

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
МИКОЛАЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ

О. О. Кравченко, В.О. Мельник

ТЕХНОЛОГІЇ
МІКРОБНОГО СИНТЕЗУ

Конспект лекцій

Миколаїв
2020

УДК 606
Т38

Автор: О. О. Кравченко, В.О. Мельник

Друкується за рішенням науково-методичної комісії факультету технології виробництва і переробки продукції тваринництва, стандартизації та біотехнології Миколаївського національного аграрного університету від 23 квітня 2020 р., протокол № 9.

Рецензенти:

- С. П. Кот – кандидат біологічних наук, доцент кафедри зоогієни та ветеринарії, Миколаївський національний аграрний університет;
В. А. Кириченко – кандидат с.-г. наук, доцент кафедри зоогієни та ветеринарії, Миколаївський національний аграрний університет.

Кравченко О. О.

Т38 Технології мікробного синтезу : конспект лекцій / О. О. Кравченко, В.О. Мельник. – Миколаїв : МНАУ, 2020. – 88 с.

В конспекті лекцій висвітлено матеріали, що стосуються біохімії і фізіології мікроорганізмів, які синтезують біологічно активні сполуки, а також біохімічні механізми синтезів. Викладено обмін азоту у мікроорганізмів, амінокислотний склад білків, основні шляхи обміну сполук азоту, також містяться дані про обмін вуглеводів, його регуляції фосфатами середовища, асиміляції вуглеводів і їх участі в конструктивному і енергетичному обмінах. Містить відомості про різні ліпіди, про шляхи асиміляції жирів і жирних кислот, містить дані про зольний склад мікробних клітин і деяких рослинних продуктів, що вживаються в якості компонентів середовищ. Широко представлений матеріал, що стосується впливу рН на процеси життєдіяльності клітини. У розділі «Ферменти» приведена схема регуляції синтезу ферментних білків. Викладено матеріали про методи отримання ферментних препаратів з мікроорганізмів і їх характеристика. Синтез амінокислот розглянуто на прикладах глютамінової кислоти, аланіну і лізину. Особливу увагу приділено значенню біотину в реакції синтезу, його вмісту в природних продуктах, компонентах середовищ.

Призначений для здобувачів ступеня вищої освіти «магістр» денної форми навчання спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія».

УДК 606

© Миколаївський національний
аграрний університет, 2020
© Кравченко О.О., Мельник В.О. 2020

ЗМІСТ

Лекція 1. Участь азотовмісних компонентів в обміні речовин мікроорганізмів та їх вплив на формування продуктів біосинтезу..	4
Лекція 2. Технологія отримання амінокислот шляхом біосинтезу.....	11
Лекція 3. Вплив вуглеводів на процеси біосинтезу.....	18
Лекція 4. Вплив жирів на процеси біосинтезу	32
Лекція 5. З'єднання фосфору та його участь в синтезі мікроорганізмів.....	40
Лекція 6. Вплив мінеральних компонентів на біосинтез	48
Лекція 7. Значення рН для життєдіяльності мікроорганізмів.....	54
Лекція 8. Технології мікробного синтезу ферментних препаратів..	59
Лекція 9. Технології мікробного синтезу вітамінів.....	72

МОДУЛЬ 1. Обмін азотовмісних речовин в культурах мікроорганізмів. Виробництво амінокислот шляхом біосинтезу

ЛЕКЦІЯ 1

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

План:

1. Азотовмісні компоненти мікробних клітин.
2. Азотомісткі компоненти міцелію *Penicillium chrysogenum* - продуцента пеніцилін
3. Азотомісткі компоненти міцелію актиноміцетів
4. Нуклеїнові кислоти мікроорганізмів.

Ключові слова: біосинтез, азот, культивування, мікроорганізми, нуклеїнові кислоти, поживне середовище.

Key words: biosynthesis, nitrogen, cultivation, microorganisms, nucleic acids, nutrient medium.

1. Азотовмісні компоненти мікробних клітин.

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

кислоти і вільні амінокислоти. Частина азоту входить до складу пептидів.

В одній мікробній клітині одночасно присутнє значне число різних за своїми властивостями білків. Всі білки складаються з амінокислот. Кількісні відносини різних амінокислот і їх взаємне розташування в молекулі визначають фізико-хімічну характеристику білка.

Білки мають певний заряд. У ізоелектричній точці білок електрично нейтральний і його фізико-хімічні характеристики володіють мінімальними значеннями. Для правильного ведення деяких технологічних операцій при роботі з міцелієм необхідно мати на увазі, що в ізоелектричній точці найменш виражено набухання, так як електрично нейтральні молекули білка утримують найменше число молекул гідратаційної води. З тієї ж причини найменше значення має електропровідність. Білки дуже чутливі до невеликих кількостей солей, які викликають їх осадження. Цю властивість часто використовують при технологічних операціях, де необхідно видалити білки.

Вільні внутрішньоклітинні амінокислоти є структурним матеріалом для синтезу білкових молекул, зокрема для синтезу ферментних білків; доведено їх участь в синтезі молекул деяких антибіотиків.

2. Азотомісткі компоненти міцелію *Penicillium chrysogenum*-продуцента пеніцилін.

Кількісний вміст різних азотовмісних компонентів в міцелії пеніциллів мінливий, він змінюється з віком, залежить від штаму і умов культивування. Молодий міцелій більш багатий білками, ніж старий. При старінні кількість небілкового азоту, зазвичай, підвищується. Значної величини досягає кількість небілкового азоту в фазі інтенсивного утворення пеніциліну. Така закономірність зберігається у всіх вивчених пеніциліноутворюючих штамів, хоча абсолютні величини речовин, що містять азот, зазвичай різні. За якісним амінокислотним складом міцелій нічим не відрізняється від інших рослинних і тваринних об'єктів, до його складу входить 14-20 амінокислот (за даними різних досліджень). Найбільша кількість припадає на глутамінову і аспарагінову кислоти, групу лейцинів, аланін, пролін, треонін. Кількість деяких амінокислот залежить в значній мірі від середовища.

При культивуванні *Penicillium chrysogenum* на синтетичному середовищі кількість фенілаланіну збільшувалася майже в три рази, проліна - в 1,8 рази, глутамінової кислоти - в 1,25 рази в порівнянні з комплексним середовищем.

Останнім часом завдяки тонким біохімічним методам аналізу вдалося провести вивчення хімічної природи клітинної стінки мікроорганізмів. Одним з основних компонентів клітинної стінки грибів є хітин.

Хітин - дуже стійкий до впливу різних хімічних речовин поєднання. Тільки шляхом тривалого кислотного гідролізу вдалося розщепити його на аміноцукор і оцтову кислоту.

3. Азотомісткі компоненти міцелію актиноміцетів

Як і у грибів, кількість азотовмісних компонентів міцелію актиноміцетів варіює залежно від віку культури, штаму і умов культивування. Різниця фізико-хімічних властивостей, що входить до складу міцелію білків, дає можливість фракціонувати їх відносно нескладними методами, наприклад шляхом послідовної екстракції при низьких температурах розчинами солей і лугів невисокої концентрації. У актиноміцетів в найбільшій кількості містяться білки, що екстрагуються 0,2% розчином лугу. Більш детальне фракціонування білків зазвичай здійснюють методом електрофорезу в розчині відповідного буфера. При лужному значенні рН буферного розчину білки рухаються до анода. Однак у зв'язку з різною величиною заряду у молекул різних білків вони пройдуть неоднакову відстань від старту - місця нанесення на носій (папір, крохмальний гель) досліджуваної суміші білків. Після обробки паперових стрічок специфічними барвниками (амідошварц, бромфенол синій і т. п.) проявляється місце розташування білків. При фракціонуванні методом електрофорезу білки, виділені сольовими розчинами з актиноміцетів, вдається додатково розділити на 2-6 фракцій. Кількісний аналіз фракцій, отриманих при електрофорезі, показав, що білковий склад міцелію в процесі зростання актиноміцетів не залишається постійним. Він в значній мірі залежить від складу середовища.

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

міцелію актиноміцетів містить велику кількість дикарбонових кислот; з основних амінокислот багато аргініну і гістидину, в значній кількості відзначаються аланін, валін, лейцин. Відносно невеликий відсоток припадає на частку сірковмісних амінокислот (метіонін і цистин) і циклічних амінокислот. Склад середовища, вік культури і штам надають істотний вплив на кількісний вміст окремих амінокислот білка міцелію. Прикладом можуть служити дві культури *Act. globisporus streptomycini* (Продуцента стрептоміцину); одна, чутлива до фагу, культура – фагочутлива, друга - фагостійка. Вміст гістидину, аспарагінової і глутамінової кислот різко відрізняється як у дводобовій, так і чотирьохдобовій культур .

Поки що немає узагальнюючих даних про зв'язок між амінокислотним складом білків продуцента і біосинтезу антибіотика. Відомо лише, що при утворенні антибіотика культурою *Act. violaceus* міцелій, інтенсивно утворює антибіотичну речовину, бідніша основними і багатша дикарбоновими амінокислотами в порівнянні з міцелієм, слабо створює антибіотики.

У міцелії актиноміцетів містяться також вільні амінокислоти. Сумарний вміст α -аміноазоту вільних амінокислот, як правило, відносно невисоке у молодих клітин, досягає свого максимуму на 2-4-у добу, після чого воно зменшується. Зменшення кількості вільних амінокислот збігається з часом інтенсивного синтезу антибіотика. У тому випадку, коли у культури відзначається вторинне зростання і утворення молодого інтенсивно синтезуючого антибіотика міцелія, кількість вільних внутрішньоклітинних амінокислот може збільшуватися. Такий факт спостерігається, наприклад, у продуцента окситетрацикліну - культури *Act. rimosus*.

На кількісний та якісний склад вільних амінокислот істотно впливає поживне середовище. Найбільш яскраво виражений вплив органічних кислот, що входять до циклу ди-і трикарбонових кислот. Наявність в середовищі кетокислот, особливо піровиноградної і α -кетоглутарової, призводить до інтенсивного синтезу всередині клітини відповідних амінокислот: α -аланіну і глутамінової кислоти. Вуглеводи і амінокислоти менш помітно впливають на кількісний склад внутрішньоклітинних вільних амінокислот. Найбільша кількість серед них припадає на глутамінову і аспарагінову кислоти, аланін, гістидин, аргінін, валін, лейцин. Мало метіоніну і цистину - сіркомістких амінокислот.

У процесі розвитку культури кількісні співвідношення між окремими вільними амінокислотами різко не змінюються, хоча змінюється сумарна кількість α -аміноазоту. Якщо культура виявляється поставленою в умови азотного голодування, тобто в середовище, позбавлене азоту, але містить вуглеводи, то використовується ендогенний азот і в першу чергу азот вільних внутрішньоклітинних амінокислот. В цьому випадку з найбільшою інтенсивністю в обмінні процеси включається глутамінова кислота.

Кількісні співвідношення між вільними внутрішньоклітинними амінокислотами не є копією амінокислотного складу поживного середовища. Це було доведено шляхом створення цих середовищ, які витримували міцелій або вирощували культуру. Через певні проміжки часу проводили аналіз кількісного вмісту вільних внутрішньоклітинних амінокислот.

Клітинна стінка гіф актиноміцетів за своїм хімічним складом має схожість з клітинною стінкою грампозитивних бактерій. Утворена вона в основному з мукополісахаридів і не містить на відміну від грибів хітину. Мукополісахариди знаходяться в зв'язку з білками. До їх складу входять аміноцукри, зокрема D-глюкозамін і D-галактозамін. Відмінності, які спостерігаються в амінокислотному і вуглеводному складі клітинних стінок, дозволили використовувати ці ознаки в якості одного з критеріїв для систематики порядку Actinomycetales. Оболонка повітряних спор міцелію відрізняється від гіф наявністю ліпідів і більш високою кількістю білка. Вона також містить у своєму складі мукополісахариди.

4. Нуклеїнові кислоти мікроорганізмів.

Всі природні нуклеїнові кислоти поділяються на два хімічно різних типи - дезоксирибонуклеїнову кислоту (ДНК) й рибонуклеїнову кислоту (РНК). Обидва типи нуклеїнових кислот є полімерами нуклеотидів. Головною хімічною відмінністю нуклеотидів дезоксирибонуклеїнової і рибонуклеїнової кислот є природа їх вуглеводного компонента. До складу ДНК входить дезоксирибоза, у склад РНК - рибоза. Кожен нуклеотид, що входить до складу ДНК, складається з фосфатного залишку, вуглеводного компоненту (2-дезокси-D-рибоза) і будь-якої пуринової або піримідинової основи. Прикладом мононуклеотиду може служити аденозинмонофосфат, або аденілова кислота. Обидва типи нуклеїнових кислот обов'язково

присутні у всіх без винятку живих клітинах організму, і лише віруси містять тільки один з них.

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

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

До складу ДНК входять також метиловані основи: 6-метил-амінопурин і 5-метилцитозин. У порівнянні з клітинами і тканинами вищих організмів для мікроорганізмів характерний високий вміст нуклеїнових кислот. Їх кількісний вміст схильний до досить сильних змін в залежності від фази розвитку, умов культивування, фізіологічного або функціонального стану.

У період лаг-фази, тобто фази підготовки до поділу клітин, і особливо до кінця лаг-фази відзначається інтенсивний синтез ДНК. Перед самим початком клітинного поділу відзначається подвоєння змісту ДНК в клітинах. У період логарифмічного і стаціонарного зростання культури відзначається сталість кількості ДНК в клітинах.

Вміст РНК піддається більш помітним коливанням. У період лаг-фази відбувається інтенсивний синтез РНК. Після досягнення певного рівня вмісту РНК в клітині починається синтез білка. Характерною особливістю лаг-фази є перевага синтезу РНК над синтезом білка. У фазі логарифмічного росту спостерігається, як правило, пряма залежність між вмістом РНК в клітинах, інтенсивністю росту і швидкістю білкового синтезу. При цьому синтез РНК і білка відбувається більш-менш паралельно, поступово уповільнюючись. Таким чином, кількість РНК в клітині зменшується відповідно до уповільнення швидкості розмноження клітин в культурі і відповідно швидкості білкового синтезу. Максимальна кількість РНК спостерігається в період найбільш інтенсивного росту.

У періоди, коли швидкість розмноження клітин постійна, вміст РНК в розрахунку на одну клітину також приблизно постійний.

Відповідно до сучасних уявлень нативна молекула ДНК являє собою дві полідезоксирибонуклеотидні ланцюги, що йдуть спіралью, правильно закручені навколо загальної осі. Ці два ланцюги утримуються один з одним за допомогою системи водневих зв'язків між протилежними азотистими основами ланцюгів. При цьому навпроти аденіну одного ланцюга завжди знаходиться тимін інший, навпроти гуаніну - цитозин, тобто один ланцюг по розташуванню азотистих основ комплементарний до іншого.

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

Порівняльне вивчення кількісного вмісту азотистих основ деяких мікроорганізмів показало, що у цвілевих грибів, що відносяться до роду аспергілів, кількість гуаніну, аденіну, цитозину, тиміну приблизно однакова. У актиноміцета, продуцента стрептоміцину, відзначається високий вміст гуаніну і цитозину; у золотистого стафілокока - аденіну і тиміну. При цьому відношення $\frac{G+C}{A+T}$ у аспергіла близько одиниці, у золотистого стафілокока воно менше одиниці; у актиноміцетів, як правило, знаходиться в межах 2,5-2,8.

На відміну від ДНК рибонуклеїнова кислота (РНК) в якості однієї з азотистих основ має в своєму складі не тимін, а його деметилвану похідну - урацил. Крім того, у деяких мікроорганізмів до складу РНК в вкрай незначних кількостях входять метиловані пуринові і піримідинові основи (наприклад, 5-метилцитозин, 6-диметиламінопурин, 1-метилгуанін і ін.). Якщо нуклеотидний склад ДНК мікроорганізмів досить сильно варіює, то нуклеотидний склад РНК, навпаки, близький у різних видів. У всіх вивчених до теперішнього часу мікроорганізмів в РНК переважають гуанін і цитозин. Таким чином, величина $\frac{G+C}{A+T}$ завжди більше одиниці.

ЛЕКЦІЯ 2

Технологія отримання амінокислот шляхом біосинтезу

План:

1. Основні шляхи включення амінокислот середовища в обмін речовин мікроорганізмів.
2. Зміна вмісту амінокислот в середовищі при культивуванні.
3. Вплив органічних азотовмісних компонентів середовища на біосинтез антибіотиків.
4. Вплив мінеральних азотовмісних компонентів середовища на біосинтез антибіотиків

Ключові слова: хімічний синтез, поживне середовище, амінокислоти, білки, реакція.

Ключові слова: хімічний синтез, поживне середовище, амінокислоти, білки, реакція.

Key words: chemical synthesis, nutrient medium, amino acids, proteins, reaction

1. Основні шляхи включення амінокислот середовища в обмін речовин мікроорганізмів.

Білки, як відомо, складаються з амінокислот. Можуть бути принципово два різних шляхи для задоволення потреб в амінокислотах: отримання готових амінокислот ззовні і самостійний синтез амінокислот з компонентів середовища.

Культивування мікроорганізмів продуцентів відбувається на середовищах складного і часто непостійного хімічного складу. Всі вони містять азот у вигляді різних сполук: білків, пептидів або вільних амінокислот.

Частіше за інших застосовують при ферментації кукурудзяний екстракт, соєву, арахісову або кукурудзяну муку, бавовняну макуху. У кукурудзяному екстракті приблизно половина вагової кількості припадає на воду; кількість загального азоту коливається в межах 3,0-8,0% (в перерахунку на суху вагу); амінного азоту - 1,0-3,0%. Якісно кукурудзяний екстракт містить всі найбільш поширені амінокислоти. Кількісний зміст окремих амінокислот піддається суттєвим коливанням, в залежності від ступеня зрілості кукурудзи, з якої отримано екстракт, сорту, місця зростання і методу обробки. Кукурудзяний екстракт на відміну від інших природних продуктів, що використовуються для ферментації, містить відносно небагато білкових речовин і більше вільних амінокислот або

низькомолекулярних пептидів. Білковими речовинами багатше соєве борошно. Воно також містить всі поширені амінокислоти, проте в основному вони пов'язані у вигляді білків. Останнім часом знаходять застосування екстракти бавовняної макухи і макухи олійних культур, наприклад соняшnikової. За змістом загального і амінного азоту вони близькі до кукурудзяного екстракту.

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

Амінокислоти відносно рідко вводяться в середовище в чистому вигляді. Найчастіше вони входять до складу білків або пептонів, з яких звільняються під впливом протеаз продуцентів. Більшість амінокислот є не тільки джерелом азоту. Деякі амінокислоти мають специфічний вплив на мікробні клітини. Наприклад, наявність в середовищі L-валіну прискорює проростання конідій *Act. Streptomycini*. Багато мікроорганізмів можуть використовувати також вуглецеву частину скелету деяких амінокислот. Амінокислоти середовища і внутрішньоклітинні вільні амінокислоти, як правило, піддаються різним трансформаціям. Є порівняно мало прикладів того, щоб амінокислоти середовища без відповідної трансформації безпосередньо включилися б в клітинні структури. Одним з найбільш поширених механізмів включення амінокислот середовища в обмін речовин є реакція дезамінування.

Свідченням реакції дезамінування є накопичення амонійного азоту в поживних середовищах в ході культивування мікроорганізмів. При реакції дезамінування в аеробних умовах відбувається відщеплення аміаку від амінокислоти. Іншим продуктом реакції є кетокислоти.

Оптимум активності для більшості дезамінази розташований в межах рН 6,5-7,5. Інтенсивність дезаміназної реакції в значній мірі залежить від штаму продуцента і умов культивування. Наприклад, *Act. griseus*, *Act. venezuelae*, *Act. lavendulae* інтенсивно дезамінує глютамінову кислоту, аргінін, гістидин, а-аланін. Повна відсутність реакції дезамінування або дуже незначна її інтенсивність визначається відносно фенілаланіну, триптофану, тирозину. Між величиною дезаміназної активності культури актиноміцетів і кількістю біомаси, що утворилась, є певний взаємозв'язок: чим вище

величина дезаміназної активності, тим вище кількість біомаси. Дезаміназна активність культур продуцентів проявляється, очевидно, протягом усього періоду культивування. У початковому періоді ферментації відбувається утворення аміаку за рахунок амінокислот, що входять до складу живильного середовища. В кінці процесу дезамінази завершують автоліз, руйнуючи амінокислоти, що утворились з білків.

