізомерів. Крім того, хімічне виробництво амінокислот, як правило, пов'язано з використанням дорогого обладнання і нерідко агресивних токсичних сполук в якості вихідної сировини.

Процес протікає при високій температурі, вимагає дорогих каталізаторів і як всяке хімічне виробництво супроводжується утворенням

побічних продуктів, забруднює навколишнє середовище, небезпечно і не нешкідливо для обслуговуючого персоналу.

Проте деякі амінокислоти отримують хімічним синтезом, наприклад гліцин, у якого немає оптично активних ізомерів, а також D-, L-метіонін, D-ізомер якого малотоксичний, тому медичний препарат на основі метіоніну містить D- і L-форми, хоча за кордоном в медицині використовується препарат, що містить тільки L-форму метіоніну. Там рацематну суміш метіоніну розподіляють біоконверсією D-форми в L-форму під впливом спеціальних ферментів живих клітин мікроорганізмів.

Наступний спосіб отримання амінокислот – *хіміко-ензиматичний*. Як видно з назви, цей метод отримання амінокислот передбачає два етапи. Спочатку хімічним методом синтезується «попередник» – відповідна карбонова кислота, а потім ця карбонова кислота (зазвичай у присутності аміаку) перетворюється на відповідну амінокислоту. Ця біотрансформація (біоконверсія) здійснюється ферментами живих клітин. Причому отримані L-стереоізомери амінокислот самі по собі необхідні для життєдіяльності цих клітин, тобто фактично цей спосіб наполовину біотехнологічний.

Таким методом отримують, наприклад, аспарагінову кислоту (на основі фумарової кислоти). Розчин фумарової кислоти пропускають через колонки, в яких іммобілізовані або ферменти, або клітини мікроорганізмів з високою активністю аспартази, наприклад, *E. coli*, туди ж подається аміак і здійснюється біотрансформація.

Аналогічним чином на основі коричної кислоти отримують фенілаланін (L-стереоізомер), використовуючи для цього дріжджові клітини. Хіміко-ензиматичне можна виробляти практично всі амінокислоти, однак через дорожнечу і складність отримання відповідних органічних кислот-попередників цей метод не завжди економічно вигідний і в більшості випадків поступається методу прямого мікробіологічного синтезу.

Четвертий спосіб отримання амінокислот – їх прямиий *мікробіологічний синтез* – цілком заснований на використанні біооб'єктів (тобто є повністю біотехнологічним). В якості біооб'єктів в ньому застосовуються штами-продуценти амінокислот. Цим методом амінокислоти найчастіше отримують на основі *E. coli*, *Brevibacterium*, *Micrococcus*, *Corynebacterium*. Всі ці мікроорганізми на сьогоднішній день прекрасно вивчені. Відома повна нуклеотидна послідовність всього їх генома. Для кишкової палички розроблені різноманітні способи генетичного обміну, що дозволяють легко комбінувати різні гени і змінювати процес метаболізму.

Використання цих мікроорганізмів для отримання амінокислот засноване на їх здатності самостійно синтезувати всі 20 амінокислот. Також вони є гетеротрофними бактеріями, які в якості джерела вуглецю використовують органічні сполуки (вуглевод або якусь органічну кислоту), а всі інші компоненти отримують з неорганічних сполук.

Застосування мікроорганізмів гетеротрофів дозволяє істотно скоротити час процесу ферментації. Так, кишкова паличка в повноцінному поживному

середовищі подвоюється кожні 20-30 хв., коринебактерії – щогодини. В бідних середовищах – час регенерації в два рази більше (1 год. для кишкової палички, 1,5 -2 год. для коринебактерії і сінної палички).

Разом з тим існують бактерії, так звані ауксотрофи – мутанти-мікроорганізми, які, з одного боку, втратили здатність самостійно синтезувати необхідні для побудови всіх компонентів своєї клітини різні амінокислоти, а з іншого – придбали здатність до надсинтезу цільової амінокислоти. Такі мутанти отримують або впливом різних мутагенів фізичної і хімічної природи на вихідну культуру мікроорганізму з подальшою селекцією штаму за заздалегідь заданими ознаками, або методами генної інженерії.

Відомо, що клітини бактерій синтезують амінокислоти для задоволення власних потреб (синтез білка та інші метаболічні процеси); синтезується їх в клітинах бактерій певна кількість. В процесі еволюції (природного відбору) виживали тільки ті форми, в яких метаболічні процеси протікали найбільш економно, і це забезпечувалося за рахунок механізмів регуляції цих процесів.

Відомо, що в регуляції та управлінні метаболічними процесами використовується *принцип зворотного зв'язку*. Існують два рівня механізму регуляції біосинтезу кінцевого (цільового) продукту – *ретроінгибування* і *репресія*. На першому рівні амінокислота, що утворюється в ланцюзі послідовних реакцій, інгибує активність одного з початкових ферментів власного синтезу. Якщо цього механізму недостатньо і кінцевий продукт (амінокислота) все одно присутній в надлишку, то включається другий механізм регуляції і в результаті пригнічується (репресується) утворення всього комплексу ферментів відповідного біосинтетичного ланцюга.

*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.

Як уже зазначалося, у природних мікроорганізмів контроль за швидкістю біосинтезу амінокислот виключає їх перевиробництво, тому виділення амінокислот з клітини в середовище можливе лише у культур з порушеною системою регуляції. Радянськими вченими наприкінці ХХ століття був створений штам-суперпродуцент треоніну. Використання його в промислових масштабах дозволило збільшити синтез треоніну до 100 г/л, а час ферментації скоротився до однієї доби.

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 грампозитивними, 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.

Біотехнологи при розробці мікробіологічної технології одержання амінокислот в процесі культивування продуцентів підбирають такі умови, за яких швидкість синтезу амінокислоти клітинами продуцента була б максимально високою і зберігалася максимально довго, а також утворення побічних продуктів біосинтезу зводилося б до мінімуму.

Максимально висока швидкість синтезу досягається при створенні оптимальних умов вирощування високоактивної біомаси. Для цього в ферментері підтримуються певні (оптимальні) концентрації джерел вуглецю, амонійного азоту, мінеральних солей, ростових факторів, рН та температура. Всі процеси з високим рівнем накопичення амінокислоти (близько 50-100 г/л) ведуться при дробовій подачі субстратів – джерел вуглецю та азоту. Як джерела вуглецю при біосинтезі амінокислот використовують вуглеводи або органічні кислоти (наприклад, ацетат), а як джерело азоту, необхідного для побудови аміногрупи, – амонійні солі та аміак.

Незважаючи на те, що амінокислоти в цілому нейтральні, в процесі їх біосинтезу відбувається сильне закислення середовища внаслідок порушення іонного балансу культуральної рідини. Справа в тому, що мікроорганізми-продуценти перетворюють іони амонію, в амінні групи амінокислоти. При цьому в середовищі залишаються незбалансованими «зайві» радикали. Для підтримки в середовищі оптимальної концентрації іонів амонію і оптимальної величини рН біосинтез амінокислот ведуть при автоматичному рН-статіруванні аміаком.

Оптимальну концентрацію джерел вуглецю в середовищі можна підтримувати, подаючи в ферментер розчин вуглеводів з тією швидкістю, яка відображає темп споживання цукрів культурою продуцента. При промисловому виробництві амінокислот широко застосовують також автоматичний режим подачі вуглеводів по сигналу від датчика рН. При цьому рН-статірування ведуть не аміаком або аміачною водою, а сумішшю аміачної води і вуглеводів. При правильному виборі співвідношення між ними на постійному рівні підтримується концентрація не тільки іонів амонію, а й джерел вуглецю.

Для ауксотрофів типу продуцента лізину надзвичайно важливим параметром є початкове дозування в середовищі джерел ростових факторів (тих амінокислот, які штам не може синтезувати самостійно). Їх надлишок призводить до пригнічення біосинтезу; при їх дефіциті концентрація клітин продуцента в ферментері буде недостатня для забезпечення високої швидкості накопичення амінокислоти. Тому у продуцентів, аналогічних продуценту лізину, існує оптимальна концентрація ростових факторів. Ця величина не постійна. Вона може варіювати в залежності від сировини, аераційних можливостей апаратури, температури культивування.



Процеси біосинтезу амінокислот є енергоємними, у зв'язку з чим ферментація при отриманні амінокислот обов'язково повинна проводитися в аеробних умовах при інтенсивній аерації і перемішуванні, що забезпечують швидкість розчинення кисню 3-7 г/(л • год.).

Після утворення у ферментері активної біомаси, синтезуючої амінокислоту, необхідно створити умови, при яких клітини мікроорганізмів «працювали» б якомога довше.

В процесі біосинтезу з різних причин вони втрачають життєздатність, і для продовження активного періоду ферментації застосовують різні методи. Зокрема для ауксотрофних продуцентів амінокислот (наприклад, продуцента лізину) тривалість біосинтезу і вихід цільової амінокислоти можуть бути збільшені, якщо по ходу ферментації в поживні середовища вносити розчини, що містять джерела вуглецю в суміші з джерелами ростових факторів (білковими гідролізатами).

Синтез цільової амінокислоти може припинятися через вплив на продуцент токсичних метаболітів синтезованих самим же продуцентом. Уникнути накопичення побічних домішок вдається, якщо процес ферментації ведуть, лімітуючи джерело вуглецю. Розчин цукру, що слугує для цього продуцента джерелом вуглецю, подають в середу з постійною швидкістю, але меншою, ніж швидкість його утилізації культурою. Внаслідок цього в культуральному середовищі підтримується дуже низька «фонова» концентрація джерела вуглецю, і весь цукор, що подається, витрачається на синтез амінокислот. В результаті робочий цикл ферментації зростає в 1,5 -2 рази, а частка домішок знижується. При цьому конверсія джерела вуглецю в цільову амінокислоту збільшується майже в два рази.

При введенні гібридних плазмід побічні домішки, як правило, автоматично зникають, при цьому продуктивність біомаси і коефіцієнт використання субстрату істотно зростають

Мікробіологічними шляхом отримують фенілаланін, або за допомогою тирозин- і метіоніндефіцитного мутанта *Brevibacterium lactofermentum*, або за допомогою ауксотрофного мутанта *E. coli*, який можна культивувати в глюкозном середовищі з фосфатами, яке є менш складним і коштовним, ніж у першому варіанті. Фенілаланін служить сировиною для харчового підсолонджувача аспартама, він солодший сахарози в 200 разів.

**2. Виробництво органічних кислот: молочної, лимонної і оцтової.** Багато з таких кислот технічного призначення вигідно отримувати хімічним шляхом. Органічні кислоти використовуються в харчовій, хімічній, фармацевтичій, легкій промисловості, в побуті. Так, річний обсяг виробництва лимонної кислоти становить 400000 т, сировиною є м'яса і н-алкани, вихід продукції становить 85-140%, продуцентами є *Aspergillus niger* і *Candida Hpolytica*. Для молочної кислоти ці параметри наступні: 30000 т, глюкоза 90%, *Lactobacillus delbrueckii*; для оцтової (10%-я): 10 млн м<sup>3</sup>, етанол 90-98%, *Acetobacter aceti*; для пропіонової кислоти - невідомо, глюкоза 60%, *Propionibacterium Shermanii*. Мікробіологічні процеси

одержання органічних кислот можна розділити на дві групи: анаеробні (молочна, пропіонова) і аеробні (оцтова, лимонна, ітаконова, глюконова). Всі органічні кислоти є проміжними або кінцевими продуктами катаболізму вуглеводів. Аеробне отримання органічних кислот реалізують як глибинним, так і поверхневим методами ферментації, а анаеробне - глибинними.

*Отримання молочної кислоти.* Молочнокислі бактерії відносяться до 4 родів: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* і *Pediococcus*. Під *Lactobacillus* включає три підроду - *Thermobacterium*, *Streptobacterium* і *Betabacterium*. Перші з них не ростуть при 15°C, але витримують температури вище 50°C. Стрептобактерії не є термофільними. Бетабактерії утворюють DL.-молочну кислоту із глюкози. Термострептобактерії, стрептококи і педікоккі гомоферментативні, тобто утворюють з гексоз переважно молочну кислоту: бетабактерії і лейконостокі - гетероферментативні. Вони поряд з молочною кислотою утворюють оцтову кислоту, діоксид вуглецю і етанол. В якості субстрату молочнокислі бактерії можуть використовувати мальтозу, лактозу, глюкозу, оцукренний крохмаль та ін. Середовище для них повинне також містити вітаміни групи В, амінокислоти, пурини, піримідини, органічні кислоти та ін. У промисловому виробництві найчастіше використовують термофільні гомоферментативні види. Наприклад, *L. delbrueckii* штам Л-3, у якого вихід молочної кислоти складає 95-98% від спожитої сахарози.

*Технологічна схема одержання L (+)-молочної кислоти наступна.*

Мелясну середу, що містить 5-20% цукру, витяжку солодових паростків, дріжджовий екстракт, вітаміни, фосфат амонію, засівають *L. delbrueckii*. Бродіння протікає при 49-50°C при вихідному рН, рівному 6,3-6,5. По мірі утворення молочної кислоти середу періодично нейтралізують крейдою. Весь цикл ферментації завершується за 5-10 днів; при цьому в культуральній рідині міститься 11-14% лактату кальцію і 0,1-1,5% сахарози. Клітини бактерій і крейду відокремлюють фільтруванням (відхід), фільтрат упарюють до концентрації - 30%, охолоджують до 25°C і подають на кристалізацію, яка триває 1,5-2 доби. Кристали лактату кальцію обробляють сірчаною кислотою при 60-70°C, гіпс випадає в осад, а до надосадової рідини додають жовту кров'яну сіль при 65°C для видалення іонів заліза, потім натрій сульфат для звільнення від важких металів. Фарбувальні речовини видаляють за допомогою активованого вугілля. Після цього розчин молочної кислоти піддають вакуум-упарювання до 50% або 80%. Таку, не до кінця очищену молочну кислоту використовують для технічних цілей. Більш очищену молочну кислоту можна отримати при перегонці її складних метильних ефірів, при екстракції простим ізопропіловим ефіром в протиточних насадочних колонах.

Лактат широко використовується в якості підкислювача при виробництві джемів, желе, кондитерських виробів, наливок, екстрактів, при консервуванні овочів. Молочну кислоту застосовують для регулювання рН пивного суслу, в шкіряної, текстильної, фармацевтичної промисловості, для виготовлення розчинників і пластифікаторів, лаків, оліфи, для приготування

миючих засобів, обробки натуральних тканин. Однак слід пам'ятати, що молочна кислота являється сильним корозуючим агентом.

