

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ УКРАЇНИ  
ЗАПОРІЗЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

РИЛЬСЬКИЙ О.Ф.

***КОРОТКИЙ КУРС ЛЕКЦІЙ  
З БІОТЕХНОЛОГІЇ***

(для студентів денної форми  
біологічного факультету)

Запоріжжя. ЗДУ  
2004

## Лекція 1

Мета курсу: дати студентам певне поняття про те, що таке сучасна біотехнологія.

Одне із визначень біотехнології:

Біотехнологія – це свідоме виробництво необхідних людині продуктів і матеріалів за допомогою біологічних об'єктів і процесів.

1. Біотехнологія – використання в промисловості біологічних систем або процесів. В основі її лежить унікальність біологічних систем у відношенні пізнання і каталізу. Використання цих дивних здібностей дозволяє проводити широкий спектр хімічних реакцій у м'яких умовах і з великою швидкістю.

2. В Європейській федерації з біотехнології проходило обговорення терміну “біотехнологія”. У 1980 році федерація визначила біотехнологію як додаток біологічних систем і процесів до промисловості і сфери послуг. Але при такому тлумаченні в поняття біотехнологія входять і коні, які перевозять пиво. Цей термін було відхилено. Потім федерація визначила біотехнологію як інтерговане використання біохімії, мікробіології та інженерних наук, з метою застосування мікроорганізмів, клітинних і тканинних культур, і їх частин у промисловості. Це визначення правильне, але коло наук, практичні результати яких втілені у біотехнологію значно ширші:



1. генна інженерія / технологія рекомбінації ДНК;
2. біокаталіз / створення ферментів за допомогою нових принципів виділення, імобілізації та стабілізації ферментів;
3. імунологія / одержання моноклональних антитіл ;
4. технологія ферментації /технологія переробки відходів і технологій виробництва харчових продуктів;
5. біоелектрохімія / технології з очистки виробничих стічних вод.

У.Е.Вієстур визначає біотехнологію як "... це дисципліна, яка займається процесами, технологією і апаратурою для одержання потрібних народному господарству продуктів / медикаментів, реактивів, засобів захисту рослин, бактеріальних добрив, розчинників, харчових і кормових властивостей / або деградація відходів тканинних і рослинних клітин, їх компонентів за допомогою мікроорганізмів, у тому числі вірусів. Нерідко до біотехнології відносять дослідження рекомбінантних ДНК і нові процеси, створенні при використанні генної інженерії".

Це визначення об'ємне, але достатньо повне, хоча з розвитком біотехнології його доведеться доповнити.

Біотехнологія – / за А.Л.Баєвим/ це направлення, покликане шукати шляхи промислового застосування біологічних агентів і процесів.

Біотехнологія - / за Ю.А.Овчинникову/ це комплексна багатoproфільна область науково-технічного прогресу, що включає мікробіологічний синтез у його широкому розумінні, генетичну, білкову і клітинну інженерію, ензимологію.

За своїм генезисом науково-технічні галузі можна поділити на три групи:

1. Галузі, що виникли на базі удосконалення традиційних емпіричних виробництв / ливарне виробництво, обробка металу різанням/. Розвиток цих галузей завжди проходить еволюційно.

2. Нові галузі, що виникли в результаті впровадження у виробництво фундаментальних наукових знань. Розвиток їх, як правило, революційно і відбувається в результаті розширення протиріччя між науковим потенціалом і станом техніки. Вони не можуть виникати на базі попереднього виробничого досвіду або емпіричним шляхом.

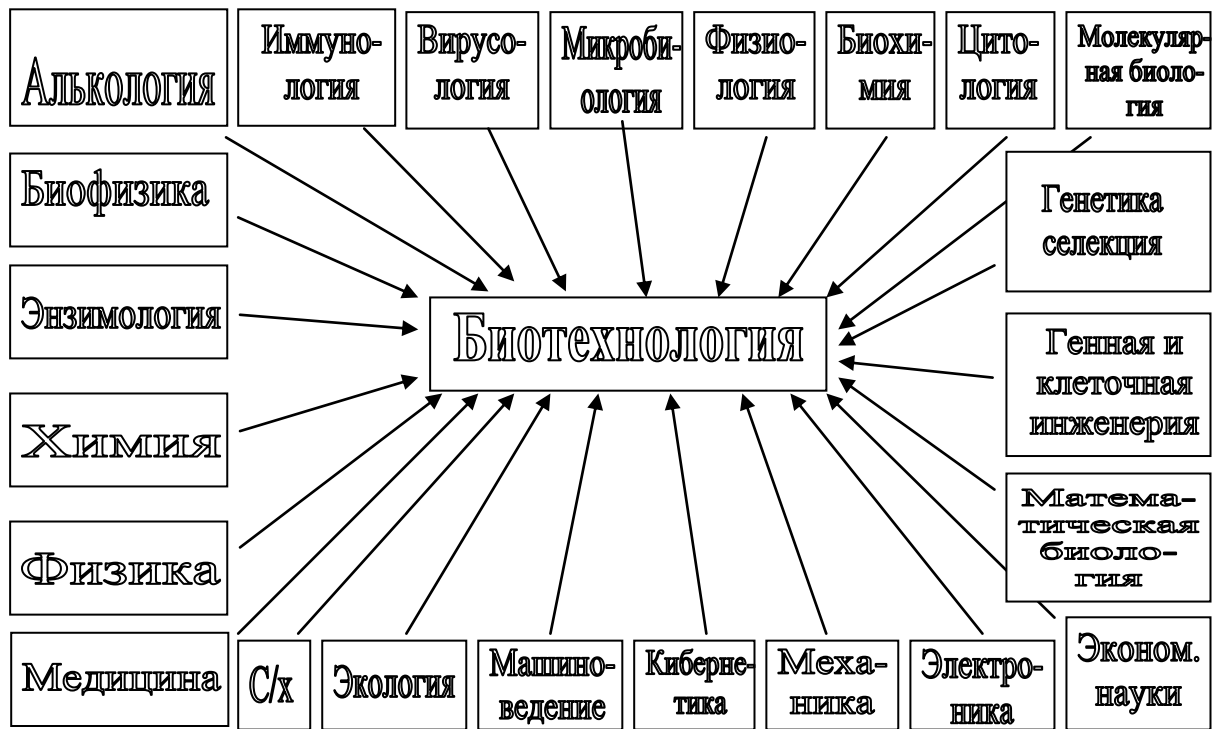
Наприклад: атомна енергетика, квантова електроніка, радіоелектроніка і обчислювальна техніка.

Природні науки входять до цих галузей в значенні суттєвого елемента.

3. Галузі, що виникли на основі традиційних виробництв в результаті корінного перевороту технології, викликаного взаємодією фундаментальних природних наук і технічних наук.

Біотехнологія відноситься до третього типу. Вона виникла в недрах мікробіології на базі традиційних мікробіологічних виробництв /в основном бродильних/.

Біотехнологія – це комплексне наукове напpавлення. Науки, що впливають на нього:



Складаючи біотехнологію елементи можна виділити і класифікувати за різноманітними ознаками:

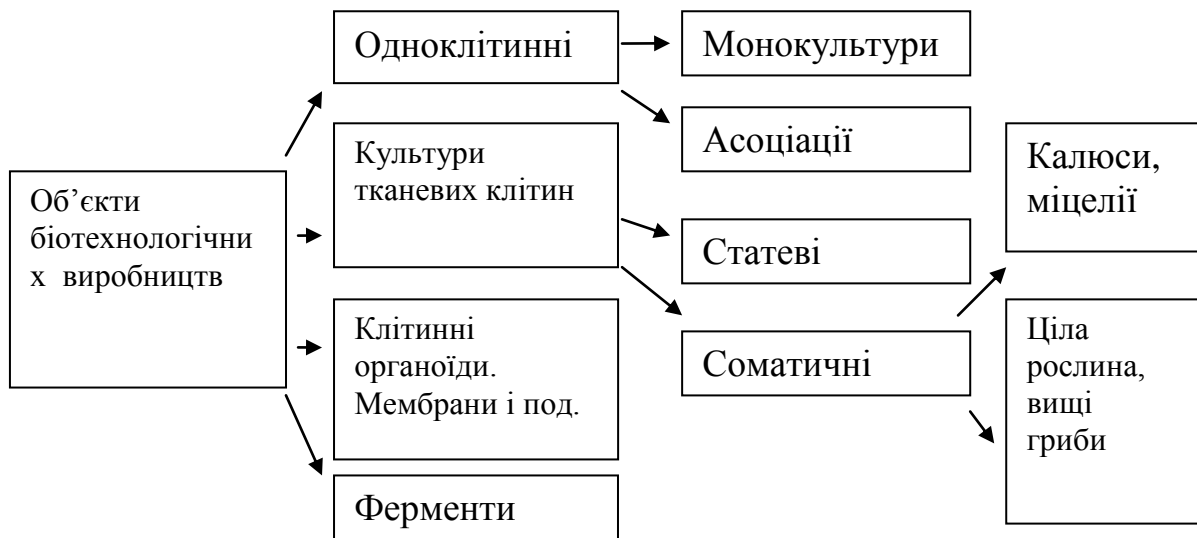
а) за рівнем організації

1. Макрорівень – вивчаються закономірності і технічне оформлення виробничого процесу, розробляється обладнання для всіх його стадій.

2. Мікрорівень – вивчається особисто біологічний об’єкт, що служить знаряддям праці.

б) за застосованим об’єктом

1. За типом об’єку, що застосовується



2. За типом переважаючого процесу :

- деструкція
- біосинтез
- транслокація органічних сполук

Але необхідно відмітити, що існує багато процесів, які відносять одночасно до різних груп однієї класифікації.

в) в залежності від масштабу

1. Крупномасштабні (мл. тонн кормового білка)
2. Середні
3. Дрібні

г) за застосованою технологією :

1. Періодичні;
2. Безперервні;
3. Поверхневі;
4. Глибинні;
5. Аеробні;
6. Анаеробні;

д) за історією виникнення, складності застосованих технологій і структури:

1. Процеси переробки продуктів харчування сільськогосподарської сировини, в яких не відбувається вирощування великих мас мікроорганізмів або продуктів метаболізму (хлібопечення, виробництво сировини, напоїв, илосування кормів). Мікроорганізми звичайно використовуються в кількох кількостях лише на одній із стадій технологічного процесу; специфічне технологічне обладнання, пов'язане із застосуванням мікроорганізмів, має тут невелику питому вагу, і удосконалення технологій проходить в основному за рахунок обладнання, що немає відношення до біотехнології.

2. Бродильне виробництво, за допомогою якого одержують деякі органічні кислоти, розчинники та енергетичну сировину (спирт, ацетон, бутанол і под.). Специфікою для цих виробництв є те, що мікроорганізми можна культивувати в нестирильних умовах, оскільки фактор температури або наявність спирту, сахару, кислот та інших компонентів середовищ або продуктів метаболізму мікроорганізмів заважають росту сторонньої мікрофлори.

3. Біотехнологічні процеси зі спеціальним обладнанням і технологією, в яких мікроорганізми використовуються у виробничих умовах для обробки сільськогосподарських, промислових і побутових відходів, очистки води і ґрунту від забруднень.

4. Одержання в промислових умовах біомаси для кормових і технологічних цілей. Процеси відбуваються в нестирильних умовах, але вимагають специфічного обладнання.

5. Одержання мікробної і клітинної біомаси в асептичних умовах для рослинництва, харчових цілей (бактеріальні добрива, пестициди, кормовий салок). Ці виробництва мають складне апаратурне оформлення процесів очистки і вирощування.

6. Одержання для потреб промисловості, сільського господарства і медицини мікробних метаболітів складної органічної структури, більшості з яких властива фізіологічна активність (антибіотики, вітаміни, ферменти, кровозамінники, гібереліни, деякі полімери, амінокислоти, полісахариди і т.п.).

Їх особливістю є необхідність спеціального складного обладнання і технології для виділення і очистки цільового продукту.

7. Використання іммобілізованих ферментів і клітинних систем.

8. Трансформація органічних речовин (одержання стереоселективних складних органічних молекул).

9. Культивування клітин багатоклітинних організмів. Виробництво моноклональних антитіл (имунна біотехнологія). Клональне розмноження найважливіших сільськогосподарських рослин за допомогою культури клітин і тканин, методів клітинної селекції, одержання гаплоїдів і гібридизація соматичних клітин для створення вихідних форм і сортів; оздоровлення посадкового матеріалу.

10. Застосування мікробіологічних процесів у традиційних небіологічних областях техніки, наприклад, для вилужування металів, видалення метану із шахт, збагачення руд, підвищення нафтовіддачі пластів і т.п.

11. Застосування методів генної інженерії для одержання нових мікроорганізмів і клітин з заданими властивостями. У перспективі - конструювання порід тварин і сортів рослин. Протеїнженерія.

д) за застосуванням об'єктом біотехнологічні процеси можна класифікувати по-різному: по-перше, за типом об'єкта, що застосовується; по-друге, за ступенем удосконалення об'єкта, що застосовується, за кількістю та якістю вкладеної в нього праці:

1. Стихійно виникаючі біоценози мікроорганізмів невідомого складу;

2. Чисті культури мікроорганізмів і їх усвідомлена селекція, а також спеціально підібрані асоціації;

3. Мутанти мікроорганізмів із зміненою спадковістю, ферменти, виділені з організмів;

4. Іммобілізовані ферменти і клітини, клітинні культури багатоклітинних організмів, сконструйовані методами генної інженерії.

ж) за областю застосування біотехнологічних процесів і продуктів, які отримують біотехнологічним способом.



Ось лише основні області застосування:

Область застосування	Приклади
1. Медицина, охорона здоров'я, фармакологія	Антибіотики, ферменти, амінокислоти, кровозамінники, алкалоїди, нуклеотиди, імунорегуляторні препарати, протипухлинні і протівірусні препарати, нові вакцини, гормональні препарати (інсулін, гормон росту), моноклональні антитіла для діагностики, дослідження природи раку і процесів старіння людського організму, продукти для дієтичного харчування.
2. Отримання хімічних речовин	Етилен, пропілен, бутилен, окислені вуглеводи, органічні кислоти, терпени, феноли, акрилати, полімери, ферменти, продукти тонкого органічного синтезу, полісахариди.
3. Тваринництво	Удосконалення кормових раціонів (виробництво білка, амінокислот, вітамінів, кормових антибіотиків, ферментів, заквасок (для силосування), ветеринарних препаратів (антибіотики, вакцини і т. п.), гормонів росту, створення

	високопродуктивних порід, пересадка запліднених яйцеклітин та ембріонів, маніпуляції над ембріонами.
4. Рослинництво	Біораціональні пестициди, бактеріальні добрива, гібберелини, виробництво безвірусного посадкового матеріалу, створення високопродуктивних сортів і гібридів стійких до езм, засухе, заморозкам, засоленности почв.
5. Рибне господарство	Кормовий білок, ферменти, антибіотики.
6. Харчова промисловість	Білок, амінокислоти, замінювачі, сахара (аспартат, глюкозофруктовий сироп), полісахариди, органічні кислоти, нуклеотіди, ліпіди, переробка харчових продуктів.
7. Енергетика і добування корисних копалин	Спирти, біогаз, жирні кислоти, аліфатичний вуглеводень, водень, уран, а також інтенсифікація добування нафти, газу, вугілля, штучний фотосинтез, біометалургія, добування сірки.
8. Важка промисловість	Покращення технічних характеристик каучуку. Бетонних, цементних, гіпсових розчинів моторних топлив, антикорозійні присадки, змазки для прокатки чорних і кольорових металів,

	технічний білок і ліпіди.
9. Легка промисловість	Покращення технології переробки шкіри, виробництво технічної сировини, шерсті, паперу, парфумно-косметичних виробів, отримання біополімерів, штучної шкіри і шерсті та под.
10. Біоелектроніка, космонавтика, екологія	<p>Біосенсиори, біотипи.</p> <p>Створення замкнених систем життєзабезпечення в космосі.</p> <p>Утилізація сільськогосподарських і побутових відходів, біодеградація токсичних речовин (пестицидів, героїцидів, нафти), що важко розкладаються, створення замкнених технологічних циклів, виробництво нешкідливих пестицидів, полімерів, які легко руйнуються.</p>
11. Наукові дослідження	Генно-інженерні і молекулярно-біологічні дослідження (ферменти рестрикції ДНК, ДНК і РНК-полімерази, ДНК і РНК-лігази, нуклеїнові кислоти, нуклеотиди і под.), медичні дослідження (засоби діагностики, реактиви і под.), хімія (сенсори, реактиви).

У 1984 році в Мюнхені голандський вчений Є.Хаувінк поділив історію біотехнології на п'ять етапів або ер.

Допастеровська ера (до 1865 р.)	Використання спиртового і молочнокислого бродіння при отриманні пива, вина, хлебопекарських і пивних дріжджів, сиру. Отримання ферментативних продуктів і оцту.
Післяпастерівська ера (1866 – 1940)	Виробництво етанолу, бутанолу, ацетону, гліцеролу, органічних кислот і вакцин. Аеробна очистка каналізаційних вод. Виробництво кормових дріжджів із вуглеводів.
Ера антибіотиків (1941-1960)	Виробництво пеніциліну та інших антибіотиків шляхом глибинної ферментації. Культивування рослинних клітин і одержання вірусних вакцин. Мікробіологічна трансформація стероїдів.
Ера керованого біосинтезу (1961-1975)	Виробництво амінокислот за допомогою мікробних мутантів. Одержання чистих ферментів. Промислове використання імобілізованих ферментів і клітин. Анаеробна очистка каналізаційних вод і одержання біогазу. Виробництво бактеріальних полісахаридів.
Ера нової біотехнології (після 1975 р.)	Використання генної і клітинної інженерії з метою одержання агентів

	біосинтезу. Одержання гібридів, моноклональних антитіл, гібридів із протопластів і меристемних культур. Трансплантація ембріонів.
--	---

Відкриття і розробки, які допомагали виникненню і розвитку біотехнології.

### 1. Допастерівська ера (до 1858 року)

1665 р.	Описана клітинна структура деяких рослинних тканин, яка спостерігалася за допомогою системи лінз (Р.Гук ).
1673 р.	За допомогою примітивного мікроскопу можна побачити одноклітинні, через 10 років було побачено бактерії.
1759-1780 рр.	Одержаний у чистому вигляді ряд органічних кислот: винна, молочна, яблучна, щавлево-оцтова, лимонна, бензойна.
1789рр.	Одержана оцтова кислота в кристалічному вигляді, так звана льодяна оцтова кислота (Т.Ловиць).
1795 р.	Перша успішна вакцинація людини – вакцинація проти віспи (Е.Дженнер).
1831 р.	У результаті спостереження за допомогою мікроскопу, зроблено висновок про те, що ядро є найважливішою й незамінною частиною клітини (Р.Браун).
1836 р.	Опубліковані спостереження, що в опадах, які залишаються після бродіння, містяться частинки, здатні до розмноження (К. де Латур).
1838-1845 рр.	Розроблена теорія клітин, згідно якої, структурною і функціональною одиницею рослин і тварин є клітина, яка містить ядро (М.Я.Шлейден, Т.Шванн, Р.Вирхов).
1857 р.	Доведено, що спиртове бродіння відбувається тільки в присутності живих дріжджів. Початок мікробіології як

	дисципліни біологічних наук (Л.Пастер).
--	---

## 2. Післяпастерівська ера (з 1858 до 1949 року).

1859 р.	Описана матеріальна теорія еволюції живої природи (Ч.Дарвін).
1865 р.	Експериментально обумовлені і сформульовані закони спадковості (І.Г.Мендель).
1875-1879 рр.	Відкрито заплідненість яйцеклітини і злиття двох проноклеусів (О.Гергівич, Г.Фоле).
1875 р.	Разроблений метод чистих культур мікроорганізмів, що гарантує вміст в інокуляті тільки певного виду мікроорганізмів (Р.Кох).
1881 р.	Одержані перші чисті культури грибів (О.Бефельд).
1885 р.	Доведено, що клітини курячого ембріону зберігають життєздатність у соляму розчині поза тілом тварин – перше дослідження анабіозу тварин (Е.П.Ру).
1886 р.	Перші комплексні дослідження фізіології грибів – початок нової дисципліни – мікробіології (А.де Барі).
1887 р.	Перші спроби використати антагонізм мікробів з метою захисту від інфекційних захворювань (А.Павловський).
1888-1901 рр.	Установлена фіксація атмосферного азоту мікроорганізмами – бульбочковими бактеріями (М.Бейеринк, Х.Хелрігель, Х.Вільфарт).
1893 р.	Установлена здатність пліснявих грибів синтезувати лимонну кислоту (К.Веллер).
1894 р.	Створений перший ферментний препарат, одержаний із пліснявілого гриба, що виріс на вологому рисі (І.Такаміне).
1897 р.	Установлено, що безклітинні екстракти дріжджів здатні

	розщеплювати сахара з утворенням діоксиду вуглецю і спирту. Закладені основи ензимології (Ф.К.Бюхнер).
1905 р.	Винайдений метод хроматографії на папері (М.С.Цвет).
1908 р.	Створена єдина теорія імунітету (І.І.Мечников, П.Ерлих).
1910 р.	Перше вдале застосування бактеріальних інсектицидів (С.М.Метальников ).  Доведена здатність специфічних вірусів сприяти виникненню деяких різновидів ракових захворювань - сарком ( П.Раус).
1911-1920 рр.	Сформульована хромосомна теорія спадковості (Т.Х.Морган)
1925 р.	Установлена можливість штучного мутагенезу мікроорганізмів (грибів) під впливом рентгенівського опромінювання (Г.А.Надсон, Г.С.Филлипович).
1926 р.	Отриманий перший фермент у кристалічному вигляді – уреазу – і доведено, що цьому білку властива каталітична активність (Д.Самнер).
1928 р.	Експериментально доведена здатність пліснявих грибів синтезувати антибактеріальні речовини (А.Флемінг).
1931 р.	Створений перший мікроскоп з використанням потоку електронів, що просвічує (М.Кнолл, Е.Руска).
1933 р.	Винайдений метод культивування мікроорганізмів. З цього часу почалося конструювання більш складної ферментаційної апаратури, що дало можливість використовувати у промисловості метод глибинного культивування (А.І.Клуйвер, Л.Х.Перквін).
1933 р.	Початок використання електрофорезу для поділу білків у розчині (Д.Гізеліус).
1934 р.	Представлена перша доцільна рентгенограма білка –

	кристалів ферменту пепсину (Дж. Бернал).
1936 р.	Опублікована теорія різноманітних рівнів складності організації матерії (Нідхем).
1938-1945 рр.	Відкритий процес аеробного ресинтезу аденозинтрифосфорної кислоти (АТФ) (В.А.Енгельгардт).
1938 р.	Створений електронний мікроскоп (М.Арден).
1939 р.	Установлена здатність деяких мутантів дріжджів асимілювати парафіни та інші вуглеводні. Початок використання у мікробіологічній промисловості нетрадиційних видів сировини (Т.А.Таусон).