При зсуві рН середовища в кислу зону відзначається реакція декарбоксилування амінокислот з утворенням амінів. У актиноміцетів і бактерій часто спостерігається реакція декарбоксилування глютамінової кислоти. При цьому утворюються α - або γ -аміномасляна кислота, в залежності від того, яка карбоксильна група піддається декарбоксилуванню. При декарбоксилуванні деякі амінокислоти можуть утворювати високотоксичні продукти: з лізину - кадаверин, з орнітину - путресцин. Аміном, що утворюється в результаті реакції декарбоксилування гістидину, є гістамін, який надає сильний вплив на кров'яний тиск. Деякі гістаміноподібні речовини виявляються у культуральній рідині при біосинтезі стрептоміцину. У разі, якщо за своїми фізико-хімічними властивостями гістаміноподібні речовини або аміни близькі до антибіотика, паралельно з яким вони утворюються, досить важким завданням є їх очищення.

Трансформація циклічних амінокислот відбувається не тільки шляхом дезамінування і декарбоксилування. Гістидин, наприклад, руйнується до глютамінової кислоти через уроканієву кислоту. Триптофан - через антранілову кислоту і т. д. Необхідно також мати на увазі, що, крім перерахованих вище шляхів використання азотистих джерел живлення мікроорганізмами, існує безпосереднє перенесення амінокислот середовища в клітину. Механізм подібного перенесення у мікроорганізмів ще вивчений недостатньо добре, проте є достатньо підстав припускати, що здійснюється він тільки лише після активації амінокислот за рахунок утворення відповідних аденилат.

2. Зміна вмісту амінокислот в середовищі при культивуванні.

При дослідженні можливості використання амінокислот в якості джерел вуглецевого і азотного живлення до складу середовища вводять досліджувану амінокислоту, потім визначають її кількісний вміст в ході культивування. Паралельно проводять спостереження за

ростом культури. При використанні комплексних середовищ, що містять в своєму складі складні органічні речовини (кукурудзяний екстракт, соєве борошно і т. д.), частина амінокислот знаходиться у вільному стані, частина в зв'язаному, в основному в білкових молекулах. В цьому випадку дуже важко встановити, які з присутніх в середовищі амінокислот найбільш інтенсивно включаються в метаболізм. Основна складність полягає в тому, що білок середовища протягом деякого часу залишається в повному обсязі гідролізованим протеазами продуцента. Тому амінокислоти поступово звільняються при гідролізі білку. Для оцінки інтенсивності включення амінокислот в обмін речовин створюють синтетичні середовища, що складаються з чистих амінокислот. Аналіз вмісту амінокислот в таких середовищах показує, що з найбільшою інтенсивністю в метаболізм деяких актиноміцетів включаються глютамінова і аспарагінова кислоти, а-аланін і гістидин. Такі амінокислоти, як лізин, триптофан, метіонін, фенілаланін, слабо включаються в обмін речовин актиноміцетів. Їх кількість на протязі всього часу культивування залишається приблизно на одному рівні. Однак це не виключає необхідності їх присутності в середовищах для біосинтезу антибіотиків. Лізин, наприклад, робить позитивний вплив на біосинтез стрептоміцину. Метіонін є джерелом металевих груп при біосинтезі еритроміцину, а також деяких інших антибіотиків, що мають в складі своєї молекули металеві групи.

3. Вплив органічних азотовмісних компонентів середовища на біосинтез антибіотиків.

У виробництві антибіотиків в даний час використовують середовища, що містять соєве борошно для отримання стрептоміцину і окситетрацикліну, кукурудзяний екстракт - для пеніциліну та антибіотиків тетрациклінової групи (хлортетрациклін, окситетрациклін, тетрациклін). Для оцінки впливу окремих компонентів середовища їх по черзі вводять до складу середовища відомого складу, не змінюючи кількості інших речовин. При цьому регулярно під час всього процесу ферментації аналізують кількість синтезованого продукту. Оцінка кількості синтезованої речовини може проводитися в вагових одиницях або одиницях активності на мілілітр культуральної рідини. У деяких випадках може становити інтерес величина продуктивності, ця величина пов'язує між собою два показники: кількість міцелію і зміст в культуральної рідини

синтезованого продукту. Продуктивність міцелію визначається відношенням кількості синтезованого продукту до кількості утвореної біомаси за один і той же певний відрізок часу, в одиниці об'єму культуральної рідини.

При порівняльному фізіологічному вивченні різних штамів *Act. streptomycini*, що синтезують стрептоміцин, було встановлено, що для штаму В-178 кращі результати за кількістю синтезованого антибіотика були отримані на середовищі, що містить кукурудзяний екстракт, а для штаму ЛЗ-1 - соєве борошно. Тому при переході до роботи з новими селекціонованими штамми вже відомого продуцента необхідно ретельно проаналізувати вплив різних компонентів середовища на біосинтез антибіотика. У зв'язку з тим, що соєве борошно, кукурудзяний екстракт і інші подібні речовини мають досить складний хімічний склад, важко часом оцінити, які їх складові частини мають позитивний вплив на процес біосинтезу антибіотика. Для оцінки впливу різних компонентів, що входять до складу соєвої муки, проводять її фракціонування за допомогою ряду фізико-хімічних методів. Як екстрагенти застосовуються вода, сольові розчини, з різними величинами рН, органічні розчинники. Отримані екстракти після їх концентрування вводять до складу середовищ. Так, при вивченні біосинтезу стрептоміцину з білків, що входять до складу соєвої муки, був виділений розчинний в сольових розчинах білок гліцинін, що відноситься до глобулінів. Цей білок піддавався кислотному і ферментативному гідролізу. В результаті гідролізу були отримані уламки білкової молекули - амінокислоти і пептиди. У цих дослідках було показано, що у штаму ЛЗ-1 відзначаються різкі відмінності в активності культуральної рідини при ферментації на білкових середовищах (гліцинін, соєве борошно) і їх гідролізатах. Значно менші відмінності спостерігаються в продуктивності міцелію. Величини продуктивності міцелію знаходяться приблизно на одному рівні. При введенні до складу середовищ для культивування окремих фракцій кислотного гідролізату знежиреного соєвого борошна було показано, що фракція моноамінокислоти сприяє зростанню актиноміцета, а основні амінокислоти - біосинтезу стрептоміцину.

Досліджуючи вплив різних фракцій кукурудзяного екстракту на біосинтез стрептоміцину, екстракт фракціонували методом електрофорезу. У зоні катода була отримана фракція, яка при введенні в середу для культивування сприяла підвищенню виходу

антибіотика в порівнянні з контролем.

Детальний аналіз цієї фракції показав, що вона складається з основних амінокислот (аргінін, гістидин, лізин, пролін). Порівняльне вивчення різних партій кукурудзяного екстракту як компонентів середовищ для культивування призвело до висновку про те, що найвищий рівень вмісту стрептоміцину може бути досягнутий, застосовуючи таку партію екстракту, де відзначається певне співвідношення між кількістю основних амінокислот і моноамінокислот. При оцінці впливу введених в склад середовища складних природних речовин (соєве борошно, кукурудзяний екстракт, макухи і т. п.) слід мати на увазі, що їх вплив на напрямок процесу обміну речовин мікроорганізмів обумовлено не тільки наявністю білків і амінокислот, а й присутніх поряд з ними вуглеводів, нуклеїнових кислот, жирів, мікроелементів, органічних кислот та інших сполук.

Вивчення впливу окремих компонентів середовища зазвичай проводять на синтетичних середовищах шляхом введення досліджуваної речовини в їх склад. Іншим методом є «гострий» метод. В цьому випадку мікроорганізми культивують на рідкому середовищі, потім їх ретельно відмивають від неї в стерильних умовах. Міцелій стерильно переносять в нове середовище, що містить компоненти, вплив яких необхідно досліджувати. Для дослідницьких цілей «гострий» метод має деякі переваги перед культивуванням. У «гострих» дослідах з міцелієм *Penicillium chrysogenum*- продуцентом пеніциліну показано що амінокислоти лейцин, метіонін, цистеїн на 20-60% стимулювали біосинтез пеніциліну. Вплив амінокислот, що входять до складу середовища, на біосинтез антибіотиків залежить від її загальної композиції.

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

4. Вплив мінеральних азотовмісних компонентів середовища на біосинтез антибіотиків.

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

У разі, якщо в якості джерела азоту бажано мати нітрат-іон, його вводять у вигляді калієвої або натрієвої солі. Найбільш поширений в

якості мінерального азотовмісного компонента середовища сульфат амонію, він виявляється придатним для біосинтезу багатьох відомих антибіотиків (крім новобіоцину). Найкращим з вивчених джерел азоту для біосинтезу хлортетрацикліну виявився хлористий амоній, а для окситетрацикліну - сульфат амонію, хоча відомо, що ці антибіотики дуже близькі за будовою. У разі одночасної присутності в середовищі іонів амонію і нітратів продуцент хлортетрацикліну *Ast. aureofaciens* зовсім не включає в метаболізм нітратний іон. Однак тоді, коли іон амонію в середовищі відсутній, до 45% присутнього в середовищі нітрату виявляється використаним.

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

МОДУЛЬ 2. Обмін вуглеводів в культурах мікроорганізмів. Вплив жирів на процеси біосинтезу

ЛЕКЦІЯ 3

Вплив вуглеводів на процеси біосинтезу

План:

1. Обмін вуглеводів в культурах мікроорганізмів. Вуглеводні компоненти мікробних клітин.
2. Основні шляхи обміну вуглеводів.
3. Характеристика основних джерел вуглеводів, які застосовуються для біосинтезу.
4. Вплив вуглеводів на процеси біосинтезу

Ключові слова: вуглеводи, глюкоза, біосинтез, мікроорганізми, поживні речовини

Key words: carbohydrates, glucose, biosynthesis, microorganisms, nutrients.

1. Обмін вуглеводів в культурах мікроорганізмів. Вуглеводні компоненти мікробних клітин.

У міцелії грибів і актиноміцетів вуглеводи присутні у вигляді полісахаридів. Хімічна структура цих полісахаридів в більшості випадків невідома. Тому найчастіше полісахариди характеризують по продуктам їх гідролізу - монозам. У вільному вигляді моноцукри зустрічаються в клітині рідко. При визначенні редукуючих речовин їх кількість при розрахунку на глюкозу виявляється досить незначною, до 2- 3% ваги сухого міцелію.

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

Кількісний вміст різних вуглеводів в полісахаридах залежить від видової приналежності культури, віку і штаму. При порівнянні двох штамів-продуцентів стрептоміцину ЛЗ-1 і В-178 було виявлено, наприклад, що полісахариди штаму В-178 містять дещо більше манози. Полісахариди більшості актиноміцетів за своєю природою

належать до мукополісахаридів. Зазвичай вони пов'язані з білковими речовинами клітини. Такі полісахариди називають комплексними.

Різні види мікроорганізмів відрізняються один від одного будовою специфічних полісахаридів, ними обумовлені також антигенні і токсичні властивості. Наявність або відсутність деяких моноз в складі полісахаридів пов'язують іноді з таксономічними ознаками. Так, на відміну від роду *Actinomyces* близький до них рід *Chainia* містить малопоширену фукозу.

Вуглеводи входять також до складу полісахаридів клітинної стінки. Актиноміцети на відміну від грибів не містять таких полімерів, як хітин і целюлоза, хоча в їх складі виявлено глюкозамін. Вважають, що глюкозамін присутній в клітинній стінці як полімер, не пов'язаний з білками. Крім широко поширених вуглеводів, в клітинній стінці *Act. bovis* виявлена 6-дезоксі-L-галактоза. Справжні актиноміцети на відміну від *Nocardia* і *Mycobacterium* не містять в складі клітинної стінки пентоз; їх клітинна стінка піддається лізису під впливом лізоциму.

З клітинних стінок деяких актиноміцетів були виділені тейхоєві кислоти. В даний час відомі два їх типи: рибіттейхоєва і гліцеринтейхоєва кислоти. Вони володіють високою молекулярною вагою. Рибіттейхоєва кислота, виділена з *Act. streptomycini* ЛЗ-1, складається з рибітфосфатних одиниць, поряд з якими в полімері присутні глюкоза, глюкозамін і бурштинова кислота. Молярне відношення глюкози до глюкозаміну в полімері дорівнює 1:2. При лужному гідролізі рибіттейхоєвої кислоти утворюються два фосфорних ефіри. Один з них глюкозилрибітмонофосфат, інший - аміноглюкозилрибіт. Аналіз отриманих глікозидів показав, що цукрові компоненти приєднані до рибітних залишків за допомогою глікозидного гідроксилу. Глюкоза з'єднана з рибітом р-глюкозидним зв'язком. Глюкозиди, що є структурною одиницею полімеру, являють собою рибіт, що несе один цукровий залишок в положенні 2 або 4. Оскільки ставлення глюкози до глюкозаміну в полімері 1:2, відношення глюкозилрибіту до аміноглюкозилрибіту в полімері також 1:2. Рибітні залишки в полімері з'єднані фосфодіефірними зв'язками.

До складу полімеру входить бурштинова кислота, що має з ним ефірний зв'язок. Кількість тейхоєвих кислот змінюється в залежності від віку культури. Так, при дослідженні *Act. streptomycini* ЛЗ-1 найбільшу кількість рибітфосфатного полімеру було виявлено в

молодому міцелії в той період часу, коли починається синтез стрептоміцину. На відміну від культури *Act. streptomycini* ЛС-1 у культури *Act. violaceus* виявлена тейхоєва кислота, позбавлена глюкозаміну. Іншим типом тейхоєвих кислот є гліцеринтейхоєва кислота, виділена з *Act. rimosus* T-118. Повна структура цього полімеру не встановлена. Відомо, що він відноситься до класу гліцерофосфатних полімерів, де гліцеринові залишки з'єднані через фосфор диефірним зв'язком по положенню 1:3 гліцерину. До складу полімеру входить галактоза, що має зв'язок з гліцерином за допомогою глюкозидного гідроксилу.

Гліцеринтейхоєва кислота з *Act. antibioticus* 39 є полімером, до складу якого входять два фосфорних ефіру: гліцерфосфат і глікозилгліцеринмонофосфат.

Складноєфірним зв'язком з'єднана з полімером оцтова кислота. Аналіз клітинних стінок різних мікроорганізмів дозволяє стверджувати, що за їх хімічним складом актиноміцети найбільш близькі до грампозитивних бактерій.

Щодо полісахаридів пеніцилів відомо, що з міцелію *Pen. chrysogenum* були виділені два полісахариди. Один з них складався з 69 глюкозних залишків, інший - з 124 залишків гексоз-манози, галактози і глюкози в співвідношенні 3,9: 2,7: 1,0. З оболонки того ж виду пеніцилу був виділений полісахарид, до складу якого входили маноза, галактоза, глюкозамін, глюкоза, ксилоза, рамноза в наступних молярних відносинах 1: 3: 4,5; 9: 0,5: 0,5. Вважають, що клітинна оболонка грибів побудована щонайменше з двох шарів полісахаридів.

2. Основні шляхи обміну вуглеводів.

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

Одним із шляхів вуглеводного обміну є гліколіз. Гліколіз є сукупністю анаеробних ферментативних процесів розпаду глюкози. Процес анаеробного розщеплювання глюкози починається з її фосфорилування і утворення глюкозо-6-фосфату. Ця реакція здійснюється ферментом гексокінази або глюкокінази. Залишок

фосфорної кислоти утворює ефірний зв'язок з первинним спиртовим гідроксилем, що стоїть при шостому вуглецевому атомі глюкози. Утворений глюкозо-6-фосфат піддається ізомеризації - перетворенню у фруктозо-6-фосфат, який в свою чергу фосфорилується під дією фосфофруктокінази з утворенням фруктозо-1-6-дифосфату. Останній під дією альдолази утворює фосфодіоксиацетон і фосфогліцериновий альдегід, між якими протікає реакція ізомеризації. Подальшим перетворенням піддається фосфогліцериновий альдегід в реакції, яка є найбільш суттєвою для анаеробного розпаду вуглеводів, що грає в гліколізі центральну роль і називається реакцією гліколітичної оксиредукції. Вона здійснюється за допомогою фосфогліцеринальдегіддегідрогенази за участю нікотинамідаденіндинуклеотиду (НАД) через ацетилмеркаптановий комплекс з утворенням 1-3-дифосфогліцеринової кислоти. Далі під дією кінази відбувається передача одного фосфорного залишку на аденозиндифосфат (АДФ), в результаті чого утворюються ЛТФ і 3-фосфогліцеринова кислота. Ця реакція дуже суттєва, так як саме завдяки їй енергія, що звільняється при окисненні фосфогліцеринового альдегіду, акумулюється у вигляді універсального високоенергійного з'єднання - АТФ. Подальший шлях перетворень 3-фосфогліцеринової кислоти складається з ряду послідовних реакцій, перша з яких каталізується ферментом гліцеромутазою і полягає в утворенні 2-фосфогліцеринової кислоти. Остання в присутності енолази перетворюється в фосфоенолпіровиноградну кислоту. Далі перенесення фосфатного залишку на АДФ здійснюється за участю піруваткінази, в результаті чого утворюються АТФ і піровиноградна кислота.

Біологічне значення гліколізу полягає в тому, що в результаті розпаду вуглеводів утворюються багаті енергією фосфорні сполуки і речовини, що використовуються для цілей синтезу, а також є основними субстратами для процесів окислення. Одним з головних субстратів окислення є піровиноградна кислота.

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

Пентозний цикл починається з окислення глюкозо-6-фосфату за участю дегідрогенази. Перший етап реакції, тобто безпосередній акт

дегідрування, не супроводжується розкриттям піранозного циклу, внаслідок чого утворюється лактон фосфоглюконової кислоти (6-фосфоглюконолактон). Потім під дією лактонази відбувається гідролітичні розщеплення лактона. Крім 6-фосфоглюконової кислоти, в результаті окислення глюкозо-6-фосфату утворюється відновлена форма НАДФ. Наступний крок в пентозному циклі полягає в окисненні фосфоглюконової кислоти за участю дегідрогенази, коферментом якої також є НАДФ. Це окислення супроводжується декарбоксілюванням шестивуглеродного з'єднання, що призводить в залежності від умов до різних продуктів: утворюються рибулозо-5-фосфат або рибоза-5-фосфат. Отже, безпосереднім продуктом декарбоксілювання фосфоглюконової кислоти слід вважати кетоформу пентози. Чи передує реакції декарбоксілювання фосфоглюконової кислоти утворення її кетопохідного, залишається неясним, в зв'язку з чим 3-кето-6-фосфоглюконову кислоту можна вважати лише гіпотетичним проміжним учасником реакції.

Рибулозо-5-фосфат піддається двом різним ізомеризаціям: з одного боку, в рибоза-5-фосфат за участю ізомерази пентозофосфатів і, з іншого боку, за рахунок епімерази в ксилулозо-5-фосфат.

Утворені в результаті реакцій ксилулозо-5-фосфат і рибоза-5-фосфат взаємодіють з утворенням седогептулозо-7-фосфату і 3-фосфогліцеринового альдегіду. Ця реакція каталізується транскетолазою. Продукти реакції негайно ж вступають у другу реакцію, в результаті якої утворюються фруктозо-6-фосфат і еритроза-4-фосфат. Ця реакція здійснюється ферментом трансальдолазою. Між еритроза-4-фосфатом і ксилулозо-5-фосфатом відбувається транскетолазна реакція, яка призводить до утворення фруктозо-6-фосфату і 3-фосфогліцеринового альдегіду. Під впливом ферменту глюкозофосфатізомерази фруктозо-6-фосфат перетворюється в глюкозо-6-фосфат. Ізомераза фосфотріоз забезпечує перетворення 3-фосфогліцеринового альдегіду в диоксиацетон-3-фосфат.

При наявності альдолази відбувається конденсація двох фосфотріоз з утворенням фруктозо-1,6-дифосфату, який в подальшому переходить у фруктозо-6-фосфат.