Гомо- та гетероферментативні молочнокислі бактерії давно використовуються в хлібопеченні. Їх асоціації з дріжджами, сприятливі для створення аромату, смаку, пористості, забарвлення і свіжості, називають заквасками. Молочнокисле бродіння лежить в основі силосування кормів і квашення овочів (капусти, огірків), плодів, ягід (маслін, яблук). Лактобактерії лежать в основі приготування кисломолочних продуктів, сиру, сирів. Нарешті, молочнокислі бактерії входять до складу профілактичних і лікувальних препаратів (біфідумбактерії, біфікол, коли-бактерин, лактобактерин). Лактобактерії антагоністичні гнильним, оцтовокислим, маслянокислим бактеріям, ентеробактеріям, але не дріжджам.

До сучасних відносять метод отримання молочної кислоти за допомогою *Streptococcus thermophilus* в біореакторі, що працює за принципом «киплячого» або псевдозріженого шару. У цьому шарі переміщаються кульки активного вугілля, покриті біофільмом ([греч. *bio(s)* — життя і англ. *film* — плівка] — популяції або співтовариства мікроорганізмів (бактерій, грибів, водоростей). У нижній частині вугілля сорбує субстрат, а у верхній - молочну кислоту. Середина містить глюкозу, дріжджової екстракт, ацетат натрію, двозаміщений цитрат амонію, двозаміщений фосфат калію, сульфати магнію та марганцю. Продуктивність системи становить 12 г/(л-год) молочної кислоти.

*Отримання лимонної кислоти.* Раніше лимонну кислоту отримували з цитрусових рослин. В даний час розроблені поверхневі і глибинні методи культивування мікробів-продуцентів. Зараз у виробництві використовують селекціоновані штами *A. niger*, зокрема, штам Р-3, що дає вихід лимонної кислоти 98-99% у розрахунку на спожиту сахарозу. Штам має високу осмоотолерантність (до 12% цукру в поживному середовищі). Основною сировиною для виробництва лимонної кислоти є меляса, в якій завжди багато заліза. Його осаджують за допомогою жовтої кров'яної солі -  $K_4 [Fe(CN)_6]$ . В окремому цеху нарощують спори (конідії) гриба в три стадії. У першій стадії *A. niger* вирощують на скошеному агаризованому середовищі в пробірках, у другій і третій стадіях його розмножують на щільному або рідкому середовищі в колбах Ерленмейера або алюмінієвих кюветах площею 8,5-12 дм<sup>2</sup>, з висотою бортиків від 7 до 20 см. Тривалість кожної стадії 2-4 діб при температурі 32°C. При утворенні та дозріванні конідій безбарвний міцелій стає чорним. Конідії збирають аспірацією вакуумним насосом, підсушують в термокамері при 28-30°C, змішують із стерильним активованим вугіллям (1:2), фасують у стерильні флакони і зберігають 1,5-2 роки. З 10 дм<sup>2</sup> поживного середовища в кюветах можна отримати до 4 - 5 г сухих конідій.

*Поверхневий спосіб рідиннофазної ферментації.* Виробництво лимонної кислоти здійснюють в «бродильних камерах». На стелажі поміщають 8-10 кювет одну над другою. На дні кожної кювети є зливний

штуцер. Ці камери обладнані припливно-витяжною вентиляцією, яка забезпечує рівномірний приплив стерильного повітря заданої температури і вологості (3-4 м/м<sup>2</sup> міцелію-год<sup>-1</sup>). Температура в камерах 34-36°C, висота поживного шару рідкого мелясного середовища 6-12 см.

Максимальне тепловиділення досягається до 5 доби (500-550 кДж/м<sup>2</sup>год), вихідна концентрація цукру дорівнює в середньому 12%. Протягом першої доби рН від 6,8-7,0 знижується до 4,5, а до 8-9 діб - до 3,0. У таких умовах максмальне кислотоутворення відбувається на 5-6 добу і потім встановлюється на рівні 50-60 г/м<sup>2</sup>-год<sup>-1</sup>. Зазвичай через 6-7 діб від початку ферментації, коли концентрація цукру знижується до 3-4%, доливають стерильний розчин меляси без поживних солей - 30-35% початкового об'єму. Таким прийомом продовжують ферментацію до 12 діб, а кількість перероблюваного середовища для отримання цільового продукту зростає на 30-35%.

У зібраної культуральної рідині міститься суміш лимонної, глюконової, щавлевої кислот і невикористаний цукор у співвідношенні 40-50:3:1:7, тобто зміст лимонної кислоти від 80 до 90%. Для її виділення до нагрітої до 100°C культуральної рідини додають вапняне молоко (Ca(OH)<sub>2</sub>) або крейду (CaCO<sub>3</sub>), доводять рН до 6,8-7,0. Тризаміщений кальцію цитрат, гірше розчинний у гарячій воді, ніж у холодній, випадає в осад разом з оксалатом кальцію. Осад відфільтровують, промивають гарячою водою і гідролізують сірчаною кислотою, при цьому вільна лимонна кислота залишається в розчині. Цей розчин очищають, піддають вакуум-упарюванню і кристалізують. Кристали кислоти висушують і фасують.

*Твердофазна ферментація.* Метод досить простий. Ферментацію штаму *A. niger* проводять на зволжених висівках рису або пшениці, що знаходяться в кюветах. Умови такі ж, як і при використанні агаризованих або рідких поживних середовищ. Після завершення культивування висівки екстрагують водою, в яку переходять кислоти. Потім виділяють цитрат кальцію і чисту лимонну кислоту за схемою, наведеною вище.

*Глибинний спосіб виробництва* лимонної кислоти економічно вигідний, якщо потужність заводу перевищує 2,5 тис. т кислоти в рік. Для його реалізації використовують спеціальні культури *A. niger*. Спочатку вирощують конідії. Потім інокулят підросшують в інокуляторі і в посівному апараті на середовищі з 3-4% цукру. Через 1-1,5 доби інокулом передають з посівного в основний ферментатор і процес ведуть протягом 5-7-10 діб, з триразовим доливом 25-28% (за цукром) розчину меляси, щоб довести кінцеву концентрацію цукру до 12-15%. Після закінчення ферментації, тобто зниження кислотоутворення, міцелій гриба відфільтровують, а культуральну рідину обробляють за схемою.

В даний час налагоджено виробництво лимонної кислоти шляхом біосинтезу її дріжджами, вирощуваними на парафінах і нижчих спиртах (етанол). Вихід продукту складає 80-140%.

Лимонна кислота посилює діяльність підшлункової залози, збуджує апетит і стимулює засвоєння їжі. Лимонну кислоту використовують у кулінарії, а також у виробництві безалкогольних напоїв, мармеладу, вафель, пастили. Вона включена в рецептури деяких сортів ковбас і сиру. Її застосовують у виноробстві, для рафінування рослинних масел, виробництва згущеного молока. Вона зберігає природний смак і аромат при тривалому зберіганні в замороженому стані м'яса і риби.

Її застосовують для приготування шампунів і миючих засобів. Останнє має важливе екологічне значення, так як лимонна кислота легко піддається мікробіологічній деградації при очищенні каналізаційних вод. Міцелій продуцента лимонної кислоти використовують для виділення ферменту пектинази, а також флавінов або висушують і поставляють на корм худобі і домашній птиці.

*Одержання оцтової кислоти.* Оцет був відомий за тис. років до н. е.. Оцтовокисле бродіння викликають *Acetobacter oxidans*, *A. aceti*, *A. xylinum* та ін. Однак щоб розвилось оцтовокисле бродіння, цукор субстрату спочатку повинен перетворитися на етиловий спирт, тобто оцтовокислому бродінню передують спиртове. Спиртове бродіння найкраще здійснюють селекціоновані штами винних дріжджів (*Saccharomyces ellipsoideus*). Вони, крім етанолу, створюють побічні продукти обміну, що поліпшують смак і аромат оцту. Оцет розрізняється по сортах в залежності від характеру зброджуваного субстрату, наприклад, яблучний, виноградний, грушевий і інші сорти оцту. Аромат і смак оцту зумовлюють складні ефіри (етилацетат та ін.), вищі спирти, органічні кислоти.

Зазвичай оцтовокислі бактерії іммобілізуються (адсорбуються) на деревній стружці, деревному вугіллі, коксі і т.д. Пропускаючи розчин етанолу через такі генератори, отримують 10-15%-й розчин оцтової кислоти. На практиці з 100 л етанолу отримують 90 л оцтової кислоти. Щорічно у всьому світі виробляють понад 100 тис. т оцтової кислоти. Половину з цієї кількості отримують хімічним шляхом у вигляді технічної оцтової кислоти. Її використовують для виробництва ацетону, ацетилену, синтетичних барвників, медичних препаратів (аспірін, антипірін, фенацетин), ароматичних речовин (кумарин, ванілін), в якості субстрату для мікробіологічної біотрансформації. Особливо широко оцтова кислота застосовується в харчовій промисловості. Продуцент оцтової кислоти з роду *Acetobacter*, розвиваючись на поверхні середовища, утворює слизову плівку, яка складається з целюлози (90%) і клітин бактерій. Цю плівку знімають, висушують, обробляють і отримують біофільми медичного призначення. Якщо опікові рани покрити такими біофільмами, то вони загоюються протягом 7-8 діб.

*3.Інші органічні кислоти.* Джерелом вуглецю для пропіонових бактерій є глюкоза. Пропіонові бактерії - грампозитивні, безспорові, нерухомі палички. Всі вони відносяться до сімейства *Propionibacteriaceae*. Для

виробництва пропіонової кислоти використовують *P. freudenreichii* і *P. acidipropionici*, а для отримання вітаміну В<sub>2</sub> - *P. freudenreichii* і *P. acne*.

Біосинтез кислоти проводять на простих середовищах, наприклад, (у %): вуглевод - 1-2, амонію сульфат - 0,3, гідрофосфат калію - 0,2, кобальту хлорид - 0,0001, біотин - 0,00001, пантотенат - 0,1, тіамін - 0,01. Все ширше використовується біосинтез пропіонової кислоти клітинами іммобілізованими в гелі, наприклад, ПААГ (поліакриламідний гель).

Часто пропіонат і ацетат, як кінцеві продукти ферментації, не поділяють, так як обидві кислоти здатні до консервування. Відокремлені клітини використовують для отримання супероксиддисмутази (СОД), каталази, пероксидази і вітаміну В<sub>12</sub>. Висушений екстракт у вигляді порошку використовують у харчовій промисловості як антиоксидант і вітамінізований препарат.

*Глюконова кислота* продукується штамми *Aspergillus niger*, які культивуються в ферментаторах при інтенсивної аерації і перемішуванні, температура повинна бути постійною (30°C), а рН середовища 6,0-7,0. Апаратурне оформлення технологічного процесу одержання глюконової кислоти близько до виробництва лимонної кислоти глибинним методом. Міцелій гриба використовують для виділення глюкозооксидази, яка застосовується в харчовій і фармацевтичній промисловості. Селекціоновані штами *A. niger* продукують майже одну глюконову кислоту, тому для її виділення культуральну рідину фільтрують від міцелія, упарюють і висушують. Глюконову кислоту і її солі широко застосовують на практиці. Так, глюконат кальцію прискорює згортання крові, глюконат натрію використовується для виготовлення миючих засобів, глюконову кислоту використовують у фотографії, літографії, при виготовленні фарб, для очищення металів і т. д.

*Ітаконову кислоту* продукують *Aspergillus itaconicus* і *A. terreus*. Технологічний процес отримання ітаконової кислоти схожий з процесом отримання лимонної кислоти - ферментацію продуцента здійснюють поверхневим або глибинним методом. Ітаконову кислоту застосовують у хімічному синтезі високоякісних смол, волокон типу нитрон, детергентів, лікарських речовин, барвників та інших органічних сполук.

*Яблучна кислота* застосовується в органічному синтезі, наприклад, у синтезі урацилу. Її одержують хімічним шляхом з малеїнової кислоти або ж шляхом мікробіологічного синтезу. У результаті хімічного синтезу утворюється рацемічна суміш L,D-яблучної кислоти, а потрібен, як відомо, L-ізомер. Його отримують з фумарової кислоти за допомогою іммобілізованої фумарази, яка приєднує воду з утворенням L-яблучної кислоти. Для цього не потрібно ізольований фермент, а тільки клітини, що містять фумаразу. Японські фірми в якості носія клітин використовують гель каррагінана - полісахариду морських водоростей. Гранули іммобілізованих клітин завантажують в колону, через яку пропускають розчин фумарової

кислоти. На виході з колони отримують розчин L-яблучної кислоти. Період інактивації такої колони складає 160 діб.

## Лекція 9

### Медична біотехнологія

#### План

1. Антибіотики, способи отримання
2. Біотехнологічне одержання інтерферонів
3. Гормон росту
4. Генно-інженерне виробництво інсуліну
5. Фактори зсідання крові.
6. Вакцини. Загальна характеристика. Класифікація
7. Моноклональні антитіла

**1. Антибіотики, способи отримання.** Антибіотики – це специфічні хімічні речовини, що продукуються мікроорганізмами і здатні у малих кількостях справляти вибіркочу токсичну дію на інші мікроорганізми або клітини пухлин. Належать до вторинних метаболітів (ідіолітів) – низькомолекулярних сполук, що не потрібні для росту в чистій культурі.

Термін «антибіотик» походить від латинського слова *antibioticum*, що означає «проти життя». У 1889 р. французький лікар П. Віллемен запропонував термін «антибіозиз», що означав процес взаємного пригнічення організмів. Наприкінці XIX ст. російські лікарі В.А. Манасєїн та А.Г. Полотебнов застосовували зелену плісень для лікування гнійних ран. У 1896 р. Б. Гозіо виділив з грибів перший антибіотик – мікофенолову кислоту.

Німецький лікар Герхард Домагк відкрив перший сульфаніламід – пронтозил.

У 1913 р. К. Алсберг виділив пеніцилінову кислоту.

У 1921 р. Олександр Флемінг відкрив лізоцим.