### 3. Ера антибіотиків (з 1941 до 1960 р.).

1942 р.	Сформульовано вчення про антибіотики, введено поняття і термін “антибіотики” (С.А.Ваксман).
1944 р.	Відкритий стрептоміцин (Б.М.Дуггер).
1944 р.	Установлено, що ДНК представляє генетичну інформацію і переносить її при трансформації клітин (О.Т.Ейвері, К.Мак-Мод, М.Мак-Карті).
1948 р.	Відкритий хлортетрациклін (Б.М.Дуггер).
1948 р.	Установлений стимулюючий ефект кукурудзяного екстракту – першого комплексного стимулятора промислового значення (Р.Д.Когхілл, А.И.Майер).
1950-1960 рр.	Фундаментальне дослідження фізіології молочнокислих бактерій (Є.І.Квасников).
1950-1960 рр.	Поява нових концепцій у таксономії актиноміцетів (Н.П.Красильников).
1953 р.	Установлена модель подвійної спіралі молекулі ДНК. Розшифрований механізм дії генетичного апарату



	(Дж.Уотсон, Ф.Крик).
1955-1965 рр.	Створена теорія безперервної ферментації (І.Малек, З.Фенце).
1953 р.	Узагальнено мікробіологічне розкладання целюлози (А.А.Імшенецький).
1955 р.	Виявлено, що клітини тварин здатні довгий час існувати в певній суміші низькомолекулярних сполук і комплексу білків сировотки. Початок практичного культивування тканинних культур (Х.Ігл).
1957 р.	Відкритий інтерферон – важливий фактор імунологічної системи тварин і людини (А.Айсакс, И.Ліндемман).

#### 4. Ера керованого синтезу (з 1961 до 1975 р.).

1961 р.	Установлена здатність мутантів бактерій до зверхсинтезу амінокислот. Початок мікробного синтезу амінокислот (С.Кіносіта, С.Накаяма, С.Кідата).
1961 р.	Створена концепція енергетичного сполучення – основи мембранної біоенергетики (О.Мітчел).
1962 р.	Одержані дані про існування ферменту ДНК – рестриктани молекули ДНК, яка використовується для розщеплення в певних місцях (В.Абвер, Г.Сміт, Д.Натанс).
1968 р.	Розшифрований генетичний код і його функції в синтезі білків (Р.Холлі, Х.Г.Корана, М.Ніренбергер).
1968 р.	Синтез гену в лабораторії (Х.Г.Корана).
1969 р.	Изольований ген із генетичного матеріалу клітини (Дж.Беквіт, Д.Шапіро, І.Ірон).
1970 р.	Відкриті інформосоми (Л.С.Спірін, Г.П. Георгієв, Л.П.Овчинников).

1970-1980 рр.	Узагальнені фізико-біохімічні основи діяльності фотосинтезуючих бактерій (Є.Н.Кондратьєва).
1970-1980 рр.	Відкриті нові шляхи біосинтезу поліфосфатів мфкроорганізмами (Н.С.Кулаєв).
1972 р.	Ророблена теорія клонірування ДНК (П.Берг).
1972 р.	Установлений хімічний склад антитіл – важливого фактора імунологічної системи тварин і людей (Дж.Едельман, Р. Портер).
1975 р.	Шляхом гібридизацій соматичних клітин одержані гібридами, що секретують моноклональні антитіла (Т.Келер, К.Мільштейн).

#### 5. Нова ера (після 1975 р.)

1977 р.	За допомогою рекомбінантних бактерій одержаний перший гормон – соматостатин (К.Ітакурі, Х.Бойер).
1977-1979 рр.	Хімічний синтез гену соматостатину та інсуліну. Ствоєння приладу-синтезатору олігонуклеотидів (фрігментів молекули ДНК) з заданою послідовністю нуклеотидів (К.Ітакурі).
1978-1981 рр.	Створена теорія хемоосматичної циркуляції протокі у біологічних мембранах (В.П.Скулаєв).
1979 р.	Визначена первинна структура бактеріородопсину – найпростішого генератора електрохімічного потенціалу клітини (Ю.А.Овчинников).
1981 р.	Мікрохірургічна трансплантація ембріонів тварин з метою найшвидшого розмноження високопродуктивних екземплярів (Вілландсон).
1985 р.	Сформульовані нові уявлення про механізм регуляції

	біохімічних реакцій у клітині за допомогою носіїв зовнішніх сигналів - цАМФ (Е.Сазерленд).
1985-1988 рр.	Розроблені основи безклітинного синтезу білка в протоці (С.Спірін).

## Лекція 2

### **Тема: БІОХІМІЯ І МІКРОБІОЛОГІЯ ПРОЦЕСУ МЕТАНОГЕНЕЗУ**

Питання:

1. Основи мікробіологічної біохімії та екології метанового бродіння.
2. Традиційні шляхи утилізації гною.
3. Виробництво біогазу як спосіб утилізації гною та іншої біомаси.
4. Використання біотехнологічного виробництва біомаси гідробіонтів.

### Основи мікробіологічної хімії і біології метанового бродіння

Метанове бродіння (зброджування) являє собою безкисневу біологічну конверсію органічної речовини в біогаз, який складається в основному із метану і вуглекислоти. Мікробіологія, біохімія і кінетика анаеробної обробки дуже складні і поки що не зовсім досліджені.

Анаеробні бродіння - багатостадійний процес, який здійснюється декількома функціональними групами бактерій, що тісно взаємодіють між собою. На першій стадії гетерогенна група анаеробних бактерій, так звані первинні анаероби, піддають ферментативному розщипленню складні водонерозчинні органічні полімери – білки, ліпіди і полісахариди. При цьому разом з бактеріями, які здійснюють гідроліз полімерів, функціонують мікроорганізми (мікрофлора розсіювання), що розкладають моносахара, органічні кислоти і спирти, які утворюються при гідролізі.

Результатом діяльності обох груп мікроорганізмів є утворення водню, CO<sub>2</sub>, низькомолекулярних (летючих) жирних кислот (ЛЖК) і спиртів.

Гідролітичні бактерії знаходяться в тісному контакті з субстратом який гідролізується. Мікрофлора розсіювання, навпаки, розвивається в рідкому середовищі.

У процесах першої стадії беруть участь облігатні анаеробні бактерії (*Clostridium*, *Bacteroides*, *Butirivibro* та ін.), а також факультативні (*Escherichia coli* і *Bacillus* sp.).

За створеними продуктами перша стадія (фаза) бродіння отримала назву кислотогенної або водневої.

Друга стадія - метанова або лужна, вона також здійснюється декількома групами бактерій. Тут основну роль відіграють метанові (метанутворюючі) бактерії (метаногени).

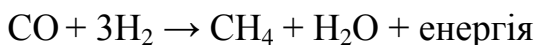
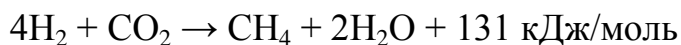
Характерною особливістю цих бактерій є дуже вузький спектр використовуваних субстратів; а) водень, б) вуглекислота, в) мурашина й оцтова кислоти, г) метанол, д) муно-, ді-, триметиламіни.

Ці субстрати частково наявні і після стадії кислотогенезу, однак, в основному, в їх утворенні бере участь так звана синтрофна мікрофлора – ацетогенні – і гомоацетогенні бактерії:

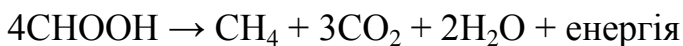


Синтрофні мікроорганізми представлені як облігатними, так і факультативними анаеробами (*Synthrophobacter*, *Syntrophomonas*, *Desulfovibrio*), їх мікробіологія не зовсім вивчена. Процес розкладення цими бактеріями органічних кислот і спиртів на водень і оцтову кислоту може бути здійснений термодинамічно тільки при дуже низьких концентраціях водню.

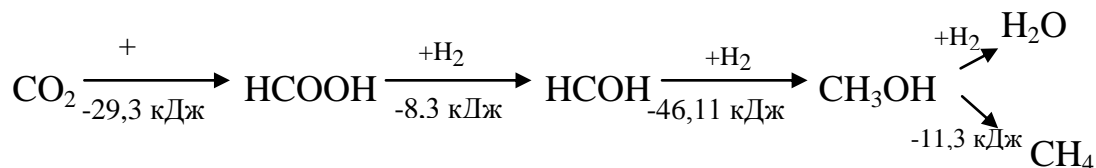
У метанотворюючому оточенні Функцію вилучення водню виконують воднево-використовуючі метаногени (роди *Methanobacterium*, *Methanobrevibacter*, *Methanosarcina*) при цьому концентрація водню стає нижче термодинамічного порогу для синтрофних бактерій:



Воднево-використовуючі бактерії складають більшість із відомих науці метанових бактерій, в процесах анаеробної обробки субстрату по водневому шляху утворюється всього близько 28% метану. Основна кількість метану (72%) утворюється із ацетату та із мурашиної кислоти:



Метанобактерії, які використовують ацетат, представлені двома родами: *Methanosarcina* і *Methanothrix*. Процес йде за схемою Barker (1950):



Метаногени – це група мікроорганізмів, які сильно відрізняються від усіх інших своїми властивостями, фізіологією і біохімією. Процес їх життєдіяльності оснований на реакціях, що протікають за участю унікальних ферментів (так звані фактори F20, F30, кофермент М).

Метанові бактерії – це особлива група бактерій – архебактерії. Вони відрізняються дуже низькою швидкістю росту, надзвичайно чутлива до умов навколишнього середовища і вимагають перш за все відсутності в середовищі розчиненого кисню та інших окислювачів.

Метаногенне оточення – це складна екологічна система. Істотні відмінності в біохімічних основах життєдіяльності бактерій різних груп передбачають їх як за фізіологією так і за параметрами росту. Так, при температурі 35°C час подвоєння біомаси гідролітичних мікроорганізмів складає 10-20 годин, негідролітичних кислотогенів – 1-10 годин, синтрофних бактерій – біля 100 годин, довикористовуючих метанових бактерій – 15 – 100 годин.

У свою чергу, кожна функціональна група представлена декількома родами (видами) фізіологічно схожих мікроорганізмів, які розрізняються за кінетикою росту. Наприклад, біомаса ацетат-використовуючих метанових бактерій роду *Methanosarcina* подвоюється за 20-30 годин, тоді як роду *Methanothrix* - за 200-300 годин. Разом з тим бактерії роду *Methanothrix* здатні використовувати у п'ять разів більш низькі концентрації ацетату (рис.І).

Переважа того чи іншого роду (виду) у складі функціональних груп метаногенного оточення залежить від складу і концентрації субстрату, умов проведення процесу.

Таким чином процес анаеробного метанового бродіння – результат складних взаємовідносин між функціональними групами і видами мікроорганізмів і може бути зрозумілим тільки при розгляді всього оточення вцілому, а не тільки властивостей окремих видів.

В анаеробних біореакторах метанові бактерії можуть утворювати один з одним та іншими мікроорганізмами складні просторові структури: флокули (хлоп'я), біоплівку на поверхні матеріалу твердої фази, гранули. При створенні подібних структур, розміром до декількох міліметрів, метанові бактерії значно втрачають здатність вільно пересуватися в об'ємі реактора, практичною щільністю зберігаючи свою метаболічну активність. Це дозволяє також при малому часі перебування стічної води в біореакторі підтримувати в ньому дуже високу концентрацію біомаси (5 – 10 г/л). Явище утворення бактеріальних макроструктур покладено в основу роботи анаеробних біореакторів другого покоління.

Створення локальних висококонцентрованих бактеріальних утворень неминує змінює властивості бактерій у порівнянні з дисперсними суспендованими культурами. Так, біоплівка (товщина її може досягати 1-4 мм) здатна в певних межах підтримувати у відповідній мікрзоні оптимальні умови середовища (рН), окислювально відновлювальний потенціал. Біореактори з біоплівкою стікі до дії токсичних речовин.

Метаногенна плівка має досить крихку структуру. Це забезпечує вільне проникнення субстрату і відвід метаболітів при товщині біоплівки приблизно до 1 мм. При більшій її товщині виникає проблема опору дифузії.

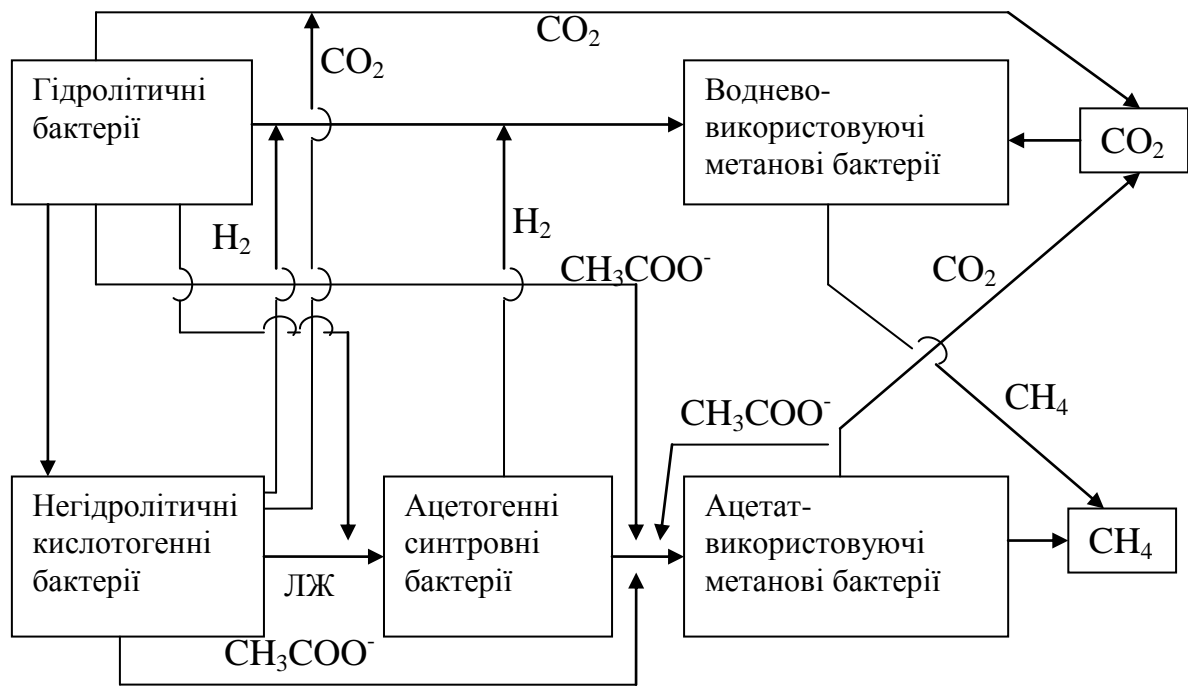


Рис. Схема конверсії складних органічних речовин анаеробними метаногенними оточеннями.



### Токсичність і метаногенез.

Метаногенез підданий інгібіруючому впливу деяких токсичних речовин, які наявні в субстратах у розчиненому стані. Інгібіторами є такі особисті проміжні продукти (ЛЖК і  $H_2$ ).

Вплив токсичних речовин може бути бактеріостатичним і бактеріцидним. До гостротоксичних для метанового бродіння відносяться деякі синтетичні органічні речовини (в основному хлорорганіка), неорганічні сполуки (ціаніти, ціаніди), важкі метали та окислювачі.

Один із токсикантів, який найбільше зустрічається в стічних водах - амонійний азот, що утворюється при розпаді білків. Ступінь токсичності залежить від рН середовища: при  $pH < 7,2$  переважає менш токсична форма - іон амонію  $NH_4^+$ , при лужному середовищі - більш токсична форма - вільний аміак  $NH_3 \uparrow$ .

Другий токсикант - сульфат іон  $SO_4^{2-}$ . В анаеробних умовах  $SO_4^{2-}$  трансформується в більш токсичні сульфіди.

Концентрація  $SO_4^{2-}$  і  $HS^-$  - є функцією рН і вмісту важких металів (перш за все заліза) при цьому утворюються нетоксичні сульфіди, які нерозчинні у воді. Токсичність - поняття відносне. Необхідні біогенні речовини і мікроелементи ( $NH_4^+$ ,  $SO_4^{2-}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  та інші) стають інгібіторами при високих концентраціях.

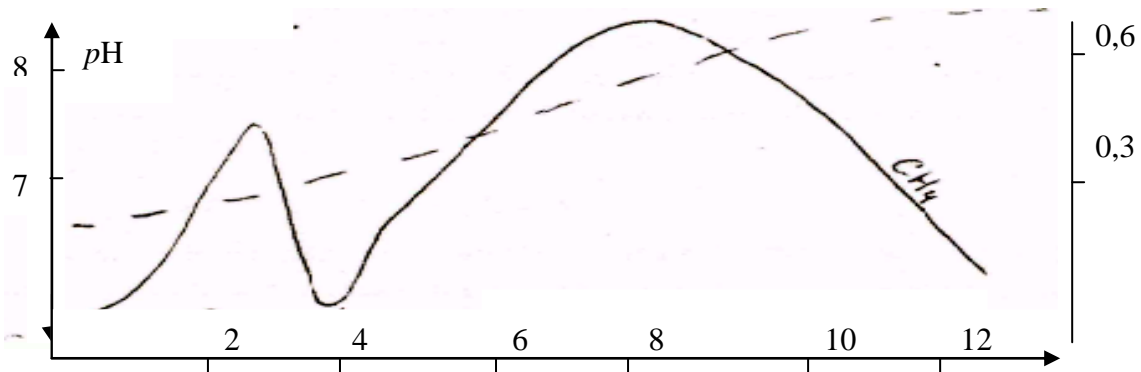
Важкі метали:	
$Cu^{2+} / Cu$	0,5 * / 30-70 мг/л
$Cr^{6+} / Cr$	3,0 * / 200-260 мг/л
$Ni^{2+} / Ni$	2,0 / 30 мг/л
Органічні сполуки:	
ЛЖК	1000 - 2000 мг/л
Формальдегід	50 - 200 мг/л

Хлороформ	0,5 мг/л
Метиленхлорид	2 мг/л

Пояснення до таблиці:

- – в чисельнику – це концентрація речовини в розчині;
- - в знаменнику – це загальна концентрація.

Вплив кисню на метаногенез в умовах короткочасної аерації.



Токсичність залежить від ступеня адаптації мікроорганізму до даного токсиканта. Якщо концентрація токсикантів повільно підвищується, то бактерії можуть успішно мобілізувати свої метаболічні системи. Доведено, що більшість мікроорганізмів успішно адаптують в анаеробних умовах до високих концентрацій ЛЖК (6-8 г/л і більше), аміачного азоту (5 г/л і більше). Після адаптації мікроорганізми здатні також розкладати велику кількість токсично органічних сполук: феноли, хлорфеноли, формальдегід та інші.

Значення порогу інгібірування метанового зброджування різноманітними речовинами.