У деяких мікроорганізмів пентозний цикл може бути головним шляхом розщеплення вуглеводів, але для більшості організмів він забезпечує можливість синтезу рибоза-5-фосфату, який бере участь в утворенні нуклеотидів і коферментів. Еритроза-4-фосфат може

служити попередником в синтезі ароматичних кислот.

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

Культура *Act. erythreus* не має ферменту фосфофруктокінази, обов'язкового для гліколітичного шляху обміну вуглеводів. Частина глюкози окислюється при цьому без попереднього фосфорилування, перетворюючись, можливо, в глюконову кислоту, інша частина фосфорилується за рахунок гексокіназної активності. Тому можливо, що утворення піровиноградної кислоти відбувається через 2-кетоглюконат. Механізм реакції залишається поки невідомим.

Шлях, по якому відбувається розпад глюкози в культурах актиноміцетів, може визначатися наявністю у поживному середовищі деяких компонентів. Зокрема, наявність у середовищі високих концентрацій фосфору пригнічує активність глюкозо-6-фосфат дегідрогенази. При цьому розпад глюкози буде відбуватися переважно шляхом анаеробного гліколізу, так як замість 6-фосфоглюконату під дією фосфогексоізомерази утворюється фруктозо-6-фосфат. Як було встановлено в дослідах з *Act. antibioticus*, неорганічний фосфат гальмує також подальший розпад рибоза-5-фосфату. Швидкість споживання рибоза-5-фосфату виявилася обернено пропорційною концентрації ортофосфата в середовищі. Високі концентрації ортофосфата пригнічують утворення піровиноградної кислоти з 2-фосфогліцеринової кислоти. Концентрації фосфору, які пригнічують зазначені реакції, не є абсолютними величинами. При збільшенні концентрації вуглеводів в середовищі відповідно дещо більшою буде оптимальна концентрація фосфору.

Іншим компонентом середовища, що регулює процеси обміну вуглеводів, може бути названий роданистий бензил, який пригнічує розпад глюкози по шляху анаеробного гліколізу, активуючи її дисиміляцію по пентозному циклу.

Цикл трикарбонових кислот. При вивченні трансформації глюкози і піровиноградної кислоти грибами та актиноміцетами, продуцентами антибіотиків, в середовищі були виявлені продукти циклу трикарбонових кислот, були поставлені «гострі» досліди з

відмитим від середовища міцелієм.

У сферу реакції вводили речовини, що входять до циклу трикарбонових кислот, за перетвореннями яких проводили спостереження. Наявність цього циклу було також підтверджено шляхом введення в досліджувану середу інгібіторів ферментативних реакцій. Цикл трикарбонових кислот є головним руслом, по якому відбувається окислення основної частини компонентів середовища. Саме за допомогою цього циклу продукти обміну вуглеводів, жирів і амінокислот окислюються до води і вуглекислого газу. Метаболіти циклу трикарбонових кислот є напівпродуктами для синтезу інших речовин, що утворюються мікроорганізмами.

Завдяки наявності відповідних ферментів в циклі здійснюються реакції, за рахунок яких відбувається подовження ланцюга від двох вуглецевих атомів оцтової кислоти до п'яти у лимонної.

Одночасно утворюються речовини з ненасиченими зв'язками, які мають кетогрупу (а-кетоглютарова, щавелевооцтова, піровиноградна кислоти), або з ненасиченими зв'язками між вуглецевими атомами (фумарова і цисаконітова кислоти). У мікроорганізмів і вищих рослин цикл трикарбонових кислот однаковий.

Крім включення піровиноградної кислоти в перетворення по циклу трикарбонових кислот, з неї можуть утворитися інші продукти, які часто виявляються у грибів і актиноміцетів. При гальмуванні реакції окислювального декарбоксілювання піровиноградної кислоти відбувається адаптивне перемикавання на її анаеробне перетворення. В результаті реакції утвориться ацетил-метил-карбинол.

При спиртовому бродінні піровиноградна кислота піддається розщепленню під дією карбоксилази на вуглекислий газ і оцтовий альдегід.

Останній далі вступає у взаємодію з відновленою формою НАДФ-коферменту алкогольдегідрогенази. Відбувається окисно-відновна реакція.

При утворенні молочної кислоти відбувається безпосереднє відновлення піровиноградної кислоти під дією лактатдегідрогенази.

При вирощуванні мікроорганізмів в культуральній рідині накопичуються органічні кислоти. Залежно від джерела вуглецю виявлено у Act. *Violaceus* різні кислоти. Наприклад, при використанні яблучної кислоти були виявлені гліколева, молочна, янтарна, фумарова кислоти; при введенні до складу середовища

піровиноградної кислоти, крім перерахованих, - яблучна; при вживанні лимонної - одна fumarова. Кількість присутніх в середовищі органічних кислот залежить від джерела вуглеводу, ступеня аерації, а також фізіологічних особливостей культури. При біосинтезі тетрацикліну *Act. aureofaciens* найбільшу кількість органічних кислот виявлялося в період між 14 і 24 год., до кінця ферментації кислотоутворення знижується. При зменшенні аерації у тій же культурі змінився якісний склад органічних кислот, переважаючими стали оцтова і піровиноградна кислоти.

Енергетична характеристика асиміляції вуглеводів. Процес асиміляції вуглеводів, так само як і інших поживних речовин, характеризується певними енергетичними величинами. Виділяють три головні фази звільнення енергії з поживних речовин.

У *першій фазі* великі молекули поживних речовин розпадаються на більш дрібні одиниці. Білки розпадаються до амінокислот, складні вуглеводи - до гексоз і жири - до гліцерину і жирних кислот. На різних етапах першої фази звільняються відносно невеликі кількості енергії. Вільна енергія гідролізу глюкозидного зв'язку крохмалю становить величину приблизно 4,3 ккал, пептидного зв'язку - 3,0 ккал і ефірного зв'язку складних ефірів - 2,5 ккал на 1 моль. Це означає, що в першій фазі звільняється близько 0,6% запасу вільної енергії полісахаридів і білків і близько 0,1% вільної енергії тригліцеридів. Реакції цієї фази готують поживні речовини для подальших перетворень, що поставляють енергію.

Різноманітні молекули з низькою молекулярною вагою, що утворюються в першій фазі - три або більше видів різних гексоз, гліцерин, близько 20 амінокислот і ряд видів жирних кислот, піддаються неповному згорянню в *другій фазі*, кінцевими продуктами якої, крім вуглекислоти і води, є: оцтова кислота у формі ацетилкоензиму А, а-кетоглютарової і щавелевооцтової кислоти. Перша з цих речовин має найбільше значення: дві третини вуглецевих атомів вуглеводів і гліцерину, всі вуглецеві атоми звичайних жирних кислот і приблизно половина вуглецевого скелета амінокислот утворюють ацетилкоензим А. Три кінцеві продукти другої фази тісно пов'язані один з одним в обміні речовин. Вони беруть участь у *третьій фазі*, де відбувається звільнення енергії, тобто в циклі трикарбонових кислот, що представляє собою загальний «кінцевий» шлях окислення всіх поживних речовин.

Розрізняють дві групи принципово відмінних енергетичних

перетворень речовин:

1) анаеробні процеси, що протікають без будь-якої участі кисню, 2) аеробні, в яких кисень повітря обов'язково бере участь. Аеробні можуть бути поділені на дві категорії в залежності від того, чи супроводжується окислення десмолітичним розщепленням речовин або не супроводжується.

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

1. *Пряме окислення речовини субстрату.* Як відібрання водню від речовини, що окислюється, так і приєднання до нього кисню відбувається без значної зміни загальної хімічної структури, зі збереженням того ж числа вуглецевих атомів.

2. *Десмолітичне розщеплення речовин без участі кисню повітря, але зі стабілізацією продуктів бродіння за рахунок сполученого окислення-відновлення (анаеробне бродіння).* Цей тип характеризується перш за все розривом вуглецевого ланцюга. Однак наведений в даному прикладі симетричний розрив на дві рівні частини є тільки окремим випадком. У багатьох випадках десмоліз призводить до відщеплення одного С-атома. У деяких випадках справа не обмежується одноразовим десмолізом, він відбувається ще раз, причому може поєднуватися з іншими реакціями.

Різні шляхи зброджування гексоз складаються, в кінці кінців, з комбінації трьох основних реакцій:

- а) реакція десмоліза, супроводжувана приєднанням іонів води.
- б) реакція сполученого окислення-відновлення (реакція Каніцаро).
- в) реакція конденсації двох або декількох вуглецевих ланцюгів.

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

3. Характеристика основних джерел вуглеводів, які застосовуються для біосинтезу.

Вуглеводи є однією з найважливіших складових частин середовищ для культивування мікроорганізмів. Як було сказано вище, вони використовуються для синтезу клітинних структур і є одночасно джерелом енергії. Вуглеводи є сполуками, багатими вуглецевими атомами. Вуглець входить до складу протоплазми клітин, клітинних оболонок, ферментів і т.п. Близько половини сухої ваги всіх мікроорганізмів припадає на частку вуглецю. Вуглеці забезпечують побудову вуглецевої структури молекули більшості антибіотиків,

амінокислот, вітамінів і т.д. Тому сполуки, що містять вуглець, мають першочергову роль в харчуванні мікроорганізмів.

Мікроорганізми-продуценти можуть споживати різні вуглеводи, але найбільш часто вживаними для промислового використання є глюкоза або крохмаль. За хімічною структурою глюкоза є альдогексозою. У поживні середовища часто вводять технічну глюкозу або маточник, що залишається після виділення кристалічної глюкози, в промисловості він носить назву гідрол. Гідрол містить до 50% редуруючих цукрів (при розрахунку на глюкозу). При введенні в середовище технічних продуктів їх кількість розраховують за вмістом редууючих речовин, в перерахунку на чисті вуглеводи. Більшість видів грибів і актиноміцетів засвоює глюкозу краще, ніж будь-який інший вуглевод. Тому глюкозу можна розглядати як майже універсальне джерело вуглецю.

При спробах культивувати мікроорганізм, харчові потреби якого ще не встановлені, першим пробним джерелом вуглецю повинна бути глюкоза. У виробництві пеніциліну використовують дисахарид лактозу. Лактоза складається з глюкози і галактози, будучи β -галактозидоглюкозою. До складу поживних середовищ для виробництва хлортетрацикліну, ністатину і деяких інших антибіотиків входить крохмаль. Він на 96-97,5% складається з полісахаридів, що утворюють глюкозу. Вуглеводна частина крохмалю складається з двох полісахаридів: амілози і амілопектину. Амілоза є лінійним полімером глюкози, з молекулярною вагою 50 - 160 тисяч. Амілоза добре розчиняється в теплій воді, утворюючи розчини порівняно невисокою в'язкості. У молекул амілози залишки глюкози пов'язані між першим і четвертим вуглецевими атомами.

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

У молекулі амілопектину є два типи зв'язків між молекулами глюкози. Одним зв'язок між 1-м і 4-м вуглецевими атомами і другий - між 1-м і 6-м. В середньому на 25 залишків глюкози доводиться один 1.6-глюкозидний зв'язок.

У крохмальному зерні спочатку утворюється амілоза, яка потім перетворюється в амілопектин за допомогою Q-ферменту.

Для того, щоб мікроорганізм міг асимілювати крохмаль, необхідно, щоб він мав відповідну ферментну систему. Ферменти, що

гідролізують крохмаль, називаються амілолітичними ферментами. β -амілаза розриває 1-4-й вуглецевий зв'язок до мальтози. Таким чином, β -амілаза на 100% гідролізує амілозу до мальтози. Розщеплення мальтози до глюкози відбувається при дії α -глюкозидази, так як в молекулі мальтози є α -глюкозидазний зв'язок.

Гідроліз амілопектину β -амілазою відбувається тільки на лінійних ділянках, до зв'язку між 1-м і 6-м вуглецевими атомами з утворенням мальтози і декстринів. Гідроліз декстринів до мальтози здійснюється α -амілазою.

Торкаючись механізму використання поживних субстратів, в першу чергу вуглеводів, необхідно відзначити, що багато гідролітичних ферментів, зокрема амілолітичні, є позаклітинними ферментами. Їх роль в основному зводиться до перетворення складних з'єднань в більш прості, засвоювані організмом. Реакції синтезу здійснюються в основному усередині клітини.

Речовини, що гідролізуються в середовищі, поступово асимілюються клітиною, тим самим постійно зрушуючи потенційно можливе становлення рівноваги ферментативної реакції. Процеси гідролізу в середовищі практично йдуть до кінця. Усередині клітини відбувається безперервне накопичення продуктів гідролізу, що сприяє зворотній реакції або, інакше кажучи, синтезу. Таким чином, можна очікувати, що синтез всередині клітини повинен відбуватися переважно в ті періоди, коли в клітину безперервно надходить велика кількість простих молекул поживних речовин. У тих же випадках, коли в клітину не надходить поживних речовин або коли їх надходить недостатньо, відбувається гідроліз запасних поживних речовин.

Вважають, що мікроорганізми, що володіють достатньою біохімічною активністю, перетворюють приблизно половину вуглеводів, що містяться в середовищі, в складові частини клітини. У лабораторних умовах практично ця величина значно менше. Вуглець, не використаний на синтез клітинного матеріалу, перетворюється на вуглекислоту і в проміжні продукти обміну речовин, наприклад спирт або органічні кислоти. До їх числа можуть бути також віднесені антибіотики, вітаміни, амінокислоти і т.д. У промисловості намагаються створити такі умови культивування, при яких можливо більша кількість вуглецю йде на утворення потрібного продукту обміну і можливо менша кількість витрачається на синтез

біомаси і утворення вуглекислого газу.

4. Вплив вуглеводів на процеси біосинтезу

При вивченні впливу вуглеводів на біосинтез різних біологічно активних речовин, як правило, для культивування продуцентів використовують синтетичні середовища. Створюється певна композиція середовища, в якій потім в серії послідовних дослідів один вуглевод замінюють іншим в рівних кількостях. У деяких експериментах, призначених для оцінки можливості застосування певних вуглеводів, в промислових умовах використовують комплексні середовища, до складу яких входять соєве борошно, кукурудзяний екстракт, кукурудзяна мука і т.п. При цьому для правильних висновків необхідно застосовувати всі компоненти середовища, крім досліджуваних вуглеводів, з однієї партії або серії. Існує певна вибірковість продуцентів до вуглеводів, що входить до складу середовища. Деякі антибіотики утворюються в більшій кількості в присутності глюкози (стрептоміцин, ністатин, мономіцин). Для отримання інших антибіотиків виявляються більш сприятливі середовища з крохмалем (окситетрациклін, тетрациклін, хлортетрациклін, неоміцин). У деяких випадках більш високий вихід антибіотиків отримували на середовищах з сумішшю глюкози з крохмалем (окситетрациклін, олеандоміцин). На прикладі дослідів, проведених на синтетичних середовищах з кількома штамами продуцента стрептоміцину, доцільно розглянути деякі питання, пов'язані з впливом вуглеводів на біосинтез антибіотика. Найбільш інтенсивно в більшості дослідів використовувалися глюкоза, фруктоза, маноза, мальтоза, крохмаль. На середовищах з цими вуглеводами було відмічено утворення найбільшої кількості біомаси. При оцінці результатів впливу вуглеводів на синтез того чи іншого антибіотика необхідно враховувати штам продуцента, його специфічну потребу у вуглеводах і особливості метаболізму, що забезпечують накопичення в середовищі потрібного продукту.

Крім штаму, необхідно враховувати загальну композицію середовища. Якщо ті ж вуглеводи, які застосовували в синтетичному середовищі, застосувати в комплексному, що містить соєве борошно, то ступінь їх використання і впливу на вихід антибіотика може бути іншим, ніж на синтетичному середовищі. При культивуванні продуцента флориміцину на середовищі з сульфатом амонію синтезувалося значно більше антибіотика в присутності глюкози, ніж

крохмалю. Заміна сульфату амонію на нітрат натрію значно підвищила вихід флориміцину на середовищі з крохмалем, практично до рівня, отриманого на середовищі з глюкозою. Однією з причин різної продуктивності тих самих штамів на середовищах, що містять глюкозу або крохмаль, є відмінність в обміні речовин в присутності даних вуглеводів. Так, наприклад, міцелій *Act. fradiae* 129, виріс на середовищі з глюкозою, містив майже в два рази більше азоту і значно більше нуклеїнових кислот, ніж міцелій з крохмального середовища.

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

При ферментації деяких антибіотиків необхідно, щоб в період біосинтезу в середовищі перебувало ще кілька вуглеводів. Якщо відбувається використання вуглеводів в перші години розвитку культури, то може виявитися, що в період інтенсивного синтезу антибіотиків вуглеводів не буде в культуральній рідині. При цьому передчасно настає максимум вмісту міцелію в культуральній рідині, автоліз культури. Порівняння використання глюкози і крохмалю при біосинтезі стрептоміцину культурою *Act. Streptomycini* B-178 показує, що глюкоза більш інтенсивно включається в метаболізм в порівнянні з крохмалем. На середовищі з крохмалем зростання культури декілька уповільнене, автоліз настає пізніше, рівень вмісту антибіотика в культуральній рідині вище.

Особливо інтенсивно відбувається процес окислення глюкози продуцентом пеніциліну *Penicillium chrysogenum*. Глюкоза окислюється настільки інтенсивно, що в період синтезу антибіотика її вже може практично не бути в середовищі. Тому в середовище одночасно з глюкозою вводять лактозу, вуглевод, який окислюється повільніше. Він значно довше затримується в середовищі і забезпечує структурним матеріалом побудову молекули пеніциліну. Оскільки лактоза вельми дорогий продукт, у середовище безперервно з певною швидкістю можна додатково вводити концентрований стерильний розчин глюкози, виключивши лактозу.

При вивченні впливу вуглеводів на біосинтез необхідно в ряді випадків аналізувати проміжні продукти метаболізму. Зокрема, однією з причин низької активності середовища, що містить крохмаль, при біосинтезі стрептоміцину виявилось надмірне

накопичення в ній пірвіноградної кислоти. Остання утворилася в великих кількостях, але повільно піддавалася подальшій трансформації, через що, в свою чергу, не утворювалися продукти, що забезпечують біосинтез стрептоміцину.

При оцінці впливу різних джерел вуглеводу на біосинтез антибіотиків необхідно мати на увазі, що при стерилізації середовищ для культивування під тиском 1,5-2,0 атм в них відбуваються різні хімічні процеси, що впливають на хід ферментації.

При зазначених умовах вуглеводи взаємодіють з амінокислотами, з солями амонію. Візуально це зазначається потемнінням середовища. Тому рекомендується стерилізацію вуглеводів проводити окремо, зокрема при системі виносної стерилізації. При ферментації на середовищах, де вуглеводи втратили свою якість після стерилізації, спостерігаються нижчі виходи.

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

ЛЕКЦІЯ 4

Вплив жирів на процеси біосинтезу

План:

1. Хімічний склад жирів, що синтезуються мікроорганізмами.
2. Шляхи асиміляції жирів мікроорганізмами.
3. Вплив умов культивування на синтез жирів.
4. Вплив жирів на процеси біосинтезу.

Ключові слова: жир, ліпіди, біосинтез, мікроорганізми, культивування, гліцерин.

Key words: fat, lipids, biosynthesis, microorganisms, cultivation, glycerol.

1. Хімічний склад жирів, що синтезуються мікроорганізмами.

До останнього часу не проводилося систематичного вивчення хімічного складу жирів, синтезованих мікроорганізмами. Зараз проблема біосинтезу жирів мікроорганізмів набуває велике народногосподарське значення. Як продуцентів жирів і ліпидо-білкових комплексів для кормових цілей в основному використовуються дріжджові культури. З мікроорганізмів, що утворюють біологічно активні речовини, найбільш повно вивчений хімічний склад жирів у грибів, що відносяться до родів *Penicillium* і *Aspergillus*.

Вміст жиру в грибах, що утворюють міцелій, коливається в дуже широких межах, від 1 до 50% (на суху вагу), в залежності від культури, віку і умов культивування. Основна маса ліпоїдної фракції складається з гліцеридів, що містять зазвичай насичені і ненасичені жирні кислоти з C₁₆ і C₁₈, головним чином пальмітинову, стеаринову, олеїнову та лінолеву кислоти.