У 1952 р. Зельман Ваксман (за походженням українець) отримав Нобелівську премію за відкриття стрептоміцину. Саме З. Ваксман запропонував термін «антибіотик». З 60-х років XX ст. учені перейшли від пошуку нових антибіотиків до модифікації структури вже відомих. З 1970 – 1980 рр. розпочалося промислове виробництво антибіотиків. У 1980 р. обсяг світового виробництва антибіотиків становив 25 000 т, а сьогодні – понад 100 000 т за рік.

Відомо більш ніж 6000 видів антибіотиків, хімічна структура встановлена лише для 1/3 з них. Антибіотики синтезуються в результаті сумісної дії продуктів 10–30 генів. Синтезувати антибіотики хімічним шляхом складно, дорого, практично неможливо. Хімічний синтез тетрацикліну радянським ученим академіком М.М. Шемякіним вважається одним із найвагоміших досягнень органічного синтезу.

У біотехнологічній промисловості основними продуцентами антибіотиків є бактерії *Streptomyces*, що мешкають у ґрунті. Один вид *Streptomyces griseus* синтезує більш ніж 50 антибіотиків. Найпоширенішими антибіотиками є пеніциліни, цефалоспорини, тетрацикліни.



Залежно від впливу антибіотики поділяють на такі групи:

- 1) антибактеріальні (тетрацикліни, аміноглікозиди, цефалоспорини);
- 2) протипухлинні (олівоміцин, рубоміцин, актиноміцин, карміноміцин);
- 3) протигрибкові (ністатин, гризеофулін).

*Молекулярні механізми дії антибіотиків* реалізуються за рахунок порушення таких процесів:

- синтез клітинної оболонки бактерій (пеніциліни);
- синтез білків (тетрацикліни, хлорамфеніколи);
- синтез нуклеїнових кислот (протипухлинні антибіотики);
- цілісність плазматичної мембрани (полієни).

У сільському господарстві антибіотики використовують не лише для боротьби з інфекційними захворюваннями рослин і тварин, а й для стимулювання росту тварин. Кормові антибіотики є висушеною біомасою продуцента, що, крім антибіотиків, містить амінокислоти, вітаміни, ферменти та інші біологічно активні речовини. Прикладом кормових антибіотиків є препарати на основі хлортетрацикліну (біовіт, біоміцин), одержані на основі біомаси бактерій *Bacillus Licheniformis*.

У медицині антибіотики використовують для лікування інфекційних (туберкульоз, менінгіт, плеврит, пневмонія) та онкологічних захворювань; у тваринництві – як добавки до кормів для покращання росту і розвитку молодняка; у харчовій промисловості – як консерванти; у біологічних дослідженнях – для з'ясування механізмів біосинтезу білка і нуклеїнових кислот, функціонування біологічних мембран, трансформації нормальних клітин у злоякісні під дією онкогенних вірусів.

Застосування технології рекомбінантних ДНК дозволяє створювати нові антибіотики з унікальною структурою, що мають сильнішу дію на певні мікроорганізми і володіють мінімальними побічними ефектами.

***Причини інтенсивного пошуку нових антибіотиків:***

- багато антибіотиків - незамінні лікарські засоби, широко застосовуються при лікуванні великої кількості інфекційних захворювань, які до відкриття антибіотиків, вважалися невиліковними або супроводжувалися високим летальним результатом (туберкульоз, чума, холера, черевний тиф та ін.);

- антибіотики - необхідні в сільському господарстві як лікарські препарати, що застосовуються в тваринництві, птахівництві, бджільництві та рослинництві;

- при широкому застосуванні антибіотиків в якості лікарських препаратів відбувається швидке накопичення резистентних до цих сполук форм мікроорганізмів, що вимагає пошуку все нових і нових антибіотиків;

- деякі антибіотики з успіхом застосовуються в харчовій промисловості в якості консервантів швидкопсувних продуктів;

- антибіотики - нові, раніше не відомі за хімічною будовою сполуки - представляють величезний інтерес для фахівців в галузі хімії природних

сполук, вивчення структури цих речовин; синтез деяких з них сприяв бурхливому розвитку хімії та самої науки про антибіотики;

- антибіотики знайшли широке застосування в наукових дослідженнях в якості речовин, що використовуються при вивченні окремих сторін метаболізму організмів, розшифровки тонких молекулярних механізмів біосинтезу білка, механізму функціонування мембран та ін. Біохімічних перетворень як специфічні інгібітори певних реакцій;

- вивчення шляхів утворення антибіотиків сприяє глибокому проникненню у механізми синтетичної діяльності продуцентів цих БАР, розкриття основних етапів їх метаболізму.

**Основні напрямки пошуку нових антибіотиків** включають в себе:

1. Випробування нових продуцентів
2. Хімічна модифікація антибіотиків.
3. Мутасинтез: застосовують мутантні штами, у яких блокований синтез окремих фрагментів молекули антибіотика, в результаті отримують модифікований антибіотик.
4. Клітинна інженерія: отримують гібридні антибіотики з новими комбінаціями аглікона і цукрів.
5. Генетична інженерія - введення в геном мікроорганізму інформації про фермент, необхідний для модифікації антибіотика, що продукується.

**Механізми біосинтезу антибіотиків.**

*Особливості біосинтезу антибіотиків:*

- антибіотики не відносяться до прямих продуктів трансляції або взагалі матричного синтезу;

- антибіотики як вторинні речовини утворюються з первинних метаболітів;

- біосинтез молекули будь-якого антибіотика відбувається за участю ряду ферментів.

- біосинтез вторинних метаболітів фазоспецифічний: процес розвитку мікроорганізмів продуцентів вторинних метаболітів носить двофазний характер:

1. *Перша фаза розвитку (тропофаза* або фаза збалансованого зростання) характеризується тим, що в культурі продуцента антибіотика відбувається швидке накопичення біомаси, що супроводжується інтенсивним споживанням основних компонентів субстрату (джерел вуглецю, азоту, фосфору та ін.), зниженням значення рН середовища в результаті утворення кислих продуктів. Біосинтез антибіотика в цей період не відбувається або здійснюється в незначній кількості. Ця фаза повинна бути швидкою, а живильне середовище – дешевим.

2. *Друга фаза (ідіофаза* або фаза незбалансованого зростання) характеризується зниженням загальної кількості біомаси. У цей період відбувається розвиток мікроорганізму і утворення нових клітин, але в культурі починають переважати автолітичні процеси, що призводять до зниження загальної кількості біомаси. Середовище збагачується продуктами

обміну і продуктами автолізу клітин, зростає значення рН, відбувається інтенсивний процес біосинтезу антибіотика. У другій фазі ферментацію ведуть на продуктивному середовищі.

#### **Продуценти антибіотиків.**

Всі антибіотики виділені в ході систематичного скринінгу мікроорганізмів; їх число було збільшено шляхом хімічної модифікації, мета якої полягає у:

- 1) розширенні спектру дії та підвищення ефективності антибіотиків;
- 2) зниженні токсичності та усуненні небажаних побічних ефектів;
- 3) створенні аналогів, стійких до руйнування мікробами, і тому володіють великим часом «напівжиття»;
- 4) удосконаленні способів введення антибіотиків.

#### **Основні групи продуцентів антибіотиків:**

*Неспорообразующие* бактерії: *Pseudomonas aeruginosa*

*Спороутворюючі* бактерії: штами *Bacillus subtilis* і *B. Brevis*

*Актиноміцети*: крім пеніциліну, найбільш важливі антибіотики отримані з актиноміцетів. До теперішнього часу виділено або описано понад 200 таких сполук (стрептоміцин, тетрациклін, еритроміцин, новобиоцин, неоміцин та ін.).

*Мікроскопічні грибки*: цефалоспорин, гризеофульвін, микофенолову і пеніцилінову кислоту, гліотоксін, клавацін, аспергіллову кислоту та ін.

Водорості здатні виробляти речовини, що володіють антибіотичними властивостями, але поки жодне з них не знайшло клінічного застосування.

*Лишайники*: лихенін і уснинова кислота.

*Вищі рослини* утворюють антибактеріальні речовини, подібні за своїми властивостями істинним антибіотикам: фітонциди - аліцин, томатина та ін.

*Тварини*: серед продуктів тваринного походження, що володіють антибактеріальними властивостями, важливе місце займає лізоцим. Багато найпростіших, личинки комах і деякі ін. Тварини можуть перетравлювати живі бактерії і грибки, але поки не з'ясовано, якою мірою ця здатність пов'язана з виробленням речовин, що володіють антибіотичними властивостями.

#### **Існує 3 способи отримання антибіотиків.**

*Біологічний синтез*. Для отримання антибіотиків цим способом використовують штами мікроорганізмів, що утворюють найбільшу кількість антибіотика.

*Хімічний синтез*. За допомогою цього методу одержують основні синтетичні антибіотики.

*Комбінований спосіб* є поєднанням двох попередніх способів: з отриманого в результаті біологічного синтезу антибіотика виділяють так зване ядро (6-амінопеніциланової кислоту з пеніциліну) і хімічним шляхом додають до нього різні радикали. Антибіотики, отримані комбінованим способом, називаються *напівсинтетичними*, до яких більш тривалий час

чутливі мікроорганізми, стійкі до природних антибіотиків. Комбінований спосіб - найбільш економічно вигідний метод виробництва антибіотиків.

### **Шляхи підвищення виходу антибіотиків**

1. Пряма ферментація продуцента з відповідним попередником, що індукує синтез ферментів вторинного метаболізму в ідіофазе. Встановлено, що молекули попередника необхідно додавати в середу в період фази росту мікроорганізму.

2. Біосинтез антибіотиків із застосуванням блокованих мутантів, у яких відсутня або блокована певна ланка в ланцюзі реакцій, що ведуть до синтезу антибіотиків. Блоковані мутанти не здатні утворювати потрібний антибіотик і переводять у аналоги сам антибіотик в ході процесу, відомого як мутаційний біосинтез (мутасинтез).

3. Шляхи створення високоактивних штамів продуцентів антибіотиків за допомогою рДНК-біотехнології. Великий ефект в отриманні антибіотиків забезпечує технологія рДНК: з її допомогою можна створювати нові антибіотики з унікальною структурою, які надають потужний вплив на певні мікроорганізми, що володіють мінімальними побічними ефектами; генно-інженерні підходи можуть застосовуватися для збільшення виходу антибіотика і для зниження вартості їх виробництва.

### **Удосконалення виробництва антибіотиків**

За допомогою методів генетичної інженерії можна не тільки створювати нові антибіотики, але і збільшити ефективність синтезу вже відомих. Лімітуючим фактором в промисловому виробництві антибіотиків за допомогою *Streptomyces spp.* часто є кількість доступного клітинам кисню. Внаслідок поганої розчинності кисню у воді і високої щільності культури *Streptomyces spp.* його часто виявляється недостатньо, ріст клітин сповільнюється і вихід антибіотика знижується. Для того, щоб вирішити цю проблему, можна:

1. Змінити конструкцію біореакторів, в яких вирощується культура *Streptomyces*;

2. Застосовуючи методи генетичної інженерії, створити штам *Streptomyces*, які більш ефективно використовують наявний кисень.

Ці два підходи не виключають один одного.

### **2. Біотехнологічне одержання інтерферонів**

Інтерферони (ІНФ) відкриті в 1957 р Айзексом і Ліндемманом в Національному інституті медичних досліджень у Лондоні (Англія) як фактори стійкості до вірусної інфекції. Встановлено, що клітини тварин, які зазнали впливу вірусу, виділяють в середовище чинник, здатний надавати клітинам стійкість до вірусної інфекції: він як би перешкоджає розмноженню вірусів у клітині і в силу цієї здатності був названий інтерфероном. ІНФ - група біологічно активних білків або глікопротеїнів, синтезованих клітинами організму у відповідь на вплив різних агентів-інтерфероногенів, якими можуть бути віруси, бактерії і продукти їх метаболізму, антигени і мітогени,

що регулюють деякі функції клітини. ІНФ виконують важливі для організму функції:

- гальмування росту пухлинних клітин за рахунок посилення цитотоксичної активності лімфоцитів, макрофагів, природних кілерів,
- стимуляції синтезу фактора некрозу пухлин,
- активації інтерферогенезу (*праймінг*)
- стимуляції утворення антитіл та ін.

ІНФ є видоспецифічними клітинними білками, кожному виду тварин властивий свій білок. ІНФ птахів, гризунів, великої рогатої худоби і людини захищають від вірусів тільки клітини свого виду, хоча є виключення - людський ІНФ захищає клітини великої рогатої худоби краще, ніж коров'ячий. ІНФ не є вірус-специфічним і виробляється у відповідь на дію багатьох вірусів.

Розрізняють  $\alpha$ -,  $\beta$ - і  $\gamma$ -інтерферони. Розшифровка структурних генів дозволила також отримати рекомбінантний інтерферон. За хімічним складом  $\alpha$ -ІНФ є білком, а  $\beta$  і  $\gamma$ -інтерферони - глікопротеїни.

Наприкінці 70-х рр. стала очевидною потенційна значимість інтерферонів для медицини, у тому числі в якості профілактики онкологічних захворювань. Клінічні випробування стримувалися відсутністю достатніх кількостей інтерферонів і високою вартістю препаратів, отриманих традиційним способом (виділення із крові). Так, у 1978 р. для одержання 0,1 г чистого інтерферону в Центральній лабораторії охорони здоров'я Гельсінкі (лабораторія – світовий лідер у виробництві інтерферону з лейкоцитів здорових людей) переробляли 50000 л крові. Така кількість препарату приблизно могла забезпечити лікування проти вірусної інфекції 10000 випадків. Перспективи одержання інтерферонів пов'язували з генною інженерією.

У 1980 р. В. Гілберту й А. Вейсману в США вдалося отримати інтерферон у генетично сконструйованій *E. coli*. Вихідні труднощі, з якими вони зіткнулися, – низький рівень мРНК у лейкоцитах, навіть стимульованих ураженням вірусом. За переробки 17 л крові вдалося виділити мРНК і одержати ДНК-копію. Останню вмонтували до плазміди й клонували в *E. coli*. Було випробувано понад 20000 клонів. Окремі клони були здатні до синтезу інтерферону, але з низьким виходом – 1...2 молекули на клітину. Аналогічні дослідження здійснювали в Японії, Англії, Франції, Росії.

