**ТЕМА 6: ВИРОБНИЦТВО МІКРОБНИХ БІЛКОВИХ ПРЕПАРАТІВ**

**Мета:** поглибити знання про будову біологічно активних сполук, сформувати поняття про їх мікробіологічний синтез.

План

1. Отримання вітаміну В12.
2. Отримання вітаміну В2, ергостерину та каротиноїдів.

2. Отримання гіберелінів.

3. Отримання гормонів та інших біологічно активних речовин (БАР).

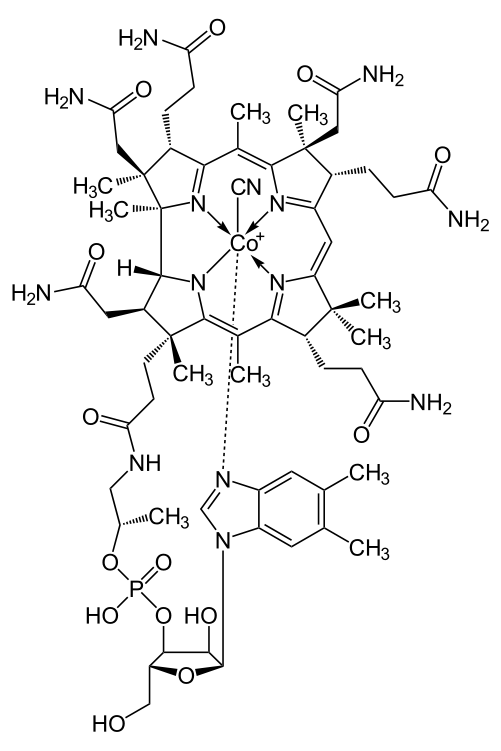
**Основні терміни і поняття:** вітаміни, ергостерин, каротиноїди, гібереліни, гормони.

Вітаміни – низькомолекулярні органічні речовини, які у низьких концентраціях мають різноманітну високу біологічну дію. Джерело вітамінів у природі: рослини, мікроорганізми. Вітаміни отримують двома способами:

* хімічним (переважну кількість вітамінів);
* мікробіологічним (В12, В2, ергостерин, каротиноїди).

**Вітамін В12 –** α-(5,6-диметилбензімідазол) – цианокобаламін. В молекулі вітаміну розрізняють:

* порфіриноподібне, хромофорне або корринове кільце, що пов’язано з атомом кобальту чотирма координаційними зв’язками через атоми нітрогену;
* верхнім лігандом кобальту є цианогрупа (її місце можуть займати органічні та неорганічні замісники, наприклад, ОН-, NО22-, SО22-, Н2О, СН3, аденозил; замісники визначають назву похідних вітаміну В12);
* нижчим лігандом кобальту є нуклеотидне ядро, що складається з азотистої основи, рібози та залишку фосфорної кислоти (в складі вітаміну В12 або цианокобаламіну азотиста основа представлена 5,6-диметилбензімідазолом).



Структура вітаміну В12

Основні продуценти вітаміну В12: *Propionibacterium freudenreicheii subsp. shermanii, Pseudomonas denitrificans*. Сировина для культивування продуцентів: соєва та рибна мука, м’ясний та кукурудзяний екстракти, спирти (метанол, ізопропанол, пропандіол). Необхідні компоненти: солі кобальту, амоній сульфат.

Схема виробництва:

1. Культивування здійснюють в анаеробних умовах. Контролюють кислотність (кислоту нейтралізують лугами). Через 72 години вносять попередник вітаміну В12 – 5,6-диметилбензімідазол. Без нього синтезується псевдовітамін В12 (азотистою основою є аденін), який не виявляє біологічну активність.
2. Через 72 години накопичується вітамін В12. Проводять сепарування (центрифугування) біомаси та екстракцію водою протягом 60 хвилин (підкислюють до рН 4,5-5,0).
3. Водний розчин охолоджують, доводять рН до 6,8-7,0 50%-вим розчином натрій гідроксиду. Для коагуляції білків додають Аl2(SО4)3**.**18 Н2О і FеСl3, фільтрують.
4. Очищують розчин, використовуючи іонообмінні смоли.
5. Проводять додаткове очищення органічними розчинниками, випарювання, очищення на колонці з Аl2О3, елюють водним ацетоном.
6. Додають ацетон, витримують 24-48 годин при +3-4 0С.
7. Кристали вітаміну В12 відфільтровують, промивають, висушують.