Речовина:	Інгібіруюча концентрація, в мг/л:
$\text{H}_2\text{O}_2$	0,01
Нітрати	50
Амонійний азот:	
$\text{NH}_4^+$	1500 – 3000
Вільний $\text{NH}_3$	100 – 200
Сполуки сірки:	
$\text{SO}_4^{2-}$	1000
$\text{S}^{2-}$	100 – 200
Іони лужних і лужно-земельних металів:	
$\text{Ca}^{2+}$	2500 – 4500
$\text{Na}^+$	3500
$\text{K}^+$	2500 - 4500

### **Лекція 3.**

#### **Тема: БІОТЕХНОЛОГІЯ ОТРИМАННЯ БІОГАЗУ І ВИРІШЕННЯ ПРОБЛЕМИ УТИЛІЗАЦІЇ ГНОЮ І РОСЛИННОЇ БІОМАСИ.**

Традиційний шлях утилізації гною – використання його для поліпшення родючості ґрунту. Наявність N, P, K, C дає збільшення гумусу (1 т гною = 40-50 кг гумусу). Щорічно в Прибалтиці (Латвія.) вносять 10-20 т гною на 1 га. Однак внесення гною вимагає витрат на суворе додержування санітарно-гігієнічних і екологічних вимог, а також необхідність підвищення рентабельності галузі.

Особливо гостро проблема утилізації гною постала у зв'язку з введенням до експлуатації крупних тваринницьких комплексів.

Концентрація тварин на обмеженому просторі неминуче супроводжується накопиченням великої кількості гною. А отримані в 1987 р. дані (Распутний А.А.) свідчать про те, що на прилеглих до свинотваринницьких комплексів площах має місце позитивний баланс деяких важких металів.

Приклад: протягом року об'єм гнойової маси, яка підлягала винищенню гнойової маси на комплексі радгоспу "Росія" Черкаської області (24 тис. голів) дорівнює 23 тис. т твердої фракції і 110 тис. т рідкої фракції. У Калитянському свинокомплексі (Київська область) (108 тис. голів) об'єм гнойової маси склав 128 тис. м<sup>3</sup> твердої фракції і 94 тис. м<sup>3</sup> мулу, а також 1,7 млн. м<sup>3</sup> рідкої фракції.

Поява проблем з утилізації гною і необхідністю отримання все більшої кількості палива (газ, нафта, вугілля) призвело до об'єднання цих проблем у процесі одержання біогазу.

Утилізація гною шляхом інтенсифікації процесу мінералізації органічних речовин у ґрунті або водоймищі, а також введення гною до раціону сільськогосподарських тварин, як спосіб його утилізації, відходять на другий план.

## Виробництво біогазу.

Сприятливою для життєдіяльності оточення метаноутворюючих мікроорганізмів вважається середовище, в якому концентрація сухої речовини на рівні 10-12%. У цьому випадку в'язкість субстрату дозволяє вільно пересуватися рідині між взвішеними твердими частинками гнойової біомаси і мікробними клітинами, що знаходяться в ній. При  $>12\%$  у зв'язку з підвищенням в'язкості субстрату і погіршенням умов протікання для ферментативних реакцій через недостатньо активного перемішування призводить до зниження виходу біогазу. Найбільш сприятливим для розмноження метанових бактерій є середовище, в якій співвідношення C: N дорівнює 10:30. Для підтримки цього співвідношення на оптимальному рівні в умовах виробництва змішують біомасу з високим вмістом вуглецю з відходами, в яких знаходиться велика кількість азоту. Суттєвий вплив на швидкість метаногенезу завдає реакція живильного середовища. Встановлено, інтенсивне утворення метану проходить при  $\text{pH} = 6,8-7,4$ , при  $\text{pH}$  нижче 6,4 і вище 7,8 знижується метаболічна активність оточення метанових бактерій, при  $\text{pH}=9$  – припиняється

Висока швидкість утворення біогазу досягається також при концентрації в середовищі летючих карбонових кислот у межах 5-500 мг/л, при відхиленні в той чи інший бік швидкість метаногенезу уповільнюється.

Процес метаногенезу відбувається при широкому діапазоні температур:

від 0 до 20 °C – психрофільний метан

від 20 до 40 °C – мезофільний режим

від 40 до 60°C – термофільний.

При утилізації гною в термофільних умовах 54-55°C швидкість утворення біогазу в 2,5-3 рази вище, ніж у мезофільному режимі (32-35°C). Часто перевагу надають мезофільному режиму, так як при цьому досягається економія енергії необхідної для нагрівання поживного

середовища. Крім того мезофільна асоціація метаногенів не настільки чутлива до поживного середовища. З іншого боку є дані, що в термофільному режимі частка метану знижується.

Тривалість процесу ферментації біомаси, у тому числі й гною, в мезофільному режимі не менше 14 діб. У більшості випадків процес метаногенезу відбувається протягом 24-28 діб і більше. Максимальний вихід біогазу на стадії найбільш інтенсивного метаногенезу значною мірою залежить від хімічного складу біомаси, який визначається видом тварин, а отже, і раціоном, який вони отримують (таблиці).

Так, яз 1кг сухої речовини гнойової біомаси одержують 0,4-0,6 м<sup>3</sup> біогазу.

На біогазових установках, що працюють в умовах виробництва, із 1кг сухої речовини гною великої рогатої худоби одержують 0,2-0,5 м<sup>3</sup>, а із такої ж кількості свинного гною - 0,3-0,7 м<sup>3</sup> біогазу (реактор працює в мезофільному режимі).

Із біомаси курячого посліду виходить більше біогазу, ніж із гною великої рогатої худоби або свиней.

Хімічний склад гною сільськогосподарських тварин, % у сухій речовині біомаси.

Інгредієнти	Вид тварин			
	Велика рогата худоба		Свині	Кури
	Корови	Худоба на відгодівлю		
Органічна речовина	77-85	77-85	77-84	76-77
Сіра клітковина	26,7-50,3	1	19,5-21,4	13,0-17,8
Сирий жир	2,9-4,3		3,5-4,0	2,4-42,1
Сирий протеїн	9,3-20,7		16,4-21,5	20,5-42,1

Лігнін	16-30	16-30		9,6-14,3
Співвідношення C:N	9-15	9-15	9-15	9-15
Азот	1,0-6,5	2,3-4,0	4,0-10,3	2,3-5,7
Фосфор	0,2-0,7	0,4-1,1	1,9-2,5	1,0-2,7
Калій	2,4	1,0-2,0	1,4-3,1	1,0-2,9
Кальцій	2,3-4,9	0,6-1,4		5,6-11,6
Магній		0,5-0,6		0,9-1,1

Хімічний склад відходів рослинництва, % у сухій речовині (за В.Банером, 1982).

Інгредієнти	Солома			Бадилля	
	житня	пшенич на	кукуруд зяна	Бурякова	картоплян а
Органічна речовина	95,4	91,4	91,7	78,5	78,9
Сира клітковина	47,5	45,5	33,3	11,5	23,8
Сирий жир	1,5	1,6	1,7	1,5	3,2
Сирий протеїн	2,9	2,9	7,5	12,5	14,5
Лігнін	15-20	15-20	5,5		
Співвідношення C:N	80-150	90-165	30-65	18	17
Азот	0,46	0,46	1,20	2,0	2,34
Фосфор	0,12	0,09	0,11	0,26	0,20
Калій	0,88	0,79	2,32	3,57	1,67
Кальцій	0,19	0,14	0,19	1,40	2,57
Магній	0,05	0,07	0,30	0,60	0,83

При проектуванні біогазової установки виходячи із того, що від однієї корови масою 500 кг за добу отримують з гною 4,8 кг сухої органічної речовини, із якої при 30-добовій переробці в реакторі утворюється 1-2,4 м<sup>3</sup> біогазу.

Еквівалентну кількість біогазу одержують із гною, який виробляють протягом доби дев'ятьма свинями на відгодівлі (і шістьма свиноматками) біогазу. – жива маса 60 кг.

Для одержання біогазу можна використовувати відходи рослинництва (солома ярих і озимих злакових культур, бурякове і картопляне бадилля, відходи переробки льону і под.). Вихід біогазу, як відомо, залежить від якості сировини, що визначається хімічним складом останнього (таблиця).

Для збільшення кількості азоту, в масу яка утилізується, вносять відходи, що містять високі його концентрації – курячий послід або свинячий гній.

При утилізації біомаси за допомогою анаеробної ферментації утворюється:

1) метан (біогаз) ;

2) нерозщепленні органічні речовини (шлам) ащепленые , кількість сухої речовини у шламі знижується на 50% за рахунок входження його до біомаси бактерій, в CH<sub>4</sub> і CO<sub>2</sub> ;

3) надсадочна рідина (не має неприємного запаху), містить органічну речовину на 80% менше вихідного, її зливати до каналізації або використовувати для вирощування рослин.

Енергетична цінність 1м<sup>3</sup> біогазу, який складається на 50% із метану, досягає 18 МДж, а при 70% вмісту метану – 25 МДж. Для порівняння – енергетична цінність пригодного газу (1м<sup>3</sup> його) – 34 МДж. Питання зберігання біогазу не вирішене: не доцільно його зниження.



Вивантаження шламу краще здійснювати через короткі проміжки часу (6 годин), а не 20 діб (15%). У значенні будівельного матеріалу його застосовують у бетоні, сталюму листі, склопластиці.

Камера для зброжування повинна бути абсолютно герметичною, володіти удосконаленою теплоізоляцією, корозійною стійкістю.

Форма реактора овальна, циліндрична, конічна, похило кубічна.

### Розповсюдження способу утилізації біомаси за допомогою БГУ в країнах світу.

У 60 країнах світу намагаються вирішити екологічні та енергетичні проблеми за рахунок використання БГУ.

З урахуванням конструктивних особливостей, які визначають ефективність і культуру виробництва, виділяють чотири рівня БГУ.

Найбільш простий технічний рівень – зброджування біомаса не підігрівається і не перемішується – реалізується в країнах з жарким кліматом (Африка, Південно-Східна Азія, Південна і Центральна Америка).

Приклад: БГУ «Габор» (КНР), в якій метантанк і газгольдер заглиблені в землю і сполучені. Біомаса зроджується протягом 40 днів.

Корисний об'єм камери  $10 \text{ м}^3$ . Вихід біогазу  $0,3\text{-}0,5 \text{ м}^3$  на  $1 \text{ м}^3$  об'єму камери бродіння. У Китаї їх 7,2 млн. Біогаз цих установок використовується в побутових умовах (освітлення, приготування їжі). На БГУ великої потужності, кількість яких 35 тис., одержують електроенергію.

В Індії широко розповсюджені БГУ схожі на "Габор", вони призначені для задоволення побутових енергетичних потреб однієї сім'ї. Їх продуктивність - близько  $1,72 \text{ м}^3$  біогазу на добу. Таких установок близько 100 тис. Планується довести їх кількість до 560 тис.

Другий рівень БГУ – роблять підігрів субстрату, перед завантаженням субстрат подрібнюють, роблять перемішування субстрату.

Установки такого типу є моделюю "Дормштадт". У них з 1 м<sup>3</sup> об'єму метантанку отримують у 4 рази більше біогазу ніж на моделі "Габор". Однак наявні і конструктивні недоробки:

- а) недостатня тепло- і гідроізоляція, викликана заглибленням в землю метантанку, можливість утворення застійних зон при перемішуванні біомаси, яка перероблюється;
- б) необхідність у додаткових енергетичних витратах на руйнування поверхневої кірки.

Біогазова установка (БГУ) з переробки біомаси в біогаз складається із ємкості для збору і зберігання гною, ферментеру (реактор, метантанк, камера бродіння), резервуара для одержання біогазу, (газгольдеру, газозбірника), нагрівального і перемішувального пристрою, контрольно-вимірювальної апаратури і засобів автоматизації.

У біогазових установках "Липп", «Райки», "МББ", "Вима", вироблених у ФРН за 10 років, по-різному переборені відмічені вище недоліки, внесена конструктивна новизна (створені двокамерні метантанки і двокамерний газгольдер), що дозволило впровадити двоступеневий процес зброджування біомаси.

У першій камері, куди надходить подріблена і підігріта біомаса, виникає утворення органічних кислот, тут підтримується температура 35°C. У другій камері, яка розташована в центрі метантанку відбувається термофільний процес метаногенезу. При цьому 1 м<sup>3</sup> об'єму метантанку дає 7 м<sup>3</sup> біогазу. Спеціалісти ФРН вважають, що БГУ можуть бути рентабельні тільки у випадку, якщо на 1 людину приходить більше 1 м<sup>3</sup> біогазу.

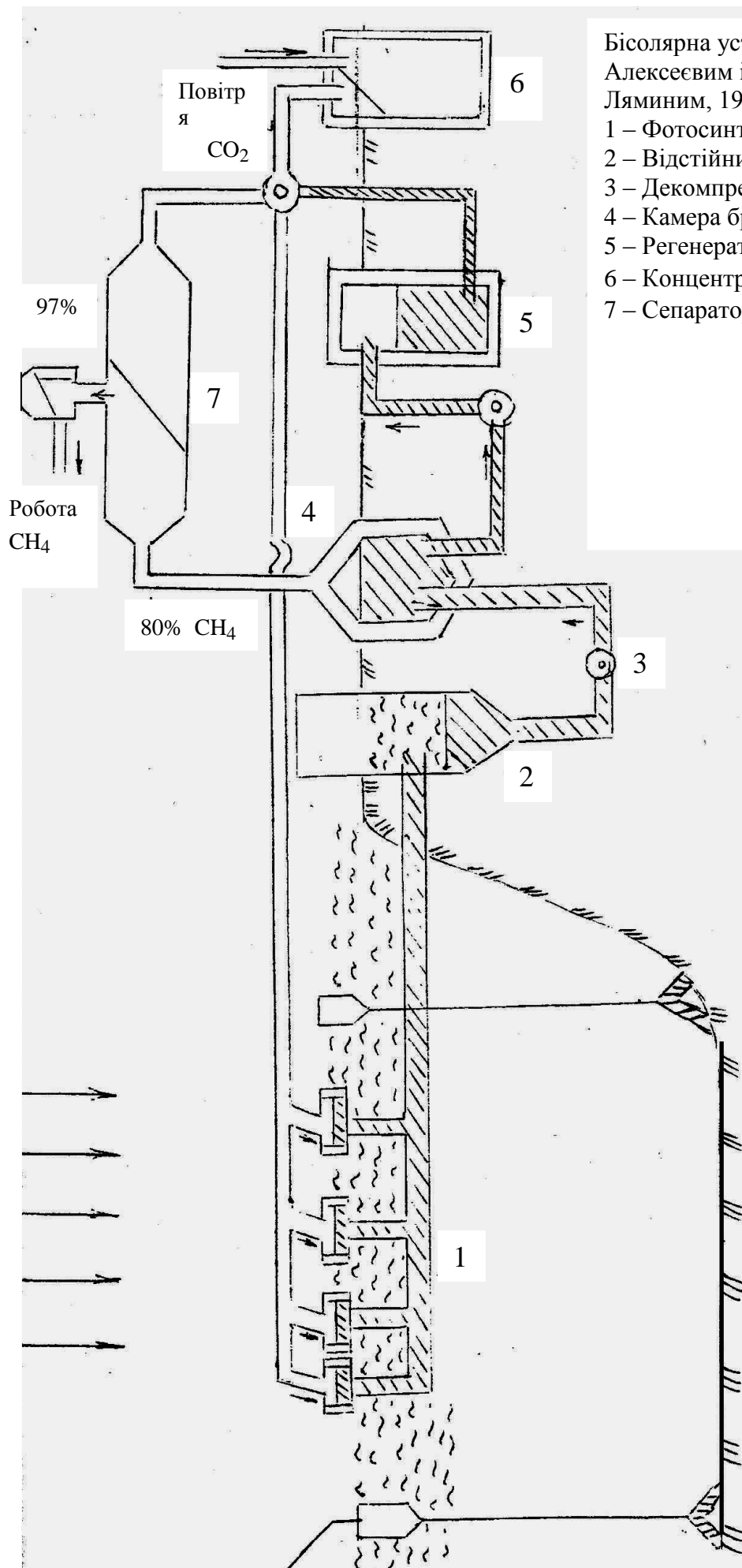
"Липп", "Райки", "МББ", "Вима" дають 1,2-1,4 м<sup>3</sup> біогазу, в ФРН кількість БГУ – 150. У Швейцарії близько 100, у Франції – 60, Англії – 50, в Японії – 10 БГУ. У США є установки з добовим виходом біогазу 43-73 тис. м<sup>3</sup>.

У радгоспі "Рассвет" Запорзької області з 1 м<sup>3</sup> об'єму БГУ одержують 3 м<sup>3</sup> біогазу. В УРСР є установки з об'ємом камери 6 тис. м<sup>3</sup>.

Використання біотехнологій виробництва біомаси гідробіонтів.

У МДУ в 1980 році створена експериментальна бісолярна установка по виготовленню біомаси водоростей і подальшої утилізацією її в метан. Конструкція системи забезпечує рециркуляцію всіх біогенних елементів. Фотосинтетичний блок бісолярної установки площею 30 м<sup>2</sup> забезпечує одержання біомаси хлорели, яка після концентрації і гомогенізації, з метою руйнації клітинних структур, подається до камери бродіння, де відбувається анаеробна ферментація біомаси і утворення біогазу, що складається із метану (80%), діоксиду вуглецю (16%) і водню (2%). Конструкція бісолярної установки передбачає введення додаткової кількості CO<sub>2</sub> повітря до фотосинтетичного блоку, існують дані (А.А.Ковальов, П.И. Гриднєв, 1985) про можливість використання діоксиду вуглецю, що входить в біогаз, для підвищення КПД фотосинтезу в теплицях.

Про потенційні можливості системи говорить той факт, що для одержання 1 млн. тон умовного топлива необхідно тільки 1,5 тис. біогенних елементів (перш за все N, P, K та ін).



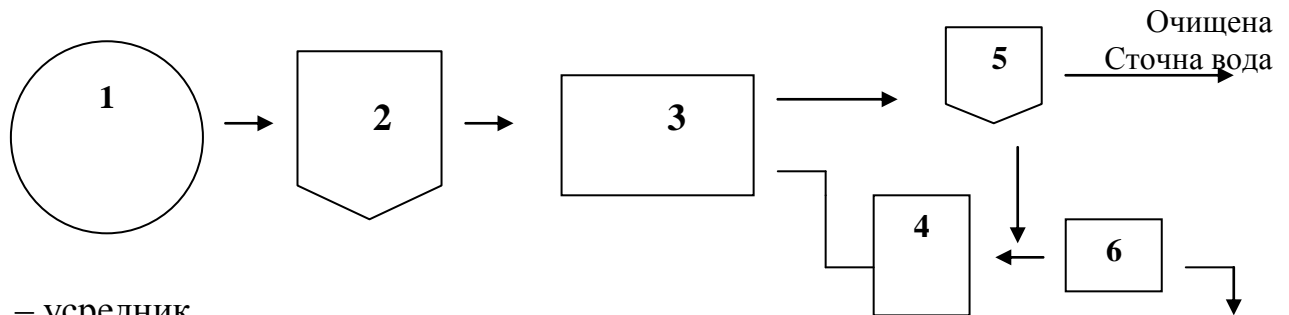
Біолярна установка (за В. В. Алексєєвим і М. Я. Ляминим, 1985г.).

- 1 – Фотосинтетичний блок
- 2 – Відстійник
- 3 – Декомпресор
- 4 – Камера бродіння
- 5 – Регенератор
- 6 – Концентратор CO<sub>2</sub>
- 7 – Сепаратор

## Лекція №4

### Тема: БІОЛОГІЧНА ОЧИСТКА СТОКІВ. АЕРОБНІ СИСТЕМИ ОЧИСТКИ СТОКІВ.

Схема системи очистки аеробних стоків.



1 – усредник

2 – відстійник

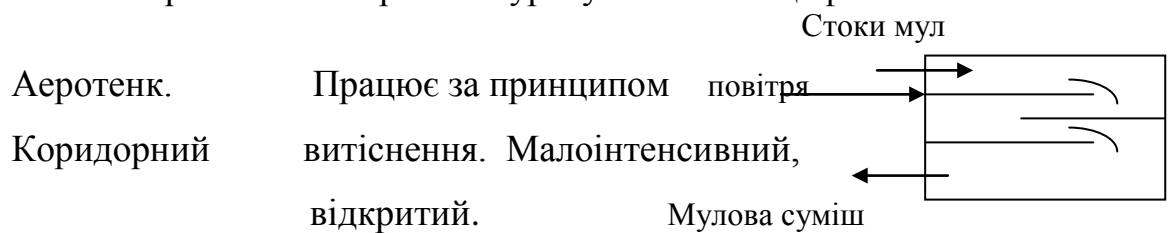
3 – аеротенк

4 – регенератор мулу

5 – відстійник мулу

6 – ущільнювач мулу

Аеротенки вибирають з урахуванням специфіки стоків



Поверховий аератор

Система Кессенера

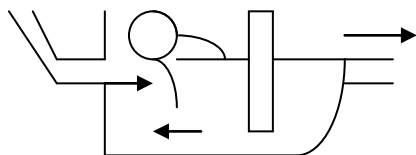
з обмеженою глибиною  
аерації відкритого типу.