Зусилля, спрямовані на одержання генно-інженерних інтерферонів, порівняно з методом культури клітин, дозволили знизити витрати більш ніж у 100 разів. Було отримано різні типи інтерферонів на основі генно-інженерних клітин бактерій і дріжджів. Це дало змогу розгорнути медико-біологічні й клінічні випробування препаратів. Одержувані протягом 1980–1981 рр. препарати інтерферонів було очищено на 80% і вони мали питому активність більше 107 міжнародних одиниць на 1 мг білка. Розширення клінічних випробувань інтерферонів, розпочатих у цей період,

залежало від підвищення ступеня їх очищення. Прогрес у цьому напрямку був досягнутий застосуванням моноклональних антитіл, які можна використовувати для афінної хроматографії (при цьому необхідні білки затримуються у колонці з антитілами).

Інтерферони володіють двома типами біологічної активності – противірусної й протиклітинної. Відносно вірусів дія трьох інтерферонів майже однакова за ефективністю, але відносно клітин більш активний  $\gamma$ -інтерферон, причому, проти пухлинних клітин він активніший, ніж проти нормальних клітин. На практиці інтерферони застосовують за вірусних інфекцій, ревматоїдного артриту ( $\gamma$ -інтерферон), імунопатології та в онкології.

**3. Гормон росту** (соматотропний гормон) - білок, що секретується передньою долею гіпофіза хребетних тварин. Наявність його в екстрактах з гіпофіза було відзначено в 1921 рр. Евансом і Дж. Лонгом, але лише через два десятиліття в 1944 р він був отриманий у вигляді очищеного препарату, а в 1948 р - в кристалічному вигляді. У гіпофізі людини міститься від 3,7 до 6 мкг гормону росту, він представлений одним поліпептидним ланцюжком з 191 амінокислотного залишку. Нестача даного гормону призводить до захворювання - гіпофізарної карликовості. Вихід гормону з одного гіпофіза становив 4-6 мг в перерахунку на готовий фармацевтичний препарат.

Крім недостатньої кількості, препарат, що одержували екстракцією, був гетерогенним, проти нього вироблялися антитіла, що зводили нанівець дію гормону. Більш того, існувала небезпека, що при отриманні препарату могло статися зараження організму вірусами, що повільно розвиваються. Тому діти, які одержували даний препарат, потребували багаторічного медичного спостереження.

Гормон росту людини, синтезований в спеціально сконструйованих клітинах бактерій, має очевидні переваги, до яких відносяться доступність у великих кількостях, висока біохімічна чистота і відсутність у препараті вірусних забруднень. Кінцевий вихід гормону склав 2,4 мкг на 1 мл культури або 1% від розчинених білкових клітин цього генетично сконструйованого штаму *E.coli* (100000 молекул на клітину).

Синтезований в бактеріях гормон володів потрібної молекулярної масою і не був пов'язаний з яким-небудь бактеріальним білком, від якого його необхідно було б відщепити. З 1984 р після випробувань на токсичність компанією «Генентек» (Сан-Франциско) розпочато широкомасштабне виробництво бактеріального СТГ. Вартість гормону до 1990 знизилася до 5 доларів/од.

**4. Інсулін** - це циклічний гетерогенний пептид, що містить 51 амінокислотний залишок і складається з двох поліпептидних ланцюгів, з'єднаних двома дисульфідними містками. В одному з ланцюгів, крім того, є внутрішній дисульфідний місток. У ланцюзі А міститься 21, а в ланцюзі В - 30 амінокислотних залишків.

Інсулін синтезується у вигляді одноланцюгового попередника - препроінсуліну, що містить кінцевий сигнальний пептид (23 амінокислотних залишки) і 35-ланковий сполучний пептид (С-пептид). При видаленні сигнального пептиду в клітині утворюється проінсулін, що складається з 86 амінокислотних залишків, в якому А- і В-ланцюги інсуліну з'єднані С-пептидом, що забезпечує їм необхідну орієнтацію при замиканні дисульфідних зв'язків. Після протеолітичного відщеплення С-пептиду утворюється інсулін.

З часу проведення перших дослідів з використання інсуліну для лікування діабету в 1922 р цей гормон виділяли з підшлункової залози тварин (корів і свиней). Встановлено, що коров'ячий і свинячий інсуліни, які є найбільш близькими до інсуліну людини за своєю будовою і амінокислотної послідовності, проявляють в організмі людини активність, порівнянну з інсуліном людини. Після цього довгий час для лікування пацієнтів, які страждають на цукровий діабет I типу, застосовували інсуліни корови чи свині, але через деякий час було показано, що в ряді випадків в організмі людини починають накопичуватися антитіла до коров'ячого і свинячого інсуліну, тим самим, зводячи нанівець їх дію. З іншого боку, однією з переваг цього методу отримання інсуліну є доступність вихідної сировини, що й зіграло вирішальну роль при розробці *першого способу отримання інсуліну людини*. Цей метод отримав назву *напівсинтетичного*. При цьому способі отримання інсуліну людини в якості вихідної сировини використовували свинячий інсулін. Від очищеного свинячого інсуліну відщеплювали С-кінцевий октапептид В-ланцюга, після синтезували С-кінцевий октапептид людського інсуліну. Потім його хімічно приєднували, знімали захисні групи і очищали отриманий інсулін. При тестуванні даного методу отримання інсуліну було показано повна ідентичність отриманого гормону інсуліну людини. Основний недолік даного способу полягає у високій вартості інсуліну, що отримується.

Інсулін, як корів, так і свиней трохи відрізняється за амінокислотної послідовністю від інсуліну людини. Особливо близькі інсуліни людини і свині: в останнього лише С-кінцевий треонін В-ланцюга замінений на аланін. Інсуліни корови і людини різняться трьома амінокислотним залишкам, саме цими відмінностями визначається підвищена імуногенна активність інсуліну корови в порівнянні з інсуліном свині.

В даний час інсулін людини в основному отримують 2 способами:

- Модифікацією свинячого інсуліну синтетико-ферментативним методом;
- Генно-інженерним методом.

У першому випадку метод заснований на заміні аланіну на треонін.

У 1981 р синтезований ген-аналог проінсуліну - міні-С-проінсулін, в якому 35-ланковий С-пептид був замінений на сегмент, що складається з 6 амінокислот.

Згодом був випробуваний альтернативний метод: в 1980 р У. Гілберт з співавторами виділили мРНК інсуліну з пухлини  $\beta$ -клітин підшлункової залози щура і за допомогою зворотної транскриптази отримали з неї кДНК. Отриману кДНК вбудували в плазмиду *E.coli*, в середню частину гена пеніцилінази. Рекомбінантна плазміда містила інформацію про структуру проінсуліна. В результаті трансляції мРНК в клітинах синтезувався гібридний білок, що містить послідовності пеніцилінази і проінсуліна.

### 5. Фактори згортання крові

Бактерії легко модифікуються методами генної інженерії, швидко розмножуються і їх зручно використовувати в промислових біотехнологічних установках. Однак, для нормального функціонування білків людини дуже важливі ті зміни, які відбуваються на післятрансляційному рівні: глікозилірування, ацетилювання, фосфорилірування, карбоксилірування й деякі інші перетворення. Більша частина біохімічних механізмів, що забезпечують ці процеси, відсутня у прокариот, і білки, синтезовані ними з матриць генів людини, не повністю ідентичні білкам із клітин людського організму.

Незважаючи на активний розвиток біотехнології в останні десятиліття, основним джерелом багатьох необхідних фармакології лікарських білків людини є донорська кров. Це фактори зсідання крові – фібриноген, антитромбіни, альбумін, імуноглобуліни й інші білки, без використання яких важко уявити собі сучасну медицину. Достатня кількість якісних і дешевих лікарських білків людини могло б урятувати багатьох пацієнтів.

Найбільший прогрес у виробництві трансгенних продуктів був досягнутий у цілеспрямованій трансгенній експресії в епітеліальні клітини молочної залози і синтезі білків поряд з молоком. Структурний ген, що пов'язаний з промотором гена молочної протеїну, в першу чергу, буде здійснювати експресію у клітинах молочної залози. Використання молока доцільне тому, що воно утворюється в організмі тварини у великій кількості, його можна надоювати за необхідністю без шкоди для тварини. Запропоновано новий термін *біофармінг*, який належить до процесу отримання з молока білків людини або фармацевтичних препаратів.

В одному з варіантів подібної процедури використовували рДНК, що містить промотор  $\beta$ -лактальбумина. Цей промотор забезпечує транскрипцію гена  $\beta$ -лактальбумина - одного з білків молока, але якщо його з'єднати з ін. геном (з геном фактора ІХ - білка, що бере участь у згортанні крові), то промотор буде включати транскрипцію цього гена і синтез відповідного білка. Рекомбіновану плазмиду з промотором  $\beta$ -лактальбумина і геном людини вводять в яйцеклітину вівці (шляхом ін'єкції), і яйцеклітину імплантують в матку вівці; деякі особини з її потомства будуть містити в своєму геномі ген людини (трансгенні тварини). Трансгенні тварини синтезують білок, який кодується геном людини; оскільки промотор  $\beta$ -лактальбумина функціонує тільки в молочній залозі, а в інших органах він неактивний, то білок, який кодується геном людини (фактор ІХ),



синтезується в молочній залозі і секретується з молоком. Синтезований білок виділяють з молока трансгенних тварин.

Також біотехнологічним шляхом отримують фактори згортання крові, особливо фактор VIII (з допомогою культивованих клітин ссавців) і фактор IX (за допомогою генно-інженерного штаму *E. coli*), необхідні для терапії форм гемофілії спадкової хвороби, при якій кров втрачає здатність згортатися.

**6. Вакцини. Загальна характеристика. Класифікація.** Вакцини - великий клас препаратів, які несуть антигенні ознаки одного або декількох збудників інфекційних захворювань, призначених для створення активного штучного імунітету з метою профілактики та лікування відповідного інфекційного захворювання людини або тварини.

Основним діючим началом кожної вакцини є іммуноген, тобто корпускулярна чи розчинена субстанція, що несе хімічні структури, аналогічні компонентам збудника захворювання, відповідальним за вироблення імунітету.

Існують наступні види вакцин:

- Живі вакцини
- Інактивовані (вбиті) вакцини
- Хімічні (субодиничні) вакцини
- Генно-інженерні вакцини

*Живі вакцини* являють собою імунопрофілактичні препарати, що складаються з спадково змінених форм збудників інфекційних хвороб (бактерій, рикетсій і вірусів). Використовувані в таких вакцинах штами з ослабленою вірулентністю називають атенуйовані. Прикладом живих вакцин можуть служити вакцини проти поліомієліту, корі, паротиту, краснухи або туберкульозу. Ці вакцини можуть бути отримані шляхом селекції.

Живі вакцини одержують шляхом штучного атенування або відбираючи природні невірулентні штами, або за допомогою генетичної інженерії на рівні хромосом з використанням рестриктаз.

Методи отримання атенуйованих штамів:

1. Використання селекції мутантів, що виникли спонтанно (дивергентних ліній) з ослабленою вірулентністю (чумна, поліомієлітна та інші вакцини).

2. Вплив на геном збудника різноманітними методами:

- тривале культивування в несприятливих умовах (вакцини БЦЖ, проти сибірської виразки та ін.);

- пасирування збудника на несприйнятливих тваринах (*антирабична вакцина проти сказу*);

- вплив мутагеном на генетичний матеріал бактерії або вірусу.

3. Штучне отримання генетичних рекомбінантів, що володіють зниженою вірулентністю, але зберегли іммуногенність.

*Інактивовані вакцини* отримують шляхом хімічного або фізичного впливу на мікроорганізми (бактерії, рикетсії і віруси) зі збереженням їх

фізичної структури. Відповідно до методу отримання вакцин їх називають гріти, формалінові, ацетонові, спиртовими, фенольні і т.д. Такі вакцини є стабільними і безпечними, тому що не можуть викликати реверсію вірулентності. Найчастіше вони не вимагають збереження на холоді, що обумовлює зручність їх застосування. *До позитивних сторін* інактивованих вакцин відносять: легкість дозування, високий ступінь очищення, можливість тривалого зберігання і низьку чутливість до температурних коливань.

Однак у цих вакцин є ряд *недоліків*, зокрема, вони стимулюють більш слабку імунну відповідь в порівнянні з живими вакцинами і вимагають застосування декількох доз; значний вміст баластних речовин (до 99%).

*Хімічні (субодиничні) вакцини* створюються з антигенних компонентів, витягнутих з мікробної клітини (ацелюлярна вакцина проти кашлюку, кон'югована вакцина проти гемофільної інфекції та ін.). Виділяють антигени, що визначають імуногенні характеристики мікроорганізму. Цей тип вакцин називають молекулярними вакцинами.

*Генно-інженерні вакцини.* У 70-х рр. ХХ ст. успіхи генетичної або клітинної інженерії дозволили розробити принципово нову технологію отримання противірусних вакцин, які отримали назву генно-інженерних вакцин. Генно-інженерні вакцини - препарати, отримані із застосуванням рекомбінантних мікроорганізмів. 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 субодиничних 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.

7. *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*).

**Лікарські речовини, що пов'язані з моноклональними антитілами.** Часто ліки, які використовують при певних захворюваннях не виявляють необхідної ефективності, що може бути пов'язане з тим, що вони не доходять до органу чи клітини необхідної концентрації. Для полегшення доставки лікарської речовини до місця дії можна приєднувати її молекули до моноклональних антитіл специфічних по відношенню до певних ділянок поверхні визначених клітин, наприклад, пухлинних (рис. 48).

Для цього потрібно, щоб моноклональне антитіло було в необхідній кількості і достатньо очищене, зв'язувалося з високоспецифічним білком клітини-мішені і за необхідності мало здатність проникати в середину пухлини. У цьому разі доза лікарської речовини, що необхідна для лікування, значно зменшується порівняно з безпосереднім використанням.

**Застосування моноклональних антитіл.** Найбільш широко використовуються моноклональні антитіла в медичній діагностиці. Якщо до антитіл приєднати радіоактивні або магнітоактивні матеріали й ввести їх у живий організм, то можна виявити в ньому патологічні зони. Такі моноанти приєднуються до уражених хворобою клітин організму, а відповідні індикаторні матеріали дозволяють з'ясувати їхнє місцезнаходження.

Набори моноантів можуть бути також призначені для боротьби з алергенами.

Моноклональні антитіла застосовуються у медичній терапії для знайдення «мішені». Припускається, що різні ракові захворювання обумовлені активацією ендогенних генів, які викликані хімічними агентами, внутрішніми хромосомними перебудовами. Ці гени кодують певні білки, і тому ракові клітини можуть містити унікальні білки на поверхні клітини. Можливо, саме ці білки беруть участь у супресії росту здорових клітин. Інактивувавши ці білки, можна гальмувати ріст ракових клітин.