При дослідженні жирних кислот, що входять до складу жиру *Penicillium sorpiti*, були виявлені наступні жирні кислоти (у відсотках до загальної суми): міристинова - 0,3, пальмітинова - 22,0, стеаринова - 7,6, арахісова - 0,9, гексадеценова - 3,3, олеїнова - 45,2, лінолева - 20,0, ліноленова - 0,3, ейкозенова - 0,3. За складом жирних кислот виділений жир нагадує арахісове масло. При аналізі жирних кислот міцелію *Streptomyces erythreus* і *Streptomyces halstedii* було встановлено, що, крім насичених кислот з прямим ланцюгом, де переважну кількість займала пальмітинова кислота, у обох культур

містяться насичені кислоти з розгалуженими ланцюгами в анітізо формах. Ненасичені кислоти були представлені в основному олеїноюю і лінолевою кислотами цис-конфігурації.

Жирні кислоти присутні в незначній кількості в міцелії у вільному стані.

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

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

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

У міцелії грибів містяться також фосфатиди і стероли. Фосфатиди, як і жири, є гліцеридами, тобто складними ефірами гліцерину і жирних кислот. На відміну від жирів вони містять фосфорну кислоту і пов'язану з нею азотисту основу.

2. Шляхи асиміляції жирів мікроорганізмами.

Ліпаза. Ліпаза - фермент, який діє на складний ефірний зв'язок між гліцерином і високомолекулярними жирними кислотами. В результаті цієї реакції утворюються гліцерин і жирні кислоти. Ліпаза виявлена у багатьох мікроорганізмів, зокрема у продуцентів антибіотиків. У зв'язку із застосуванням різних жирів в якості піногасників і джерел вуглецевого харчування ліпаза становить значний інтерес. Наявність ліпази є одним з факторів, що сприяють засвоєнню жирів в якості поживних речовин. Завдяки присутності

ліпази в культуральній рідині відбувається розпад жирів, які були введені в середовище.

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

З міцелію *Penicillium chrysogenum* шляхом розтирання замороженого міцелію і подальшої екстракції отримано ферментний препарат, що містить ліпазу. У своєму складі він містить сульфгідрильні групи.

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

β - окислення жирних кислот. Механізм, за допомогою якого у мікроорганізмів відбувається окислення утворених в результаті гідролізу жиру жирних кислот, добре вивчений у актиноміцетів. Він носить назву β -окислення. Механізм β -окислення полягає в послідовному укорочуванні жирної кислоти на два вуглецевих атома. Окисленню (дегідруванню) в цьому випадку піддається радикал - CH_2 , що знаходиться в β -положенні по відношенню до карбоксилу. У реакціях β -окислення бере участь коензим А. Реакція дегідрування ацил-коензиму А похідного жирної кислоти каталізується відповідною ацилдегідрогеназою, в результаті чого утворюється сполука, що має подвійний зв'язок у другого вуглецевого атома.

Далі діє фермент еноілгідраза, що каталізує реакцію приєднання води до ненасичених сполук. Потім відбувається дегідрогенізація (3-оксикислоти до кетокислот за допомогою β -оксиацилдегідрогенази). Перед дією β -кетоацилтіолази відбувається заключна реакція. Таким шляхом утворюється ацил-коензим А - похідне жирної кислоти, укороченої на два вуглецевих атома, з яких виникає ацетилкоензим А. Утворене КоА - похідне жирних кислот проходить через такі ж

чотири реакції і знову коротшає на два вуглецевих атома і т. д. Коензим А після включення ацетильного радикалу в цикл трикарбонових кислот, знову звільняється і може знову діяти як каталізатор.

3. Вплив умов культивування на синтез жирів.

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

Найбільш істотний вплив на синтез жирів мікроорганізмами надають вуглеводи середовища, їх концентрація та хімічна природа. Концентрація цукру повинна знаходитися в певних межах, так як при високих її величинах зростання грибів виявляється пригніченим. З експериментальних даних, виходить, що найбільша кількість жиру синтезується грибом при утриманні в середовищі 40% глюкози.

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

За інших однакових умов кількість синтезованого жиру залежить від культури. Наприклад, при культивуванні на середовищі, що містить сахарозу, *Aspergillus nidulans* на 100 г використаного вуглеводу синтезував 13,2 г жиру, *Penicillium javanicum* - 7,9 г; *Penicillium spinulosum* - 5,1.

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

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

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

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

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

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

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

Ацил-коензим А, що утворився, - похідне жирної кислоти з 4 вуглецевими атомами, в свою чергу, конденсується з молекулою малонілкоензима А. Після відновлення і декарбоксилювання продукту, що виникає таким шляхом, утворюється ацил-КоА - похідне капронової кислоти і т. д.

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

4. Вплив жирів на процеси біосинтезу.

При біосинтезі багатьох біологічно активних речовин в ферментері утворюється значна кількість піни. Інтенсивне вспінювання небажано, бо піна може проникнути в різні вузли комунікацій, пов'язаних з ферментером. Надалі, в місцях, куди проникла піна, може розвинутися стороння мікрофлора.

Існують різні способи боротьби з піною. Найбільш часто намагалися застосовувати механічне пошкодження піни, проте це не дало бажаного результату. Боротьба з піноутворенням в основному пішла у напрямку зміни поверхневого натягу культуральної рідини. Для цієї мети зазвичай застосовують поверхнево активні речовини. Багаторічною практикою перевірено застосування жирів і масел. За рахунок наявних в складі жирів вищих жирних кислот з яскраво вираженими гідрофобними властивостями вони різко знижують поверхневий натяг і тим самим перешкоджають піноутворенню. Крім жирів, можуть бути використані інші речовини, що володіють тими ж фізико-хімічними властивостями, наприклад високомолекулярні кремній-органічні сполуки типу полісілоксанів. Застосування кремній-органічних сполук в якості піногасників вимагає спеціального уточнення деяких технологічних показників процесу.

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

За кордоном часто застосовують як піногасник лярд (топлене свиняче сало). Жири додають в процесі ферментації періодично. Однією з причин, внаслідок якої жир слід додавати періодично, є можливість утворення кальцієвих мил з крейдою, що присутня в середовищі.

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

Під дією ліпази мікроорганізмів жир розщеплюється, причому в кінці ферментації він має майже таке ж кислотне число, яке може бути отримано при його лужному гідролізі.

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

Динаміка споживання різних фракцій кашалотового жиру була вивчена при біосинтезі гризюфульвіну культурою *Penicillium nigricans*. Середовище містило 5% кашалотового жиру. З середовища насамперед зникали тригліцериди, при цьому одночасно значно збільшувалася фракція вільних жирних кислот. Тільки після виснаження тригліцеридів і вільних жирних кислот відбувалося посилене споживання спермацету. Останній повністю грибом не використовувався навіть в тому випадку, коли в середовищі перебувало менша його кількість, ніж зазначено вище. З жирних кислот, присутніх в середовищі при введенні кашалотового жиру, найбільш інтенсивно використовуються ненасичені жирні кислоти: олеїнова, лінолева, ліноленова, арахідонова. Так, наприклад, кількість олеїнової кислоти в культуральній рідині за час ферментації зменшується майже в шістьдесят разів. У дослідах, які були проведені з високоактивними штамми продуцентів пеніциліну, було показано, що різні масла і особливо кашалотовий жир можуть частково або повністю замінювати в середовищі лактозу і глюкозу як джерела вуглецю. Вивчення динаміки синтезу антибіотика і біохімічних змін в культуральній рідині показало, що жири споживаються так само, як лактоза. Після досягнення максимуму ваги міцелію автоліз не спостерігається, і більший вихід пеніциліну відбувається за рахунок продовження фази пеніциліноутворення.

На середовищі з 3,5% жиру вдавалося отримати до 7800 ОД / мл пеніциліну. Різні масла можуть повністю замінити глюкозу при біосинтезі стрептоміцину. До їх числа відносяться кукурудзяне, соєве, бавовняне, льняне, оливкове, арахісове масло і лярд. При

розрахунку необхідної кількості масла для повної заміни глюкози пропонується виходити не з вагової кількості, а з калорійності.

При біосинтезі окситетрацикліну заміна крохмалю соняшnikовою або соєвою олією або кашалотовим жиром по калорійності, як це мало місце при отриманні стрептоміцину, виявилася невиправданою. Тільки підвищення концентрації олії в середовищі до 3-4% дозволило отримати приблизно таку саму кількість окситетрацикліну, що і на середовищі, що містить 2,5% крохмалю. Продукент окситетрацикліну Act. rimosus використовує масло не більше ніж на 60%. Цей факт дозволяє припустити, що якісь складові частини соняшnikової олії не використовуються продуцентом або використовуються ним дуже повільно.

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

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

При ферментації хлортетрацикліну використовували гліцерин, стеаринову, міристинову і олеїнову кислоти.

При введенні до складу середовища олеїнової кислоти в кількості 0,05-0,1% спостерігалася пригнічення росту і слабке утворення антибіотика. Стосовно до біосинтезу хлор тетрацикліну висловлюється припущення, що в тому випадку, коли швидкість розкладання масла актиноміцетом перевищує швидкість використання його складових частин, ненасичені жирні кислоти, що накопичуються, негативно впливають на вихід антибіотика. Це має місце при додаванні масел в погіршених умовах аерації, при застосуванні масел, що містять велику кількість ненасичених жирних кислот. Стимулюючий вплив масла на біосинтез хлортетрацикліну відзначається при введенні його в перший період ферментації. Присутність в середовищі для культивування масла впливає на багато показників процесу ферментації. На прикладі культури Act. streptomycini ЛС-1 було показано, що вага міцелію при наявності в середовищі масла протягом усього процесу ферментації значно вище, ніж на контрольному середовищі без масла. У присутності масла значно швидше і повніше використовувався амонійний азот, а виділення його в середовищк сповільнювалося. Введення масла надавало стабілізуючий вплив на величину рН, зменшуючи в порівнянні з контролем діапазон коливань. При високій концентрації масла уповільнювалося використання вуглеводів.

МОДУЛЬ 3. З'єднання фосфору та їх участь в синтезі мікроорганізмів. Вплив мінеральних компонентів на біосинтез. Значення рН для життєдіяльності мікроорганізмів.

ЛЕКЦІЯ 5

З'єднання фосфору та їх участь в синтезі мікроорганізмів

План:

1. Фосфоровмісні компоненти мікробних клітн.
2. Вплив фосфору на біосинтез антибіотиків.

Ключові слова: фосфор, поліфосфати, мікроорганізми, синтез, культивування, середовище.

Key words: phosphorus, polyphosphates, microorganisms, synthesis, cultivation, nutrient medium.

1. Фосфоровмісні компоненти мікробних клітн.

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

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

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

Для синтезу поліфосфатів в поживному середовищі необхідно мати достатню кількість фосфору і джерел енергії. Так, велика кількість поліфосфатів у клітинах виявляється при наявності в середовищі великої кількості фосфору і субстратів, що легко окислюються, наприклад глюкоза. У синтезі поліфосфатів бере участь АТФ, при цьому відбувається передача фосфорних груп від АТФ до поліфосфатів та назад.

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

Обмін поліфосфатів у різних мікроорганізмів відбувається в загальному по одним і тим самим закономірностям. Так, в процесі

проростання спор цвілевих грибів і в латентну фазу розвитку бактерії йде інтенсивний синтез високополімерних поліфосфатів. Створення КНР поліфосфатів йде в цей період за рахунок низькополімерних КР поліфосфатів, кількість яких різко знижується. У цей період ферменти, що розщеплюють КНР поліфосфати, знаходяться в неактивному стані. Фосфор поживного середовища не надходить в спори цвілевих грибів, тому при синтезі нуклеїнових кислот поліфосфати є для них джерелом фосфору. З початком інтенсивного росту і ділення клітин, зокрема при утворенні міцелію у грибів, високополімерні поліфосфати КНР-фракції використовуються на синтетичні процеси, які активно йдуть в цей час, і в першу чергу на біосинтез білка і нуклеїнових кислот. З переходом в стаціонарну фазу розвитку використання поліфосфатів для синтетичних цілей дещо призупиняється. Кількісні відносини між КНР і КР поліфосфатами залежать від умов культивування, що забезпечують, зокрема, ферментативну активність різних деполімераз полі фосфатів. Вважають, що наявність конденсованих неорганічних фосфатів в відчутних кількостях тільки у нижчих організмів пов'язано з властивою цим організмам надзвичайно високою швидкістю поділу їх клітин. Поліфосфати, будучи концентратом великих кількостей фосфору і енергії, можливо якраз і забезпечують таку високу швидкість ділення у цих організмів.

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

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

На утворення валютину в міцелії суттєвий вплив надає склад середовища для культивування. При цитологічному вивченні *Act.*

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

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

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

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

2. Вплив фосфору на біосинтез антибіотиків.

На біосинтез антибіотиків значний вплив має концентрація в середовищі з'єднань фосфору. Такими поєднаннями найбільш часто бувають одно- або двозаміщенні фосфати калію та натрію. Зміни вмісту фосфату у середовищі несе за собою зміни в синтезі важливих для життєдіяльності клітини фосфоровмісних компонентів: нуклеопротейдів цитоплазми та ядерних елементів. Крім того, фосфор є речовиною, яка дозволяє за допомогою змін його концентрації в

середовищі, регулювати активність ферментних систем вуглеводного обміну, зокрема переключати розпад вуглеводів з гліколітичного на гексозомонофосфатний шлях.

Дослідні дані, які були отримані при ферментації деяких антибіотиків, показали, що підвищенні концентрації фосфату у середовищі значно знижують їх вихід. При ферментації на середовищі з кукурудзяним екстрактом вміст фосфору 2мг% більш сприятливий, ніж 12мг%. При вивченні впливу різних концентрацій однозаміщеного фосфату калію на біосинтез окситетрацикліну штамами *Act.rimosus* ЛС-118 та 293 було показано, що оптимальний вміст фосфату у середовищі залежить від штаму. У деяких ферментативних середовищах, що містять кукурудзяний екстракт, неорганічний фосфор під час приготування середовища і стерилізації частково зв'язується крейдою. Тому в початковому середовищі, поряд з розчиненим неорганічним фосфором, завжди присутня деяка кількість неорганічного фосфору у вигляді осаду. Вивчення споживання цих форм фосфору в процесі ферментації хлортетрацикліну показало, що фосфор розчинних мінеральних сполук дуже швидко використовується мікроорганізмом і вже до 18-ї години зростання він практично зникає з культуральної рідини. Фосфор нерозчинних мінеральних сполук використовується продуцентом в значно меншому ступені. Аналіз динаміки кількісного вмісту вуглеводів в процесі біосинтезу хлортетрацикліну показує, що присутність в середовищі надлишку фосфату веде до підвищення швидкості споживання вуглеводів і накопичення піровиноградної кислоти. Новоутворена піровиноградна кислота найбільш інтенсивно включається в матаболізм тоді, коли вуглеводи середовища виявляються майже повністю зруйнованими. Істотний вплив на обмін речовин має час введення фосфатів в середовище. При введенні надлишкової кількості фосфатів у середовище при біосинтезі стрептоміцину було встановлено, що гальмування біосинтезу антибіотика відбувається у всіх випадках, однак найбільше пригнічення синтезу спостерігалось, якщо фосфат був доданий в ранні терміни ферментації.

Щодо впливу фосфору на матаболізм грибів при біосинтезі антибіотиків немає настільки великих експериментальних і теоретичних матеріалів, як для актиноміцетів. Вміст фосфору в середовищі, що забезпечує нормальний розвиток *Pen.chrysogenum*, варіює в досить широких межах - від 0,6 до 0,03% K_2HPO_4 . Однак для

максимального утворення пеніциліну фосфору потрібно більше, ніж його необхідно для зростання гриба. При зменшенні вмісту фосфору в синтетичному середовищі в 10 разів (з 0,068 до 0,0068%) не відзначається впливу на ріст міцелію. Його вага в обох випадках однакова. Разом з тим кількість пеніциліну в культуральній рідині знижується на 30%.

Таким чином, оптимальна концентрація в середовищі фосфату не є чимось постійним, а залежить від складу використовуваних середовищ і умов культивування. При підборі композиції середовища для культивування необхідно враховувати не тільки мінеральні фосфоромісні з'єднання, але і органічні, що містять фосфор. Такі сполуки, зокрема, містяться в кукурудзяному екстракті, соєвому борошні, бавовняній макусі та інших речовинах рослинного і тваринного походження, які входять в комплексні середовища. Однак їх вплив на процеси обміну вуглеводів і біосинтез антибіотиків можуть бути іншими, ніж вплив фосфатів.

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

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

У зв'язку з тим, що фосфор кукурудзяного екстракту, на думку багатьох дослідників, є одним з істотних факторів, що впливають на біосинтез антибіотиків, проводилася спеціальна обробка екстракту з метою видалення фосфоромісних речовин. Однією з таких речовин є фітин. При дефітинізації кукурудзяного екстракту кількість фосфору знижується приблизно в десять разів. Введення в середовище дефітинізованого кукурудзяного екстракту по-різному впливає на здатність синтезувати пеніцилін різними штамми. При використанні штаму *Pen. chrysogenum* 49-113 активність культуральної рідини зростає, у штаму «Новий гібрид» - активність знижується.

Як вище зазначалося, це залежить, напевно, від індивідуальних особливостей штаму щодо оптимальної концентрації фосфору в середовищі для успішного синтезу антибіотика.

Залежність між біосинтезом антибіотиків та вмістом фосфору в міцелії. Як було показано численними дослідженнями, продуктивність міцелію залежить від кількості фосфору, що в ньому знаходиться. Кількість фосфору в міцелії залежить від концентрації фосфору в середовищі. В. А. Северин і С.В.Горська вивчали названі закономірності на синтетичному середовищі, що містить глюкозу, молочну кислоту, сульфат амонію, сірчанокислі солі магнію, заліза, марганцю, цинку. Кількість K_2HPO_4 була змінною. Вони встановили, що міцелій, що містить 5-6 мкг фосфору на 1 мг сухого міцелію, продукує мало стрептоміцину. Клітини такого міцелію володіють зниженою здатністю споживати основні поживні речовини середовища. Міцелій утворює нехарактерні для даного виду форми. 20-37 мкг фосфору на 1 мг міцелію також гальмують утворення стрептоміцину, хоча динаміка процесу ферментації в цьому випадку інша - повне споживання вуглеводів, швидке накопичення біомаси, ранній автоліз міцелію. Кількість фосфору в 10-13 мкг на 1 мг міцелію найбільш сприятлива для успішного біосинтезу антибіотика. Така кількість фосфору накопичується в міцелії, якщо синтетичне середовище містить 12-15 мг% фосфору (або 0,05% K_2HPO_4).

Вище було відзначено, що вміст фосфору в міцелії залежить від його концентрації в середовищі. Так, при вирощуванні *Pen.chrysogenum* на синтетичному середовищі, що містить 0,1% K_2HPO_4 , грибок асимілює 8-11 мг% фосфору, при цьому в 1 г міцелію його міститься 15 мг. При зменшенні концентрації фосфату в середовищі до 0,03% споживання фосфору знизилось до 6,5 мг% 10, а вміст його в міцелії склав 10 мг на грам сухої речовини. Однак прямої

залежності між концентрацією фосфору в середовищі и вмістом його в міцелії не відзначається.

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

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

ЛЕКЦІЯ 6

Вплив мінеральних компонентів на біосинтез

План:

1. Зольний склад мікроорганізмів.
2. Мінеральні компоненти середовища, їх участь у обміні речовин та вплив на біосинтез.

Ключові слова: мінеральні речовини, біосинтез, поживні середовища, з'єднання металів, ферментація.

Key words: mineral substances, biosynthesis, nutrient media, metal compounds, fermentation.

1. Зольний склад мікроорганізмів.

Поряд з органічними компонентами - білками, вуглеводами, жирами, в протоплазмі клітин містяться сполуки, що складають велику групу мінеральних речовин. Кількісний вміст їх різний, багато хто з них виявлений в мікрокількостях.