Масообмін до 1,3 кг O<sub>2</sub> на

вхід

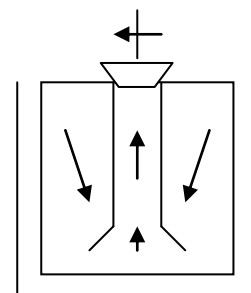
вихід

1 кВт. ч електроенергії



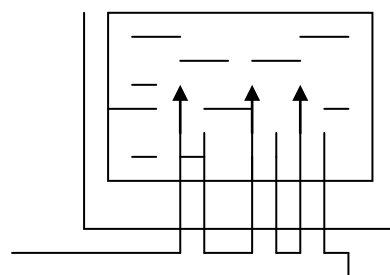
Система  
«Симплекс»

Турбінний аератор; відкритий  
Масообмін до 2,3 кг O<sub>2</sub> на 1 кВт ч



Аератор с кера -  
мічними повітря-  
розповсюджувачами

Відкрита система, відбувається інтенсивна  
аерація  
(потрібен компресор)

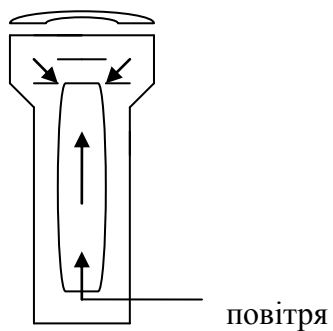


повітря

Колонний вежний  
або ерліфний аератор

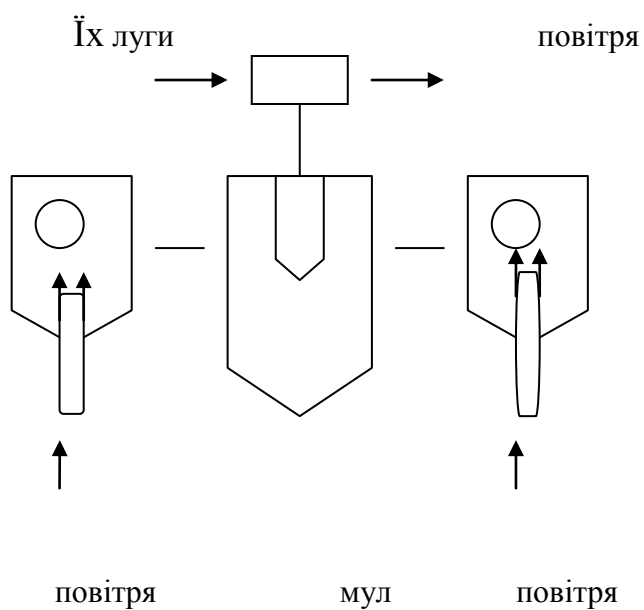
Низька турбіди́зація середовища  
(потрібен компресор).

Закритий, має 50 – 60 м в  
висоту. Енерговитрати малі  
0,5 кВт ч на 1 кг O<sub>2</sub>.



Інжекційний з ре -  
циркуляцією мулу і спалюванням  
органічних речовин, які містяться  
у відпрацьованому газі

інтенсивна аерація  
(потрібен компресор).  
Закритий

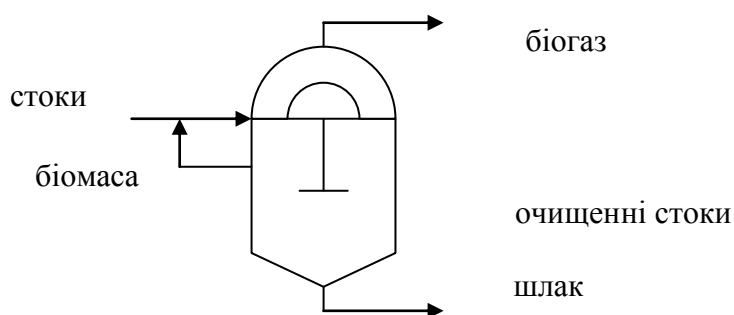


## Лекція №5.

### Тема: Система анаеробних реакторів для отримання метану и очистки стічної води.

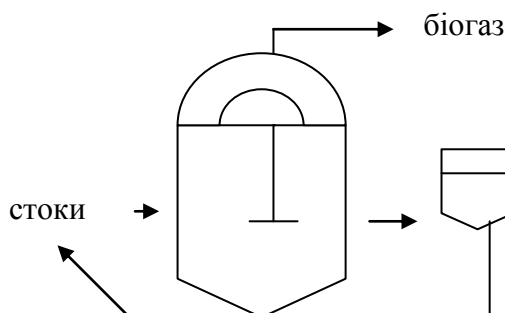
#### 1) традиційний біореактор метанового бродіння.

Це герметичні металеві або залізобетонні ємкості у вигляді вертикальних циліндрів, в яких проходить повільне перемішування газом або механічною мішалкою. Повна заміна субстрату відбувається через 10-20 діб.



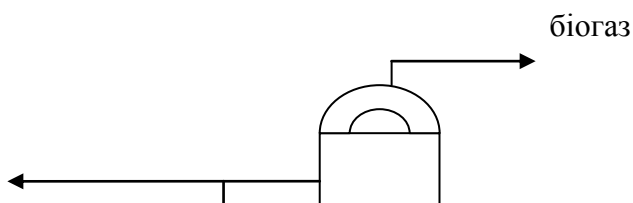
#### 2) контактний біореактор.

Цей апарат має механічну мішалку, яка здійснює повне перемішування в об'ємі реактора, є її відстійник (сепаратор біомаси), біомаса частково повертається до біореактора. Повна заміна субстрату відбувається через 5-15 діб.



#### 3) біореактор «киплячого шару».

Являє собою циліндр. Стоки подаються знизу зі швидкістю, яка забезпечує утворення киплячого шару носія (піску, поліпенопласту) з біомасою.



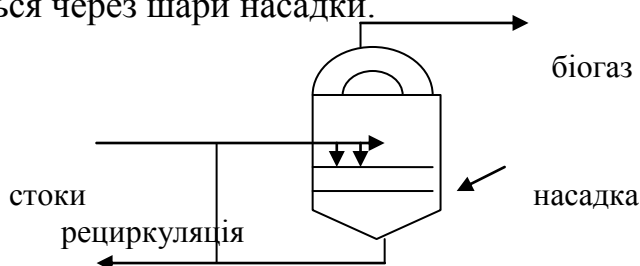


Очищенні  
стоки

стоки

#### 4) анаеробний фільтр.

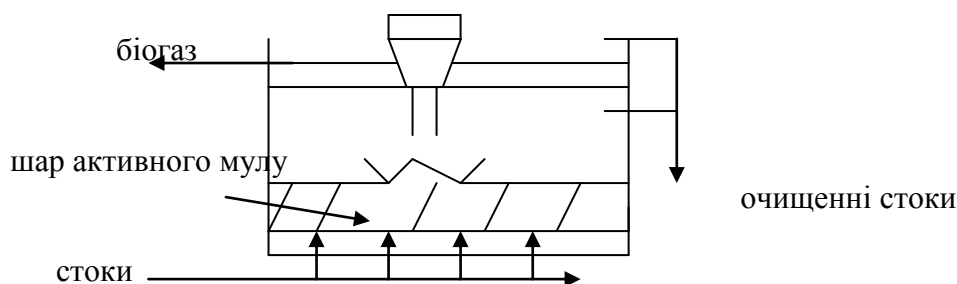
Являє собою вертикальний циліндр з насадкою твердого пористого носія, до якого прикріплюється анаеробна мікрофлора. Стоки подаються знизу і зверху і подаються через шари насадки.



очищенні стоки

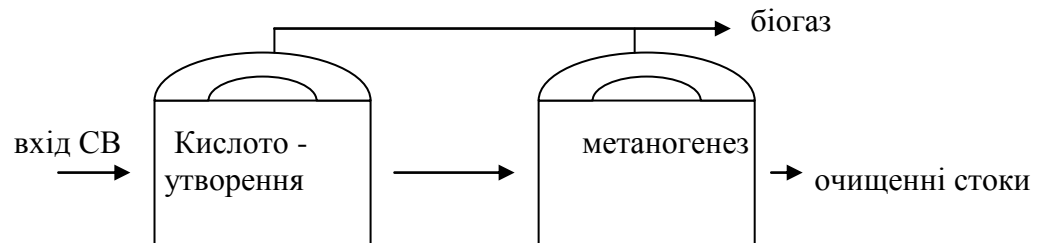
#### 5) біореактор з шаром біомаси (активного мулу).

Стічні води рівномірно розподіляються по площині нижньої частини реактора і направляються вгору зі швидкістю, яка забезпечує утворення гранул біомаси крихкого шару, у верхній частині є пристрій для розподілу твердої, рідкої і газоподібної фракції. Сточные воды равномерно распределяются по площади нижней части реактора и направляются вверх со скоростью, обеспечивающей образование гранул биомассы рыхлого слоя, в верхней части имеется устройство для распределения твердой, жидкой и газообразной фракции.



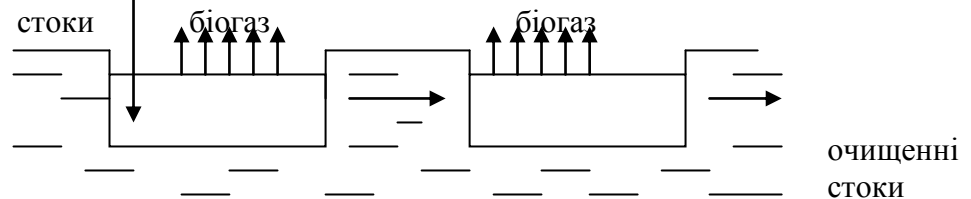
6) двоступеневий біореактор.

Ферментаційний простір поділено на дві частини: у першій реалізується процес біодеградації субстрату і кислого утворення, а в другому біогенез.

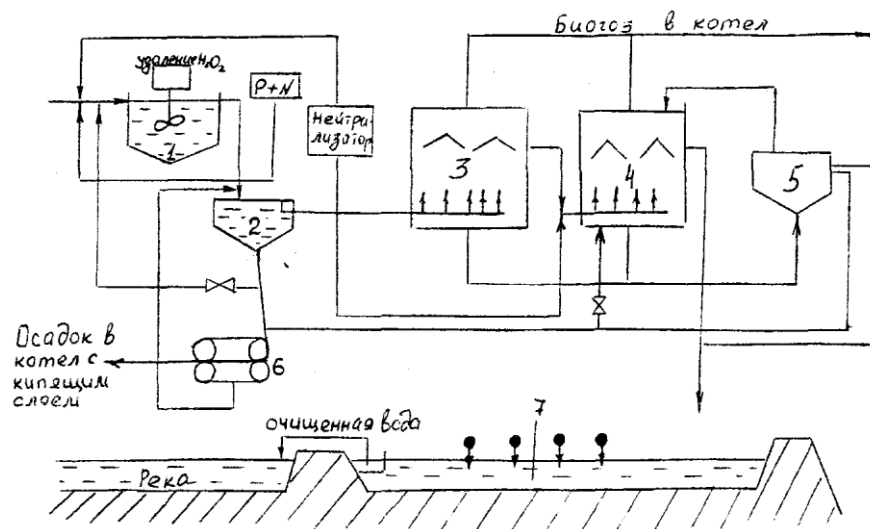


7) анаеробні лагуни.

Система відстійників, в яких стоки знаходяться від декількох тижнів до 2 місяців, гази вільно виділяються в атмосферу.



Анаеробний двоступеневий процес “Таман” з наступною доочисткою паперового заводу.



1 – ємкість для розбавлення стоків; 2 – первинний відстойник - пастка; 3 - метантенк для кислотного бродіння (І ступінь); 4 - метантенк для метаногенезу (ІІ ступінь); 5 – вторинний відстойник; 6 - стрічковий фільтр-прес; 7 - аеріований став.

Фінською фірмою "Тампелла" запропонована раціональна система очистки стоків харчових і паперових заводів. Біореактор "Таман" сконструйований з урахуванням можливості реалізації двостадійного процесу (кисла і метаногенна стадії), причому на метаногенній стадії застосовується гранулоподібний шлам. Інтенсифікація метаноутворення забезпечується в результаті виносу із зони метаногенезу свіжого субстрату з важливими інгібіторами, а також наявності в другій зоні великої маси метаноутворюючих бактерій. Обидві зони можуть бути розміщені в одному вертикальному циліндрі, який розділений горизонтальною перегородкою на верхню зону об'ємом 300 м<sup>3</sup> і нижню - 350 м<sup>3</sup>.

Ця система очистки ефективно працює на заводі, який виробляє в рік 63 млн. л молока, 3000 т сировини, 2000 т масла, 1,2 тис. т паперу.

#### Очистка стічних вод від ПАВ.

У наш час ПАВ широко застосовується при добуванні нафти, в гірприменяються при добувчє нафти, в гірничорудній, текстильній, паперовій, фармацевтичній промисловості. У першу чергу ПАВ входять до складу синтетичних миючих засобів і потрапляють, перш за все, у воду.

ПАВ прийнято ділити на такі групи:

- 1) іогенні – які дисоціюють у воді на іони;
- 2) неіогенні (НПАВ), розчинність яких обумовлена не дисоціацією, а утворенням водневих зв'язків між молекулами води і киснем ПАВ.

Існують і природні ПАВ неіогенного характеру, але вони мало відомі і під ПАВ за звичай розуміють синтетичні ПАВ.

Іонні ПАВ поділяються на: а) аніонні (АПАВ);.

б) катіонні (КПАВ);

в) амфолітні (АМПАВ).

Аніонні ПАВ дисоціюють з утворенням макроіонів, які обумовлюють поверхневу активність сполук и противоіону металу (наприклад, К, №а).

У кПАВ поверхневою активністю володіє макрокатион.

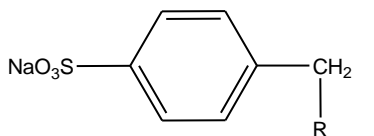
Амфолітні ПАВ ведуть себе в розчинах як амфотерні сполуки. У кислому середовищі, завдяки наявності аміногруп, вони дисоціюють як кПАВ, а у лужному середовищі, за рахунок карбоксильних груп, вони розпадаються на іони аналогічно аПАВ.

Найбільше розповсюдження отримали аніонні ПАВ, а серед них найбільше широко застосовуються адкілсульфати, алкілсульфанати та адкірилсульфанати. До першої групи відносяться також мило.

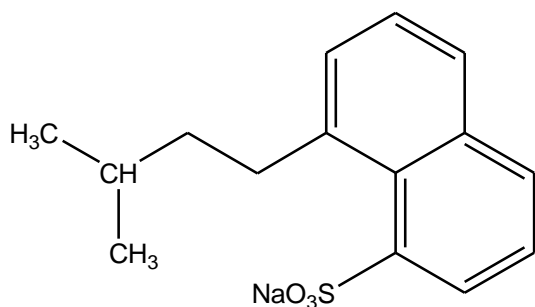
1. Алкілсульфати являють собою соли складних ефірів сірної кислоти і мають таку будову  $R-CH_2OSO_3Me$ , де R - радикал, який найчастіше складається із 10-18 атомів вуглецю. На поверхневу активність ПАВ впливає розгалуженість алкільного ланцюга, його довжини, положення сульфогруп.

2. Алкілсульфонати – загальна формула  $R-CH_2SO_3Me$  - солі сульфокислот, їх використовують як миючий засіб. Група  $SO_3Me$  може приєднуватися до будь-якого атома вуглецю в ланцюгові. Вони володіють менш вираженими миючими властивостями.

3. Алкірилсульфонати – вони найбільш розповсюдженні, особливо алкілбензосульфонати, загальна формула яких



Їх отримують при алкілюванні бензолу з наступним сульфюванням. Крім бензолу дифеніл і нафталін. У техніці широко відома речовина – некаль, що являє собою солі алкілзамінних нафталін-сульфокислот:

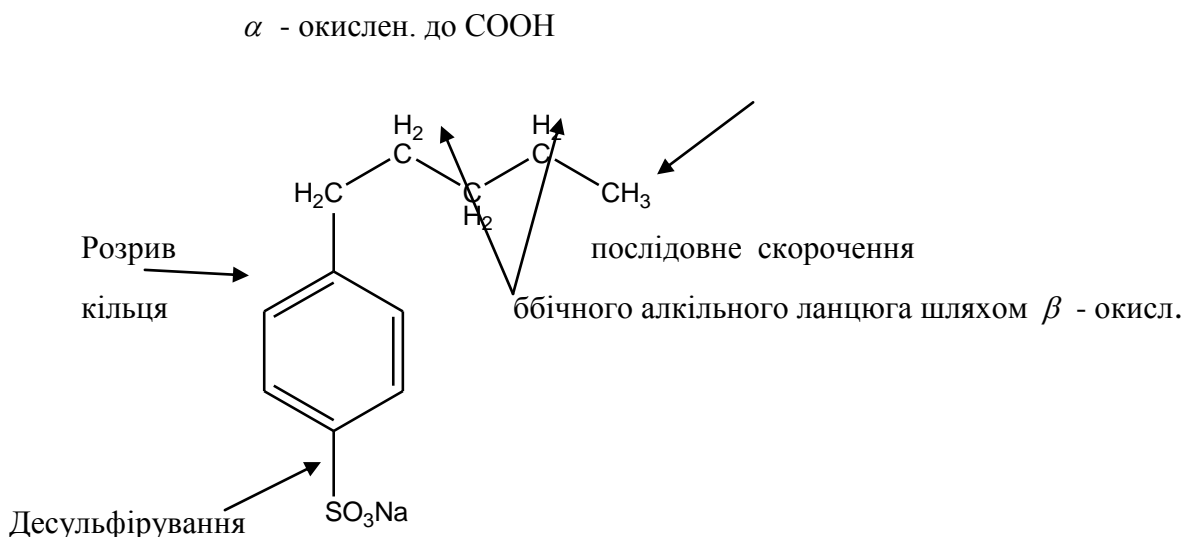


Властивості алкірилсульфанатів залежать від природи ароматичної сполуки, від довжини і ступеня розгалуженості алкільного радикалу.

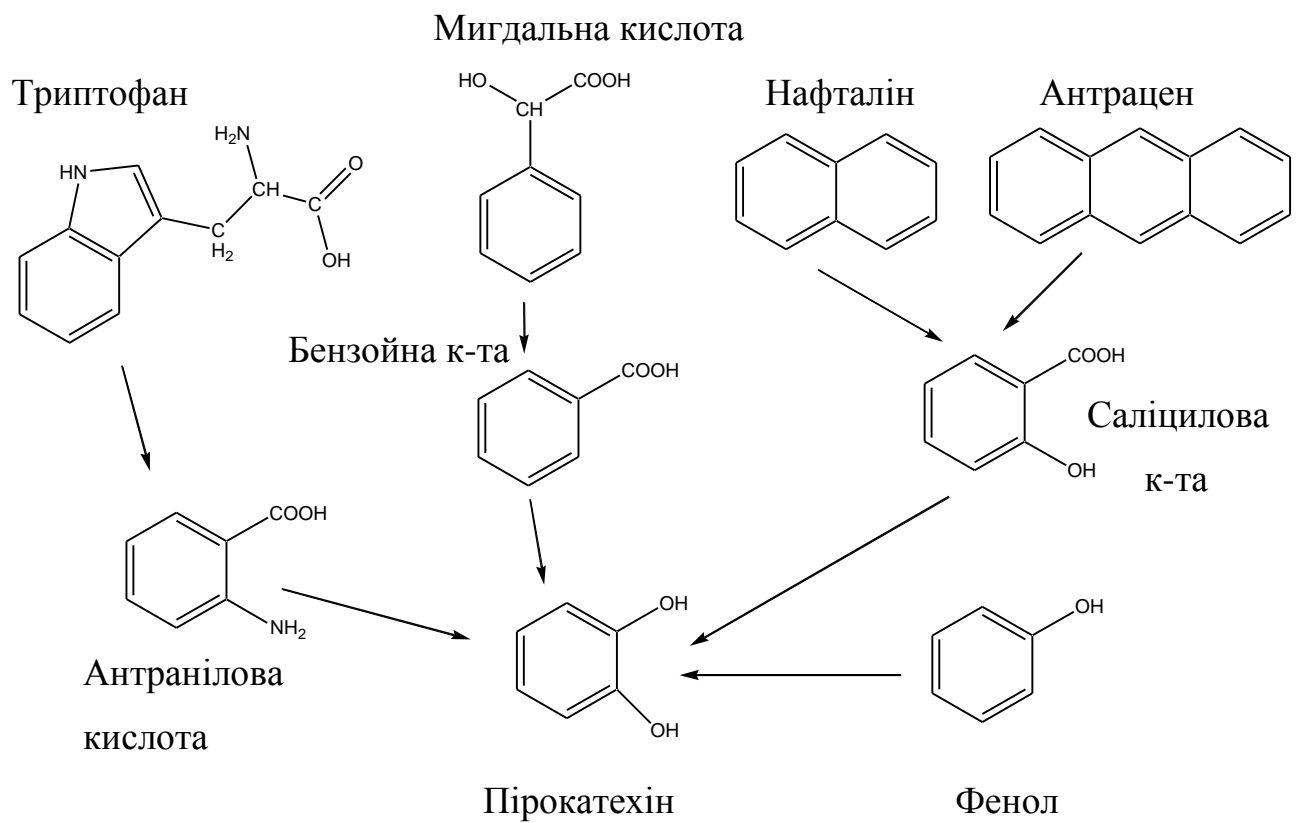
Адсорбція ПАВ на поверхні мікробної клітини вважається першим етапом взаємодії мікроорганізмів з хімічними сполуками. Адсорбція посилюється в присутності двовалентних катионів, які знижують негативний заряд клітини і посилюють адсорбцію.