## Лекція 10 СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКА БІОТЕХНОЛОГІЯ

### План

1. Промислове одержання кормових добавок.
2. Біотехнологічна модифікація рослинних кормів.
3. Бактеріальні закваски. Премікси та пробіотики у тваринництві.
4. Біоенергетика. Біомаса як джерело енергії.
5. Отримання біогазу.
6. Виробництво біоетанолу і біодизелю. Перспективи виробництва водню.

*1. Промислове одержання кормових добавок.* Годування сільськогосподарських тварин повинно забезпечити максимальну, генетично обумовлену продуктивність при збереженні їх здоров'я і відтворної функції. В даний час в годівлі тварин використовують понад 500 різних видів кормів та кормових добавок. Це відходи маслоекстракційної і харчової промисловості, продукти мікробіологічного синтезу, солі макро- і мікроелементів, препарати вітамінів, ферментів, амінокислот, антибіотиків, транквілізаторів, сорбентів, антиокислювачів, смакових засобів та ін.

Роль біотехнології у виробництві кормів різного походження величезна. У сучасному світі тільки за допомогою цієї науки можливо ліквідувати постійно існуючий дефіцит кормів для с.г тварин та птиці.

Біотехнологічним шляхом отримано кілька кормових продуктів рослинного походження: гідролізна патока, тонкоподрібнена і технологічно оброблена деревина, РУК-1 і РУК-2.

У *кормовій гідролізній патоці* знаходиться до 30% сухих речовин, у тому числі 83-96% моносахаридів. В залежності від виду деревної сировини в СР (суха речовина) може бути 38-80% глюкози від суми всіх моносахаридів. У гідролізатах листяної і хвойної сировини ксилоза становить відповідно 25 і 13%. Причому розроблена технологія дозволяє відокремити від патоки шкідливі леткі домішки (метанол, формальдегід, ацетон, летючі феноли, фурфурол, лігногумінові речовини), а також надлишок гіпсу та сульфату амонію.

*Тонкоподрібнена і технологічно оброблена деревина* створюється в результаті комплексного термомеханічного та хімічного впливу на деревину. Це руйнує впорядковану структуру деревини і викликає частковий гідроліз полімерів. В отриманій таким чином кормовій добавці міститься до 20% легко засвоюваних цукрів.

Варіантом селективного гідролізу є культивування дріжджів на твердих частках лігноцелюлози, тобто гетерофазне культивування. Після ферментації біомасу відокремлюють разом з твердою фазою методом фільтрації. У висушеному продукті знаходиться до 20% білка.

**2. Біотехнологічна модифікація рослинних кормів.** Із зеленої маси люцерни, конюшини та травосуміші можна за сезон отримати понад 1 т протеїну з гектара. Вартість протеїну зеленої маси в 2,5-5 разів менша, ніж протеїну зерна. 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. У цьому процесі спонтанного бродіння контролюється загальна кислотність і співвідношення кислот.

**3. Силосування і сенажірування кормів.** Біоконверсія - ефективний спосіб подовження строків зберігання кормів. Одразу після порушення системи захисту рослинного організму своєю активність проявляють дріжджі і кислотоутворюючі бактерії. Вуглеводи при цьому перетворюються на спирт і органічні кислоти. У результаті відбувається природне консервування рослинних продуктів, тобто відбувається їх квашення. Головна мета прогресивних технологій консервування кормів (хімічне консервування, штучне зневоднення, консервування інертними газами і пр.) полягає у зниженні втрат сухих речовин при збереженні хорошої якості продукту.

Силосування - складний мікробіологічний та біохімічний процес консервування різної соковитої рослинної маси, що швидко псується. В основі силосування лежить молочнокисле бродіння. Причому молочної кислоти в силосі повинно бути в 2-3 рази більше ніж оцтової, а рН силосу становить 4,2-4,4. При цьому значенні рН не розвиваються гнилісні бактерії. Якщо ж виникають аеробні умови, то молочна кислота руйнується аеробної мікрофлорою, що приводить до псування силосу через розвиток гнильних процесів, накопичуються масляна кислота, аміак, триметиламін (оселедцевий запах), бацили ботулізму цвілеві гриби.

Сенажірування - різновид консервації корму, який створюється з пров'ялених до вологості 40-55% багаторічних і однорічних трав. Збереженість кормів забезпечується не за рахунок значної кислотності, а за рахунок фізіологічної сухості вихідної сировини, що зберігається в анаеробних умовах; рН сінажу - 4,4-5,6.

Силосування кормів завжди супроводжується втратами сухих речовин, до 15-20%, що пов'язано з життєдіяльністю мікрофлори.

Сучасним біотехнологічним прийомом стабілізації та біоконверсії кормів є застосування ферментних препаратів мікробного або грибного походження.

Відомо, що при консервуванні 1 м<sup>3</sup> соку зеленої маси з вуглеводів утворюється 15 кг органічних кислот, що супроводжується втратами приблизно 5% сухих речовин, а поживних - 70%. Для стабілізації соку, призначеного до згодовування тваринам протягом короткого терміну (1-3

доби), анаеробна ферментація економічно вигідніша ніж застосування хімічних консервантів. При цьому втрати сухих речовин незначні, а ацетат, що утворився, безпосередньо піддається окислення. Однак необхідна певна адаптація, зазвичай 7-20 днів, свиней, телят і курчат до такого підкисленого корму.

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.

**3.Бактеріальні закваски.** 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 для силосування кормів зазвичай готують на основі бактерій *Lactobacillus plantarum*. Застосовують також культури гомоферментативних молочнокислих бактерій *L. acidophilus*, *L. faecalis*, *Streptococcus lactis* або гетероферментативних - *L. brevis*. Бажано використовувати культури, які продукують L-молочну кислоту, яка піддається метаболізму і як вуглеводи служить джерелом енергії.

Крім монокультур при виготовленні заквасок для силосування застосовують суміші культур. До складу заквасок слід вводити бактерії з амілолітичною і целюлазною активністю. Нерідко практикують спільне застосування ферментів і заквасок. Застосування суміші культур дозволяє більш ефективно силосувати субстрати різного складу.

Закваски молочнокислих бактерій отримують методом глибинної ферментації з наступним відділенням клітинної маси та її висушуванням.

Для збільшення кількості протеїну в рослинних кормах використовують два прийоми:

- ◆ вирощування мікроорганізмів на крохмальвмісної сировині. Це підвищує кількість протеїну і збагачує продукти вітамінами. Наприклад, в дріжджах присутні всі вітаміни групи В і різні інші речовини, що стимулюють ріст і метаболізм;

- ◆ введення гідролітичних ферментів. Показано, що додавання таких ферментів до корму, збільшує приріст живої маси тварин і птахів в середньому на 10-15% і знижує витрати корму на 1 кг приросту на 5-7%.

Технологічний процес одержання білково-ферментного препарату складається з двох стадій: приготування посівного матеріалу і головної ферментації.

Дріжджову культуру в головному ферментаторі вирощують при температурі 30-32°C, з постійним перемішуванням і подачею повітря. Процес культивування головної ферментації триває 12 год. Слід пам'ятати, що живі клітини в організмі тварин перетравлюються важко, тому частина дріжджового білка не засвоюється. У зв'язку з цим культуральну рідину

підігривають до 90°C протягом півгодини. Готова продукція не може довго зберігатися, і тому її після завершення ферментації направляють на ферму для згодовування тваринам в суміші з іншими кормами.

Протеїнізацію крохмальвмістної і лігноцелюлозної сировини проводять і методом твердофазної ферментації. Так, при вирощуванні *Aspergillus niger* вміст протеїну в масі може підвищуватися до 17-20%, при цьому виділені культурою кислоти захищають середовище від забруднення. Великим недоліком твердофазної ферментації є трудність відведення теплоти. Тому процес проводять в тонкому шарі, а це збільшує розміри установок.

**Премікси та пробіотики в тваринництві.** Премікс - це однорідна маса подрібнених до необхідних розмірів мікродобавок і наповнювача, що використовується для збагачення комбікормів і білково-вітамінних добавок. Крім вітамінів, мікроелементів, амінокислот, до преміксу вводять сполуки, що володіють стимулюючою дією на організм тварин, а також речовини, що надають захисний вплив на корми і запобігають зниженню їх якості. Премікси сприяють поліпшенню смакових якостей корму і більш ефективному його використанню (антиоксиданти, емульгатори, ферменти, смакові добавки та ін.) До складу преміксів вводять сполуки, що здійснюють лікувальну і профілактичну дію (фуразолідон, сульфадимезин та ін.), заспокійливі речовини (транквілізатори), поверхнево-активні речовини (детергенти).

В якості наповнювача використовують пшеничні висівки, зерно пшениці тонкого помелу, кормові дріжджі, соєвий шрот. Вводять премікси у відповідні комбікорми для різних видів і груп тварин у кількості 1% (10 кг на 1 т).

Як відомо, близько половини всього заготовлюваного зерна йде як корм на тваринницькі ферми. Фуражне зерно можна витратити значно економніше, якщо підвищити в ньому вміст білка та інших кормових добавок, що покращують обмін речовин. У нас в країні щорічно випускається понад мільйон тонн мікробних білкових препаратів, що дозволяє підвищити поживну цінність майже 20 млн т зернових кормів. В основному це дріжджі, що вирощують на різних дешевих поживних середовищах. Добавка тонни дріжджів в зерновий раціон птахів дозволяє додатково отримати 1-1,5 т м'яса або 25-30 тис. яєць, у свинарстві - 0,4-0,6 т м'яса зберігаючи при цьому близько 5-7 т фуражного зерна.

Отже, завдяки біотехнології сільське господарство забезпечується високопоживними кормовими добавками, створеними на основі дріжджів, грибів або мікроорганізмів. З відходів сільськогосподарського виробництва отримують різноманітні, в т.ч. незамінні амінокислоти, що мають велике народногосподарське значення, спирти (етиловий, метиловий, бутиловий та ін.), всілякі органічні кислоти (лимонна, молочна, глюконова, оцтова, пропіонова, фумарова та ін.), розчинники (ацетон, бутанол), вуглеводи і їх

похідні (декстран, леван, ксантан, альгінова кислота пуллулан, склеролукан та ін.), ферменти мікробного походження.

Останнім часом все більшу увагу привертають *пробіотики*. Цей термін введений в наукову літературу в 1985 р. Згідно сучасним визначенням, пробіотики - це препарати, створені на основі живих, спеціально підібраних штамів мікроорганізмів або специфічні субстанції мікробного, рослинного або тваринного походження. При введенні в організм пробіотики позитивно змінюють ендогенну мікрофлору, що в кінцевому рахунку сприятливо впливає на фізіологічні функції і біохімічні реакції макроорганізму. Інші біодобавки, які селективно стимулюють ріст і розмноження бактерій, природних для людини і тварин, прийнято позначати *пребіотиками*. Комбіновані препарати, що містять пробіотики і пребіотики, називають *симбіотики*. Термін «еу-биотики» є синонімом слова «пробіотики».

Пробіотики не поступаються за ефективністю деяким антибіотикам і хіміотерапевтичним препаратам. Вони не здійснюють негативного впливу на мікрофлору шлунково-кишкового тракту, не змінюють екологію, сприяють кращому переварюванню і засвоєнню їжі і корму. Так, з більш ніж 100 асоціацій мікроорганізмів, виділених з рубця домашніх і диких тварин, був створений пробіотик целлобактерін. Цей препарат підвищував перетравність целюлози рослинних кормів, а у курей-несучок значно збільшував продуктивність і загальну масу знесених яєць. У наш час широку увагу привернули препарати групи ефективних мікроорганізмів, які будучи пробіотиками нового покоління, надають значний позитивний вплив на сільськогосподарські культури, організм тварин і людини.

Для підвищення ефективності годівлі все більше застосування знаходять мікробні препарати. Одні з них містять живі мікроорганізми-симбіонти бактерій шлунково-кишкового тракту (пропіовіт, пропіоцід, азоацід). Так, для профілактики шлунково-кишкових захворювань і підвищення продуктивності молодняку застосовують сухий ацидофілін і пропіовіт. У боротьбі з дисбактеріозами, для врівноваження біоценозів в шлунково-кишковому тракті використовують комплекс штамів мікроорганізмів. До таких препаратів відносять пропіоцід і азоацід. У свинарстві перспективний біфідобактерін. Препарат має лікувальну і профілактичну дію при гострих шлунково-кишкових розладах, нормалізує склад мікрофлори кишечника, стимулює ріст і розвиток порослят.

Спороутворюючі аеробні бактерії ефективні також в лікуванні захворювань шлунково-кишкового тракту сільськогосподарських тварин. Все ширше поряд з кормовими дріжджами використовують для годівлі тварин препарати грибного походження, в т.ч. виготовлені і за біотехнологічними рецептами.

Інші мікробні препарати отримують, використовуючи мікроорганізми, що не відносяться до нормальної мікрофлори травного тракту тварин. Такі препарати складаються з вбитих бактерій і використовуються в якості білкових добавок.



Таким чином, використання біотехнології у сільському господарстві розкриває вельми привабливі перспективи. Для тваринництва зусилля біотехнологів повинні бути спрямовані в першу чергу на виробництво необхідної кількості кормового білка з бактерій, грибів, дріжджів, водоростів, а також за рахунок біоконверсії рослинної сировини, що поновлюється. Важливою задачею є розробка сучасних заходів профілактики, діагностики та лікування інфекційних захворювань тварин на основі рестрикційного типування вірусних геномів, діагностичних ДНК або РНК-зондів, моноклональних антитіл, виготовлення генно-інженерних вакцин і вакцин-антигенів, різних пробіотиків і т.д.

**4. Біоенергетика** – це використання енергії біомаси (органіки, яка утворюється за рахунок фотосинтезу). "Зелене паливо" - так інколи називають паливо рослинного походження, сировиною для отримання якого є біомаса. Проте чим більше говорять про біоенергетику, тим частіше поняття "біопаливо" розуміють як рідке біопаливо (біодизель, біоетанол і метанол) та забувають про тверді і газоподібні - біогаз, синтез-газ, піролізні рідини, відходи сільськогосподарської та побутової продукції, залишки переробки деревини. Саме енергетичні рослини, які вирощуються для отримання енергії чи палива, у найближчому майбутньому створять конкуренцію газу та дизелю. До них належать харчові рослини (пшениця і цукрова тростина) і нехарчові (енергетична верба, тополя та багаторічні трави, ріпак, соя, соняшник, кукурудза, льон тощо).