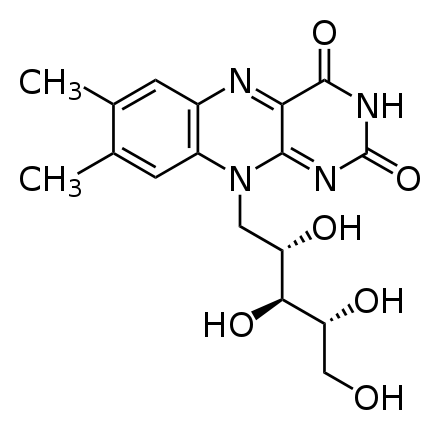
Щоб запобігти руйнуванню вітаміну В12 все проводять у затемненому приміщенні або при червоному світлі. Застосовують вітамін Вітамін В12 для лікування анемії та як кормову добавку.

Схема біосинтезу корринової структури вітаміну В12:

гліцин + сукциніл-КоА амінолевулінова кислота порфобіліноген

уропорфіриноген кобіринова кислота кобінамід вітамін В12.

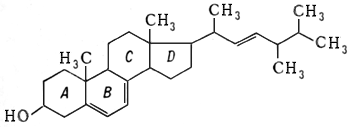
**Вітамін В2 –** рібофлавін (7,8-диметил-10-(1′-D-рібітил-ізоалоксазин)). Продуценти: дріжджеподібні гриби Eremothecium ashbyii, дріжджі *Candida* *famata*, бактерії *Bacillus subtilis*. Сировина для культивування продуцентів: кукурудзяна та соєва мука, кукурудзяний екстракт, буряковий цукор; необхідні калій дигідрофосфат, кальцій карбонат, натрій хлорид.



Структура вітаміну В2

Культивують в аеробних умовах при +28-30 0С до початку спороутворення (до 12 мг/мл В2). Вітамін використовують для лікування захворювань печінки, підшлункової залози, вітамінізації хліба, як кормову добавку.

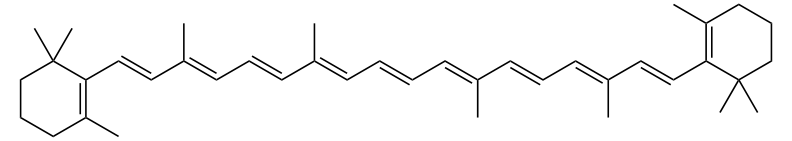
**Ергостерин** – вихідний продукт для виробництва вітаміну D2, стероїдних гормонів. Продуценти: дріжджі *Saccharomyces cerevisiae, Saccharomyces carlsbergensis,* плісняві гриби роду *Aspergillus* і *Penicillium.*



Структура ергостерину

Культивують в аеробних умовах з надлишком джерела вуглецю до джерела нітрогену. Опромінюють культуру УФ-променями (200-300 нм) для збільшення вмісту ергостерину.

**Каротиноїди** – природні органічні [пігменти](http://uk.wikipedia.org/wiki/%D0%9F%D1%96%D0%B3%D0%BC%D0%B5%D0%BD%D1%82%D0%B8), що виробляються [бактеріями](http://uk.wikipedia.org/wiki/%D0%91%D0%B0%D0%BA%D1%82%D0%B5%D1%80%D1%96%D1%8F), [грибами](http://uk.wikipedia.org/wiki/%D0%93%D1%80%D0%B8%D0%B1), [водоростями](http://uk.wikipedia.org/wiki/%D0%92%D0%BE%D0%B4%D0%BE%D1%80%D0%BE%D1%81%D1%82%D1%96) і [рослинами](http://uk.wikipedia.org/wiki/%D0%A0%D0%BE%D1%81%D0%BB%D0%B8%D0%BD%D0%B8). β-каротин є провітаміном А. Основний продуцент – гриб *Blakeslea trispora*. Сировина для культивування: меляса, соєва олія, кукурудзяний екстракт.