Найбільш доцільно вивчена мікробна деструкція алкілбензолсульфонатів.

Біорозклад алкілбензолсульфонатів може відбуватися декількома шляхами в аеробних умовах:

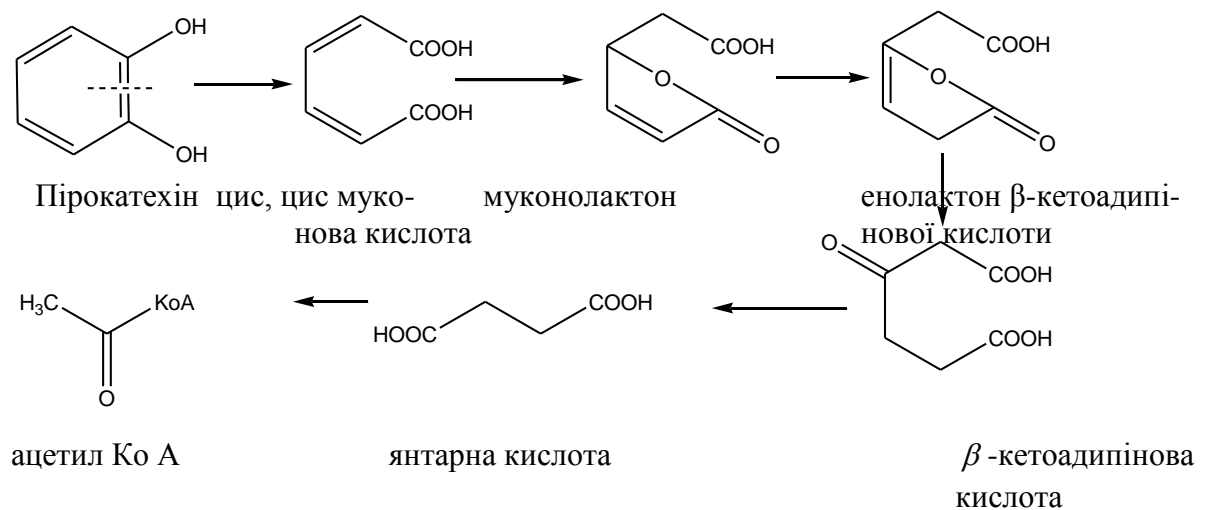


Перевтілення ароматичних ядер мікроорганізмами відбувається через стадію пірокатехіну, які в подальшому трансформуються шляхом розриву ароматичного кільця. Приклади:

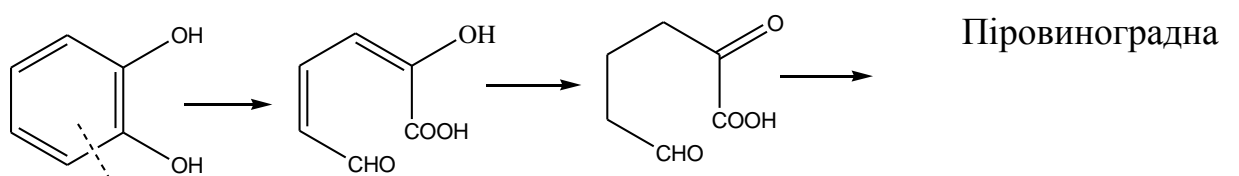


Розрив кільця здійснюється за орто – або мета -шляхом

Орто-розщиплення пірокатехіну ( $\beta$ -кетoadіпіновий шлях)



Мета – розщиплення пірокатехіну



пірокатехін      полуальдегід      кетоформа  
α-оксимуконової  
кислоти

Основна маса мікроорганізмів розщеплює ароматичні ядра за ортошляхом.

ПАВ служать єдиним джерелом вуглецю. Процеси проходять в анаеробних умовах. Швидкість руйнування залежить від концентрації речовини, від інтенсивності аерації, від природи самої речовини.

Культури, які рйунують ПАВи:

*Citrobacter freundii* – рйунує 1,0 г/л додецилсульфонату за 28 годин

*Ps. putida, aeruginosa*

*Ps. stutzeri, Ps. mendosina*

*Achromobacter Eurydice*

При вивченні питань, пов'язаних з очистки стічних вод від ПАВ та інших ксенобіотиків, застосовують такі підходи:

1. Збагачують активний мул спеціально селекціонованими гетеротрофними бактеріями – деструкторами забруднень.
2. Використовують фотосинтезуючі бактерії для очистки води.
3. Вивчають деструкцію речовин, які забруднюють воду, чистими культурами мікроорганізмів та їх комплексами.
4. Здійснюють стимуляцію деструктивної активності мікроорганізмів шляхом ванесення додаткового джерела живлення.
5. Вивчають можливість використання мікробних ферментів для очистки стічних вод.

Деструкція аіонних ПАВ, яка призводить до втрати поверхневої активності, може відбуватися або шляхом відщеплення від молекули речовини гідрофільної групи, або в результаті послідовного окислення алкільного радикалу.

Відщеплення гідрофільної групи у синтетичних акілсульфатів, акілсульфонатів і акіларилсульфонатів здійснюється в результаті впливу ферментів сульфотаз. Алкілсульфотази, які розривають ефірний зв'язок у молекулі алкілсульфатів, відносять до групи алієстераз, що гідролізують різноманітні аліфатичні ефіри і що характеризуються широкою субстратною специфічністю.

Вивчені деякі властивості алкілсульфатаз, вони розщеплюють додецилсульфат з виділенням сульфіту.

Оптимальна температура, яка забезпечує високу активність цього фермента, виявилася дуже високою  $= 70^{\circ}\text{C}$ , а оптимальна  $\text{pH}=7,5$ .

Фосфат, арсенат і солі важких металів  $\text{Pb}, \text{Cu}, \text{Fe}^{3+}$  перевищують ензиматичну активність, а іони  $\text{Mg}$  і  $\text{Mn}$  - декілька стимулюють її.

#### ВИСНОВКИ:

1. ПАВ руйнуються гетерофільними грамонегативними паличкоподібними бактеріями роду *Pseudomonas* при відсутності інших джерел вуглецю в середовищі.
2. В природних субстратах, де поряд з ПАВами завжди є й інші органічні сполуки, може також відбуватися процес кометаболізму, тобто розклад ПАВ пов'язаний з використанням зросту субстратів.
3. У присутності додаткових джерел вуглецю алкілсульфат руйнуються дріжджеподібними грибами, які не використовують ці речовини у відсутності косубстрату.
4. На процес деструкції суттєво впливають температура середовища,  $\text{pH}$ , ступінь аерації.
5. Велика кількість ПАВ руйнується в аеробних умовах.



## Лекція № 6-7

### Тема: БІОТРАНСФОРМАЦІЯ ОРГАНІЧНИХ СПОЛУК.

Біотехнологічна промисловість умовно поділяється на крупнотонажне виробництво і виробництво продуктів тонкого синтезу.

Виробництво етанолу, кормових і Производство этанола, кормовых и хлебопекарських дріжджів, органічних кислот, органічних розчинників, полісахаридів і ферментів відносять до крупно тонажних виробництв. До цієї групи можна приєднати одержання фруктозної патоки за допомогою ферментів.

До тонкого синтезу відноситься, перш за все, виробництво антибіотиків, гормонів, медичних (очищених) ферментів, фармацевтичних препаратів, а також різноманітних біохімічних реактивів.

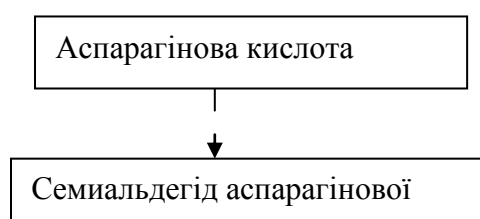
#### КОРМОВИЙ ЛІЗИН.

У СРСР створено виробництво кормового лізину, до складу якого входить бактеріальна біомаса.

Установлено, що лізин в організмі є не тільки структурним елементом білка. Але й виконує ряд найважливіших біохімічних функцій: є попередником каратину та оксилізину, допомагає транспортуванню кальцію і стронцію в клітини і т. п.

Концентрат лізину можна використовувати в рослинництві як стимулятор росту культурних рослин і атрактант ґрунтових шкідників насіння.

Для біосинтезу лізину використовують гомосериндіфіцитні мутанти ауксотрофних бактерій родів *Brevibacterium*, *Micrococcus*, *Corynebacterium* та ін.



## Аспартаткіназа

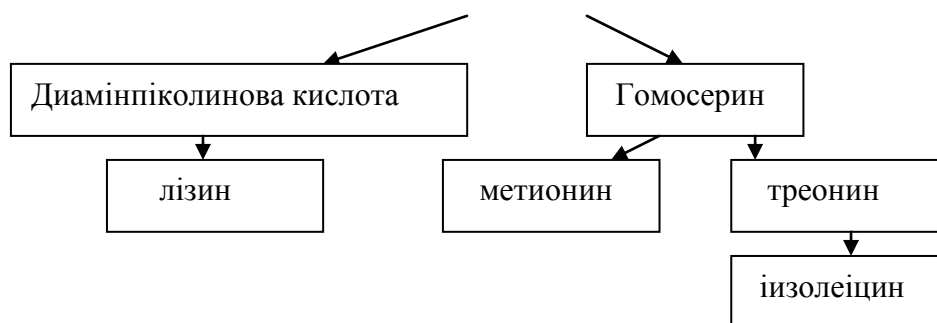


Схема біосинтезу лізину в бактерії через діамінпіколінову кислоту.

У більшості природних штамів вищеперерахованих родів бактерій лізин разом з треоніном інгібує фермент аспартаткіназу, що повільнює утворення лізину. Щоб усунути цей дефект, генетики створили штамми, нездатні синтезувати гомосериндегідрогеназу. Таким чином, усувається накопичення гомосерину, треоніну і метионіну. Якщо до середовища додати в необхідних для росту культури дозах треонін, метионін або гомосерин, то відбувається інтенсивний зверсинтез лізину.

У НАШ ЧАС СЕЛЕКЦІОНОВАНІ ШТАММИ РОДУ *Brevibacterium*, що забезпечують на м'ясному середовищі синтез лізину до 50-70 г/л, на сахарозних середовищах - до 100 г/л при продуктивності системи в напівбезперервному процесі 15-20 г/л на добу.

Середовище для одержання лізину готується із м'яси, кукурудзяного екстракту, солей амонію, одно- і двозаміщеного фосфату калію. Кукурудзяний екстракт іноді замінюють дріжджовим гідралізатом, концентратом клітинного соку картоплі або витяжкою із пшеничних висівок. Після стерилізації таке середовище використовують для вирощування посівного матеріалу і для головної ферментації.

Спочатку культуру розмножують у колбах, а потім казмножують в колбах на качалках, потім у ферментерах об'ємом 100 і 3000 л. кількість посівного матеріалу 5-10% оптимальна температура 30-35°C і рН 7,4. Тривалість ферментації для кожної стадії близько 24 години. Головна ферментація триває

50-70 годин при аналогічних режимах. Концентрація лізину в розчині 20-60 г/л, концентрація клітинної біомаси 15-20 г/л у перерахунку на суху масу.

Високу концентрацію лізину 60-80 г/л можна одержати на м'яясному середовищі, якщо під час ферментації ввести дроблену підкормку частиною живильного середовища при дотриманні точної регуляції культивування. М'яєсу можна замінити сахарозою, соком цукрового буряка, глюкозою або гідролізатом крохмалю, деревини, торфу, а також оцтовою кислотою і підняти концентрацію лізину до 100 г/л (рис. 1).

Для одержання кристалічного лізину клітинну масу центрифугують, а культурну рідину пропускають через катіоніт КУ-2 або КВ-4-Р-2.

Лізін елюють 2,0-3,5% розчином. Елюат упарюють у вакуумі при температурі 60°C до 1/20 - 1/70 частини вихідного об'єму, потім, за допомогою НСІ устанавлюють рН 4,5-5,0, охолоджують до 1,4-18°C і кристалізують.

Після фільтрації і центрифугування кристалів одержують технічний лізін - 94-96% лізину монохлоргідрат.

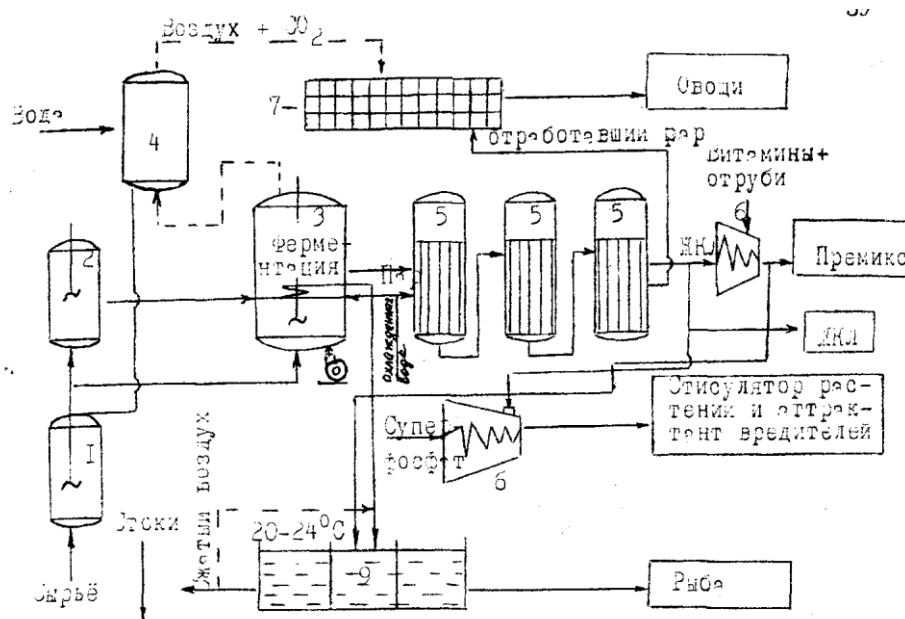


Рис.1. Схема безвідходної технології одержання концентрату лізину.

1. блок приготування живильного середовища
2. інокулятори
3. ферментатори
4. скрубоєр
5. вакуум-випарна установка

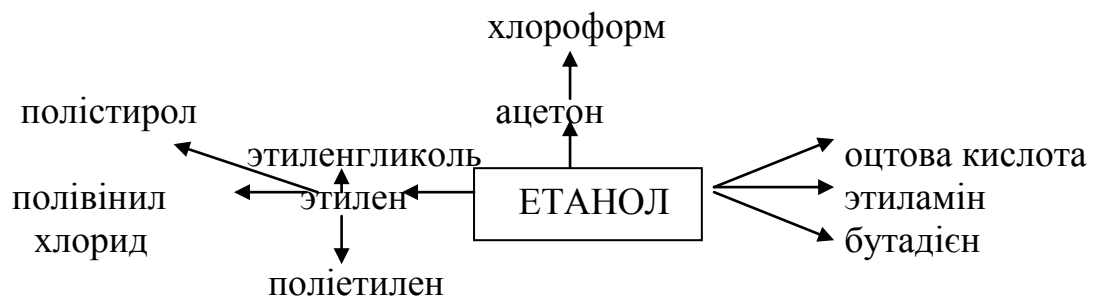
6. блок приготування преміксів
7. теплиця
8. блок приготування аттрактантів
9. басейн для вирощування риби
10. рідкий концентрат лізину.

Для ОДЕРЖАННЯ ЧИСТОГО ЛІЗИНУ КРИСТАЛИ ТЕХНІЧНОГО ЛІЗИНУ ПІДГРІВАЮТЬ у НЕВЕЛИКІЙ КІЛЬКОСТІ ВОДИ ДО  $70^{\circ}\text{C}$ , додають активне вугілля, перемішують і фільтрують. За допомогою НСІ устанавлюють рН 4,9, розчин упарюють і кристалізують. Кристали сушать при  $60^{\circ}\text{C}$ . Одержаний лізин містить 99,9% лііну монохлоргідрату, і 0,1% золи і не більше 0,001% солей важких металів. Для кормових потреб у СРСР одержують концентрат лізину.

### ІНТЕНСИВНІ ТЕХНОЛОГІЇ ОДЕРЖАННЯ ЕТАНОЛУ.

За витратами сировини це найбільше біотехнологічне виробництво в світі. Однак за вартістю продукту займає 3 місце серед крупногонажних.

#### Шляхи використання етанолу.



Із 3,8 сахарів можна одержати 1,7 кг етанолу, а із нього 1 кг етилену.

Як рідке паливо, етанол не може конкурувати з бензином, так як, наприклад, у США, одержаний із зерна етанол у 2-3 рази дорожчий за бензин. Існують національні програми по заміні частини бензину (20%) на етанол, що дозволить зменшити імпорт нафти.

Бразилія ще в 1912 році планувала одержати із цукрової тростини 3,8 млрд. л етанолу, щоб скоротити імпорт нафти на 4 млрд. доларів.

Одержання етанолу – одна із найстаріших біотехнологій. Добре вивчені різноманітні процедури етанолу, біохімія спиртового бродіння. Енергія субстрату в процесі бродіння розподіляється так: 90% переходять в етанол і по 5% в біомасу і тепло. У значенні продуценту в спиртовому виробництві використовують тільки дріжджі, але етанол можуть продуціювати більшість бактерій.

Найпродуктивніші види мікроорганізмів:

1. *Saccharomyces cerevisiac* - оптимальна рН 3-4, температура 30°С вихід (у процентах від максимального) -100%, максимальна концентрація етанолу в середовищі – 130 г/л. У значенні субстрату використовують полісахариди, але не використовують пентози.
2. *Saccharomyces rosei* - оптимальна рН 4, 6, оптимальна температура 35°С, вихід (у процентах від максимального) -88%, максимальна концентрація етанолу в середовищі – 42, 5 г/л. У значенні субстрату використовують полісахариди, можуть використовувати топінамбур.
3. *Kluuyveromyces marxianus* - оптимальна рН 4,4, оптимальна температура 35°С, вихід 88%, максимальна концентрація етанолу в середовищі – 44 г/л. Субстрати тіж.
4. *Zymomonas mobilis* - оптимальна рН 5,5, оптимальна температура 30°С, вихід 95%, максимальна концентрація етанолу в середовищі – 130 г/л. Це аеротолерантні бактерії, вони інтенсивно вивчаються, але використовуються лише тільки в Канаді.
5. *Clostridium thermocellum* - оптимальна рН 7,0, оптимальна температура 32°С, вихід 50%, максимальна концентрація етанолу в середовищі – 1,5 г/л.

Продуктивність сільськогосподарської сировини:

- цукрова тростина	76 л/т	4000 л/га
- кукурудза	388	12000
- картопля	110	6000
- тростинна меляса	190	9000

Існує багато технологічних варіатів реалізації процесу спиртового бродіння. Розглянемо схему двопоточного способу зброджування меляси (рис.2). Ця схема, передбачає приготування оремих середовищ для одержання дріжджів (сухої речовини в них 8-12%) і для зброджування (32-36% сухої речовини). У дріжджегенераторних застосовують аерацію. Об'єм повітря, що подіється 3-4 м<sup>3</sup> на годину. Це слабка аерація. Температура в дріжджегенераторах підтримується на рівні 28-30°C, а рН 4,2 – 4,5. Концентрація етанолу в дріжджегенераторах досягає 2,8-3,5%, дріжджів 2,5-6,5% сухої речовини.

Вирощені дріжджі із дріжджегенератора за верхніми лініями відбору направляють у головний бродильний апарат, куди одночасно надходить середовище з концентрацією сухої речовини 32-36%. Після заповнення головного апарата культуральна рідина послідовно проходить бродильні апарати і із останнього потрапляє на перегонку. Температура бродіння 29-31°C. Концентрація сухої речовини в першому бродильному апараті 7,5-8,5%, у другому – 8-9%, у третьому – 9-9,5% и в останньому 5-6,5%. Система працює без оновлення дріжджів 7-10 діб.