Біомасу як джерело енергії можна використовувати у процесі безпосереднього спалювання деревини, соломи, сапропелю (органічних донних відкладів), а також у переробленому вигляді як рідке (ефіри ріпакової олії, спирти) або газоподібне (біогаз, біоводень) паливо. Конверсія біомаси у енергоносії може відбуватися фізичними, хімічними та біологічними методами; останні є найбільш перспективними.

Окрім рослинного матеріалу, одержувати енергію можна з різноманітних твердих і рідких відходів, що утворюються в процесі життєдіяльності людей у великих кількостях. Це побутові відходи, каналізаційні стоки міст, стоки та відходи виробництва і переробки сільськогосподарської продукції, величезна кількість органічних залишків після лісозаготівель і переробки деревини тощо.

Найпростіший спосіб перетворення біомаси в енергію полягає у згоранні - воно забезпечує тепло, яке можна перетворити в механічну або електричну енергію.

Але зовсім інша можливість **одержання енергії з біомаси тваринного і рослинного походження**, яка має багато переваг, - це анаеробне (без доступу кисню) зброджування під дією наявних у біомасі метанобактерій. Ці мікроорганізми активно розвиваються в будь-яких органічних рештках, а в результаті процесів їхньої життєдіяльності утворюється біогаз - газ, який приблизно на 60 % складається з метану (CH<sub>4</sub>) і на 40% - з вуглекислого газу (CO<sub>2</sub>). Синонімами до біогазу є такі терміни, як "каналізаційний газ",

"шахтний газ", "болотний газ", "газ-метан". Різноманітні види мікроорганізмів метаболізують вуглець з органічних субстратів у безкисневих умовах. Це процес так званого гниття, або безкисневого бродіння, що є частиною ланцюга живлення. Теплоємність біогазу досить велика: 1 м<sup>3</sup> утворює стільки ж тепла, скільки 600-800 г антрациту. Тонна органічних решток (гній, сміття тощо) дає до 500 м<sup>3</sup> біогазу. Щоправда, цей процес відбувається досить повільно, але безсумнівно його перевагою є те, що понад 80% енергії, яка міститься у стічних водах або відходах, вилучається у вигляді горючого газу.

**5. Отримання біогазу.** Використання біогазу економічно може бути дуже привабливим, не кажучи вже про екологічні вигоди. Не потрібно затрачувати зайві кошти на проведення газопроводу до віддаленого хутора, якщо його може забезпечити газом місцева свиноферма. Вирішення цієї і багатьох подібних проблем - застосування найбільш ефективної технології очищення стічних вод підприємств з одержанням біогазу і подальшої його утилізації у когенераційних установках з одержанням електричної і теплової енергії.

Технологія одержання біогазу дуже проста: гноєм, сміттям, соломою, листям заповнюють бетонні ємності або колодязі будь-якого об'єму. Ємність має бути щільно закрита, щоб не було доступу кисню. Газ, який утворюється в процесі бродіння, відводять у приймальні пристрої або безпосередньо в газову плиту. Такі установки діють у багатьох країнах світу. Найперші біогазові установки (БГУ) виникли ще до створення наукових основ метаногенезу. В Індії (Бомбей) вони були вже у 1900 р. У 1918 р. аналогічні установки з'явилися у Німеччині, у 1928 - в Англії, у 1930 р. - у США. Перші БГУ були спробою імітації природних процесів розкладання органічної речовини в болотах із виділенням болотного газу, що містить метан.

В Україні перший біореактор був запущений у Запоріжжі у 1959 р. В Індії акцент було зроблено на сімейні та громадські біогазові установки. До 1993 р. там налічувалося вже близько 2 млн БГУ. Програма децентралізації виробництва енергії, ініційована урядом Індії у 1995 р., забезпечила підтримку проектів з виробництва енергії у сільських громадах з використанням біогазу одиничною потужністю від 10 до 15 МВт. Широко розвинулося сімейне і громадське одержання біогазу в Китаї - у 1978 р. там функціонувало вже більше 7 млн БГУ. Крім сімейних, у країні є ще 600 великих і середніх БГУ, що використовують відходи тваринництва і птахівництва, а також виноробних і спиртових виробництв. Досить поширене одержання енергії за допомогою БГУ у Великій Британії, Австрії, Італії, Данії, Швеції, Нідерландах.

Нині малих установок у світі близько 6 млн. Високоєфективних БГУ (як промислових, так і централізованих сільськогосподарських), спроектованих на високому інженерному рівні, у світі нараховується близько тисячі. Приблизно 44% із них зосереджено у Європі, 14% - у Північній Америці.

### **6. Виробництво біоетанолу та біодизелю.**

Окрім біогазу, є й інші види біопалива, які можна використовувати для отримання енергії, у тому числі й на транспорті, - це біодизель і біоетанол. Вважається, що саме паливний етанол має найбільший потенціал з огляду на невичерпні джерела його отримання. Ними можуть бути трав'янисті рослини та деревина, відходи сільського господарства і деревообробної промисловості, а також побутове сміття.

*Етанол* - найдавніший продукт біотехнології, яка була застосована не пізніше IV тис. років до н. е. у Давньому Єгипті і Вавилоні. У цій технології цукри (глюкоза, сахароза та деякі інші) зброджують (ферментують) у безкисневому середовищі пекарськими (спиртовими) дріжджами. Ще донедавна майже весь етанол, отриманий шляхом дріжджового зброджування цукрів, використовувався виключно для виробництва алкогольних напоїв. Лише незначна його кількість, переважно отримана хімічним шляхом, застосовувалась у промисловості. Однак протягом останніх 25 років ситуація докорінно змінилася. Тепер уже більше половини світового виробництва етанолу використовується як додаток до палива для двигунів внутрішнього згоряння (бензину), і лише близько 15% - для виробництва спиртних напоїв.

Перші спроби використання етилового спирту як автомобільного палива були здійснені ще на початку XX ст. У 1902 р. на інтернаціональному конкурсі в Парижі демонструвалося більше 70 карбюраторних двигунів, що працювали на етиловому спирті та його сумішах з бензином нафтового походження. Однак етиловий спирт не почав відразу швидко й широко застосовуватися, тільки у 70-х роках XX ст. у зв'язку з катастрофічним погіршенням екологічної ситуації і нафтовою кризою почалося відродження інтересу до спиртів і, особливо, до етанолу. Це обумовлено тим, що етанол може бути отриманий з постійно відновлюваних джерел рослинної сировини, біомаси, а також побутових відходів. З 80-х років розпочалося масове використання бензинів, що містять 5, 10, 15 і 22% паливного етанолу, у Бразилії, США, Швеції, Нідерландах, Франції, Канаді і Колумбії.

Значний досвід у виробництві і використанні паливного етанолу з відновлюваної сировини накопичений у Бразилії, США, Канаді. На заправних станціях продають суміші бензину з етанолом E10 (10% етанолу), E85 (85% етанолу), E95 (95% етанолу) і чистий етанол E100. Основним виробником паливного етанолу у світі є Бразилія (12 млрд л на рік, що становить половину потреби країни у бензині і 57 % світового виробництва). Це стало можливим завдяки Національній програмі із широкомасштабного використання етанолу як автомобільного палива і субсидіям уряду, які одержали відповідну фінансову підтримку Світового банку. Весь бразильський етанол одержують із цукрової тростини ферментаційним способом.

У США кожна четверта тонна виробленого бензину містить етиловий паливний біоспирт. З відновлюваної сировини (головним чином, з кукурудзи)

на 58 підприємствах виробляється понад 4 млн т на рік паливного етанолу. Зростання цін на нафту стимулювало розробки більш економічних і екологічно чистих процесів виробництва етанолу. Дослідження, проведені у Канаді, свідчать, що використання палива E85 дозволяє знизити викиди парникових газів на 37%; оксиду вуглецю - на 25-39%; оксидів азоту - на 20%; летких органічних сполук - на 30%; канцерогенних ароматичних сполук - на 50%.

Надзвичайно важливим є глобальний позитивний ефект використання біоетанолу як палива, адже вуглекислий газ, що виділяється під час його спалення, має первинне атмосферне походження. Тобто його знову можуть асимілювати рослини, які потім будуть джерелом отримання цього самого паливного етанолу. Коли ж використовується викопне паливо, то виділений ним CO<sub>2</sub> є додатковим джерелом сумнозвісного парникового ефекту.

*Біодизельне паливо* виробляється з ріпаку та сої і на сьогодні коштує дорожче за традиційне дизельне паливо. Для отримання біодизельного палива можна використовувати також соняшкову і кукурудзяну олію, але найчастіше використовують ріпакову, оскільки собівартість виробництва зерна ріпаку, порівняно з іншими олійними культурами, найнижча.

Відомо, що кількість ріпаку, 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.

Ріпакова 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 соняшкового 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).

Біопаливо на основі рослинної олії ще у 1853 р. винайшли англійці. Двигун для нього був винайдений пізніше. 10 червня 1893 р. у місті Аугсбург, Німеччина, відомий інженер і конструктор Рудольф Дизель випробував свій перший одноциліндровий двигун, який був завдовжки 3 м та важив 4,5 т. Двигун вибухнув і ледь не вбив винахідника. На згадку про подію, 10 червня проголошено "Міжнародним днем біодизеля". У 1900 р. на Всесвітній виставці в Парижі Р. Дизель продемонстрував свій винахід і отримав головну нагороду.

Винахідник вірив, що майбутнє для його двигунів - за використанням біопалива. У 1912 р. він передбачав, що: "Використання рослинних жирів для виробництва палива може видаватись несуттєвим на той момент, але з плином часу такі жири можуть стати настільки ж важливими, як продукти з нафти та вугільної смоли". Справді, на той час біопаливо було набагато дорожчим від звичайного дизельного палива з нафти. Протягом 1920-х виробники дизельних двигунів переорієнтували свої двигуни на

використання дизпалива, виготовленого з нафти, що має меншу в'язкість порівняно з рослинними жирами. Нафтова промисловість увійшла на паливний ринок, оскільки виробництво палива з нафти було значно дешевшим, ніж з біологічної сировини. Як наслідок - багаторічний занепад виробництва біопалива. Лише нещодавно на тлі занепокоєння станом довкілля та зменшення різниці у вартості біодизельне паливо стало реальною альтернативою традиційному.

### ***Перспективи виробництва водню.***

*Біоводень* – газоподібний різновид біопалива, яке розглядають як найекологічніший енергоносіє, як *паливо третього покоління*.

На даний час у всьому світі щорічно виробляється близько 50 млн. тонн водню. З них приблизно 48% виробляється з природного газу, 30% з нафти, і 18% з вугілля. Тільки 62% водню виробляється як цільовий продукт, решта 38% є побічним продуктом нафтопереробки, коксохімії, виробництв хлору та каустичної соди тощо. При виробництві водню з вуглеводнів утворюється велика кількість  $\text{CO}_2$ , який є однією з причин глобального потепління. До того ж не всі країни мають власні вуглеводні.

Такі технології одержання водню, як парова конверсія метану або його часткове окиснення, газифікація вугілля, піроліз, електроліз є енергозатратними, і відповідно водень, одержаний за такими методами, має високу собівартість.

Рішенням цих проблем може стати виробництво водню з біомаси. Водень з біомаси отримують термохімічним (термолізом біомаси деревини, риформінгом біогазу) або біохімічним способом (разом із біобутанолом за рахунок бутилового або ацетонобутилового зброджування біомаси технічних рослин; шляхом фотосинтезу бактеріями і фотолізу біомасою водоростей).

*Термохімічний метод.* При термолізі біомасу нагрівають без доступу кисню до температури 500-800°C (для відходів деревини), що набагато нижче температури процесу газифікації вугілля. В результаті процесу виділяється  $\text{H}_2$ ,  $\text{CO}$  і  $\text{CH}_4$ .

Собівартість процесу \$ 5-7 за кілограм водню. В майбутньому можливе зниження до \$ 1,0-3,0.

Переробка біогазу. Водень можна отримувати риформінгом біогазу або лендфіл-газу (*термокаталітичний процес отримання для виробництва індивідуальних вуглеводнів і технічного водню в результаті каталітичних перетворень*). Спосіб вимагає великих затрат енергії та (або) коштовних каталізаторів, ретельної підготовки вихідних газів.

*Біохімічні методи.* Методом *бутилового бродіння* сахарози або крохмалю з 1 тонни меляси можна одержати до 140 м<sup>3</sup> водню, 1 т стебел солодкого сорго — 50 м<sup>3</sup>, 1 т картоплі — 42 м<sup>3</sup>. При *ацетонбутиловому* зброджування з 1 т картоплі одержують 25 м<sup>3</sup> водню, тоді як 1 т стебел солодкого сорго дає 30 м<sup>3</sup>.

Виробництво водню може ґрунтуватися на процесах фотосинтезу та фотолізу.

Вчені Каліфорнійського університету в Берклі в 1999 році виявили, що якщо водоростям не вистачає кисню і сірки, то процеси фотосинтезу у них різко слабшають і починається бурхливе утворення водню.

Водень може виробляти група зелених водоростей, наприклад, *Chlamydomonas reinhardtii*. Водорості можуть виробляти водень із морської води, або каналізаційних стоків.

Біохімічний метод *фотосинтезу* – продукування водню різними бактеріями, наприклад, *Rhodobacter sphaeroides*, *Enterobacter cloacae*. Можливе застосування різних ензимів (гідрогеназ та нітрогеназ) для прискорення виробництва водню з полісахаридів (крохмаль, целюлоза), що містяться в біомасі. Процес проходить при температурі 30°C і нормальному тиску. Собівартість водню близько \$ 2 за кг.

Гідрогентвірні фотобактерії та рослини продукують водень, використовуючи різні фотосистеми, для яких водень є побічним продуктом. За допомогою гідрогеназ будь-яка рослинна система може виділяти водень.

**Асоціації культур для одержання водню.** Перспективні напрями систем біоводню, що розробляються, - це отримання водню на основі мікробних популяцій хемосинтезуючих і фотосинтезуючих організмів, що ростуть.

Для отримання фотоводню розробляються різні біосистеми :

- однокомпонентні - фототрофи;
- двокомпонентні (рослини та бактерії);
- багатокомпонентні - системи, що містять ліофілізовані клітини ціанобактерій і пурпурних бактерій; системи, що містять ціанобактерії і водорості тощо.