Для того, щоб визначити, які елементи входять до складу мікробних клітин, проводять спалювання біомаси (озолення), а потім аналізують золу, застосовуючи специфічні хімічні реакції або емісійний спектральний аналіз. Спектральний аналіз міцелію продуцента стрептоміцину дозволив виявити в відчутних кількостях кальцій, магній, натрій, кремній, залізо, калій, фосфор, а стронцій, алюміній, літій, рубідій, марганець, свинець - у вигляді слідів. Приблизно такі ж елементи були виявлені в золі міцелію гриба *Asp. niger*, де, крім названих елементів, були ідентифіковані мідь, вісмут і срібло. У цього ж гриба проводилося окреме вивчення вмісту мінеральних компонентів в міцелії і спорах. Виявилося, що одні мінеральні речовини переважно накопичуються в спорах, інші в міцелії. Спори містять в три рази більше золи, ніж міцелій. Кожен з представлених елементів, за винятком кальцію, присутній в спорах в більшій кількості, ніж в міцелії. Коливання вмісту мінеральних речовин в міцелії можуть бути досить значними. Так, в залежності від концентрації елементів в середовищі, їх вміст в міцелії спостерігався в наступних межах: K^+ - 0,073-0,27 мМ/г; Ca^{++} - 0,0012-0,139 мМ/г; Mn - 0,007-0,172 мМ/г.

Наявність мінеральних речовин в протоплазмі клітин обумовлено їх присутністю в середовищі. Однак зольний склад протоплазми клітин не є точним відображенням кількісних відносин мінеральних

компонентів середовища. Склад зольних елементів клітини залежить від присутніх в середовищі компонентів. Наприклад, оцтова кислота в кислому середовищі перешкоджає проникненню фосфору всередину клітини *Asp. niger*, але не впливає на перенесення одноатомних іонів, таких, як хлорид і йодид. Зольний склад міцелію залежить також від композиції мінеральних компонентів середовища: додавання 1,0 мг заліза до культуральної рідини збільшує майже в два рази вміст в міцелії калію і зменшує вміст фосфору.

2. Мінеральні компоненти середовища, їх участь у обміні речовин та вплив на біосинтез.

При вивченні впливу мінеральних компонентів середовища на біосинтез необхідно мати на увазі, що практично ми завжди вносимо в середовище значну і часом не враховану їх кількість. Можливими джерелами мінеральних іонів можуть бути хімічні реактиви, посівний матеріал, вода, посуд і ін. При аналізі деяких хімічних речовин спектрографічним методом було виявлено, наприклад, в глюкозі присутність у вигляді домішок сімнадцяти елементів, в сульфаті магнію і сульфаті цинку - по дев'ять елементів. Вода зазвичай найбільш багата солями заліза, кальцію і магнію. Для спеціальних досліджень при вивченні мінерального обміну рекомендується користуватися двічі дистильованою водою.

Джерелом забруднення середовищ мінеральними іонами може бути скляний посуд, зокрема колби, де відбувається культивування. Відомо, що скло піддається вилужуванню, при цьому деякі іони – натрій, калій, магній, кальцій – можуть переходити з скла в середовище. Рекомендують застосовувати колби з такого скла, яке майже не піддається вилужуванню. Найкращим в цьому відношенні є кварцеве скло, однак через дорогу вартість в практиці застосовують його рідко. Задовільним для роботи можна вважати скло «Пірекс». Є також ряд пропозицій щодо застосування посуду зі спеціальної пластмаси.

Всі відомі методи з очищення поживних середовищ від домішок важких металів можна розділити на сорбційні і екстракційні. В якості сорбентів використовують деревне вугілля, крейду, окис алюмінію. Для видалення деяких металів використовується також здатність дифенілтіокарбазону (дитизону) і 8-гідроксихіноліну (оксин) до утворення з металами забарвлених комплексних сполук. Реакція з названими речовинами дозволяє вловити 0,0001-0,0005 мг цинку,

міді, нікелю, кобальту, свинцю, кадмію, заліза, вісмуту. Як правило, найбільша кількість важких металів виявляється в вуглеводах. У ряді випадків буває цілком достатнім проводити видалення важких металів тільки з вуглеводів.

Мінеральні компоненти середовища мають різне фізіологічне значення. Однією з їх істотних властивостей є вплив на фізико-хімічний стан колоїдів протоплазми. Під впливом неорганічних солей поверхневий шар клітини безперервно зазнає змін, які позначаються і на швидкості ферментативних реакцій і на обміні речовин в цілому. Відзначають, наприклад, що під впливом присутнього в живильному середовищі хлористого натрію при біосинтезі стрептоміцину відбувається зміна проникності клітинної мембрани; цим забезпечується більш легкий перехід антибіотика з міцелію в культуральну рідину. Метали мають велике значення в здійсненні ферментативних реакцій. Деякі метали (цинк, залізо, магній, марганець і ін.) є активаторами дії ферментів. В іншій групі ензимів метали входять до складу молекули, такі ензими називаються металоензимами. Механізм активуючої дії металів на ферменти поки ще мало вивчений.

Підсумовуючи сучасні уявлення про механізми участі катіонів металів в ферментативних реакціях, основні з них: а) метал є складовою частиною каталітично активного центру ферменту, б) метал створює або стабілізує певну конформацію білкової молекули, необхідну для забезпечення каталітичної дії фермента; в) метал впливає на субстрат, змінюючи його електронну структуру таким чином, що він легше вступає в ферментативну реакцію; г) метал забезпечує приєднання коферменту до апоферменту або активацію коферменту; д) метал виконує функцію «містку», що зв'язує фермент та субстрат при утворенні з них проміжного з'єднання; є) роль металу у ферментативній реакції обумовлена поєднанням тих або інших перерахованих вище механізмів. Одна з викладених тез про механізм участі металів може бути проілюстрована на прикладі флавопротеїнів. При дії ферменту нітратредуктази функції флавінаденіндинуклеотиду і металу пов'язані між собою. В даній реакції молібден є переносником електрона в реакції відновлення нітрату. Міцність з'єднання металу з ферментом зазвичай визначають шляхом діалізу. Для встановлення наявності певного металу в ферменті використовують реакції, які пов'язують метал і викликають пригнічення ферментативної активності. Якщо

шляхом введення інгібітора в сферу ферментативної реакції вдається пригнічити дію ферменту, а потім введенням певного металу вдається здійснити реактивацію, то цей факт може свідчити про участь металу в даній ферментативній реакції. З металів, які входять в якості інгредієнтів в поживні середовища, при виробництві антибіотиків великий інтерес представляє залізо. Крім того, що залізо у вигляді солей, найчастіше сульфату, входить до складу багатьох середовищ, воно входить до складу сталі, з якої виготовлені ферментери. При ферментації в апаратах, виготовлених з вуглецевих сортів сталі, виявляється до 20-40 мкг заліза на мілілітр середовища.

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

На синтез стрептоміцину також впливає форма, в якій присутнє в середовищі залізо. Зокрема, при утворенні в середовищі гелю заліза (колоїдного заліза) міцелій покривається його тонкою плівкою, при цьому дихальний коефіцієнт знижується, зростання культури і біосинтез стрептоміцину значно пригнічуються.

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

подальше підвищення концентрації заліза на біосинтезі пеніциліну помітно не позначається. При проведенні промислових ферментацій важливо мати на увазі, що з плином часу внутрішня поверхня ферментера покривається захисною колоїдною плівкою, яка значно перешкоджає корозії та переходу заліза в середовище. Крім заліза, велике значення для біосинтезу антибіотиків мають цинк, мідь, марганець, бор, калій, магній, кальцій та ін. перші п'ять з названих елементів застосовуються в мікрокількостях та часто наявність їх у вигляді домішок з основними компонентами середовища є достатньою для нормального розвитку мікроорганізмів. Кукурудзяний екстракт, що широко застосовується в промисловості, містить, за даними емісійного спектрального аналізу золи, наступні елементи: алюміній, миш'як, бор, кальцій, хром, кобальт, мідь, залізо, свинець, літій, магній, марганець, нікель, фосфор, калій, кремній, срібло, олово, вольфрам, цинк.

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

Марганець.....0,004

Калій.....0,5 – 1,5

Мідь.....0,001

Магній.....0,5 – 1,0

Цинк....0,005

Калій.....1,0 – 2,0

Вода, на якій готуються поживні середовища, містить багато мінеральних речовин. При вивченні двох поживних середовищ одного складу, що використовуються для біосинтезу стрептоміцину, але приготованих на дистильованій і водопровідній воді, виявилось, що активність була вищою на середовищі, приготовленому на водопровідній воді.

Вода, на якій готуються поживні середовища, містить багато мінеральних речовин. При вивченні двох поживних середовищ одного складу, що використовуються для біосинтезу стрептоміцину, але приготованих на дистильованій і водопровідній воді, виявилось, що активність була вищою на середовищі, приготовленому на водопровідній воді.

Будь-які оптимальні концентрації мінеральних компонентів, універсальні для всіх середовищ і антибіотиків, не можуть бути рекомендовані, бо ці величини будуть ефективні тільки у

застосуванні до даних умов досліду, до данного співвідношення інгредієнтів. Співвідношення мінеральних компонентів середовища та їх взаємний вплив треба враховувати при складанні середовищ або підібрати ці співвідношення дослідним шляхом. Було, наприклад, підібрано для одного з штамів пеніциліну, що утворює пеніцилін, наступне співвідношення деяких компонентів середовища – $\text{K}_2\text{HPO}_4 : \text{MgSO}_4 : \text{NaNO}_3 = 0,475 : 0,05 : 0,475$.

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

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

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

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

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

ЛЕКЦІЯ 7

Значення рН для життєдіяльності мікроорганізмів

План:

1. Значення рН для життєдіяльності мікроорганізмів.

Ключові слова: культивування, мікроорганізми, кислотність, поживні середовища, синтез.

Key words: cultivation, microorganisms, acidity, nutrient medium, synthesis.

Для культивування мікроорганізмів застосовують різні середовища, як комплексні, так і синтетичні.

Одним з факторів, що визначають придатність того чи іншого середовища для мікроорганізму, є її активна кислотність, що характеризується величиною рН. Встановлено, що активна кислотність впливає на зростання культури в залежності від двох факторів. **Перший фактор** це безпосередній вплив іонів водню або гідроксильних іонів на живу клітину. Цей фактор пов'язаний з особливостями протопласту клітин, в значній мірі ще нез'ясованими, а також активністю ферментних систем. **Другий фактор** - це побічна дія рН середовища на клітину. Величина рН регулює ступінь дисоціації компонентів середовища. У кислому середовищі слабкі кислоти виявляються у вигляді цілих молекул, а лужному - у вигляді іонів, так як солі слабких кислот сильно дисоційовані, а самі кислоти - слабо. При цьому для кожної кислоти і солі є певна критична зона рН, в якій кислота може переходити з дисоційованого стану в недисоційований. Для прикладу можна навести дані, отримані при дослідженні впливу різних факторів зовнішнього середовища на ріст пеніцилу при культивуванні на синтетичному середовищі. Було показано, що присутність оцтової кислоти в недисоційованому вигляді в середовищі протягом фази зростання сприяло токсичній дії на ріст гриба.

Деякі мікроорганізми виявляються здатними самі регулювати рН середовища. Так, бактерії, що утворюють при зброджуванні вуглеводів нейтральні продукти, можуть протягом усього циклу розвитку культури підтримувати оптимальне значення рН. При цьому спочатку відбувається перетворення вуглеводів до утворення органічних кислот, а коли кислотність середовища досягає певної

величини, в дію вступають ферментативні системи, що сприяють утворенню не кислоти, а нейтральних продуктів, зокрема спиртів.

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

Зміни значення рН в процесі росту мікроорганізмів істотно впливають на хід біосинтезу. Роботами ряду авторів встановлено, що біологічний синтез антибіотиків відбувається при певних значеннях рН.

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

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

Введення крейди в якості фактору, що регулює рН, має широке розповсюдження в промисловості. Суттєве значення має його вихідна концентрація.

Найбільш високий вихід пеніциліну відмічається при тих концентраціях крейди, які забезпечують в період пеніциліноутворення оптимальні для біосинтезу величини рН та найменші коливання рН у процесі ферментації.

При ферментації глютамінової кислоти культурою *Micrococcus glutamicus* використовують високі концентрації глюкози. Щоб забезпечити необхідний інтервал рН в період активного накопичення амінокислоти, в живильне середовище вводять стерильний розчин сечовини.

На зміну величини рН впливають не тільки джерела вуглецю, а й азоту. При біосинтезі окситетрацикліну на середовищах, що містять глюкозу і солі амонію або нітрати, відзначаються різні коливання рН,

в залежності від джерела живлення. Найбільш різке зниження рН виявлено в тих випадках, коли при йоні амонію знаходяться аніони сірчаної та соляної кислот або використовується двозаміщенна сіль фосфорної кислоти. Величина рН залежить також від кількості використаного азоту. При інтенсивному засвоєнні амонійного азоту середовище закислюється в значній мірі.

Останнім часом для регулювання величини рН по ходу розвитку мікроорганізмів знаходять застосування іонообмінні смоли.

Не менш важливе значення для розвитку мікроорганізмів має вихідна величина рН. У дослідах було встановлено, що діапазон сприятливих для синтезу стрептоміцину початкових значень рН середовища знаходиться в межах 7,96-5,27.

Максимальне утворення антибіотику відмічалось при початковому значенні рН середовища - 7,19. Процес «вирівнювання» активної кислотності середовища відбувається протягом деякого часу, і чим далі відстоять величини рН від оптимальних значень, тим більший проміжок часу займає цей процес.

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

Чим менше pH_2 , тим більше відновна здатність розчину. Необхідно враховувати, що pH_2 далеко не завжди характеризується реальним тиском водню. В аеробних умовах при $pH_2 = 25-30$ ніякого

реального водню немає. Але в цьому випадку в рівновазі з воднем знаходяться інші окислювально-відновні пари, які мають реальні концентрації. І. Л. Работнова, яка зробила найбільш значний внесок у вивчення rH_2 при культивуванні мікроорганізмів, вважає, що показник rH_2 не має того рівня точності, який необхідний в фізичній хімії для характеристики умов.

Ця величина дає приблизну характеристику окисно-відновних умов.

Величину rH_2 культур, що розвиваються, визначають зазвичай за допомогою електродів з приладом, що реєструє ЕДС. Стосовно продуцентів антибіотиків, актиноміцетам і грибам умови їх розвитку при різних окислювально-відновних потенціалах середовища вивчені недостатньо. Відомо, що деякі з актиноміцетів, які відносяться до групи *Act. globisporus* або *Act. griseus*, можуть розвиватися в широких інтервалах rH_2 – від 7 до 28. Присутність в середовищі $Na_2S_2O_4$ викликало зниження rH_2 до 7-8, додавання $KMnO_4$ збільшувало rH_2 до 21-23 в порівнянні з контролем, де $rH_2 = 14$. Штучно створювані умови високих і низьких значень rH_2 в культурі *Act. globisporus* утворює активні проти *Vac. mycoides* речовини, що не викликали його інактивацію.

Вивчались окислювально-відновні умови середовища при культивуванні *Act. griseus* в глибинних умовах, в перші 2-3 діб відзначається уповільнене зростання подібно лаг-фазі у бактерій, величина окислювально-відновного потенціалу в цей період залишається майже на одному рівні або трохи зростає. Деякий підйом rH_2 в початковий період розвитку культури пояснюється перенасиченням середовища киснем за рахунок сповільненого зростання. Потім настає період різкого зниження потенціалу, що співпадає з періодом найбільш інтенсивного росту культури. У період спороутворення і автолізу величина rH_2 дещо підвищується. Наростання антибіотичної активності збігається зі зниженням окислювально-відновного потенціалу.

При культивуванні *Str. griseus* в поверхневих культурах зміна величини rH_2 відрізняється від описаного вище і відбувається таким чином, що протягом фази зростання актиноміцета значення потенціалу знижується, досягає певної низькою величини і зберігається на цьому рівні до автолізу культури, в зв'язку з чим значення rH_2 збільшується. Показана відмінність у змінах окислювально-відновного потенціалу у одного і того ж

мікроорганізму обумовлена умовами культивування та пов'язана з окисно-відновних станом середовища.

Найбільший інтерес має вивчення внутрішньоклітинної величини r_{H_2} в процесі біосинтезу антибіотиків. Користуючись спеціальними індикаторами, що характеризують певну величину r_{H_2} , З.

Е. Бекер забарвлювала міцелій пеніцила на різних стадіях утворення пеніциліну. На початку росту відзначався $r_{H_2} = 10-15$, в кінці ферментації - 5-6. Часто основна маса міцелію показує в період інтенсивного синтезу антибіотика різке падіння r_{H_2} від 7,0 до 3,0 і знаходиться в цьому стані до кінця ферментації.

Таким чином, до періоду синтезу антибіотика найбільш інтенсивно функціонують системи, що беруть участь в вищих щаблях окислення. Зрушення r_{H_2} в низькі області призводить до зміни метаболізму, зокрема, швидше за можливе утворення таких продуктів, як етанол. При високих рівнях r_{H_2} біосинтез пеніциліну практично здійснюватися не може, так як в цих умовах сірка молекули пеніциліну повинна була б перейти в дисульфідну форму, що призвело б до інактивації антибіотика.

МОДУЛЬ 4. Технології мікробного синтезу ферментних препаратів та вітамінів.

ЛЕКЦІЯ 8

Технології мікробного синтезу ферментних препаратів

План:

1. Ферменти.
2. Вплив рН на ферментативну активність.
3. Інгібітори ферментативних реакцій.
4. Механізм регулювання синтезу ферментних білків мікроорганізмами.
5. Промислове отримання ферментних препаратів із мікроорганізмів.
6. Основні методи отримання ферментних препаратів з мікроорганізмів.

Ключові слова: ферменти, культивування, мікроорганізми, поживні середовища, синтез.

Key words: enzymes, cultivation, microorganisms, nutrient media, synthesis

1. Ферменти.

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

Середовищем, в якому протікає велика частина біохімічних процесів, служить вода. У воді молекули знаходяться в постійному тепловому русі і реагують, коли стикаються один з одним. У розчині без ферментів ймовірність такого зіткнення молекул, при якому може відбутися реакція, дорівнює $1: 10^{12}$. Якщо ж присутній відповідний фермент, то ця ймовірність значно збільшується. Ферменти високоспецифічні, вони викликають зіткнення, що ведуть до реакцій тільки серед молекул строго визначених речовин, тобто дія їх направлена на певні хімічні зв'язки. Всі обмінні процеси, що протікають в мікробній клітині, відбуваються за участю певних ферментних систем.

2. Вплив рН на ферментативну активність.

При культивуванні мікроорганізмів істотний вплив на обмін речовин надає величина рН середовища. Пояснюється це перш за все тим, що оптимум каталітичної активності ферментів розташований при різному значенні рН, характерному для кожного ферменту. Залежно від рН по-різному можуть відбуватися перетворення одних і тих же компонентів середовища. Так, наприклад, при кислому значенні рН середовища амінокислоти найбільш інтенсивно піддаються декарбоксілюванню з утворенням амінів, в лужному середовищі відбувається дезамінування з утворенням кетокислот. Особливо важливо забезпечити вихідну величину рН середовища, бо якщо на ранніх етапах розвитку мікроорганізму не забезпечено необхідне рН, то серед метаболітів можуть не виявитися напівпродукти, що забезпечують біосинтез антибіотика або іншої потрібної речовини. Можна уявити, що вихідний продукт А, присутній в середовищі, піддається трансформації в залежності від рН за трьома різними шляхами, з утворенням продуктів Б, В, Г. З них продукт В є напівпродуктом-метаболітом, що забезпечує подальший біосинтез антибіотика. Перетворення з А в Б відбувається в межах рН 4,0-7,0; з А в В - при рН 6,0-8,0; з А в Г - при рН 7,0-9,0. Очевидно, найбільша кількість продукту В утворюється при оптимальному значенні рН (рН 7,0). Продукти Б і Г утворюються лише в незначних кількостях, бо при рН 7,0 активність ферментів, їх утворюючих, буде найменшою. Природно, що створенням рН середовища рівним 7,0 можна забезпечити оптимальні умови для біосинтезу антибіотика.

3. Інгібітори ферментативних реакцій.