Перед перегонкою із бражки виділяють хлібопекарські кормові дріжджі. Великий інтерес являють собою аеротолерантні бактерії *Zymomonas mobilis* як продуценти етанолу. Вони, на відміну від дріжджів, характеризуються низькою чутливістю до етанолу. Крім того, гранична швидкість вживання глюкози і утворення етанолу в 2-3 рази вища. Ця бактерія здатна утилізувати глюкозу, сахарозу. Недостаток – повільне зростання біомас, що знижує продуктивність системи. Великі успіхи при культивуванні *Z. mobilis* були досягнуті з одержання етанолу в Канаді, де в результаті селекції одержані штамми, що дають 200 г/л. При одержанні етанолу хімічним шляхом із етилену продуктивність складає 80 г/(л.ч.).

Ідея японця Яомото – замкнута безвідходна система одержання етанолу із картоплі. Він довів, що одержаний із мікроміцетів роду *Rhizopus* ферментний препарат, володіє амілазною і пектиназною активністю, добре переводить

крохмаль картоплі розтертої маси в етанол. Процес відбувається при  $pH = 4,2$  і температурі  $25^{\circ}C$ . Тут не вимагається розварювати картоплю і осахарювати масу.

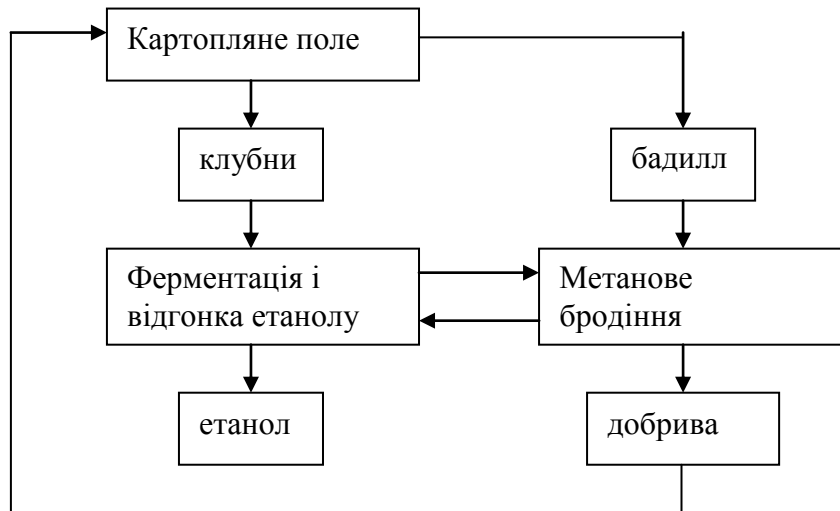
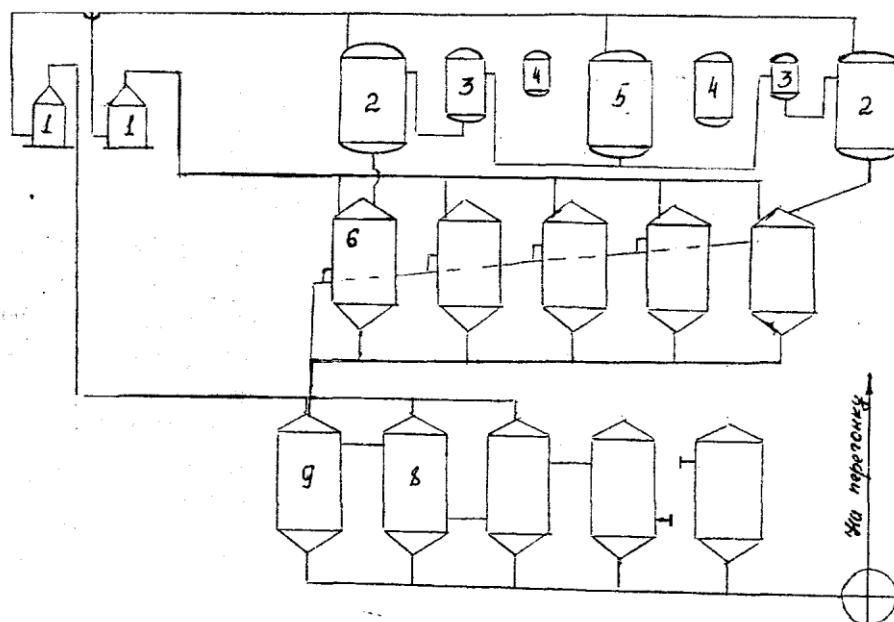


Рис.2. Апаратурно-технологічна схема одержання етанолу із меляси.

1- розсиропники; 2-4- апарати чистої культури; 5- стерилізатор; 6- дріжджегенератор; 7- насос; 8- бродильний апарат; 9- головний бродильний апарат.



### Одержання органічних кислот

Економічно вигідніше одержувати органічні кислоти технічного призначення.

Органічні кислоти використовуються в харчовій, хімічній, фармацевтичній, легкій промисловості, у побуті.

Об'єми виробництва органічних кислот, їх продуценти і сировина для їх виробництва в промислових масштабах мікробіологічним шляхом наведені в таблиці I.

Таблиця I.

Світове промислове виробництво органічних кислот.

(Фінагенова, 1984р.)

Кислота	Річний обсяг виробництва	Сировина	Продуценти	Вихід, в %
Лимонна	300000 т	Меляса, н-алкани		85
Ітаконова		Глюкоза, сахароза		60
Молочна	30000 т	Глюкоза		90
Глюконова	30000 т	Глюкоза		95
Оцтова 10%	10 млн. т			90-95
Проіонова		Глюкоза		80

Мікробіологічні процеси одержання органічних кислот поділяють на дві групи: 1) анаеробні (молочна, пропіонова);

2) аеробні (оцтова, лимонна, ітаконова, глюконова).

Всі органічні кислоти є проміжними або кінцевими продуктами метаболізму. Основним механізмом регуляції їх утворення є лімітація росту продуценту факторами середовища. Наприклад, утворення таких органічних кислот, як глюконова,  $\alpha$  - кетоглутарова допомагає лімітація росту культур за азотом, тобто при надлишку в середовищі джерела вуглецю.

При одержанні лимонної кислоти на вуглеводному середовищі, важливе значення має лімітація росту продуцентів по залізі і фосфору. В мелясі є багато заліза, яке на стадії приготування живильного середовища осаджують за допомогою жовтої кров'яної солі.



Для аеробних процесів, що лімітують ріст фактором може бути ступінь аерації і рН середовища. Аеробні процеси реалізують як глибинним, так і поверхневим способом ферментації, а анаеробні тільки глибинним.

#### Одержання лимонної кислоти.

Розроблений метод одержання лимонної кислоти із н-alkanов за допомогою *Candida lipolytica*. Це процес глибинної ферментації. Вихід лимонної кислоти складає 130-140% від концентрації внесених парафінів. Вихід лимонної кислоти при переробці вуглеводів складає 85%. Однак сьогодні найширше розповсюдження отримала технологія синтезу лимонної кислоти із меляси.

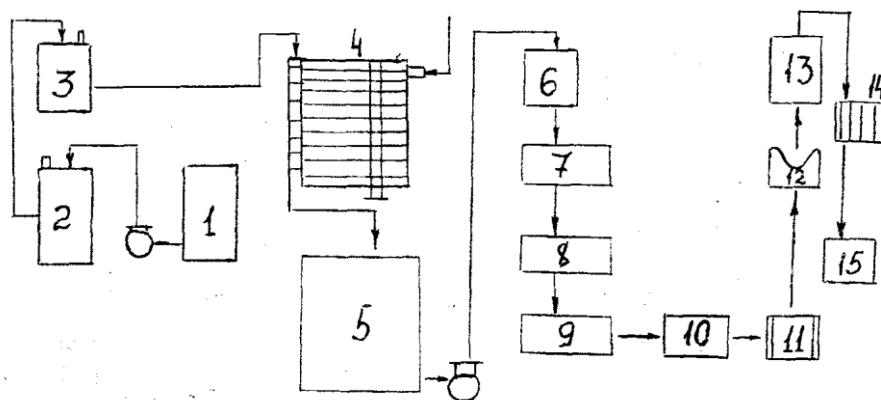


Рис.3. Апаратурно-технологічна схема одержання лимонної кислоти.

1- сховище меляси; 2-ємність для розчинення меляси; 3-стерилізатор; 4- камера для бродіння; 5-збірник збродженої рідини; 6-нейтралізатор; 7-фільтр; 8-вакуум-випарний апарат; 9-збірники; 10-повторювальний розчинник; 11- фільтр-прес; 12-кристалізатор; 13-центрифуга; 14-сушарка; 15-збірник.

#### Технологія виробництва лимонної кислоти із меляси.

В окремому цеху вирощують посівний матеріал у вигляді спор (конідії) *Aspergillus niger*, потім розмножують його в три стадії – у пробірках, колбах і алюмінієвих кюветах. Тривалість кожної стадії 2-4 доби при температурі 32 С.

Для вирощування у пробірках використовують тверду агаризовану сусло-середовище, для вирощування в колбах і кюветах використовують рідку рідину.

Під час культивування на поверхні розчину утворюється щільні плівка міцелію, яка потім покривається кунідіями. На останній стадії вирощування

спілі і підсушені конідії збирають із кювет за допомогою спеціального вакуумного насосу.

Для збільшення строків зберігання конідії змішують з активним вуглем після висушування. Їх можна зберігати в такому вигляді 1-2 роки. З 10 дм<sup>2</sup> площі кювет можна одержати 3-4 г сухих конідій (площа 1-ї кювети складає 8,5 дм<sup>2</sup>). Такий посівний матеріал є комерційним препаратом.

Лимоннокисле бродіння відбувається в камерах при 34-35<sup>0</sup> С. На полицях розміщують металеві кислотійкі кювети висотою 7-10 см, при висоті шару, який живиться 6-12 см. До кожної з них подається свіже живильне середовище і від кожної після збродження відводиться маса. У камері передбачена стерильного кондиціонованого повітря, яке рівномірно розподіляється по всьому об'єму середовища.

При роботі за безобмінним методом цикл бродіння закінчується через 6-8 діб. Максимальне кислотоутворення відбувається на 5-й добі.

100г (м<sup>2</sup> ч)

5 9

Продуктивність бродильних камер можна збільшити, подаючи до міцелію, свіже живильне середовище. Це можна здійснити двома методами: 1-цей метод називають обмінним. Він полягає в тому, що після видалення із кювет збродженого розчину і промивання міцелію стерильною водою під плівку заливають свіже стерильне середовище і продовжують збродження.

2-метод доливок. Цей метод полягає в тому, що через 3-4 доби культивування, коли початкова концентрація сахарів 7-10% зменшується до 3-4% і висота живильного середовища знижується в результаті, під плівку міцелію додають, свіже живильне середовище до первісного рівня. Таким чином, у ході одного циклу вдається переробити на 30-40% більше живильного середовища.

У кінці бродіння культуральну рідину зливають, міцелії прмивають і після висушування використовують на потреби тваринництва або для одержання ферментного препарату – пектинази. У 1 літрі культуральної рідини міститься

приблизно 40-50 г/л лимонної кислоти, 3 г глюконової кислоти, 1 г щавлевої кислоти і 7 г незбродженого сахару.

Лимонна кислота складає 90% від загальної маси. Її виділяють із розчину хімічним шляхом.

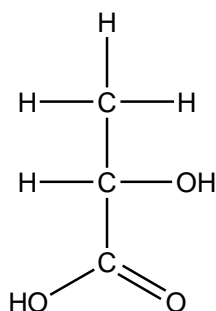
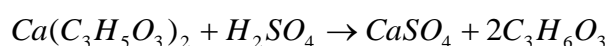
#### Одержання молочної кислоти.

Прикладом анаеробної ферментації оргвнічних кислот є одержання момлочної кислоти за класичною схемою на *Lactobacillus delbrueckii* або *L. bulgaricus*.

У значенні основної сировини одержання молочної кислоти використовують мелясу, сахарозу, гідролізат крохмалю (для *L. bulgaricus* використовують молочну сироватку). Концентрація сахару в середовищі 5-20%, температура 44-50°C, рН 6,3-6,5. під час ферментації рН середовища підтримують, додаючи крейду. На молочно-кисле бродіння позитивний вплив виявляє дія біологічно активних речовин. З цією метою до середовища додають кукурудзяний або дріжджевий екстракт, витяжку із солодових паростків, а також вітаміни; через 6-7 діб ферментації в середовищі залишається 0,5-0,1% сахара і 11-14% лактату кальцію. Із 100 грам сахару виходить 80-90 грам лактату. Фільтрат упарюють до 27-30%, потім охолоджують до 25-30°C і затримують у кристалізаторах 36-38 годин. Кристали лактату відокремлюють центрифугуванням.

Останнім часом розроблені методи безперервної кристалізації лактату. Молочну кислоту із лактату одержують за допомогою сірчаної кислоти.

Реакція відбувається при 60-70°C за рівнянням



Для відокремлення іонів заліза молочну кислоту (сирець) при 65°C обробляють жовтою кров'яною сіллю. Важкі метали осаджують сульфатом натрію. Адсорбцію красильних речовин проводять активним вугіллям, потім масу концентрують до 50-80% у вакуум – випарювальних апаратах при тискові 900 кПа.

## Молочна кислота

Далі фільтрують, додатково обробляють активним вугіллям і фасують.

Сучасним є метод одержання молочної кислоти за допомогою *treptococcus thermophilus* у біореакторі, що працює за принципом "киплячого" шару.

У біореакторі через цей шар переміщують шарики активного вугілля. У нижній частині вугілля сорбірує субстрат, а у верхній частині сорбує молочну кислоту. Таким чином зменшується інгібіруючий ефект як субстрату, так і продукту і відходить проблема регуляції рН. Середовище готували із глюкози, дріжджевого екстракту, ацетату натрію, двозаміщеного цитрату амонію, двозаміщеного фосфатк калію, сульфатів магнію і марганцю. Досягнута продуктивність 12 г/л ч молочної кислоти.

## Лекція 8

### ОСОЛИВОСТІ КУЛЬТИВУВАННЯ РОСЛИННИХ І ТВАРИННИХ КЛІТИН.

#### Культивування рослинних клітин.

1. Труднощі: у природних умовах клітини тварин і рослин знаходяться в тканинах і органах і захищені від впливу зовнішнього середовища. Клітини потребують у багатьох компонентів мінеральної і органічної природи для метаболізму і росту, тому всі експерименти з культивуванням *in vitro* закінчувалися невдало.

Спочатку до мінекральних середовищ додавали екстракти рослин або сыворотку, і лише в 1922 році Роббінсу вдалося на синтетичному середовищі здійснити ріст меристеми кінчиків коренів томатів і кукурудзи.

Для вирощування клітин горобейника необхідно 23 кмпоненти.

Для культивування рослинних клітин важливе значення мають солі N, K, Mg, P і мікроелементів: Mo, B, Zn. Із органічних речовин, крім вуглеводів, важливі окремі амінокислоти, вітаміни, фітогормони (індолілооцтова кислота і кінетин). У клітинах тварин інша потреба у живильних речовинах.

У наш час клітини культивують у вигляді каллусу. Каллусні клітини одержують із фрагментів тканин різних органів вищих рослин, вміщуючи шматок цієї тканини у живильне середовище (у колбах, пробірках, чашках Петрі). У природних умовах каллусна тканина виникає у травмовану місці для анатомічної регенерації органу, що постраждав. Від інфекції каллусну тканину захищають імунні механізми організму. У штучних умовах необхідно суворо дотримуватися стерильності. Як завжди ексиланти обробляються дезинфікуючим розчином, а потім відмивають стерильною водою. Середовище, посуд і апаратуру стерилізують у автоклаві, УФ і  $\gamma$ -променями.

Щоб забезпечити розвиток калусних клітин у середовищах, що містять необхідні для росту речовини, клітини тканин записуючої паренхіми, кори і стебла, мезофілу листа та інших тканин повинні втрачати здатність диференціюватися. Недиференційованному розвитку клітин допомагає передінкубаційний період експлантів на середовищі без гормонів протягом 3-6 діб. Через 4-6 тижнів культивування трансплантату виникає первинний калус, який переносять на свіже живильне середовище. Шматочок калусу масою 60-100 мг переносять на 30-40 мл свіжого середовища. Калусна тканина, яка виросла на твердому живильному середовищі, має аморфну структуру, що являє собою масу тонкостінних паренхімних клітин. При довготривалому пересаджуванні калусні клітини, що мають початкове біле, жовте і червоне забарвлення, структура тканини стає більш пухко. Хімічний склад калусної тканини звичайно відрізняється від складу існуючої рослини.

Калусні клітини після ряду ділень переходять на звичайний для даної рослини цикл розвитку і розпочинається їх диференціювання. Цей процес регулюють гормони.

Клітини рослин можна культивувати і глибинним методом у штучному середовищі. Для цього необхідно одержати лінію клітин, що утворюють невеликі агрегати (по 5-10 клітин). Для глибинного культивування більш придатними пухкі калусні тканини. Трансплантат бажано обробляти пектиназою. Рекомендується використовувати середовища, що містять 2,4-дихлорфеноксиоцтову кислоту і ті, які не містять іонів  $\text{Ca}^{2+}$ . У таких середовищах агрегати клітин не утворюються. Перед пересівом первинну культуру фільтрують через два шари марлі або через сита (нейлонові, металічні), щоб визначити великі агрегати калусної тканини і залишки трансплантату. На утворення клітинних агрегатів виявляє також вплив інтенсивність перемішування середовища, тобто ступінь турбулізації.

Глибинне культивування можна здійснювати в колбах на качалках при частоті обертання 100-120 об/хв. На 60-100 мл середовища беруть 2-3 г свіжої калусної тканини.

Недолік: процес подвоєння рослинних клітин - 2-3 тижня, а у мікроорганізмів – 2-3- доби. Це підвищує вимоги до забезпечення асептичних умов.

У наш час методами культивування рослинних клітин одержують речовини вторинного метаболізму:

- Винбластин – лікування лейкемії;
- Дитітин – лікування серцево-судинної системи;
- Хітин – лікування малярії;
- Жасмин – в парфюмерії.

У наш час розвивається виробництво різноманітних речовин медичного, косметичного і харчового призначення, що одержують культивуванням рослинних клітин. Перспективним є застосування двостадійного процесу ферментації, коли на першій стадії забезпечується інтенсивний ріст культури, а на другій – біосинтез метаболіту. Клітини іммобілізують на крохмальних, агаризованих і поліакриламідних гелях. Процес одержання цільового продукту можна здійснювати у біореакторах, що працюють за принципом “киплячого шару”. Інтенсивний процес біосинтезу відбувається до 150 діб.

Недивлячись на значний успіх лабораторних досліджень, можна назвати лише окремі приклади економічно виправданих процесів промислового виробництва продуктів за допомогою рослинних клітин. Один із них – одержання тонізуючого препарату з використанням женьшеня, який здійснений у СРСР.

Антибактеріальна і протизапальна дія виявляє шиконін – виробництво нафтохінону. 1-2% шиконіну міститься у коріннях *Lithospermum erythrorhizon*. Ця рослина розвивається повільно 5-7 років. Ціна 1 кг шиконіну, що одержують із коріння рослин, складає 4500 доларів. У наш час в Японії шиконін одержують культивуванням клітин *Lithospermum erythrorhizon* у

промислових умовах. Селекційована лінія клітин, що накопичує шиконін до 15% на суху масу. Ферментація відбувається у дві стадії. Спочатку вирощують клітинну біомасу, потім створюють умови для утворення вторинних продуктів, які накопичуються у вакуолях. У біореакторі, об'ємом 200 л, який укомплектований екстрактом, із біомаси за один цикл ферментації одержують 5 кг шиконіну. Шиконін виділяють із біомаси збільшенням проникливості клітин шляхом додавання диметилсульфоксиду.

Рослинні тканини можна використовувати для біотрансформації сполук. Так стимулятор серця дитоксин можна одержати із дититоксину шляхом 1,2- $\beta$  – гідроксилювання за допомогою клітин наперстянки *Digitalis lanata*, у вигляді суспензії або іммобілізованням на носіях.

Перерахуємо ряд сполук, що продукують рослинними клітинами: антропін - *Atropa belladonna*; нікотин – *Nicotina tabacum*; пальмітин, кофеїн – *Coffea arabica*, барберин.

### Культивування клітин тварин.

Культивування тканин тварин широко застосовується у вірусологічних дослідженнях і при виробництві вірусних вакцин. Розглянемо у значенні прикладу одержані вакцини СОЛКА із тканин культури нирок мавп. Тканина кіркового шару свіжих нирок здрибнюють і суспензують при рН середовища 7,6, щоб ферментативно гідролізувати тканини і розподілити клітини. Суспензію центрифугують і клітини суспензують у тому ж середовищі з додаванням плазми телячої крові або гідролізату лактальбуміну. Суспензію клітин інкубують 5 діб в особливих посудинах, де за цей час на їх стінках утворюється одношарова плівка клітин.

Коли клітини виростуть, рідку фракцію зливають, клітини промивають ізотонічним розчином кухонної солі, додають свіже середовище і засівають його відповідним вірулентним вірусом поліомієліту. Після 3-добового інкубування вірусу клітини повністю руйнуються і віруси переходять у



розчин. Залишки клітин видаляють центрифугуванням і розчин, що залишився використовують для вакцинізації. Для збереження вакцину заморожують. При (положи?) натуральних клітин тварин одержують також  $\beta$ -інтерферон і урокіназу (розчинники крові).