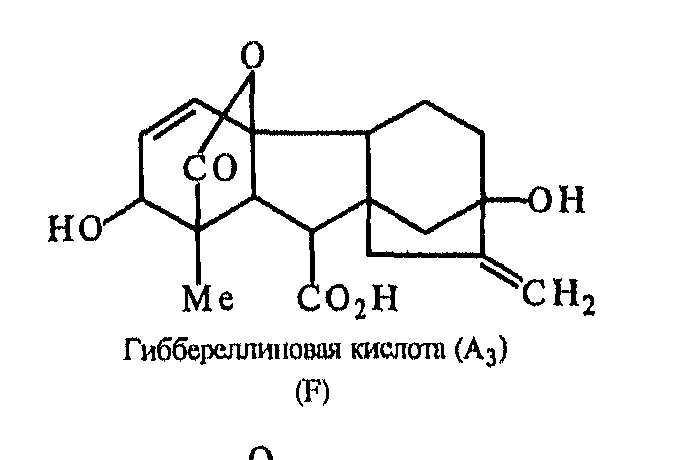
Структура β-каротину

Мікробіологічний синтез застосовується на окремих етапах виробництва **вітаміну С**. Використовують оцтовокислі бактерії *Gluconobacter oxydans*, які здійснюють перетворення D-сорбіту в L-сорбозу та у 2-кето-L-гулонову кислоту – попередник вітаміну С. Також, розробляється мікробіологічне виробництво **вітаміну Н** (біотин) як кормової добавки.

**Гібереліни** – регулятори росту рослин гормонального походження. Стимулюють ріст рослин, забезпечують перехід рослин до цвітіння. За хімічною природою є тетрациклічними карбоновими кислотами, що належать до дитерпенів. Розділяють на 2 групи:

* істинні дитерпени – сполуки, що мають 20 атомів вуглецю (кількість вуглецю кратна 5);
* С19 – карбонові сполуки.

На даний час описано більше 50 сполук, що належать до гіберелінів. Найбільш відомий гіберелін – гіберелова (гіберелінова) кислота (гіберелін А3).



Структура гіберелової кислоти

Продуценти: гриб *Gibberella fujikuri* (у конідіальній стадії – *Fusarium moniliforme*). Сировина для культивування: соєва мука, необхідні – виннокисла сіль амонію, сахароза, глюкоза (до 200 мг/л). Головна умова культивування – виснаження джерела нітрогену при збереженні високого рівня сполук вуглецю. Характерна особливість – рН 3,0-4,5.

Утворення гіберелінів – це окремий випадок синтезу терпенів (синтез через мевалонову кислоту). Ріст ланцюга починається з ацетил-КоА шляхом поступового його збільшення на 2 атоми вуглецю (ацетильних залишки).

Загальний шлях біосинтезу гіберелової кислоти:

ацетоацетил-КоА 3-окси-3-метилглутарил-КоА мевальдинова кислота

мевалонова кислота 5-фосфомевалонова кислота 5-пірофосфомевало-нова кислота ізопентенилпірофосфат (ізомеризація в диметилалілпіро-фосфат) геранілпірофосфат фарнезілпірофосфат геранілгеранілпіро-фосфат – перший ациклічний дитерпен (циклізація) лабадієнолпірофосфат

пімарадієн каурен кауренова кислота 7β-гідроксикауренова кислота

гіберелін А4 гіберелін А7 гіберелін А1 гіберелова кислота

Стероїдні гормони та окремі поліпептиди не є природними метаболітами мікроорганізмів. Однак мікроорганізми здатні здійснювати окремі стадії синтезу гормонів. Зокрема, завдяки грибу *Rhizopus arrhirus* з 37 стадій синтезу кортизону залишилось 11 (відповідно вартість знизилась більше ніж у 30 разів). Сировина для культивування: складні спирти (стероли), які присутні у відходах соєвого масла (стигмостерол, ситостерол), а також сполука з мексиканської бульби – діосгенін.

Поліпептиди синтезуються генетично сконструйованими штамами *E. coli*. Наприклад, при обробленні бромцианом певного поліпептиду утворюється соматостатин. Також, створено гени для синтезу інсуліну, гормону росту, інтерферонів. Крім *E. coli* використовують *B. subtilis*. Ці мікроорганізми виділяють чужорідні білки в культуральну рідину.

Також, за допомогою мікроорганізмів отримують рід диагностикумів: алергенних (туберкулін), серологічних (для реакцій розеткоутворення та ін.).