Інтенсивність каталітичної активності ферменту залежить від впливу на них відповідних активаторів і інгібіторів. Пригнічення ферментів може відбуватися як під впливом неспецифічних, так і специфічних інгібіторів. До числа перших можна віднести солі важких металів (свинцю, ртуті), трихлороцтову кислоту. Дія їх заснована на здатності зв'язуватися з білками, з утворенням нерозчинного осаду. Специфічні інгібітори проявляють свою дію шляхом утворення зв'язків з певними хімічними групами ферментів. Так, наприклад, синильна кислота є специфічним інгібітором ряду окислювальних ферментів, що містять залізо. Вступаючи в хімічні сполуки з залізом, синильна кислота зв'язує його і тим самим паралізує активність відповідного ферменту.

Останнім часом значний інтерес як інгібітори ферментативних реакцій набувають деякі органічні сполуки, зокрема δ -оксихінолін, трилон Б (натрієва сіль етилендіамінтетраоцтової кислоти). Останні утворюються з металами, що входять до складу ферментів, «клешнеподібні зв'язки». δ -оксихінолін утворює, наприклад, з міддю, що входить в фенолокендазу, комплексне з'єднання. «Клешнеподібний зв'язок» утворюється між іоном металу і органічною молекулою, що містить дві сусідні групи, здатні з'єднуватися з металом. Зазвичай одна з таких груп утворює з металом простий іонний зв'язок, а інша комплексний зв'язок, в якому вільна пара електронів стикається з зовнішньою електронною оболонкою металу. Таким чином, зв'язок між металом і органічною молекулою виявляється частково іонною і частково ковалентною.

У ряді випадків відзначається явище так званого конкурентного гальмування ферментативних реакцій. Воно засноване на явищі біологічного антагонізму речовин, що володіють подібною структурою. У більшості випадків одним з антагоністів є речовина, необхідна для існування або життєдіяльності організмів. Такі речовини внаслідок їхньої вирішальної ролі в реакціях обміну речовин зазвичай називають метаболітами. Структурні аналоги цих метаболітів здебільшого представляють собою синтетичні сполуки, отримані в лабораторії, але іноді вони зустрічаються і як природні сполуки. Такі антагоністичні структурні аналоги були названі антиметаболітами. Прикладом природного метаболіту і антиметаболіту можуть бути бурштинова і малонова кислоти. Так, сукцинатдегідрогеназа каталізує перетворення в фумарат тільки бурштинової кислоти. Ефективність дії сукцинатдегідрогенази значно падає, якщо в розчин додати малонову кислоту - речовину, за своєю будовою дуже схожу на бурштинову кислоту. Експериментально було показано, що хоча малонова кислота сама при цьому не змінюється, вона, мабуть, приєднується до ферменту і виключає його з реакції, зайнявши те місце на молекулі, яке повинна займати бурштинова кислота.

Прикладом антиметаболіта пара-амінобензойної кислоти може бути сульфаніламід. Внаслідок структурної схожості з пара-амінобензойною кислотою він входить замість неї в реакцію, припиняючи подальші перетворення метаболітів мікробної клітини. Як конкурентне включення в молекулу металів може бути наведений приклад з ферментами, що містять магній. Зазвичай магній

включається до складу синтезованого ферменту з живильного середовища. Однак, якщо в середовищі присутній берилій, він може виявитися в складі молекули замість магнію. При цьому такий фермент не буде володіти ферментативною активністю. У більшості відомих випадків дію інгібіторів може бути знято. Наприклад, якщо в сферу реакції ввести нормальний метаболіт замість антиметаболіта. Реактивацію ферментів, що містять сульфгідрильні групи, можна проводити шляхом введення цистеїну. Останній, як відомо, містить в складі молекули сульфгідрильні групи.

4. Механізм регулювання синтезу ферментних білків мікроорганізмами.

В останні роки велика увага дослідників приділяється генетичній ролі ДНК. Було показано, що здатність до синтезу специфічних білків і передача цієї здатності в поколіннях пов'язана з ДНК. Як відомо, молекула ДНК являє собою довгу двутяжну структуру, функціонально неоднорідну по своїй довжині. Різні ділянки молекули ДНК відповідальні за специфічний синтез різних білків. Тим самим одна молекула ДНК може визначати синтез великої кількості різних білків клітини. За синтез кожного одного типу білків відповідальна певна ділянка молекули ДНК. Таку ділянку молекули ДНК, пов'язану з синтезом якого-небудь одного білка в клітині, прийнято позначати терміном «цистрон» або, враховуючи, що вона визначає специфічну структуру цього білка, «структурний цистрон» або «структурний ген». Різні цистрони (гени) розташовані лінійно уздовж молекули ДНК. При цьому кожен цистрон займає в молекулі фіксоване місце, і порядок проходження різних цистрон по довжині молекули суворо постійний для даного виду клітин. Зміна послідовності пар нуклеотидів кожного структурного цистрона веде до зміни хімічної і біологічної специфічності даного білка. Хімічно це зміна виражається порушенням послідовності амінокислот у поліпептидному ланцюзі, а біологічно - втратою специфічної ферментативної функції, якою раніше володів даний білок. Синтез білка не відбувається безпосередньо на молекулі ДНК. На молекулі ДНК (на структурному цистроні) синтезується відповідна інформаційна, або матрична, РНК (м-РНК), яка передає в рибосому місце синтезу білка, інформацію. Таким чином, передача структурної інформації йде за схемою: ДНК → м-РНК → білок. Клітина ніколи не синтезує всіх білків, які вона

може синтезувати, а лише ті, які їй «потрібні» в даний момент. При зміні умов існування припиняється синтез одних ферментів і починається синтез деяких нових ферментів.

У мікроорганізмів явище синтезу нових ферментів добре відомо в тих випадках, коли клітини отримують новий субстрат, на який повинен діяти фермент. Речовина, що викликає (індуцію) подібний синтез, називають «індуктором» ферменту, а сам фермент називають «індукованим». Однак більшість ферментів утворюються в значних кількостях під час відсутності внесеного ззовні індуктора. Такі ферменти називають «конститутивними». Якщо клітини отримують яку-небудь речовину, яку вони раніше синтезували самі, в готовому вигляді, то утворення ферментів, що забезпечують синтез цієї речовини, може припинитися.

Це явище називають **репресією**. Репресія ферменту може бути викликана також в результаті накопичення продукту діяльності цього ферменту всередині клітини, коли подальший синтез цього продукту на якийсь час уже не потрібний. Крім структурних цистронів, уздовж ланцюга ДНК розташовані ще деякі функціональні одиниці, що мають відношення до синтезу білка. Однією з таких функціональних одиниць (ділянок на молекулі ДНК) є регуляторні цистрони, або цистрони-регулятори (гени-регулятори). Цистрони-регулятори контролюють діяльність відповідних структурних цистронів.

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

На підставі викладених даних про механізм блокади структурних цистронів була запропонована теорія, що пояснює синтез

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

Один цистра-регулятор може регулювати роботу цілої групи структурних цистронів. Як правило, такі структурні цистрони об'єднані також і просторово, перебуваючи поряд уздовж молекули ДНК. Ця одночасно регульована група просторово зчеплених структурних цистронів отримала назву **оперон**. Весь оперон підпорядковується одному цистрону-регулятору. Цистрони, пов'язані в оперон, визначають синтез білків, спільно беруть участь в тому чи іншому ланцюзі обміну. Наприклад, засвоєння лактози вимагає не тільки р-галактозидази, але і ферменту пермеази, який активно переносить лактозу із зовнішнього середовища в клітину. Виявилося, що синтез цих білків починається і припиняється одночасно і, хоча синтез визначається різними структурними цистронами, обидва вони підкоряються одному цистрону-регулятору. Обидва ці структурні цистрони дійсно виявилися розташованими поруч в ланцюзі ДНК, тобто є єдиним опероном. Репресор, контрольований цистрон-регулятором, не діє безпосередньо на структурні цистрони. До регульованого цистрона, якщо він одиночний, або до регульованого оперона безпосередньо примикає ділянка ДНК, яку називають цистрон-оператором, або геном-оператором.

Саме він є місцем дії репресора, саме він керує роботою оперона, що примикає до нього, або одиночного структурного цистрона. Якщо репресор починає активуватися і діяти на цистрон-оператор, то

оперон, що примикає до нього, або одиночний структурний цистрон перестає виробляти м-РНК. Тим самим зв'язування оператора активованим репресором призводить до зупинки роботи суміжного оперона або структурного цистрона. Порушення структури цистрона-оператора ніяк не позначається на структурі і функції вироблених білків, але призводить до їх нерегульованого конститутивного синтезу так само, як і в разі порушення цистрона-регулятора.

Крім зазначеного, для життєдіяльності клітин виняткове значення має алостеричний механізм регуляції синтезу метаболітів. Відомо, що синтез більшості продуктів обміну речовин проходить ряд етапів, кожен з яких здійснюється завдяки діяльності певного ферменту. Встановлено, що кінцевий результат ряду послідовних синтетичних реакцій визначається перш за все активністю ферменту, що каталізує «головну» реакцію. Цей фермент суттєво відрізняється від інших ензимів тим, що, крім здатності реагувати зі своїм субстратом, володіє специфічною чутливістю до кінцевого продукту. Кінцевий продукт обміну речовин, накопичуючись в клітині, пригнічує активність першого ферменту і тим самим регулює утворення самого себе за принципом негативного зворотного зв'язку. На поверхні молекули ферменту є ділянка, до якої може приєднатися молекула кінцевого продукту - «алостеричного ефектора» («алостеричний» позначається просторово різноманітний). Структура такого ферменту, який також називають алостеричним, відрізняється особливо великою гнучкістю, і найменші її зміни впливають на стан і активність каталітичного центру.

Зміни ці можуть викликати лише суворо певні метаболіти-ефектори. Прикладом може служити алостерична регуляція синтезу валіну. При підвищенні концентрації кінцевого продукту – валіну - останній впливає на «головний» фермент, пригнічуючи його активність. В результаті ланцюг взаємопов'язаних синтезів блокується на першому ж етапі. Таким чином, механізми регулювання, хімічні за своєю природою, носять кібернетичний характер.

5. Промислове отримання ферментних препаратів із мікроорганізмів.

Мікробні клітини містять значний набір ферментів, які здійснюють найрізноманітніші реакції. Обмін речовин мікробів відрізняється від тварин і вищих рослин. Можливість асиміляції

таких речовин, які не використовуються вищими рослинами, визначається у мікроорганізмів наявністю специфічних ферментних систем. Весь ферментативний комплекс мікробів зосереджений в одній клітині, на відміну від тварин, що мають диференційовані органи.

Необхідно добре знати ферментні системи, щоб, керуючи їх діяльністю, отримувати за допомогою мікроорганізмів корисні людині продукти. Крім того, мікроорганізми можуть бути джерелами отримання ферментних препаратів. У порівнянні з більш дорогими джерелами тваринного і рослинного походження мікроорганізми як джерела сировини для отримання ферментів мають істотні переваги. Висока швидкість розмноження мікробів дозволяє за відносно короткий термін отримати більшу біомасу. Мікроби можна культивувати на середовищах, що містять нехарчову сировину. Мікроорганізми мають досить високу активність ферментних систем на одиницю біомаси. Вона значно вище, ніж у рослин і тварин. Тому при використанні сировини з більшою питомою активністю легше отримати концентровані високоактивні препарати.

Технічні ферментні препарати мікробного походження отримують з грибів, бактерій і дріжджів. Актиноміцети поки ще не знайшли собі місце серед промислових продуцентів ферментних препаратів. За допомогою ферментних препаратів вдається вирішити багато технологічних питань, виключивши з ряду виробництв дорогі або шкідливо діючі на організм людини речовини. В даний час препарати різних ферментів застосовуються не менше ніж в 25 галузях харчової, легкої та медичної промисловості. Весь час розширюється застосування ферментів в медицині.

6. Основні методи отримання ферментних препаратів з мікроорганізмів.

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

Робота по отриманню ферментів вимагає спеціальних запобіжних заходів, бо ферменти легко денатуруються і втрачають активність. Тому рекомендується проводити роботу при низьких температурах, уникати контактів з металевими поверхнями і т. д. У разі, якщо ферменти необхідно витягти з міцелію, клітини повинні

бути попередньо зруйновані. Руйнування клітин проводиться різними способами. Одним з найстаріших лабораторних методів є розтирання густої міцеліальної суспензії з кварцовим піском в ступці. Суспензія міцелію готується, як правило, на фізіологічному сольовому розчині. При такому методі вилучена значна частина білків і ферментів переходить в розчин. Існують також спеціальні гомогенізатори. У них мікробні клітини руйнуються під дією ножів особливої форми, що обертаються з великою швидкістю. Деякі мікроорганізми піддаються руйнуванню за рахунок дії ультразвуку. Клітинні стінки деяких мікроорганізмів можуть бути зруйновані при впливі на них ферменту лізоциму.

Лізоцим лізує клітинні стінки, звільняючи протоплазму оболонки. Препаративне виділення ферментів багато в чому нагадує виділення білків. Білки, що володіють близькими фізико-хімічними властивостями, в тому числі ферментні білки, можуть бути вилучені з міцелію водою, сольовими розчинами або розчинами лугів низької концентрації. З таких екстрактів, розбавлених водою, автолізатів або з нативного розчину (культуральної рідини, звільненої від міцелію) може проводитися фракціоноване осадження ферментів, використовуючи висолювальну дію мінеральних солей. До числа таких солей належать сульфати амонію, натрію і магнію, хлористі солі калію і натрію, деякі фосфати і нітрати. Фракціонування проводиться шляхом поступового підвищення концентрації висолюючих агентів в розчині. При цьому можна виділити білкові речовини, що випадають в осад при різному насиченні розчину осаджувачем. Видалення висолюючих речовин проводиться діалізом проти водопроводної води. Можна застосовувати метод електродіалізу. У цьому випадку розчин ферментного препарату з сульфатом амонію поміщають в ємність, розділену двома мембранами на три частини. У середню частину поміщають розчин, що містить ферментний препарат і висолюючу речовину, в бічних розташовані електроди. Мінеральні іони переміщуються до відповідних електродів, а фермент залишається в середній камері.

Крім висолювання мінеральними солями, можуть бути застосовані органічні речовини - етанол, ацетон, діоксан, в різних концентраціях (50-75%). Користуючись різними їх концентраціями, можна також вибірково отримувати необхідну фракцію білка з розчину. Органічними розчинниками можна екстрагувати ферменти з висушеного матеріалу. Наприклад, шляхом екстракції ацетоном із

соєвого борошна Д. Самнером був вперше отриманий кристалічний фермент уреаза. Отримані методами екстракції або висолювання ферментні препарати, як правило, містять багато сторонніх домішок і тому ступінь їх активності відносно невисокий. Подальше очищення ферментних препаратів проводять сорбційними методами, з яких в останні роки найбільше значення має іонний обмін. Про ступінь чистоти ферментного препарату зазвичай судять по наростанню ферментативної активності при дії на специфічний субстрат. Як приклад може бути приведений метод іонообмінного очищення протеази продуцента стрептоміцину.

З нативного розчину спочатку виділяється стрептоміцин, потім розчин передається на іонообмінну колонку, сорбує фермент. Фермент елюється боратним буфером. Для отримання кристалічного препарату після концентрування розчину фермент спочатку осідає ацетоном, а потім викристалізовується з ацетону. Всі операції по вилученню і кристалізації ферменту проводяться при низьких температурах. Крім іонітів, в якості сорбентів можуть застосовуватися мінеральні речовини: оксид алюмінію, оксид магнію, каолін і т. п. Сорбція відбувається в певних межах рН, потім проводиться елюція ферменту з колонки буферним розчином. Виділення ферментів може здійснюватися також методом електрофорезу на крохмальному або агаровому гелі. Після елюації з різних ділянок і визначення ферментативної активності елюатів вдається визначити місце розташування ферменту в гелі. Шляхом підбору відповідних умов - буферні розчини, градієнт потенціалу, час, температура - можна домогтися отримання ферментних препаратів високого ступеня чистоти. В даний час цей метод має значення лише в лабораторній практиці.

Висушування отриманих ферментних препаратів найкраще проводити методом сушіння сублімацією (ліофільної сушки), після попереднього заморожування розчину, що містить фермент, при мінусових температурах (-15, -40 °).

Протеолітичні ферменти. Гриби і актиноміцети здатні використовувати в якості джерел азотистого харчування білкової сполуки, що містяться в соєвому борошні, макухах, кукурудзяному екстракті і т. д. Перетворення складних білкових речовин в більш прості азотовмісні компоненти відбувається за допомогою протеолітичних ферментів. Протеолітичні ферменти піддають гідролітичному розщепленню - пептидний зв'язок. Вони діють або на

білки або на продукти їх розпаду. Протеолітична активність залежить від складу середовища, на якій культивується мікроорганізм. При використанні в якості джерел азоту амінокислот, пептидів і білків для культивування продуцента стрептоміцину *Act.streptomycini* було показано, що найвища протеолітична активність середовища відзначалася на середовищах з амінокислотами, низька - на середовищах з білком. Аналогічні результати були отримані на середовищах з гліциніном (білком соєвого борошна) і його кислотним гідролізатом.

При використанні в якості джерел азоту мінеральних азотовмісних речовин величина активності залежить в основному від специфічних особливостей культури. Крім того, активність протеолітичних ферментів залежить також від значення рН середовища, в якій діє фермент. Найбільша протеолітична активність спостерігається в межах рН 7,2-8,2. При кислому значенні рН активність різко падає (приблизно в 2-3 рази). Активність ферменту залежить і від субстрату. Різні білки при інших рівних умовах одним і тим же ферментом гідролізуються з різним ступенем глибини гідролізу. На активність ферменту істотний вплив роблять мінеральні іони, зокрема іон Ca^{++} , який стабілізує активність і може запобігати денатурації. При культивуванні актиноміцетів підвищенню активності сприяє наявність в середовищі іона калію і присутність глюкози.

Накопичення протеолітичних ферментів в середовищі при біосинтезі стрептоміцину відбувається паралельно з утворенням антибіотика. Однак це не є закономірним. Максимум протеолітичної активності культуральної рідини при біосинтезі альбоміцина настає пізніше максимуму концентрації антибіотика, а при біосинтезі окситетрацикліна - раніше.

Стосовно виробництва стрептоміцину зближення кривих протеолітичної і антибіотичної активності має велике значення на практиці. В Японії М. Номото і І.Нарахасі шляхом іонного обміну виділили протеазу з відходів виробництва стрептоміцину. За цим методом з культуральної рідини спочатку отримують стрептоміцин, а потім протеолітичні ферменти. Цей препарат, як і всі інші вивчені протеолітичні ферменти актиноміцетів, відноситься до трипсиноподібних ферментів. Препарат має відносну специфічність, він здатний гідролізувати майже всі пептидні зв'язки, причому гідроліз йде до вільних амінокислот. На відміну від протеаз,

виділених з інших об'єктів, препарат продуцента стрептоміцину має досить високу активність. Фірмова назва препарату - проназа. Він не є індивідуальною речовиною, містить дві пептидази і чотири протеази, що відрізняються за своїми фізико-хімічними властивостями і специфічністю.

При вивченні протеолітичних ферментів продуцента пеніциліну *Penicillium chrysogenum* Q-176 було показано, що розщеплення желатину відбувається в дві фази. У першій фазі спостерігається падіння в'язкості розчинів. Ця фаза може бути охарактеризована як дезагрегація; у другій фазі - гідроліз. Цілком ймовірно, гриб має комплекс протеаз, причому в перші години розвитку культури діють ферменти з оптимумом при кислому значенні рН (рН 6,6), потім вступають ферменти з оптимумом в нейтральних зонах рН і, нарешті, з оптимумом при рН 7,8 - 8,3.

Оптимум протеолітичної активності культури залежить в значній мірі від субстрату. В іншому протеолітичні ферменти пеніцила мало чим відрізняються від протеолітичних ферментів актиноміцетів. При промисловому виробництві протеїназ з мікроорганізмів за кордоном, крім названої культури актиноміцета, використовують *Asp. oryzae*, *Vac. subtilis*.