Істотною перевагою клітин тварин у порівнянні з бактеріями є те, що протеїн екскретирується із клітин, які полегшують його виділення і очищення. Клітини тварин здійснюють посттрансляційну модифікацію, наприклад, глікозильованні протеїни мають більш вираженні імуногенні властивості. Крім того, глікозильованні продукти в організмі більш стабільні.

Однак клітини тварин поступаються прокаріотам за продуктивністю і концентрацією в середовищі, яка досягається.

## Генетична інженерія.

Завданням генетичної інженерії є виділення окремих генів, їх молекулярне клонування і створення рекомбінантної ДНК – штучної комбінації із генів і різноманітних промоторів.

Перший етап цієї роботи – виділення і клонування генів. Інструментами у цій роботі можуть бути особливі ферменти, які одержують із найрізноманітніших джерел – бактерій, клітин ссавців і птахів, яких вирощують у культурі заражених різноманітними вірусами і т.п. В основному використовують три види ферментів: рестриктази, лігази і зворотню транскриптазу.

Рестриктази – це різновид дезоксирибонуклеаз, ферментів, що розрізують ДНК на короткі або довгі відрізки або навіть на окремі нуклеотиди. Особливість рестриктаз складається з того, що вони розрізують ДНК не у будь-якому місці, а тільки між певними нуклеотидами на ділянці з суворо характерною для кожної рестриктази послідовністю нуклеотидів. Найчастіше це 4-6 пар нуклеотидів у місці розрізу. Наприклад, рестриктаза *EcoRI* розщеплює ДНК на ділянці ГААТТЦ, а рестриктаза *BamHI* на ділянці ГГАТЦЦ. Тепер відомо більше сотні різноманітних послідовностей, які “можна впізнати” різноманітними рестриктазами. При випадковому розподілі нуклеотидів уздовж ДНК імовірність наявності послідовності із чотирьох певних нуклеотидів складає  $1/256$ , а із шести –  $1/4096$ . Тому рестриктази розрізають ДНК, на шматки, що складаються із декількох сотень або тисяч пар нуклеотидів.

Лігаза – фермент, що зшиває вільні кінці ДНК між собою. Цей фермент у нормальних клітинах бере участь у синтезі ДНК і у процесах її репарації, тобто у відновленні нормальної структури ДНК після її часткового ушкодження.

Зворотня транскриптаза – фермент, аналогічний РНК-полімеразі, але який синтезує ДНК не на ДНК. А на РНК. Цей фермент у порівнянні

з РНК-полімеразою працює мовби у зворотньому напрямку, тобто не від ДНК до РНК, а від РНК до ДНК. Чи є зворотня транскриптаза у нормальних клітинах і чи відбувається у них синтез ДНК на РНК – питання суперечливе і поки що до кінця не вирішене. Але цей фермент з'являється у клітинах еукаріот при зараженні їх вірусами, що містять РНК і розмножуються через ДНК. Геном цих вірусів кодує зворотню транскриптізу, за допомогою якої утворюється вірусна ДНК-матриця, на якій потім відбувається синтез багатьох молекул вірусних РНК.

Перший етап клонування будь-якого гену – одержання “бібліотеки” генів і відшукування в її складі потрібного гену, наприклад, гену людини, яка кодує один із глобінів – білків, що утворюють в еритроцитах гемоглобін. Одержання “бібліотеки” генів починається з розрізування ДНК, що вивчають /у нашому прикладі ДНК людини / на багато фрагментів. Число таких ферментів залежить від вибраної рестриктази. Для того, щоб одержати фрагменти, що містять окремі гени, потрібно розрізати ДНК на декілька десятків або навіть сотень тисяч фрагментів. Щоб відділити гени один від одного використовують плазмиди, у складі яких фрагменти ДНК вводяться в інші клітини, звичайно бактеріальні. Таку плазмиду-переносія називають вектором.

У значенні вектора як завжди вибирають плазмиду, в якій міститься ген стійкості до антибіотиків, наприклад, ампіциліну, до якого дуже чутлива кишечна паличка. Таку плазмиду розрізають за допомогою рестриктази в одному певному місці, змішують із сумішшю фрагментів ДНК людини і додають лігазу, яка знову зшиває розрізані кінці. У багатьох випадках лігаза просто замикає плазмиду знову в кільце, але достатньо часто вона зшиває вільні кінці фрагментів ДНК з вільними кінцями ДІ плазмиди. У результаті виникає велика кількість кільцевих плазмід, у які вбудовані різноманітні фрагменти ДНК людини.

Десь серед них виявиться і потрібний нам ген одного із глобінів.

Потім цими плазмідами “заражають” кишечну паличку або інший вид клітин. Клітини висипають на живильне середовище, так, щоб кожна бактеріальна клітина лежала окремо від інших і могла створювати особисту колонію. Такі колонії не утворюють бактерій, в яких не виявлено плазмід, так як у середовище додають той же антибіотик (ампіцилін), від якого плазмід захищає. Але в деяких бактеріях будуть ті плазмід, в які ніякий фрагмент ДМ не ввійшов. Такі колонії теж вдається виключити, так як включення чужих генів зменшує стійкість до іншого антибіотику /тетрацикліну/, і надалі вирощують тільки ці чутливі колонії.

## Лекція № 9

### ВИРОБНИЦТВО ОЦТОВОЇ, ІТАКАНОВОЇ, ЯБЛУЧНОЇ, ГЛУТАМАНОВОЇ КСИЛОТ.

Харчові кислоти: лимонна, молочна, оцтова, винна, іноді яблучна і глютамінова.

Оцет у вигляді перекишеного вина був відомий за 7 тис. Років до нашої ери, але тільки у 1986 році Л.Пастер установив фізіологічну природу оцтовокислого бродіння, який можна викликати за допомогою оцетнокислих бактерій.

Щоб оцтовокисле бродіння проходило нормально, потрібно щоб сахар був перетворений в етанол, тому:

1. оцтовокислому бродінню передуює спиртове, але не тими штамми, що використовуються у виробництві етанолу.
2. у виробництві оцту спиртове бродіння краще за все здійснюють селекціоновані штами винних дріжджів (*Saccharomyces ellipsoideus*), які крім етанолу синтезують побічні продукти метаболізму, що поліпшують смак і аромат оцту.

Оцет, одержаний мікробіологічним шляхом (харчова оцтова кислота, столовий оцет), як і вино, розрізняють за сортами в залежності від зброджуваного субстрату. Відомий яблучний, виноградний, грушевий та інші сорти оцту. Оцет, одержаний при бродінні, має приємний аромат і смак, які обумовлені побічними продуктами бродіння: складними ефірами (етилацетат та ін.), вищими спиртами, органічними кислотами.

Оцтова кислота була першим мікробіологічним продуктом, одержаним за допомогою іммобілізованих клітин. Протягом довгого часу застосовується адсорбування оцтовокислих бактерій на деревній стружці, деревному вугіллі, коксі та інших субстратах.

Пропускаючи розчин етанолу через генератори з імобілізованими бактеріями, одержують 10-15% розчин оцтової кислоти. Із 100 літрів безводного етанолу теоретично повинно бути одержано 103 літра оцтової кислоти. На практиці із 100 літрів етанолу вихід оцту рідко перевищує 90 літрів, що пов'язано з переокисленням і неповним окисленням етанолу оцтовокислими бакетріями, а також із його випаровуванням. Щорічно у світі виробляють 100 тис. т оцтової кислоти (половину одержують хімічним шляхом, у вигляді технічної оцтової кислоти).

Оцтову кислоту широко використовують у харчовій промисловості. Технічну оцтову кислоту використовують для виробництва ацетону ацителену, синтетичних барвників, медичних препаратів (аспірин, антипірин, фенацетин), ароматизованих речовин (кумарін, валілін), а також як субстрат для мікробіологічної біотрансформації.

Ферментацію сахарозних середовищ реалізують за допомогою двох стадій. На першій стадії за допомогою дріжджевої інвертазу одержують інвертазний сахар, на другій, за допомогою *Acetobacter xylinum* – оцтову кислоту, друга стадія триває 60 годин, за цей час вуглеводи (їх міститься 6%) зброджуються, рН зменшується до 2, на поверхні рідкої фази утворюється продукт - біофільм.

Установлено, що продуцент оцтової кислоти із роду *Acetobacter*, розвиваючись на поверхні середовища, утворює слизову плівку, яка складається із целюлози (на 90%) і клітин бактерій. Якщо цю плівку зняти, висушити і відповідно обробити, можна одержати досить міцні біофільми медичного призначення. Якщо опікові рани покрити таким біофільмом, вони загоюються протягом 7-8 діб.

Глутамат натрію широко застосовують як смакову речовину в харчовій промисловості і кулінарії. Із амінокислот – глутамінова виробляється в найбільшій кількості. Продуцентами її є штами із родів *Micrococcus*, *Microbacterium*, *Corynebacterium*, *Brevibacterium*. В основі біосинтезу її лежить два біохімічних принципи:

1. нестача ферменту  $\alpha$  - кето-глутаратдегідрогенази;

## 2. блокування біосинтезу біотину.

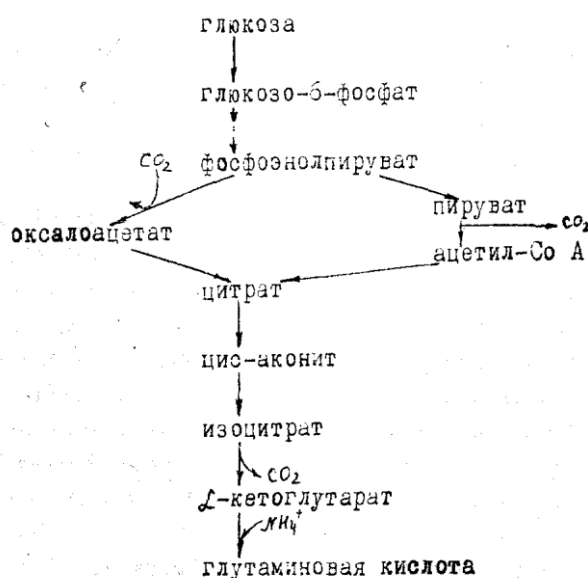
Нездатність клітин синтезувати біотин призводить до збільшення проникнення цитоплазматичної мембрани, що підвищує секрецію глутамату. Він утворюється в результаті амініювання  $\alpha$ -кето-глутарату, нездатного до перетворення у циклі трикарбонових кислот.

Рис.1.

При біосинтезі глутамінової кислоти дуже велике значення має концентрацію біотину в середовищі. Його концентрації повинна бути 1-5 мкг/л. У цьому випадку порушується нормальний синтез фосфоліпідів мембрани й остання стає проникною для глутамату. При концентрації 15 мкг/л спостерігається інтенсивний зростання біомаси. Проникнення може зменшитися також за рахунок пеніциліну, при додаванні його в середовище під час логарифмічного росту. У цьому випадку фосфоліпіди екстрагуються із мембрани і глутамат може транспортуватися протягом 4-50 годин.

Бактеріальний біосинтез глутамату дозволяє одержати приблизно 50% на вихід продукту із сахару і накопичувати в середовищі до 200 г/л глутамату, відомі методи одержання глутамату на етанольних середовищах (60 г/л) або на ацетаті (98 г/л).

СХЕМА БИОСИНТЕЗА ГЛУТАМАТА



## ВИРОБНИЦТВО ЯБЛУЧНОЇ КИСЛОТИ.

Фумарова кислота:

У харчовій промисловості поряд з молочною, лимонною і глюконовою кислотами використовують також яблучну кислоту. Як відомо, у результаті хімічного синтезу утворюється рацемічна суміш DL-яблучної кислоти. L-ізомер яблучної кислоти почали одержувати із фумарової кислоти за допомогою іммобілізованої фумарази. Цей фермент каталізує приєднання до фумарової кислоти по подвійному зв'язку молекули води з утворенням L-яблучної кислоти. Для цих цілей потрібно не ізольований фермент, а клітини, що містять фумаразу.

Фірма “Танабе Сейяку” (Японія) у ролі носія клітин використовує гель каррагінану – полісахариду морських водоростей. Гранули іммобілізованих клітин загружають у колонку, через яку пропускають розчин фумарової кислоти, при виході із колонки в розчині знаходиться L- яблучна кислота. Період полуінактивації ферменту 160 діб.

### РОЗЧИННИКИ.

Органічні розчинники – ацетон і бутанол широко використовуються не тільки в хімічній, але й в інших областях народного господарства.

Ацетобутилове бродіння є анаеробним і викликається бактеріями *A.asetobutylicum*. Ацетон і бутилою спирт одержують зброджуючи зернові, мелясно-зернові затори або мелясу. Якщо готують із зерна (кукурудзи), борошно грубого помолу спочатку змішують з водою (3 кг муки + 100 л води). Потім затор варять 2 години під тиском 200 кПа і стерилізують. Охолоджену до 37-42<sup>0</sup> С масу зброджують протягом 2-х діб при рН 5-7. У процесі бродіння в перший період утворюються оцтову і масляну кислоти, водень і CO<sub>2</sub>. Потім масляна кислота відтворюється до бутилового спирту. Ацетон утворюється із продукту конденсації оцтової кислоти – ацетоацетил CoA при декарбоксиліруванні.

У процесі бродіння утворюється суміш, що містить 6 частин етилового спирту, і частина етилового спирту і 3 частини ацетону. Із 3 кг крохмалю



ВИХОДИТЬ 1 КГ ОРГАНІЧНИХ РОЗЧИННИКІВ. У ПЕРІОД БРОДІННЯ В СЕРЕДОВИЩІ НАКОПИЧУЄТЬСЯ РИБОФЛАВІН, ПРИЧОМУ ТИМ БІЛЬШЕ, НІЖ ІНТЕНСИВНІШЕ УТВОРЮЄТЬСЯ АЦЕТОН.

У наш час після відділення розчинників, ацетонобутилов барду концентрують десятиразово у вакуум-випарювальних апаратах і висушують у розпилювальних сушарках. Одержують сухий концентрат, що містить 60-100 мгк/л рибофлавіну, і використовують як кормову добавку.

Зараз розроблений метод біосинтезу органічних розчинників на основі синтетичного газу. Реалізований двоступеневий безперервний процес. Спочатку із  $CO$  утворюють органічні кислоти за допомогою *Butyribacterium methylotropicum*. Потім кислоти і водень газу. Затем кислоти и водород газа перетворюється в бутанол, етанол, ацетон.

На першій стадії процес регулює виміром рН. Він повинен бути в інтервалі 6,5-5,0. При більш низькому рН утворюється більше бутанолу, ніж ацетону.

Одержано мутант, який дає вихід розчинників 22,7% концентрація бутанолу в середовищі 13 г/л.

### ПОЗАКЛІТИННІ ПОЛІСАХАРИДИ.

Ряд мікроорганізмів у процесі життєдіяльності утворюють полісахариди. Бактерії із роду *Leuconostoc* розвиваючись у сахарних розчинах, часом закупорюють трубопроводи, де циркулюють ці розчини. Слизеподібним продуктом цих бактерій є полісахарид декстран – полімер глюкози.

*Zyomonus mobilis* у сахарних середовищах утворює полісахарид леван (до 90 г/л), який є полімером фруктози. До числа мікробних полімерів відносять, полі- $\beta$ -оксимасляну кислоту. Вона накопичується в клітинах *Azotobakter*, у кількості 50-70% і сліжить енергетичним резервом. Це перспективна сировина для біодеградууючих пластмас.

Великого масштабу досягло виробництво ксантану (складний полімер глюкози і її похідних, і бацетил-Д-маннози). Ксантан використовують у

значенні стабілізатора і згущувача (отвердувача) харчових продуктів, фармацевтичних засобів, у косметичці, при здобутті нафти, у металургії.

Полісахариди змінюють характеристики розчинів. Вони знижують розбризкування і покращують прилипання миючих засобів, зберігають кислотність і лужність розчинів, підвищують їх в'язкість.

Біосинтез різноманітних екзополісахаридів сильно відрізняється. Декстан і леван синтезуються позаклітинно із відповідних мономерів глюкози і фруктози за участю декстансахарози і левансахарози. Інші полісахариди, наприклад, ксантан, синтезується всередині клітини з активацією вихідних компонентів за допомогою нуклеотидтрифосфатів і модифікацій до різноманітних специфічних сполук, які полімерізуються з утворенням специфічних бічних ланцюгів, а потім за допомогою носіїв ліпідної природи транспортуються із клітини в середовище.

На утворення полісахаридів і відокремлення їх від клітинної поверхні сильний вплив виявляють рН і температура середовища. Температура впливає на ступінь полімерізації. Так, при 35<sup>0</sup>С утворюється ксантан з меншою молекулярною масою, ніж при 30<sup>0</sup>С.

Для виділення полісахаридів звичайно спочатку відокремлюють біомасу від КЖ, потім полісахарид осаджують, відокремлюють і проводять механічне збезводнювання з наступним сушінням. Для осадження полісахаридів застосовують етанол, метанол або ацетат. Для одержання харчового ксантану використовують ізопропанол, для одержання левану – етанол.

## Лекція 10

### БІОТЕХНОЛОГІЯ ВИРОБНИЦТВА АНТИБІОТИКІВ

До антибіотиків відносяться низькомолекулярні речовини, що розрізняються за хімічною структурою. Спільне для цих з'єднань те, що вони є продуктами життєдіяльності мікроорганізмів, вони в найменших концентраціях специфічно порушують ріст мікроорганізмів.

Більшість антибіотиків відносяться до вторинних метаболітів. Їх також, як токсини й алкалоїди, неможна віднести до суворо необхідних для забезпечення росту мікроорганізмів речовинами. За цією ознакою вторинні метаболіти відрізняються від первинних.

Біосинтез антибіотиків, як і інших вторинних метаболітів, як правило відбувається в клітинах, що пройшли стадію інтенсивного росту а (трофофазу), тобто в мікроорганізмах, які припинили рост (ідіофаза). У зв'язку з цим антибіотики відносять до метаболітів-ідіолітів.

Біологічна рол їх в забезпеченні життєдіяльності клітин – продуцентів залишається до цього часу не вивченою.

Вважається, що вони в несприятливих умовах стримують рост конкуруючих мікроорганізмів, забезпечуючи тим самим більш сприятливі умови для виживання мікропродуцентів того чи іншого антибіотика. Значення процесу антибіотикоутворення в життєдіяльності мікробної клітини підтверджується тим, що у стрептоміцетів близько 1% геномної ДНК відводиться на долю генів, що кодують ферменти біосинтезу антибіотиків, які протягом більшої кількості часу можуть не експресуватися.

Відомо близько 5000 (Я. Аарановиць, Дж. Коен, 1984) – 6000 (С.М. Навашин. Ю.О. Сазикін, 1984) антибіотиків, продуцентами яких є в основному 6 родів нитчастих грибів, три роди актиноміцетів (майже 4000 різноманітних

антибіотиків) і два роди істинних бактерій (приблизно 500 антибіотиків). Із нитчастих грибів особливу увагу потрібно звернути на плісневі гриби, які є продуцентами так званих лактамних антибіотиків: пеніцилінів і цефалоспоринів. Більша частина синтезуючих актиноміцетами антибіотиків, включаючи тетрацикліні, синтезується родом.

Із відомих 5000-6000 природних антибіотичних речовин для реалізації споживачам виробляється тільки близько 100.

У той час, коли встановили антибактеріальну дію пенициліну і можливість його використовувати у значенні лікарського засобу (Х.У. Флорі, Е.Б. Чейн та ін., 1941), продуктивність лабораторного штамму плісені – 2 мг препарату на 1 л культурної рідини – була досить недостатньою для налагодження промислового виробництва антибіотика. Багаторазовими систематичними впливами на вихідний штамм *Penicillium chisogenum*, такими мутагенами, як рентгенівське та ультрафіолетове опромінювання, азотистий іприт у сполученні зі спонтанними мутаціями і відбором найкращих продуцентів, удалося збільшити продуктивність гриба в 10 000 разів і довести концентрацію препарату в культуральній рідині до 2%.

Шлях підвищення ефективності штамів-продуцентів антибіотиків, заснований на безладних мутаціях, що став класичним, недивлячись на дуже великі витрати рпаці і часу, використовується до цього часу. Становище. Яке склалося є наслідком того, що антибіотик, на відміну від білка, не є продуктом вираження гену, біосинтез антибіотика відбувається в результаті спільної дії 10-30 різних ферментів, які кодують відповідною кількістю різних генів. Крім того, для багатьох антибіотиків, мікробіологічне виробництво яких налагоджене, молекулярні механізми їх біосинтезу до цього часу не вивчені. Полігенний механізм, який покладено в основу біосинтезу антибіотиків, є причиною того, що зміни окремих генів не можуть бути успішними.