**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 перенесення електронів фотосинтезуючих механізмів передбачає одержання вуглеводнів, водню, вуглекислоти, аміаку з неорганічних та органічних донорів при уловлюванні кванта енергії біоантенами через розділення зарядів у реакційному центрі.

Одержання водню як палива при фотолізі води активно продовжується на рівні пошукових розробок та комерційних програм.

Розкладання води під впливом світла може бути здійснено за умовою створення системи з розвиненою поверхнею розділу фаз, при якій при перенесенні електрону через межу розділу фаз первинні окислювач ( $D^+$ ) і відновлювач ( $A^-$ ) okazуються роз'єднаними у просторі, що запобігає їх швидкій рекомбінації. У якості молекулярних структур з розвиненою поверхнею пропонуються мікроемульсії, міцелярні та ліпідні розчини.

Вихід з положення може бути знайдений за рахунок підвищення вибірковості каталізаторів виділення кисню і окислення киснем саме води. До складу систем для розділення зарядів необхідно вводити компоненти, що стійкі до дії окислювачів. Рішення цих і деяких інших питань прискорить

створення молекулярної фотокаталітичної системи для розкладання води під дією світла – штучного аналога природного фотосинтезу.

## Лекція 11

### Використання біотехнології в харчовій промисловості

#### План

- 1 Роль біотехнології в одержанні харчових продуктів.**
- 2 Виробництво молочних продуктів.**
- 3 Виробництво хлібопродуктів.**
- 4 Бродильні виробництва, одержання білкових продуктів, харчових добавок й інгредієнтів**
- 5. Харчові добавки й інгредієнти**

#### **1. Роль біотехнології в одержанні харчових продуктів**

З часом стає все більш очевидним, що існує найтісніший зв'язок між продуктами харчування і здоров'ям людини. Неодноразово було доведено, що харчові продукти або їх окремі компоненти можуть бути єдиною причиною багатьох патологій. Нові технологічні підходи щодо виробництва харчових продуктів дають можливість зв'язати наукові нововведення масового виробництва харчових продуктів з можливістю отримання повноцінної і здорової їжі. Тісний взаємозв'язок між здоров'ям і харчовими продуктами дала початок нової течії у виробництві харчових продуктів – «функціональній їжі». За сучасними уявленнями, їжа повинна бути не тільки здоровою, але і функціональною, що передбачає її цілеспрямований вплив на організм.

Використання функціональної їжі служить двом цілям: в потрібній кількості дати організму метаболічно необхідні харчові компоненти і захистити його від можливих захворювань. Роль біотехнології полягає в отриманні екологічно чистої функціональної їжі або корму в масовій кількості. За допомогою біотехнології (ферментативний каталіз, культивування мікроорганізмів, культивування рослинних і тваринних клітин) можливе швидке вирішення проблеми як масового виробництва харчових продуктів, так і отримання різних функціонально важливих інгредієнтів.

Ферменти мікроорганізмів або технології, засновані на використанні самих мікроорганізмів, представляють найважливіший сектор сучасної харчової промисловості. Сьогодні виробництво харчових продуктів є найпоширенішою сферою промисловості і становить 20-25% бюджету практично будь-якої країни. Зв'язок між сільським господарством і споживачем продукції здійснюється через харчову промисловість. Завдання останньої - зробити із сільськогосподарської сировини продукти з високою харчовою цінністю, привабливі зовні, з добрим смаком і ароматом.

Сучасні методи біотехнології дають можливість масового виробництва окремих харчових компонентів, наприклад таких, як харчові органічні та амінокислоти, які широко застосовуються при виробництві продуктів і



напоїв. Ці продукти мають середню ціну. Дорогі харчові компоненти, вироблені в меншій кількості, це: білки високої чистоти і білки виключного амінокислотного профілю, біологічно активні харчові добавки, замінники цукру, ароматизатори та ін.

Існує два різновиди біотехнології, що розрізняються за цінністю одержуваних продуктів і за масштабами їхнього виробництва:

1. Біотехнологія маломасштабного виробництва;
2. Біотехнологія великомасштабного виробництва.

При виробництві харчових продуктів потрібний великий вихід продукту й проста технологія. Із цих причин головними в біотехнології харчової промисловості є методи великомасштабного виробництва продуктів. Спектр продуктів харчування, одержуваних за допомогою мікроорганізмів, великий: від вироблюваних із древніх часів за рахунок бродіння хліба, сиру, йогурту, вина й пива до новітнього виду харчового продукту - грибного білка мікопротеїна. Мікроорганізми при цьому відіграють важливу роль: використовуються продуковані ними ферменти або інші метаболіти, з їхньою допомогою зброджується харчова сировина, а деякі з них вирощуються для безпосереднього споживання.

Донедавна біотехнологія використовувалася в харчовій промисловості з метою вдосконалення освоєних процесів і більш вмілого використання мікроорганізмів, але майбутнє тут належить генетичним дослідженням зі створенням більш продуктивних штамів для конкретних потреб, впровадженню нових методів у технології шумування. Таким шляхом можна підвищити вихід і якість отримуваної продукції.

Передбачається, що в найближчому майбутньому харчова промисловість знайде свій розвиток у збільшенні врожайності рослин, підвищенні продуктивності мікроорганізмів і тварин. Цього можна досягти за допомогою всіх способів (класична селекція, мутагенез, клітинна та генна інженерія). Значні зміни очікуються в результаті впровадження генної інженерії в технологію виробництва харчових продуктів. Використання трансгенних високоврожайних, стійких до захворювань і швидкозростаючих рослин, мікроорганізмів і тварин може дати початок новим напрямкам галузі. Сучасна біотехнологія тісно пов'язана з усіма галузями харчової промисловості, починаючи з якісного поліпшення організмів, що беруть участь у технологічних процесах, і кінчаючи якістю харчових продуктів. Перетворення, що відбуваються в процесі виробництва харчових продуктів, являють собою природні біологічні процеси і протікають за допомогою ферментів. З іншого боку, для прискорення або удосконалення технологічних процесів в реакційне середовище штучно вводять ферменти.

## **2. Виробництво молочних продуктів**

У харчовій промисловості ферментацію застосовують головним чином для одержання молочних продуктів. У сквашуванні молока зазвичай беруть участь стрептококи й молочнокислі бактерії; лактоза при цьому перетворюється в молочну кислоту. Шляхом використання інших реакцій, які

супроводжують головний процес або йдуть при наступній обробці, одержують й інші продукти переробки молока: сметану, йогурт, сир й ін.

Різні процеси ферментації молока проводяться в контрольованих умовах. Протягом багатьох тисячоріч вони здійснювалися за участю бактерій, вже присутніх у молоці. У наш час для цього використовують різноманітні закваски, що дозволяють одержувати молочні продукти потрібної якості й типу. Необхідно відзначити, що технологія з використанням молочнокислих бактерій має ряд переваг завдяки наступним моментам:

- 1) молочнокислі бактерії інгібують розмноження небажаних мікроорганізмів, тим самим консервуючи молоко;
- 2) вони дозволяють отримати з молока високоякісний за смаком і структурі молочний продукт;
- 3) ці бактерії роблять позитивний вплив на здоров'я людини, перебуваючи в його кишечнику.

Один з найдавніших способів, заснованих на ферментації молока – сироваріння. При виробництві сиру зберігається поживна цінність 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 молоко створюють, для чого звичайно застосовують фермент ренін (хімозин, або сичужний фермент).

Виробництво сичужного ферменту у світовому масштабі становить 25 млн.кг. Незважаючи на це, сичужний фермент є дефіцитним і лімітуючим компонентом в технології виробництва сиру.

В результаті численних пошуків отриманий протеолітичний фермент мікробного походження з аналогічною сичужному ферменту субстратною специфічністю. Цей фермент частково заповнив дефіцит сичужного ферменту. Інша значна біотехнологічна новизна полягає в клонуванні гена реніну в одну з культур міцеліальних грибів. Це дозволило отримати абсолютний аналог сичужного ферменту.

Для промислових цілей сичужний фермент отримують з тваринних організмів (ягнят, телят, поросят) і з культур грибів.

Смак, аромат і якість різних сортів сиру визначають такі чинники: різновид молока (козяче, коров'яче овече), температура приготування сиру, наявність вторинної мікрофлори.

Якщо первинна мікрофлора - молочнокислі бактерії здійснюють формування сиру як продукту, то вторинна мікрофлора (бактерії, гриби) надають аромат і властивості, що визначають специфічний смак сиру.

Древнім продуктом, одержуваним шляхом ферментації є йогурт. Після термообробки молоко заквашують додаванням 2-3% закваски йогурту. Головну роль тут грають бактерії *Streptococcus thermophilus* й *Lactobacillus*

*bulgaricus*. Для одержання бажаної консистенції продукту, смаку й запаху ці організми повинні бути в культурі приблизно в рівних кількостях.

### **3. Виробництво хлібопродуктів**

Для виробництва хліба застосовують в основному дріжджі *Saecharomyces cerevisiae*. Звичайно їх ростять у ферментерах періодичної дії. У найпростішому випадку готують тісто, змішуючи при кімнатній температурі борошно, воду, дріжджі й сіль. При замісі шари тіста переміщуються, створюються умови для утворення пухирців газу й підйому тіста. Замішаному тісту дають можливість «підійти», а потім ріжуть на шматки потрібної ваги, формують і витримують у вологій атмосфері. При витримці газові пухирці, що утворилися, заповнюються вуглекислим газом. Він виділяється в ході анаеробного зброджування глюкози й мальтози борошна. Крім вуглекислого газу при анаеробному бродінні утворюються різноманітні органічні кислоти, спирти й ефіри. Всі вони впливають на формування смаку хліба. Тісто, що «підійшло», випікають. У ході цього термічного процесу крохмаль желатинізується, дріжджі гинуть і тісто частково збезводнюється. При випічці деяких сортів хліба із пшеничного борошна до тіста додають попередньо зброжену суміш житнього борошна й води, заквашену змішаною культурою лактобактерій. Кислота, що є в цій заквасці, надає хлібу особливий смак.

### **4. Бродильні виробництва, одержання білкових продуктів, харчових добавок й інгредієнтів**

Одне з найдавніших бродильних виробництв – одержання напоїв шляхом спиртового бродіння. Першими з таких напоїв були вино й пиво. Алкогольні напої одержують шляхом зброджування цукровмісної сировини, у результаті чого утворюється спирт і вуглекислий газ. Для отримання алкогольних напоїв застосовуються рослинні субстрати моно-, ди- і олігосахариди і полісахариди (крохмаль, целюлоза, інколи геміцелюлоза).

Полісахариди потребують попереднього гідролізу. Останній здійснюється відповідними ферментами (амілазами, целюлазами, геміцелюлазами) або, рідше, концентрованими неорганічними кислотами (для технічних цілей).

Целюлозо- і геміцелюлозовмісна деревна сировина вважається непридатною для отримання харчового етилового спирту. Етиловий спирт, отриманий таким шляхом, навіть незважаючи на високий рівень дистиляції, придатний лише для технічних цілей.

Алкогольні напої можуть бути класифіковані за різними ознаками:

- за технологічними параметрами на ферментовані і неферментовані;
- за вмістом алкоголю - концентровані, дистильовані і неконцентровані.

Все більшого значення у виробництві напоїв набувають біотехнологічні підходи. Процес ферментації (бродиння) має на увазі не тільки утворення спирту. У цьому процесі в межах метаболічних можливостей дріжджів відбувається послідовне перетворення значної

кількості сполук у середовищі, що зброджується. За допомогою методів сучасної біотехнології вдається розширити метаболічні можливості організмів, що беруть участь в бродінні, звідси очевидна роль біотехнології у виробництві алкогольних напоїв.

Більшість алкогольних напоїв отримано переробкою злаків або іншої крохмальвмісної сировини. У Скандинавських країнах, Голландії, Німеччині, Польщі, Україні та ін. традиційно популярно виробництво пива і міцних напоїв зі злаків. У південних країнах - Іспанії, Італії, Франції, Греції, Югославії, Грузії - більш традиційним вважається отримання напоїв на основі переробки винограду. Все більш популярним стає отримання напоїв різної міцності з фруктів (яблуко, слива, шовковиця, персик, плоди тропічних і субтропічних рослин) і меду.

**Вино.** Може здатися незвичайним, але технологія виробництва вина, в порівнянні з технологією виробництва пива є більш простою. Цей процес майже не змінився протягом 5000 років. Припускають, що вино - напій близькосхідний і європейський, в цих районах поширені різні сорти винограду. До сьогодення географія виноробства охоплює всі в цій області традиційно відомі країни: Францію, Італію, Іспанію, Німеччину, Грецію, Угорщину, Молдову, Росію, Україну і Закавказзя, де за поширеністю ендемних сортів винограду і технологій виробництва вина провідне положення займає Грузія. Значно зросла кількість країн, що виробляють вино, до них додалися Австралія, Китай, США, Чилі, Аргентина, Ізраїль, Південно-Африканська Республіка. У цих країнах кліматичні умови і ґрунт дозволяють вирощувати високоякісні сорти винограду. Протягом століть збирають урожай з білих і червоних, селективно підібраних сортів винограду і вичавлюють сік, що містить 15-25% цукру. Червоне вино одержують пресуванням чорного винограду і ферментацією всієї виноградної маси. Рожеве - додаванням шкірки червоного винограду в сік білого.

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.

Після завершення спиртового бродіння молоде вино зберігають в особливих умовах, щоб воно не зіпсувалося. Першосортні вина піддають витримці різного роду залежно від типу вина, а більш дешеві розливають, як правило, у той же рік, коли його отримали. 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.

Велика кількість літератури присвячено корисним властивостям вина. Як було встановлено, у вині міститься до 700 метаболітів, що мають різну хімічну природу, зокрема антиоксиданти і пептиди, харчові органічні кислоти, алкалоїди, стероїдні гормони, широкий спектр фенольних сполук, вуглеводи та ін. Наприклад, дослідження останніх десяти років підтвердили той факт, що вплив фенольних сполук на живий організм має багатостороннє значення. Їх роль в обміні речовин підтверджує особливу значимість цих сполук. Фенольні сполуки вина активно використовуються для лікування таких захворювань, як цинга, авітаміноз, плеврит, перитоніт, ендокардит, променева хвороба, глаукома, гіпертонія, ревматизм, атеросклероз та ін. Таким чином, виноградне вино можна розглядати як низькоалкогольний напій, що володіє унікальними лікувальними властивостями, помірне вживання якого може принести велику користь здоров'ю людини.