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

Глюкозооксидаза. Глюкозооксидаза є одним з поширених ферментів у грибів; описана вона також і у деяких актиноміцетів. Фермент каталізує реакцію окислення глюкози в глюконову кислоту, а молекулярний кисень при цьому відновлюється до перекису водню. Перекис водню, в свою чергу, розкладається каталазою. Глюкозооксидаза має надзвичайно велике значення в лабораторній практиці. Завдяки її високій специфічності вдається кількісно визначити глюкозу в суміші вуглеводів. Він може мати застосування при аналізах в антибіотичній промисловості, наприклад при отриманні пеніциліну, де в поживному середовищі присутні два вуглеводи: глюкоза і лактоза.

Глюкозооксидаза є флавопротеїд, що має простетичну групу у вигляді алоксазин-аденіндинуклеотида, умовно названого флавінаденіндинуклеотид (ФАД). Згідно з новою номенклатурою ферментів, прийнятої на V Міжнародному конгресі біохіміків, систематична назва ферменту – β – D - глюкоза: O_2 -оксидоредуктаза. Глюкозооксидаза ідентична з антибіотиками нотатіном (з *Pen. Notatum*) і мікроцидом (з *Pen. vitale*). Сильна антибактеріальна дія цих антибіотиків, можливо, зумовлено перекисом водню, що виділяється в

присутності глюкози. Однак у трактуванні механізму дії антибіотика немає єдиної думки. Наприклад, Н. К. Монахов і С. А. Нейфах вважають, що при наявності активної каталази тваринних тканин і мікроорганізмів не відбувається накопичення перекису водню. Вони припускають, що дві різні функції ферменту-антибіотика обумовлені різними активними центрами білкової молекули. Виробництво глюкозооксидази зарубіжними фірмами засноване на застосуванні *Asp. niger*. Внутрішньоклітинні ферменти екстрагуються з міцелію і осідають додатком безводних органічних розчинників. Промисловий препарат ферменту містить значну кількість каталази. Крім сухого препарату, випускається папір, просочений сумішшю ферментів глюкозооксидази-пероксидази і індикатора о-толідіна. Якщо смужку такого паперу змочити розчином, що містить глюкозу, то в результаті наступних реакцій протягом однієї хвилини з'являється синє забарвлення (окислений о-толідін).

Амілолітичні ферменти мікроорганізмів. У мікроорганізмів широке поширення мають амілази, гідролізуючі глюкозидні зв'язки. Амілази грибів відрізняються від амілаз бактерій. Останні виявляють значну активність при високих температурах. Амілази грибів при температурах 70-75 ° повністю втрачають активність. Для хлібопечення застосовують ферментний препарат з культури *Asp. niger*. При ферментації α -амілаза накопичується в культуральній рідині. Для промислового отримання глюкози з крохмалю застосовують послідовно бактеріальні та грибні амілази. Глибина гідролізу крохмалю залежить, як відомо, від активності α -амілази (α -1,4-глюкан - 4-глюканогідролаза), β -амілази (α -1,4-глюкан-мальтогідролаза) і α -глюкозидази (α -D-глюкозидглюкогідролаза). Необхідно мати таку культуру, яка гідролізує розчинний крохмаль до глюкози, тобто має відповідний ферментний комплекс. Такою культурою є гриби роду *Rhizopus*. Вони в однаковій мірі гідролізують глюкозидні зв'язки амілози і амілопектину.

На відміну від грибів роду *Aspergillus*, *Rhizopus* не мають активної трансглюкозидази, в результаті дії якої утворюються деякі олігосахариди, що мають гіркуватий смак. *Rhizopus* зазвичай культивують поверхневим методом з використанням пшеничних висівок в якості середовища. З культури отримують екстракт, з якого додаванням сульфату амонію виділяють осад, що містить необхідний фермент. Осад використовується в якості препарату. Прес гідролізу відбувається в два етапи. Спочатку 30-40% розчин крохмалю попередньо обробляють бактеріальною амілазою при 85-94°, рН 5-6. Після руйнування бактеріальної амілази нагріванням при високій температурі до отриманого розчину додають ферментний препарат з *Rhizopus* і проводять гідроліз протягом декількох годин при 55° і рН 4,5. Потім гідролізат піддають подальшій обробці з метою отримання кристалічної глюкози. Крім *Rhizopus*, застосовують деякі культури роду *Endomycopsis*. При її глибинному культивуванні амілолітичні ферменти містяться в культуральній рідині. Для гідролізу крохмалю в даному випадку використовується нативний розчин.

ЛЕКЦІЯ 9

Технології мікробного синтезу вітамінів

План:

1. Вітаміни
2. Біосинтез вітаміну В₁₂
3. Біосинтез Рибофлавіну
4. Біосинтез Тіаміну
5. Біосинтез Аскорбінової кислоти
6. Біосинтез β -Каротину

Ключові слова: вітаміни, культивування, мікроорганізми, поживні середовища, біосинтез, бактерії.

Key words: vitamins, cultivation, microorganisms, nutrient media, biosynthesis, bacteria.

1. Вітаміни

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

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

Оскільки отримання більшості вітамінів методом ферментації економічно вигідніше, ніж шляхом хімічного синтезу, одним з найближчих завдань генетиків слід визнати отримання мутантів, що

володіють гіперфункцією щодо синтезу вітамінів, які поки ще отримують хімічним шляхом. Міцелій деяких продуцентів антибіотиків, які отримують витягом з культуральної рідини, використовують для підживлення сільськогосподарських тварин, тому присутність в ньому вітамінів дуже важлива. Вітаміни, поряд з антибіотиками, є одними з вирішальних чинників, що забезпечують високу ефективність застосування міцелію для підживлення.

2. Біосинтез вітаміну B_{12}

Біосинтез вітаміну B_{12} здійснюється спеціальними культурами, до числа яких можуть бути віднесені актиноміцети (*Act. Olivaceus*, *Act. Griseus*, *Act. Aureofaciens*, *Act. Fradiae*), а також бактерії (*Bac. Megatherium*, *Lactobacillus casei*, *Clostridium tetanomorphicum*, пропіоновокислі бактерії). Найбільше промислове значення мають *Act. olivaceus* і *Propionobacterium shermanii*.

Крім біосинтезу вітаміну B_{12} спеціальними продуцентами, існують методи отримання вітаміну паралельно з антибіотиками, зокрема з хлортетрацикліном. Отримання вітаміну B_{12} мікробіологічним шляхом економічно значно вигідніше, ніж з тваринної сировини, де в якості вихідного продукту використовують печінку. Молекула вітаміну B_{12} складається з двох частин: кобальтмісткої (порфіриноподібної) і нуклеотидної, що містить 5,6-диметилбензimidазол. Характерні особливості першої частини полягають в наявності атома кобальту і ціаногрупи, що утворюють координаційний комплекс. Так само, як і порфірини, він складається з чотирьох азотистих гетероциклів типу піролу. Як у порфіринів, так і у гетероциклів вітаміну B_{12} є однакові заступники - бічні ланцюги (- CH_3 і $-CH_2 - CH_2-COOH$ групи). На відміну від порфіринів у вітаміну більше насичення металними групами. Поряд з біосинтезом вітаміну B_{12} , який носить назву ціанкобаламіну, можуть утворитися його похідні: окси-, хлоро-, сульфато-, нітрито-кобаламін, які не поступаються за своєю клінічною ефективністю ціанкобаламіну. Інші аналоги вітаміну B_{12} характеризуються тим, що в нуклеотидній частині молекули замість 5,6-диметилбензimidазола міститься аденін або метиладенін, або їх похідні. Вони не мають біологічну активність для людини і тварин і є, отже, псевдовітамінами. Перевага отримання вітаміну B_{12} пропіоновокислими бактеріями в порівнянні з актиноміцетами полягає в тому, що вони синтезують виключно істинний вітамін B_{12} . Основні етапи біосинтезу вітаміну B_{12}

розроблені Шемінім, а також В.Н.Букінім і Г. В. Проняковою. Шляхи біосинтезу порфіринів і хромофорної частини молекули вітаміну В₁₂ є загальними до певного етапу.

До порфіринів відноситься ряд дуже важливих біологічно активних сполук: хлорофіл, гемін, дихальні пігменти та інші сполуки. Утворення порфіринів тісно пов'язане з іншими реакціями метаболізму, в першу чергу, з реакціями циклу трикарбонових кислот. Одна з проміжних сполук трикарбонового циклу - бурштинова кислота (сукцинат) у вигляді свого похідного - сукциніл-коензиму А дає початок новому ланцюгу реакцій, яку Шемін називає сукцинат-гліциновим циклом. Початковою реакцією цього циклу є конденсація сукциніл-КоА з амінокислотою гліцином по його α-вуглецевому радикалу. Виникає α-аміно-β-кетoadипінова кислота, декарбоксилуючись, дає δ-амінолевулінову кислоту. Два моля δ-амінолевулінової кислоти (δ-АЛК) конденсуються з утворенням монопіролу порфобіліногену. Надалі утворюються порфіриноподібні структури, що містять пірольні кільця. У вітаміну В₁₂ пірольні кільця відсутні, є лише їх більш відновлені аналоги: одне тетрагідропірольне або піролідинове (А) і три дигідропірольних або піролінових кільця. При вивченні продуктів метаболізму *Propionibacterium shermanii* було виявлено наявність в середовищі δ-амінолевулінової кислоти і вільних порфіринів. Таким чином, ці дані є підтвердженням спільності розглянутих шляхів біосинтезу. Введення в пептонове живильне середовище δ-амінолевулінової кислоти сприяє різкому збільшенню синтезу порфіринів культурою пропіоновокислих бактерій, але не позначається на кількості синтезованого вітаміну. Введення паралельно з δ-амінолевуліновою кислотою хлористого кобальту (1 мг СоС₂·6Н₂О на 100 мл) призводить до утворення вітаміну. Подальше збільшення концентрації солі кобальту призводить не тільки до синтезу вітаміну, але і до якісної зміни порфіринів. Цілком ймовірно, утворюється Со-порфірин. На середовищі з кукурудзяним екстрактом пропіоновокислі бактерії практично зовсім не утворюють порфіринів, а додавання δ-амінолевулінової кислоти призводить до збільшення виходу вітаміну. Вважають, що фактором, який гальмує біосинтез порфіринів і перемикаючим на синтез вітаміну, є залізо. Цілком ймовірно, саме зі стадії δ-амінолевулінової кислоти намічаються розбіжності щодо шляхів біосинтезу порфіринів і вітамінів В₁₂. Зокрема, можливо, що в молекулу вітаміну включається метилована β-амінолевулінова

кислота. Щодо метилування є також дані про те, що джерелом метильних груп є метіонін. Однак поки немає достатніх підстав говорити про те, чи відбувається метилування δ -амінолевулінової кислоти і її подальше включення в молекулу або метилується вже сформована структура вітаміну В₁₂. Показано, що введення метіоніну в соєве середовище стимулює біосинтез. Синтез норфіринів гальмують пурини, а також аденінмісткі нуклеотиди і нуклеозиди. Припускають, що їх введення до складу живильного середовища викликає пригнічення синтезу δ -амінолевулінової кислоти, ймовірно, за принципом зворотного зв'язку.

При біосинтезі пеніциліну і еритроміцину в поживне середовище вводять «уламки» молекули, які потім цілком або значною частиною включаються до складу молекули. Для біосинтезу вітаміну В₁₂ в якості такого «попередника» є 5,6-диметилбензімідазол, який входить до складу молекули як нуклеотидна основа. Однак при введенні цього компонента в середовище стимулюючого біосинтезу вітаміну ефекту не відзначається, якщо в середовищі відсутній кобальт. Солі кобальту доводиться спеціально вводити в середовище, бо в комплексних середовищах кобальт може бути присутнім в вкрай незначних кількостях, у вигляді слідів, ледь доступних для аналітичного визначення.

Необхідно зазначити, що солі кобальту відносяться до досить ефективних бактерицидних речовин. Тому при оцінці впливу солей кобальту (частіше за інших використовуються хлорид або нітрат) необхідно обрати таку його концентрацію, яка не гальмує розвитку продуцента, але стимулює біосинтез вітаміну. Концентрації кобальту в середовищах не є абсолютними величинами і залежать від штаму. Вітамін В₁₂ вдалося синтезувати штучно за допомогою ферментного препарату, виділеного з *Str. olivaceus*. У систему компонентів входили: Na-солі кобальт-порфірину; 5,6-диметилбензімідазол; D-рибоза, DL-треонін, KCN, АТФ і ферментний препарат. Цей ферментний препарат не є якимось одним ферментом, відповідальним за заключний етап біосинтезу молекули вітаміну, бо перераховані компоненти не всі є уламками або попередниками молекули. Ймовірно, він містить групу ферментів.

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

вказівки, що вітамін В₁₂ утворюється при ферментації ністатину і еритроміцину. Утворення вітаміну В₁₂ і антибіотиків протікає, як правило, майже паралельно. У перші години ферментації (для *Act. Aureofaciens* через 24 год і *Act. Globisporus streptomycini* через 48 год), у період інтенсивного утворення біомаси, в середовищі виявляється незначна кількість вітаміну і антибіотиків, і лише коли зростання культури припиняється, починається інтенсивне накопичення цих продуктів обміну в культуральній рідині. Подібний факт є важливим в тому відношенні, що дозволяє поєднувати обидва процеси, оскільки час закінчення біосинтезу антибіотика збігається за часом зі значним вмістом вітаміну В₁₂.

При оцінці впливу солей кобальту на біосинтез в дослідях з культурами *Act. aureofaciens* і *Act. globisporus streptomycini* оптимальними межами концентрації були 0,12-0,05 мг% (для нітрату кобальту). Введення понад 0,25 мг% нітрату кобальту в середовище для хлортетрацикліну і 1,25 мг% в середовище для стрептоміцину гнітило утворення вітаміну В₁₂ і антибіотиків. Як вихідний продукт для виділення вітаміну В₁₂ при ферментації *Act. aureofaciens* використовується матковий розчин після фільтрації кальцієвої солі хлортетрацикліну на фільтр-пресах. Отримання кальцієвої солі хлортетрацикліну є одним з перших етапів виділення антибіотика з нативного розчину.

У зв'язку з тим, що вітамін В₁₂ синтезується паралельно з антибіотиками, проводилося вивчення впливу інгібіторів на біосинтез еритроміцину і вітаміну В₁₂ *Str. erythreus*. Введення миш'яковистокиислого натрію в середовище знижувало продукцію еритроміцину на 90%, а продукцію вітаміну В₁₂ тільки на 20% в порівнянні з таким же середовищем без інгібітору. Це показує, що процеси синтезу вітаміну В₁₂ і еритроміцину протікають незалежно один від одного.

Спрямований біосинтез вітаміну В₁₂ пропіоновокислими бактеріями і актиноміцетами. Деякі спеціальні штами пропіоновокислих бактерій і актиноміцетів є продуцентами тільки вітаміну В₁₂ і не синтезують антибіотики. У промисловості переважно використовують пропіоновокислі бактерії. Однією з істотних позитивних сторін процесу є відсутність аерації. Відомої трудностю є підвищені вимоги в дотриманні асептичних умов процесу. При біосинтезі антибіотиків, особливо широкого спектру, антибіотик, що утворюється в середовищі, має бактеріостатичну або бактерицидну

дію на сторонню мікрофлору. При біосинтезі вітаміну В₁₂ небезпека зараження значно вище.

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

Наявність в середовищі 5,6-диметилбензimidазола сприяє направленому синтезу істинного вітаміну, знижуючи до мінімуму або зовсім виключаючи наявність в мікробної маси псевдо форм. В. Г. Макаревич і Т. Н. Лазнікова вважають, що всі псевдоформи вітаміну В₁₂ можуть бути, мабуть, перетворені в істинний вітамін за допомогою 5,6-диметилбензimidазола, який додається в будь-який момент ферментації, навіть після того, як культура вже закінчила синтез. Для перетворення псевдовітамінів В₁₂ в істинний вітамін В₁₂ досить вести ферментацію додатково 12-24 год після додавання 5,6-диметилбензimidазола. Кращі результати біосинтезу вітаміну В₁₂ спостерігаються в тому випадку, якщо 5,6-диметилбензimidазол додавався через 72 годин після посіву культури. При додаванні 5,6-диметилбензimidазола через 96 годин після посіву повного перетворення псевдоформ в істинний вітамін не спостерігалось.

При проведенні біосинтезу з експериментальними цілями в середовище замість 5,6-диметилбензimidазола вводили аденін. Було отримано псевдовітамін, що містить в складі аденін. Якщо біосинтез здійснюється культурою актиноміцета, то додавання 5,6-диметилбензimidазола в середовище істотно не позначається на виході вітаміну В₁₂. Біосинтез вітаміну В₁₂ культурою *Act. olivaceus* проводиться на середовищах, що містять кукурудзяний екстракт або спиртову барду, гідрол або крохмаль, глюкозу, сульфат амонію, солі кобальту і крейду. У розвитку *Act. olivaceus* можна розрізнити дві фази. В першу фазу накопичується основна маса міцелію. Синтез вітаміну В₁₂ починається в період початкового росту організму, але значно прискорюється після 24 год. В цей період в міцелії може накопичуватися до 40% від максимальної кількості вітаміну в культурі. У першій фазі, протягом першої доби відбувається інтенсивна дисиміляція глюкози. Від вихідного рН 7,0 в цей період величина рН знижується до 6,5-6,8. У другу фазу розвитку культури, коли практично немає росту міцелію, синтезується основна кількість вітаміну В₁₂. У цей період, в другу фазу, середовище стає лужним

(рН 8,2-8,7). Загальна тривалість процесу ферментації становить 72-96 год.

Для гарного росту актиноміцета і стимуляції утворення вітаміну необхідно перемішування і аерація середовища. Посилена аерація сприяє підвищенню біосинтезу вітаміну В₁₂. Це підвищення біосинтезу відбувається не тільки за рахунок збільшення біомаси, бо прямої залежності між зростанням актиноміцета і накопиченням вітаміну немає. Кількість біомаси може бути практично однаковою в різних умовах аерації, в той час як біосинтез вітаміну при посиленій аерації протікає більш інтенсивно. Інтенсивність аерації (у відомих конкретних виробничих і технологічних умовах) може сприяти прискоренню процесу ферментації. Інтенсивна аерація сприяє також спрямованого біосинтезу вітаміну В₁₂, значно знижуючи кількість псевдовітамінів в культуральній рідині.

Оптимальними межами температури для розвитку культури і біосинтезу вітаміну В₁₂ є 28-30 ° С. Верхня температурна межа для синтезу вітаміну дорівнює 32°. Суттєве значення для хорошого виходу вітаміну В₁₂ має певна концентрація в середовищі солей кобальту. Пропіоновокислі бактерії можуть культивуватися як в абсолютно анаеробних, так і в аеробних умовах. Вони не можуть рости в сильно аерованих середовищах. Культивування може проводитися на середовищах, що містять кукурудзяний або дріжджовий екстракти, глюкозу, сульфат амонію, солі кобальту. Процес ферментації триває більше часу, ніж у актиноміцетів, до 96 - 120 год. В культурі пропіоновокислих бактерій вітамін утримується всередині клітин протягом всього процесу ферментації на відміну від культури *Act. olivaceus*, де вже через 24 годин після засіву починається дифундування вітаміну в середовище. Зростання біомаси пропіоновокислих бактерій спостерігається протягом усього процесу ферментації, бо в середовище систематично в асептичних умовах вводиться стерильний розчин глюкози. Найбільша продуктивність бактерій відносно вітаміну В₁₂ відзначається у молодій культурі, продуктивність знову утворюваних клітин в старій культурі значно нижче.

Найбільша кількість вітаміну В₁₂ утворюється при культивуванні бактерій в виключно анаеробних умовах. Особливо шкідливий вплив на біосинтез вітаміну В₁₂ надає вирощування бактерій в аеробних умовах протягом перших 50 год. Що стосується зростання, то при

аеробних умовах бактерії накопичують не менше біомаси, ніж при анаеробних.

На розвиток пропіоновокислих бактерій і біосинтез вітаміну істотний вплив роблять деякі мінеральні компоненти середовища, необхідно введення солей кобальту. Цинк у вигляді сульфату (0,001%) гальмує розвиток культури більш ніж в 2 рази і майже в 4 рази знижує утворення вітаміну. Токсична дія цинку усуває іон нікелю або гіпосульфід. Хром підсилює розвиток бактерій, але гальмує синтез. Помітне зниження кількості істинного вітаміну викликає сульфат марганцю. Здатний легко окислюватися іон марганцю гальмує, ймовірно, одну зі стадій біосинтезу як відновник.

Вітамін V_{12} виконує певні функції в обміні речовин продукуючих його мікроорганізмів. Він входить у вигляді коензиму до складу ферментів, які беруть участь у синтезі нуклеотидів, тобто у процесах, що відбуваються в організмі в період інтенсивного росту. У зв'язку з цим стає зрозумілим, чому при вирощуванні пропіоновокислих бактерій утворення та накопичення вітаміну відбувається паралельно накопиченню бактеріальної маси тільки в першу добу розвитку культури. Подальше зниження продуктивності бактеріальної маси щодо вітаміну V_{12} свідчить про те, що потреба в вітаміні у культури продуцента задовольняється накопиченою кількістю. Можна припускати, що і у випадку з *Act. olivaceus* сам організм-продуцент не потребує такої кількості вітаміну, яку він утворює.

Отримання вітаміну V_{12} шляхом термофільного метанового бродіння відходів спиртової промисловості. В останні роки, крім перерахованих вище способів отримання вітаміну V_{12} , запропонований метод, що дозволяє використовувати в якості продуцентів термофільні метанові бактерії. Процес бродіння часто використовують для знешкодження стічних вод. При метановому бродінні відбувається відновлення CO_2 або CO молекулярним воднем або воднем, що відщеплюється від органічних речовин в процесі їх дегідрування. У спеціальних апаратах, так званих метантанках, гнильними бактеріями здійснюється протеоліз білків стічних вод до амінокислот з подальшим їх дезамінуванням. Утворені в результаті цих реакцій жирні кислоти зброджуються метановими бактеріями. Метанові бактерії, як відомо, являють собою суміш різних культур (до 70 штамів) і утворюють, як його іноді називають, активний мул. Оптимальними умовами для одночасного розвитку гнильних і термофільних метанових бактерій є рН 7.0-7,5, температура - 52-53°.

Для отримання вітаміну В₁₂ при метановому бродінні може бути використана барда, яка надходить з ацетоно-бутилових заводів, а також паточная спиртова барда, що є промисловими відходами. Паточна барда перед введенням її в середовище повинна бути попередньо нейтралізована розчинами їдкою натру або аміаку до рН 7,0-8,0. Оптимальною зоною рН, в якій процес біосинтезу протікає найбільш активно, є величини в інтервалі 6,8-8,5. Додавання одного відсотка метанолу або етанолу активує метанове бродіння і збільшує вихід вітаміну В₁₂. Факторами, що стимулюють процес бродіння, є продування рідині, що бродить пропан-бутаном і вуглекислим газом.

В процесі біосинтезу вітамін В₁₂ залишається всередині клітин і не переходить в поживне середовище. Процес бродіння здійснюється в залізному або залізобетонному ферментаторі. У ферментатор з інокулятора надходить культура; потім щодня зливається 20% обсягу культуральної рідини, а замість зливої доливається нова в тій же кількості. Бактеріальна маса відділяється від середовища осадженням або центрифугуванням. У разі застосування методу осадження в якості коагулянту використовують хлорне залізо. Виділена біомаса сушиться при температурі 110-120°. Залежно від способу відділення біомаси вітамінний склад змінюється. Якщо біомаса відокремлюється за допомогою коагуляції хлорного заліза, то на грам сухої ваги припадає 61 мкг вітаміну В₁₂ і 35 мкг рибофлавіну. Якщо хлорне залізо не застосовується, то вітаміну В₁₂ міститься 172 мкг / г і рибофлавіну 69 мкг / г. Такі величини були отримані Е.Д.Міхлін, Н. П. Єрофєєвою, Н. В. Соловйовою і В. Г. Симоновою в дослідах з біомасою, що утворюється при метановому бродінні ацетонобутилової барди. Зрозуміло, абсолютні цифри залежать від технологічних умов, від культур мікроорганізмів, що входять до складу «активного мулу». Крім вітамінів, біомаса містить велику кількість азотистих речовин. Як показали досліди по годівлі різних сільськогосподарських тварин, по засвоюваності азоту, що міститься в біомасі, остання еквівалентна незнежиреному соєвому борошну.

Викладений спосіб має важливі переваги в порівнянні з іншими способами ферментації вітаміну для кормових цілей. Метанове бродіння барди дозволяє, поряд з отриманням вітаміну В₁₂ і метану, значно знешкодити стічні води, що скидаються спиртовими і ацетоновими заводами, і тим самим поліпшити санітарні показники роботи цих підприємств. Воно є більш економічним, бо не вимагає витрат на поживне середовище (використовуються відходи); може

йти в залізних або залізобетонних ємностях, замість ферментерів з нержавіючої сталі; не вимагає стерилізуючих систем і витрати пара на стерилізацію середовища. Процес здійснюється безперервним методом замість періодичного. В якості побічного продукту виходить значна кількість метану, який може бути використаний як паливо.

3. Біосинтез Рибофлавіну

Рибофлавін синтезується багатьма мікроорганізмами: бактеріями, дріжджами і грибами. Найбільш відомими продуцентами рибофлавіну є *Ermothecium ashbyii*, *Ashbya gossypii*, *Clostridium acetobutilicum*, деякі штами *Candida* і *Mycobacterium*. Рибофлавін бере участь в процесах перенесення водню в окисно-відновних реакціях, що є складовою частиною флавінаденіндинуклеотиду. Рибофлавін присутній в культуральній рідині у вільній формі. У клітинах *E.ashbyii* він зустрічається у вигляді флавінаденіндинуклеотиде і вільного вітаміну, розташованого в вигляді жовтих кристалів в вакуолях. Для вирощування *E.ashbyii* придатні глибинний і поверхневий методи. Як джерела азотного харчування використовується молочна сироватка, насіння бобових рослин, рибне борошно, кукурудзяний екстракт, соєве борошно і казеїн. З вуглеводів - глюкоза, сахароза. Дуже перспективним і економічно вигідним є застосування в якості основного компонента поживного середовища барди пшеничного борошна (відходи спиртового бродіння). Склад поживного середовища і кількісні відносини інгредієнтів залежать від культури.

При ферментації *E.ashbyii* спостерігаються більш-менш близькі закономірності в зміні біохімічних показників культуральної рідини. Протягом 30-40 год майже повністю витрачаються вуглеводи, після чого відзначається інтенсивний синтез і накопичення в культуральній рідині рибофлавіну. Накопичення рибофлавіну в поживному середовищі збігається за часом з початком автолізу культури.

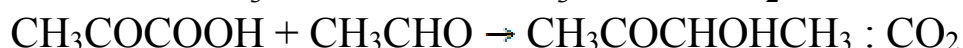
Кількісні відносини між внутрішньоклітинним і позаклітинним рибофлавіном в залежності від зростання *E.ashbyii* показує, що у першу добу ферментації різко падає рН, але починаючи з другої доби повільно піднімається. Весь процес триває протягом 3-5 діб, при температурі 28-30 °. Для нормального ходу синтезу рибофлавіну необхідна хороша аерація. На біосинтез рибофлавіну гальмівну дію надають іони заліза, тому їх концентрація в середовищі повинна бути ретельно підібрана. У глибинній культурі *E.ashbyii* протягом перших

двох діб утримання рибофлавіну приблизно однаково в міцелії і культуральній рідині. Починаючи з третьої доби переважна його кількість знаходиться в культуральній рідині, а вміст в міцелії різко падає. Ненасичені жирні кислоти цис-конфігурації стимулюють біосинтез рибофлавіну *E.ashbyi* на противагу насиченим, які гальмували його або не чинили зовсім ніякого впливу. Для отримання флавінаденіндинкулеотиду біомасу екстрагують сумішшю піридин: метанол : вода (1:3:1) і потім хроматографічно очищують від супутніх домішок.

Шляхи біосинтезу молекули рибофлавіну культурами *Ashbya gossypii*, *Eremothecium aslibyii* і деякими штамами *Candida* були вивчені за допомогою «мічених» по вуглецю (C^{14}) з'єднань. Як було встановлено, формування кілець В і С відбувається за тими ж шляхами, по яких йде синтез пуринових основ, таких, як аденін, ксантин і гуанін. Досить імовірно, що безпосереднім попередником цих кілець є діаміноурацил, що утворюється з ксантина в результаті відщеплення вуглецевого атома (С-8). Вважають, що ксантин може утворюватися з аденіну та гуаніну. Як відомо, пуринові основи аденін і гуанін входять до складу нуклеїнових кислот. Існує точка зору, що посилений синтез культурою рибофлавіну є результатом надмірного утворення пуринів. Можливо, що, поряд з аденіном і гуаніном, утворюються поки неідентифіковані їх деривати, які забезпечують біосинтез молекули рибофлавіну; або аденін і гуанін самі перетворюються в ксантин в результаті ферментних реакцій.

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

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



Ацетоін послідовно приєднується спочатку до похідного діаміноурацилу (5-аміно-4-рибітиламіноурацил) з утворенням 6,7-диметил-8-рибітиллумазіну, а потім до названої речовини з утворенням рибофлавіну. Можливо, що, крім ацетоіна, в реакцію утворення кільця А вступає діацетил.

Хімічний (не ферментативний) шлях перетворення 6,7-диметил-8-рибітиллумазину починається з розриву піразинового кільця з наступною альдольною конденсацією двох молекул в димерний біацетил і циклізацією його в рибофлавін. На якому етапі біосинтезу молекули рибофлавіну включається бічний ланцюг, що містить рибітол, поки не встановлено.

4. Біосинтез Тіаміну

Тіамін синтезують багато мікроорганізмів, однак промисловий метод його отримання шляхом ферментації ще не набув поширення. Однією з причин цього є відсутність селекціонованих високопродуктивних культур, що синтезують тіамін в таких кількостях, які дозволяють при використанні мікробіологічного методу отримати належний економічний ефект у порівнянні з хімічним синтезом. У дослідженнях, проведених з культурою *Asp. flavus* (Srinivasan, Ramakrishnan, 1962), було відзначено, що вітамін міститься як в міцелії, так і в культуральній рідині. На накопичення тіаміну істотний вплив робить середовище, значення його початкової величини рН і концентрація амонійного азоту. В умовах експерименту було встановлено, що при концентрації амонійного азоту 0,4% оптимальна величина вихідного значення рН повинна дорівнювати 6,6.

При вивченні шляхів біосинтезу тіаміну основна увага дослідників приділялася механізму формування молекули з похідних піримідину і тiazолу. З дріжджів були отримані ферментні препарати, які дозволили припустити, що на цьому етапі відбувається з'єднання похідних тiazолу з піримідинів за участю іонів магнію і АТФ, за рахунок якого утворюються фосфорильовані похідні, які вступають в реакцію. Непрямим підтвердженням можливості подібних реакцій є добре відомий факт, коли тіамін дефіцитні культури мікроорганізмів добре розвиваються, якщо в поживне середовище замість тіаміну будуть введені похідні піримідину і тiazолу.

5. Біосинтез Аскорбінової кислоти

Аскорбінову кислоту синтезують деякі гриби, що відносяться до сімейства *Aspergillaceae*. Промисловий біосинтез аскорбінової кислоти мікроорганізмами в даний час не має поширення. Синтез вітаміну відбувається хімічним шляхом, лише на одному з етапів при окисненні сорбіту в сорбозу використовують мікроорганізми.

Найбільш детальне дослідження біосинтезу аскорбінової кислоти було виконано І. Мітевим, І. Пашевим, М. Харізановою, Б. Ламбревим і М. Бешковим (1957). Як продуцентів 1-аскорбінової кислоти ними були використані культури *Pen.chrysogenum*, *Asp. oryzae*, *Asp. niger*. У останньої здатність до синтезу виявилася найбільш сильно вираженою. Для спрямованого процесу біосинтезу необхідними умовами є аеробна ферментація, температура 30° і вихідна величина рН середовища повинна бути в межах 2,0-3,0. Сахароза в якості єдиного джерела вуглецю повинна бути в концентрації не нижче 10%. Джерелом азоту є нітрат амонію, кількість якого в п'ятсот разів менше кількості сахарози. Сприятливий вплив на біосинтез надає молібден, що вводиться в середовище у вигляді молібдату амонію. Утворення аскорбінової кислоти починається одночасно з розвитком вегетативного міцелію. Крім зазначеного способу, біосинтез аскорбінової кислоти в Японії проводять двома культурами: *Acetobacter suboxydans* окисляє глюкозу, а потім мутантний штам *Pseudomonas iluorescens* доводить процес до утворення вітаміну. Вихід спостерігається в кількості 40-45% від введеної в середовище кількості глюкози. Біохімічний механізм синтезу молекули вітаміну мікроорганізмами дозволений ще не повністю.

6. Біосинтез β -Каротину

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

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

Серед великої кількості виділених з мікроорганізмів каротиноїдів найбільший інтерес має β -каротин. Молекула β -каротину містить β -іононові угрупування. β -каротин є провітаміном, який перетворюється на вітамін А в організмі тварини або людини. Деякі інші каротиноїди, ізомери β -каротину, також можуть володіти провітамінною активністю, але не в

такій мірі, як β -каротин. Вивчення біосинтезу каротиноїдів у мікроорганізмів проводилося в основному з культурами *Blakeslea trispora*, *Phycomyces blakesleeanus* і деякими дріжджами. Локалізація β -каротину внутрішньоклітинна. Найбільш інтенсивний синтез його відбувається після того, як зростання культури практично закінчене. Дуже важливим фактором, що впливає на біосинтез, є концентрація в середовищі джерел вуглецю і азоту. Чим більше відношення C:N, тим більше утворюється каротину. Зрозуміло, це положення має певні межі, які зумовлені фізіологічними особливостями культури.

Кількість азоту має бути достатньою для максимального розвитку культури, кількість вуглецю - для подальшого синтезу каротиноїдів. Для отримання β -каротину використовують середовища, що містять кукурудзяний екстракт або казеїновий гідролізат, глюкозу, гліцерин, мінеральні солі. На біосинтез каротиноїдів деякими культурами стимулюючу дію надають жири і масла, зокрема, бавовняне і оливкове. Показано також позитивний вплив олеїнової і лінолевої кислот. Серед різних пропозицій щодо вдосконалення складу середовищ для біосинтезу β -каротину висловлюється можливість використання міцелію *Blakeslea trispora*, що залишився після екстракції β -каротину в якості компонента середовища. Перед додаванням в середовище міцелій попередньо висушується. Стимулюючий вплив на каротиногенез надавала також водна витяжка з міцелію. Припускають, що речовиною, що надає позитивний вплив на синтез β -каротину, є цитрусова кислота. Механізм біосинтезу каротиноїдів повністю не з'ясований.

Можливо, що він має деяку схожість з синтезом полієнових антибіотиків, що містять, як і каротиноїди, пов'язані подвійні зв'язки і ізопренові угруповання, що чергуються. За Karrer (1949), вихідною речовиною для біосинтезу каротиноїдів є β -метилкротоновий альдегід. Синтез відбувається по типу альдольної конденсації з подальшим видаленням води. Ця гіпотеза підкреслює аналогію синтезу каротиноїдів із загальноприйнятою гіпотезою утворення жирів.

Дослідження, проведені за допомогою «мічених» з'єднань, показали, що потенційно можливим може бути інший шлях. Численними дослідженнями було показано, що найкращим попередником ізопренової структури є мевалонова кислота. Утворення її відбувається в результаті конденсації ацетил-коферменту А і ацетоацетил-коферменту А. При цьому, спочатку утворюється 3-

гідрокси-3-метил-глутарил-кофермент А. Останній перетворюється в мевалонову кислоту (3,5-дигідрокси-3-метил-валеріановакислота).

Хоча деталі всіх зазначених перетворень з'ясовані ще не повністю, вважають, що далі відбувається ензиматичне перетворення мевалонової кислоти в фарнезилпірофосфат, який вступає в реакцію конденсації з ізопрентенілпірофосфатом. В результаті реакції відбувається утворення гераніл-гераніл-пірофосфату, з двох молекул якого в присутності НАД (нікотинамід-аденін-динуклеотид) і НАДФ (нікотинамід-аденін-динуклеотид-фосфат) утворюється безбарвний попередник каротиноїдів фітоен. Фітоен не має подвійних зв'язків в хромофорній групі. Утворення β -каротину відбувається після декількох послідовних реакцій дегідрування, в результаті яких утворюються пов'язані подвійні зв'язки, характерні для каротиноїдів. Цьому процесу сприяє двовалентне залізо, яке необхідно вводити в поживне середовище. Інгібітором реакції дегідрування, ймовірно, є дифеніламін, бо в його присутності виростають культури, позбавлені пігменту. Як вважають, дифеніламін пов'язує дегідрогенази каротиноїдів, що забезпечують утворення подвійних зв'язків.

Утворення β -іононових угруповань відбувається на більш пізніх етапах формування молекули β -каротину. Коли основний структурний ізопреновий ланцюг сформований, тоді спочатку на одному кінці ланцюга, а потім на іншому відбувається циклізація. Дані про ензиматичне включення β -іонуна в каротиноїдний ланцюг відсутні. У зв'язку з цим розглядати β -іонон як можливий «попередник» β -каротину немає достатніх підстав.

При вивченні механізму утворення молекули каротиноїдів, шляхом введення в середовище мевалонової кислоти, було показано, що продукт біосинтезу залежить від часу введення кислоти в середовище. Якщо мевалонова кислота вводилася в кінці першої фази росту культури, то переважним продуктом біосинтезу був γ -каротин, якщо спочатку - лікопін. Мікроорганізми, очевидно, не синтезують вітамін А, однак культура *Pseudomonas aeruginosa* при зростанні на рідкому синтетичному середовищі, в яке входить β -каротин як єдине джерело вуглецю, перетворювало β -каротин в вітамін А.

Література

1. Машины и аппараты пищевых производств : учебник для вузов / [Антипов С. Т., Кретов И. Т., Остриков А. Н. и др.]; под ред. В. А. Панфилова. – М. : Высшая школа, 2001. – 704 с.
2. Промышленная микробиология : учеб. пособие для вузов / [Аркадьева З. А., Безбородов А. М., Блохина И. Н. и др.]; под ред. Н. С. Егорова. – М. : Высшая школа, 2000. – 688 с.
3. Безбородов А. М. Биотехнология продуктов микробного синтеза: Ферментативный катализ, как альтернатива органического синтеза / А. М. Безбородов – М. : Агропромиздат, 1991. – 238 с.
4. Бекер М. Е. Биотехнология / М. Е. Бекер, Г. К. Лиепиньш, Е. П. Райпулис. – М. : Агропромиздат, 2000. – 334 с.
5. Егоров Н. С. Биотехнология : микробиологическое производство биологически активных веществ и препаратов : учеб. пособие для вузов. / Н. С. Егоров, В. Д. Самуилов. – М. : Высшая школа, 1997. – 143 с.
6. Воробьева Л. И. Промышленная микробиология: учеб. пособие / Л. И. Воробьева – М. : Изд-во МГУ, 1989. – 294 с.
7. Пирог Т. П. Загальна мікробіологія: підручник / Т. П. Пирог. – К. : НУХТ, 2004. – 471 с.
8. Пирог Т.П. Загальна біотехнологія: підручник / Т. П. Пирог, О. А. Ігнатова. – К. : НУХТ, 2009. – 336 с.
9. Сельскохозяйственная биотехнология / [Шевелуха В. С., Калашникова Е. А., Кочиева Е. З. и др.]; под ред. В. С. Шевелухи. - [3-е изд., перераб. и доп.] – М. : Высшая школа, 2008. – 710 с.

Навчальне видання

Кравченко Олена Олександрівна
Мельник Володимир Олександрович

ТЕХНОЛОГІЇ МІКРОБНОГО СИНТЕЗУ

Конспект лекцій

Відповідальний за випуск: С. І. Луговий

Формат 60×84 1/16 Ум. друк. арк. 5,5

Тираж 10 прим. Зам № _____

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

Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 4490 від 20.02.2013