Із застосуванням технології рекомбінантних ДНК отримані дріжджові культури з розширеним метаболічним спектром. Деякі з них застосовуються тільки в конкретних випадках (зброджування лактози, целобіози, пентоз). У перспективі для приготування екологічно чистих вин доцільно створити такі форми дріжджів, які окрім своєї головної функції (бродіння) будуть здатні засвоювати і перетворювати ті хімікати, які передбачені агротехнічними заходами і часто потрапляють в ягоди винограду, а потім і в вино.

**Пиво.** Пиво отримують з злакових, що містять крохмаль найчастіше для цієї мети використовують ячмінь.

Ферментація або бродіння протікає в спеціальній посудині - біореакторі, де до розчину додається чиста культура дріжджів. Якщо можна внести якусь біотехнологічну новизну в цю сталу класичну технологію - це в першу чергу стосується культури дріжджів. З цією метою традиційно використовували селективне відібрані протягом сотень років дріжджі.

**Біотехнології у виробництві чаю, кави.** У країнах Східної Азії, Африки та Латинської Америки безалкогольні ферментовані напої готують з чайних і кавових рослин. У східних країнах з незапам'ятних часів чай використовували в якості підбадьорливого напою, проте технологія виробництва чаю була розроблена лише в ХХ в. Різноманітність чайного продукту залежить від виду рослин і технології переробки листа. Відомі три технології приготування чаю - чорного, зеленого і того, що знаходиться між ними за ступенем окислення дубильних речовин - жовтий чай. Готовий чай за ступенем ферментації розподіляється на такі категорії:

- Неферментований чай, в якому ступінь окиснення дубильних речовин (катехінів) не перевищує 12%;
- Слабкоферментований чай, ступінь окиснення дубильних речовин - до 12-30%;
- Ферментований чай, ступінь окиснення дубильних речовин - в межах 35-40%.

Кожна категорія готової продукції за ступенем окислення, в свою чергу, ділиться на більш дрібні групи. Неферментований - це зелений чай.

Для інактивації окислювальних ферментів сировину фіксують водяною парою і гарячим вологим повітрям. В результаті на наступних стадіях переробки в чайному листі не відбуваються процеси ферментативного окислення.

Чай другої категорії - слабоферментований, піддається частковій ферментації; до нього належать: жовтий, оолонг (червоний) і чорний чай.

Якщо під час виробництва зеленого чаю основним завданням є збереження катехинів в нативному стані, то під час виробництва ферментованого чорного чаю намагаються максимально окислити комплекс катехинів в чайному листі. Чорний чай, приготований за вказаною технології, характеризується інтенсивним настоєм і специфічним ароматом.

Для отримання чорного чаю свіжозібране листя піддають наступним технологічним операціям: в'яленню, скручуванню, ферментації і сушці. Зав'ялювання є важливим технологічним етапом, при якому відбуваються основні біохімічні зміни в чайному листі, що визначають смак і утворення ароматичних сполук під час процесу скручування і ферментації. Під час скручування чайного листа пошкоджується структура і порушується цілісність клітини, в результаті забезпечується контакт окислювальних ферментів і їх субстратів. У чайному листі ферментація здійснюється за рахунок ендогенних ферментів. Цим виробництво чаю відрізняється від багатьох інших процесів харчової промисловості, де ферменти додають штучно. У технологічному циклі виробництва чаю ферментація є центральним процесом, від якого в значній мірі залежить якість готової продукції.

Кавовий напій відомий людині з давніх-давен. Можна також припускати, що спочатку кава була не напоєм, а їжею. У кам'яних ступках африканські племена товкли плоди кавових дерев, змішували із тваринним жиром і ліпили з цієї суміші круглі кульки. Жир разом із протеїном сирої кави (у напої він втрачається) забезпечував достатню калорійність їжі, а кофеїн слугував стимулятором. Слідом за цим з'являється вино, приготовлене із соку спілих ягід кави, що перебродив, змішаного з холодною водою. Тільки після цього кава перетворюється на гарячий напій.

Плоди кавових дерев червоні або чорно-сині, розміром як велика вишня. Розкривши плід, можна побачити дві одягнені в рогову оболонку плосковипуклі насінини, покриті сріблястою шкірочкою. Насінини, так звані кавові зерна, прилягають одна до одної плоскими боками. Оточені вони більш-менш їстівним навколоплоддям. Кавовий плід за своєю структурою є кістянкою, а не бобом, як його іноді помилково називають. Зібрані вручну ягоди зазвичай піддаються обробці вологим способом. Вони поміщаються в протиральну машину, яка знімає з насіння більшу частину м'якоті. Потім насіння на один-три дні кладуться в баки, де під дією ензимів, що виникають природним шляхом, м'якоть, що залишилася, розкладається в процесі ферментації. Після цього насіння промивають, видаляючи останні залишки м'якоті. Частину з них сушать під сонцем на бетонних терасах або сушильних

столах, а частину - пропускаючи через сушарки з гарячим повітрям. Слідом за цим механічно видаляються шари сухої шкірки, що покривають насіння, яка складається з пергаментної і сріблястою оболонкою. Ферментація, яка здійснюється при обробці вологим способом, поряд з використанням тільки повністю дозрілих ягід дозволяє отримувати м'яку каву відмінної якості.

При виготовленні розчинної кави кавові зерна обсмажують, подрібнюють та обробляють гарячою водою. Одержаний концентрований розчин або висушують, перетворюючи на порошок (Порошкова кава), або заморожують та сушать у вакуумі для отримання сублімату (Сублімована кава), або кавовий порошок зволожують ще раз, перетворюючи в гранули (гранульована кава).

Мікроорганізми почали використовувати у **виробництві білкових продуктів** задовго до виникнення мікробіології. Це всілякі різновиди сиру, а також продукти, одержувані шляхом ферментації соєвих бобів. І в першому, і в другому випадку поживною основою є білок.

За багатьма важливими показниками біомаса мікроорганізмів може мати досить високу поживну цінність. У чималому ступені ця цінність визначається білками: у більшості видів вони становлять значну частку сухої маси клітин.

Для мікробного білка придумана спеціальна назва - білок одноклітинних організмів (БОО). Виробництво його пов'язане з великомасштабним вирощуванням певних мікроорганізмів, які збирають і переробляють у харчові продукти. В основі лежить технологія ферментації. Щоб здійснити більш повне перетворення субстрату в біомасу мікробів, потрібен багатобічний підхід. Вирощування мікробів у харчових цілях становить інтерес по двох причинах:

1. Вони ростуть набагато швидше, ніж рослини або тварини: час подвоєння їхньої чисельності вимірюється годинами. Це скорочує строки, потрібні для виробництва певної кількості їжі.

2. Залежно від вирощуваних мікроорганізмів як субстрати можуть використовуватися різноманітні види сировини.

Що стосується субстратів, то тут можна йти по двох головних напрямках: переробляти низькоякісні непридатні продукти або орієнтуватися на легкодоступні вуглеводи й одержувати за їхній рахунок мікробну біомасу, що містить високоякісний білок. І в тому, і в іншому випадку технологія ферментації відіграє ключову роль.

Особливість БОО полягає в тому, що цей продукт

- по перше, практично цілком складається з мікробної біомаси,
- по друге, у його виробництві нерідко беруть участь мікроби, досвід використання яких малий й які раніше в їжі були відсутні.

Єдиний офіційно дозволений вид білкової їжі мікробного походження - це мікопротеїн (мукопротеїн).

## 5. Харчові добавки й інгредієнти

**Підкислювачі** застосовуються в основному як смакові добавки для додання продуктам «гострого» смаку. У практику вони ввійшли швидше за все в результаті широкого використання органічних кислот для збереження їжі. Самим популярним підкислювачем у харчовій промисловості є лимонна кислота. Спочатку цей продукт одержували віджимаючи сік з лимонів, сьогодні лимонну кислоту одержують зброджуючи утримуючі глюкозу гідролізати.

**Амінокислоти.** У світі виробляється приблизно 200 тис. тонн амінокислот у рік; їх використовують головним чином як добавки до кормів і харчових продуктів. Головними продуктами, одержуваними за технологією ферментації є глютамінова кислота й лізин.

**Вітаміни й пігменти.** Основні потреби промисловості в цих сполуках задовольняються за рахунок природних джерел і хімічного синтезу, але два з них - каротин і рибофлавін, одержують методами біотехнології.

**Підсилювачі смаку.** Головним підсилювачем смаку вважається натрієва сіль глютамінової кислоти: її можна одержати за допомогою *Micrococcus glutamicus*. Піонером використання підсилювачів смаку є Японія, але сам принцип застосовувався при створенні рецептів багатьох блюд в всьому світі.

Технологія виробництва **цукрозамінників**. Вживання сахарози або будь-якого іншого натурального цукру навіть при раціональному підході в ряді випадків викликає розвиток атеросклерозу, діабет, збільшення у вазі і ряд інших патологій. Тому велика увага приділяється розшуку еквівалентних смакових цукрозамінників нецукристої природи. Сполуки, що володіють солодким смаком, можуть бути розділені на дві групи:

1. Природні органічні сполуки - білки, дипептиди та інші натуральні сполуки
2. Речовини, отримані шляхом хімічного синтезу.

Як правило, при виборі цукрозамінників велика увага приділяється їх здатності включатися в метаболізм, калорійності, безпеки для здоров'я людини, а також собівартості і технології отримання. На сьогоднішній день в науковій літературі описано велика кількість цукрозамінників, але з різних причин реально в практиці застосовується тільки їх невелика частина.

До натуральних солодким сполук відносяться моносахариди і низькомолекулярні олігосахариди, продукти гідролізу крохмалю і часткової ізомеризації - суміш глюкози і фруктози, а також сполуки неуглеводного типу.

У перерахунку на сахарозу, використання цукрозамінників в США і Західній Європі становить 55-56 кг на рік на душу населення.

Цукрозамінник *сахарин*, одержуваний хімічним синтезом і протягом декількох десятків років інтенсивно використовувався в кондитерській промисловості, сьогодні повністю витіснений новими натуральними, низькокалорійними цукрозамінниками, наприклад, етиловим дипептидом *аспартамом*, виробленим біотехнологічним методом.



При синтезі аспартама амінокислота фенілаланін є найдорожчим компонентом, її у великій кількості одержують шляхом культивування відповідного продуцента. Токсикологічні дослідження протягом десяти років передували застосуванню аспартама у виробництві харчових продуктів.

Серед великого числа інших цукрозамінників заслуговує на увагу *стевіозид*, що міститься в рослині *Stevia rebaudiana*, поширеному в Південній Америці і на Чорноморському узбережжі

Цукрозамінники іншого типу - флавонол-7-глюкозиди, містять цитрусові рослини. В результаті незначної хімічної модифікації цих сполук утворюються *дігідрохалкони*, які солодше цукру в 300 а то і в 2000 разів. Доброю сировиною для їх отримання є цитрусовий віджим, що накопичується при переробці цитрусових (одержання соку).

*Тауматин* - сполука білкового походження. У промислових масштабах тауматин отримують екстракцією з плодів цієї рослини. З усіх відомих сьогодні цукрозамінників ця сполука - сама солодка.

Цукрозамінники використовуються у виробництві різних напоїв (алкогольних і безалкогольних), варений, джемів, тістечок, цукерок, жувальних гумок і інших солодких продуктів.

З упевненістю можна констатувати, що виробництво і продаж цукрозамінників в найближчому майбутньому (10 років) будуть збільшуватися, на це вказують дані останніх років (річне зростання споживання становить 8-9%).

**Список використаних джерел**

1. Андріяш Г. С., Заболотна Г. М., Шульга С. М. Мутантні штами мікроорганізмів-продуцентів лізину та треоніну. *Biotechnol. Acta*. 2014. № 3. С. 95-101.
2. Безуглий М., Головка В, Бісюк І. Ветеринарна біотехнологія. Харків : Гімназія, 2012. 491с.
3. Васильківська М. К., Пенчук Ю. М. Сучасний стан та перспективи біотехнологічних методів виробництва амінокислот. *Ukrainian food journal*. 2012. № 2. С. 51-54.
4. Капрельянц Л. В. Теоретичні основи біотехнології навчальний посібник. Харків : Гімназія, 2020. 291 с.
5. Мартиненко О. І. Методи молекулярної біотехнології : лабораторний практикум. Київ : Академперіодика, 2010. 231 с.
6. Мікробіологія харчових продуктів і кормів для тварин. Настанови щодо готування та виробництва поживних середовищ. Частина 1. Загальні настанови щодо виготовлення поживних середовищ гарантованої якості в лабораторії (ISO/TS 11133-1:2000, IDT): ДСТУ ISO/TS 11133-1:2005. – [Чинний від 2008-03-01]. К. : [б.в.], 2007. IV, 12 с. (Національний стандарт України).
7. Пирог Т. П., Ігнатова О. А. Загальна біотехнологія : підручник. Київ : НУХТ, 2009. 336 с.
8. Пирог Т. П. Загальна мікробіологія : підручник. Київ : НУХТ, 2010. 632 с.
9. Підгорський В. С., Іутинська Г. О., Пирог Т. П. Інтенсифікація технологій мікробного синтезу. Київ : Наук. думка, 2010. 328 с.
10. Федоренко В. О., Осташ Б. О., Гончар М. В., Ребець Ю. В. Великий практикум з генетики, генетичної інженерії та аналітичної біотехнології мікроорганізмів : навч. Посібник. Львів : видавничий центр ЛНУ імені Івана Франка, 2006. 279 с.
11. Юлевич О. І., Ковтун С. І., Гиль М. І. Біотехнологія : навчальний посібник. Миколаїв : МДАУ, 2012. 476 с.

Навчальне видання

**Каратєєва Олена Іванівна**  
**Юлевич Олена Іванівна**

**Загальна біотехнологія**  
*курс лекцій*

Технічний редактор: О. І. Каратєєва

Формат 60x84 1/16. Ум. друк. арк. 6,69  
Тираж 15 прим.

Надруковано у видавничому відділі  
Миколаївського національного аграрного університету  
54020, м. Миколаїв,  
вул. Георгія Гонгадзе, 9  
Свідоцтво суб'єкта видавничої справи  
ДК № 4490 від 20.02.2013 р.