Для виробництва одного із найбільш розповсюджених антибіотиків – пенициліну, використовується високопродуктивний промисловий штамм *Penicillium chrysogenum*, який вирощують у 100 000-літрових ємкостях –

ферментерах, у присутності фенілоцтової кислоти на багатому живильному середовищі. Для забезпечення безперервного виходу пеніциліну декілька ферментів працюють у режимі змін. Так як мікробіологічна стадія у виробництві пеніциліну триває близько 200 годин, для забезпечення безперервності процесу достатньо 14 (Голландія, компанія «Гист-брокадес НВ») і 15 (США, фірма «Пфизер ИНК») ферментерів, що працюють у режимі змін. Вироблений мікробними клітинами із 100 00-літрового ферментеру добувають протягом 15 годин.

По закінченню ферментації виснаження мікробні клітини і культурну рідину поділяють фільтруванням, клітини плісняви промивають. Із одержаного фільтрату і промивання за допомогою бутанолу і джерела іонів калію в спеціальних установках-кристалізаторах одержують кристалічну калієву сіль пеніциліну – 99,5% чистоти. Вироблений і виділений у чистому вигляді антибіотик пеніцилін є вихідною речовиною для наступних хімічних модифікацій. Оброблений ферментом пеніциліанамілазою, продуцентом якого є спеціальний бактеріальний штамм, пеніцилін, у результаті вибірного видалення із молекули бензольної групи при 37<sup>0</sup>С у водному середовищі перетворюється в 6-амінопеніциланову кислоту (6-АПК). Ця кислота як антибактеріальний засіб має слабку активність. Однак, структура ядра 6-АПК є зручною основою для модифікаційних маніпуляцій, у результаті яких, при приєднанні бічних груп антибактеріальна ефективність препарату значно зростає.

Крім пеніцилінів і цефалоспоринів до  $\beta$ -лактамним антибіотикам належать цефаміцини, продуцентами яких є мікроорганізми нитковидних бактерій актиноміцетів, що відносяться до роду стрептоміцетів *Streptomyces*.

Стійкість бактерій до дії  $\beta$ -лактамних антибіотиків, що спостерігається, у тому числі і цефаміцинів, пов'язана з деградуючою здатністю мікробних ферментів  $\beta$ -лактамаз, які призводять до руйнації  $\beta$ -лактамних структур. Вишукування (дослідження) і використання інгібіторів  $\beta$ -лактамаз апріорі повинно підвищити антибактеріальну ефективність  $\beta$ -лактамних антибіотиків.

Виявилося, що такий представник цефалінових антибіотиків, як клавуланова кислота, не тільки може бути виражена антибактеріальним ефектом, але й є досить сильним засобом, що обумовлює інгібіторну дію на бактеріальні  $\beta$ -лактамази, які синтезуються багатьма мікроорганізмами (бактеріями, актиноміцетами, цианобактеріями, дріжджами). Механізм їх нейтралізуючої дії зводиться до гідролітичного розщеплення циклічного амідного зв'язку в  $\beta$ -лактамному кільці антибіотиків, що відносяться до цього ряду.

Після розрушення  $\beta$ -лактамного кільця молекула антибіотика втрачають активність бактеріальних пептидаз, що забезпечують реакцію полімеризації пептидоглікану. Гени, які кодують ферменти  $\beta$ -лактази можуть передаватися від одного мікроорганізма до іншого за допомогою плазмід, що забезпечують внаслідок цього появу резистентних до відповідних антибіотиків штамів. Створений на основі клавуланової кислоти і  $\beta$ -лактамного антибіотика амоксициліну антибактеріальний препарат – огментин – завдяки інгібуванню  $\beta$ -лактамною активності забезпечує високий антибіотичний ефект. Принцип хімічної модифікації  $\beta$ -лактамних структур і одержання на цій основі напівсинтетичних антибіотиків виявився ефективним і для аміноглікозидів, перш за все стрептоміцину.

Одним із головних моментів у механізмі антибактеріальної дії  $\beta$ -лактамних сполук, який поки що не до кінця вивчений, є хімічна спорідненість останніх до ферментів (транспептидазі, карбоксипептидазі та едопептидазі), що беруть участь у створенні пептидогліканової структури клітинної стінки

мікроорганізмів. Порушення процесу полімеризації веде за собою утворення дефектів у клітинній стінці, що несумісно з життєдіяльністю. У зв'язку з тим, що пептидоглікаки є обов'язковим компонентом клітинної стінки бактерій і відсутні в еукаріотичних організмах,  $\beta$ -лактамні антибіотики проявляють високу специфічність і, очевидно відносяться до найбільш токсичним із застосованих на практиці антибактеріальним препаратам.

Антибактеріальна дія при використанні інших груп антибіотиків досягається за рахунок порушення метаболізму в інших клітинних компартментах.

Молекулярні механізми токсичної дії антибіотиків на мікробну клітину повністю не встановлені.

Створення нової біотехнології виробництва антибіотиків спирається на досягнення молекулярної біології, молекулярної генетики і генетичної інженерії. У наш час розробляється перспективне направлення, засноване на припущенні про біосинтез антибіотиків або їх окремих ключових структур.

Генноінженерний підхід припускає конструювання продуцентів з використанням плазмід у значенні вектора для створення рекомбінантних ДНК, що включають гени, які контролюють біосинтез ферментів, що каталізують реакції утворення антибіотиків, поки встановлено тільки у продуцентів метиленоміцину. В інших випадках плазмідам приписується роль регуляторів активності генів, локалізованих у хромосомах, хоча у більшості штамів мікроорганізмів, що використовуються для одержання антибіотиків у промислових масштабах, плазмиди поки виявити не вдалося.

Застосовується також мутаційний біосинтез (мутасинтез), який зводиться до одержання за допомогою мутацій мікроорганізму, втратившого фермент, який каталізує будь-яку стадію біосинтезу антибіотика. Якщо в культуральне середовище додати цей попередник, утворюється антибіотик, що має природну структуру; якщо хімічну структуру попередника незначно модифікувати, то можна одержати антибіотик, який не дуже буде відрізнятися від природної структури, а отже, і властивостями, завдяки чому можуть проявлятися переваги нового антибіотика. Цей прийом реалізований і використовується при синтезі аглікону амакродів і одержанні антибіотиків, що відносяться до категорії гібридних.

Як вважають С.М.Навашин і Ю.О.Сазикін, у найближчий час збільшення продуктивності продуцентів може бути досягнуто за рахунок використання відкритих А.С.Хохловим (1979) специфічних регуляторів, який визначає перехід мікробної культури із стадії профазу до ідіофазу, а також за рахунок подавлення процесів ретроінгібування (алостеричне інгібування антибіотиком активності ферменту, що каталізує стадію біосинтетичного

процесу продуктом, та інгібування ферменту на рівні транскрипції і-РНК), що внаслідок цього призводить до пригнічення метаболічної активності мікроорганізму – продуценту антибіотика.



## Лекція 11

### ОДЕРЖАННЯ МІКРОБНИХ ФЕРМЕНТІВ.

Ферменти вигідніше одержувати мікробіологічним шляхом, ніж виділити із тваринної чи рослинної сировини. Це особливо стосується екстрацелюлярних ферментів, які легко виділити із культуральної рідини.

Перерахуємо ферменти, які виробляють мікробіологічним шляхом у більшій кількості.

Фермент	Продуцент
А-амілаза	<i>Aspergillus, Bacillus, Streptococcus</i>
Протеази (лужна і кисла)	<i>Bacillus, Aspergillus, Penicillium, Clostr</i>
Целюлази	<i>Cillulomanus, Clostr, Penicillium, Trichoderma</i>
Пектинази	<i>Mucor, Erwinia, Aspergillus, Penicillium</i>
Глюкоізомераза	<i>Bacillus, Microbacterium, Streptomyces</i>
Інвертаза	<i>Saccharomyces, Kluyveromyces, Streptomyces</i>
Ліпаза	<i>Candida, Clostr, Aspergillus</i>
Сичужний фермент	<i>Mucor, Bacillus</i>
Лактаза	<i>Escherichia, Saccharomyces</i>
РНК-ази	<i>Aspergillus, Bacillus, Streptococcus, Clostr</i>

Виробництво ферментів має деяку специфіку у порівнянні з іншими мікробіологічними процесами:

1. Потрібно ретельне дотримання стерильності, так як продукт, що

утворився – фермент – на відміну від кислот, спиртів і антибіотиків не подавляє сторонню мікрофлору.

2. Біосинтез ряду ферментів подавляється катаболітною репресією.

3. Для продукту представляють небезпечні протеази.

Ці особливості враховують при складанні середовищ, селекції штамів і реалізації процесу.

У значенні джерела вуглецю використовують кукурудзяне або пшеничне борошно, крохмаль, глюкозу, лактозу.

Крохмаль є індуктором для  $\alpha$ -амілази, а глюкоза репресором. Декстрин індукціює біосинтез пліоамілази, а глюкоза – репресує. Утворення глюкоїзомеразі інтенсивніше відбувається в середовищах з ксилозою або геміцелюлозою. У значенні джерела азоту в середовищах для одержання ферментів застосовують соєве борошно або білкові ізеляти, рибне борошно, кукурудзяний екстракт, казеїн, солі амонію. Сухой речовини в таких середовищах повинно бути 10-20%.

Більшість процесів одержання ферментів аеробні, тому потрібні біореактори з аераторами. Приплив повітря 0,1-1,0 м<sup>3</sup> (м<sup>3</sup>\* хв.). При роботі з бактеріальними продуцентами потрібні механічні мішалки - 1-3 кВт/м<sup>3</sup>, а при роботі з міцеліальними – 4-6 кВт/м<sup>3</sup> рН нейтральний або слабкокислий.

Культури продуценту звичайно потрапляють на заводи в ампулах у ліосфіцізованому вигляді. Головна ферментація триває 3-5 діб. Якщо фермент екстрацелюлярний, то КЖ відокремлює біомасу, а фермент осаджують і очищують у залежності від потреб споживачів. Кількість інокуляту 1-5 % за об'ємом для кожної стадії.

У виробництві ферментів переважно застосовують глибинну ферментацію, однак у Японії для одержання амілаз використовують і поверхневу.

У СРСР широко застосовують сухі амілолітичні ферментні препарати для потреб спиртової і пивоваренної промисловості, тваринництва. Ці

препарати називають часто "грибним солодом". Процес його одержання типовий для твердофазної ферментації. Доцільно розглядати не будемо.

Розглянемо виробництво ферментного препарату амілази методом поверхневого культивування.

Для стерилізації висівок, що використовуються у головній ферментації, застосовують спеціальні апарати у вигляді горизонтальних циліндрів з мішалками, з подачою пару і з охолоджуючими властивостями. Термічну стерилізацію висівок сполучають з хімічною, додаючи до висівок формалін..

Мікроміцети вирощують у дві стадії. У перші 8-10 годин при температурі 32-33°C і невеликій аерації спори набухають і проростають. На другій стадії утворюється багатий на амілазу міцелій. У цей період температуру понижують до 25-28°C. Протягом 24-35 годин висівки вкриваються білим пухнастим міцелієм, вологість маси складає 38-40%.

Міцелій, що виріс підсушують повітрям температурою 40-45 °C і змільчують. Потім препарат сушать в установках барабанного або іншого типу при 85-90°C до вологості 10-14%. Температура матеріалу не повинна перевищувати при сушінні 45-60°C. Сухий препарат фасують у мішки по 25-40 кг.

Недоліки твердофазної ферментації – великі поверхні апаратів і невисока продуктивність. Якщо збільшувати шар субстрату, тоді важко відводити тепло, так як інтенсивне перемішування шару не допускається.

Для потреб бродильних виробництв, одержання декстрину і фруктозної патоки (меляси), для хлібопекарської і текстильної промисловості у великих кількостях виробляють  $\alpha$ -амілазу. Для цього потрібна в основному термостабільна  $\alpha$ -амілаза, активна при 95°C і навіть при 105-110°C.

Такий фермент продукує *Bacillus licheniformis* в умовах глибинної ферментації на середовищах з крохмалем, соєвим борошном або кукурудзяним екстрактом з вмістом СВ придлизно 20%. При 40°C і нейтральному рН в умовах інтенсивної аерації протягом 5 діб утворюється 1-3% розчин позаклітинного

ферменту. Біомасу і нерозчинні частинки відокремлюють за допомогою флокулянту. Потім фермент звичайно стабілізують кальцієм і розчин концентрують. Препарат випускають у рідкому або в сухому вигляді.

Глюкоамілазу продукують штамми родів *Aspergillus* и *Rhizopus*. Фермент активний при 55°C и рН = 4,0; 5,5. Він відщеплює глюкозу від кінців декстрину. Глюкоамілази широко використовуються при одержанні глюкозних і фруктозних сиропів із крохмалю. Рідкий препарат містить 5% активного ферменту.

Глюкоізомеразу виробляють в іммобілізованому вигляді для одержання фруктози із глюкозної патоки. Цей фермент продукує позаклітинно ряд бактерій (*Bacillus*, *Microbacterium*, *Arhrobactert*) і мікроміцети (*Streptomyces*, *Actinoplanes*) у середовищах, що містять ксилозу або геміцелюлозу. Через 2-3 доби глибинної ферментації при нейтральному рН і температурі 30° С біомасу відділяють і фермент стабілізують звичайно шляхом зв'язування за допомогою глутарового альдегіду.

Методом глибинної ферментації за допомогою *Bacillus subtilis* одержують лужну протеазу, яка широко використовується для приготування миючих засобів. У цьому випадку важливо селекціонувати термостабільні і лужностійкі штамми.

Оскільки з'ясувалося, що протеази, як компоненти миючих засобів. Викликають алергію, було запропоновано випускати їх у гранульованій або рідкій формі.

Значно складніше виробництво мікробних ферментів, що містяться у клітинах продуцентів, наприклад,  $\alpha$ -аспарагінази (медичний фермент). Його одержують із *E. Coli* и *Erwina cerotovara*. Під час аеробної ферментації накопичується 5-6 г/л бактеріальної біомаси.

Після центрифугування одержують суспензію клітин у перерахунку на СВ 120г/л.

Дезинтеграцію – гомогенізацію біомаси можна здійснювати в апараті системи APV – *Mantan gaulin*, шляхом дворазової обробки біомаси при 30° С. Гомогенізатор обробляють метанолом у зростаючих концентраціях, починаючи від 33%, для коагуляції білка. Потім білок фільтрують, осаджують фермент 50%-ним розчином метанолу при низькому рН і фільтрують на фільтр-пресі. Потім фермент розчиняють у воді і знову осаджують 60%-ним метанолом. Осадок (осад) відділяють на центрифугі, а із фугату ультрафільтрацією виділяють 90%  $\alpha$ -аспарагіназ.

Фермент очищують за допомогою хроматографії. Це дозволяє знизити пирогенність препарату. Кристалізують фермент із розчину етанолу (0,6 об'єму) при рН=5, кристали відділяють на центрифугі. Для одержання готового препарату необхідно продукт обробити вугіллям, провести стабілізацію фільтруванням, обробити манітом і потім ліофілізувати. Цикл виділення ферменту триває добу, вихід готового ферменту 30%.

## ОДЕРЖАННЯ ФРУКТОЗНОЇ ПАТОКИ.

Фруктоза широко розповсюджена в природі, міститься у всіх фруктах, медові, вона в 1,5 рази солодша сахарози і має більш приємний медовий смак. У 1968 році фірма "Клинтон-Корн" почала працювати з іммобілізованою глюкоїзомеразою у періодичному процесі. Із глюкози вдалося одержати фруктозний сироп, що містить 42% фруктози. У подальшому був утворений безперервний процес, який дозволяє одержувати патоку з концентрацією фруктози 42-55%. Для одержання сиропу, що містить 55% фруктози, необхідно застосовувати хроматографічне відділення частини глюкози. Це допомагає подорожченню продукту на 25%, але стає придатним для приготування напоїв типу кока-коли.

Виробництво фруктозної патоки складається із двох етапів:

1. Одержання глюкозної патоки із крохмалю (кукурудзяного);
2. Ізомерізація глюкози.

Для одержання глюкозної патоки крохмальну суспензію змішують з  $\alpha$ -амілазою, і, інтенсивно перемішуючи, витримують у реакторі 30 хвилин. Крохмаль розріджується шляхом розщеплення вуглеводного ланцюга на фрагменти-декстрини і мальтозу. Для цієї мети (цілі) більш перспективна амілаза, вона більш стійка, ніж грибна, так як більш термостабільна. Концентрація ферменту – 0,04-0,1%. Далі мальтози і декстрини розщеплюються до глюкози за допомогою глюкоамілази. Якщо процес проходить у періодичному режимі з вільним ферментом, то він триває 3-4 доби при 55-60° С. Після цього фермент інактивує термічно або адсорбірує на вугіллі.

Експериментально встановлено, що глюкоамілазу можна іммобілізувати на різноманітних носіях шляхом адсорбції.

Заключний етап виробництва фруктозної патоки – ізомерізація глюкози в системі з глюкоїзомеразою.

Фермент пов'язують адсорбційно з ДЕАЕ-целюлозою (діетиламіноетилцелюлоза), що має вигляд повних ниток, гранул. Розчин

глюкози пропускають через іммобілізований фермент і із реактора витікає суміш глюкози і фруктози. Продук, потім обробляють вуглем для деколоризації, звільнюють від домішок в іонообмінних колонках, потім упарюють до СВ 71%. Фруктозна патока містить 50% глюкози і 42% фруктози.

Добова продуктивність досягає 400 тон. Із 1 тони іммобілізованного ферменту за 100 діб роботи одержують 4000 тон фруктози.

Період полуінактивації 20-50 діб, отже, фермент необхідно міняти через 2-3 місяці. Іммобілізація скорочує об'єм глюкоізомерази, що застосовується в 10 разів, затрати праці – в 3 рази. Одержують на комбінатах по комплексній переробці кукурудзи.

## Лекція 12

### **БІОТРАНСФОРМАЦІЯ ОРГАНІЧНИХ РЕЧОВИН**

Сучасна біотехнологія розглядає біотрансформацію органічних речовин у нові сполуки за допомогою мікроорганізмів і ферментів, як самостійний розділ, бо існує специфіка реалізації самого процесу, на відміну процесів біосинтезу і бродіння, в яких бере участь велика кількість ферментів, у мікробіологічній трансформації звичайно бере участь один визначений фермент, що каталізує окислення, декарбоксилювання, метилування ті інші реакції. Щоб зробити трансформацію будь-якої речовини, на початку розмножують культуру відповідного мікроорганізму до кількості, яка складає 5-10% процентів об'єму, що трансформує розчин. При підготовці розчину для трансформації речовин необхідно враховувати, що, по-перше, у ньому потрібно розчинити максимально можливу кількість речовини, яка трансформується (а саме 10-25%) і, по-друге, потрібно використати мінімальну кількість необхідних для розвитку культури живильних солей, причому в такому вигляді, щоб не було затруднено хімічне виділення речовини. Якщо речовина, яка трансформується не розчинюється у воді, її попередньо розчиняють у нейтральному органічному розчинникові, а потім при інтенсивному помішуванні змішують з основним середовищем.

Трансформацію проводять у стерильних умовах, при підтримуванні оптимуму рН, температурі та інших факторів. Процес триває 0,5-2 доби.

Після мікробіологічної трансформації відбувається хімічне виділення речовини.

Технологічні методи трансформації органічних сполук можна поділити на такі групи:

1. Використання клітин, що не розмножуються.
2. У періодичних умовах з використанням культури, яка росте.
3. Використання спор.
4. Застосування дезинтегрованих клітин.
5. За допомогою іммобілізованих клітин мікроорганізмів.
6. З використанням виділених із мікроорганізмів ферментних препаратів, у тому числі іммобілізованих.
7. Безперервні методи.

Покажемо трансформацію деяких органічних речовин мікрорганізмами.

Субстрат	Продукт	Мікроорганізми	Вихід
Сорбіт	Сорбоза		98
Гліцерин	Дигідроксіацетон	Gluconobacter	90
Глюкоза	5-кетоглюконова к-та	Suboxydans	90
Манніт	Фруктоза		95



Глюкоза	Глюконова к-та	<i>Aspergillus niger</i>	100
Д-фенілаланін	L-фенілаланін	<i>Ps. miyamiry</i>	97
Д,L-пироглутамінова к-та	L-глутамінова к-та	<i>Ps. alkaligenes</i>	90
Глюкоза	2-кетоглюконова к-та	<i>Ps. fragilis</i>	92
Прогестерон	112-гідроксипрогестерон	<i>Rhizopus nigricans</i>	90
Малеїнова к-та	Фумарова к-та	<i>Alcaligenes faecalis</i>	90
Сорбіт	Фруктоза	<i>Bacillus fruceosus</i>	92

Мікробіологічну трансформацію почали активно застосовувати після 1934 року, коли було з'ясовано, що за допомогою культури *Acetobacter suboxydans* із Д-сорбіту можна одержати L-сорбозу, необхідну для синтезу аскорбінової кислоти.

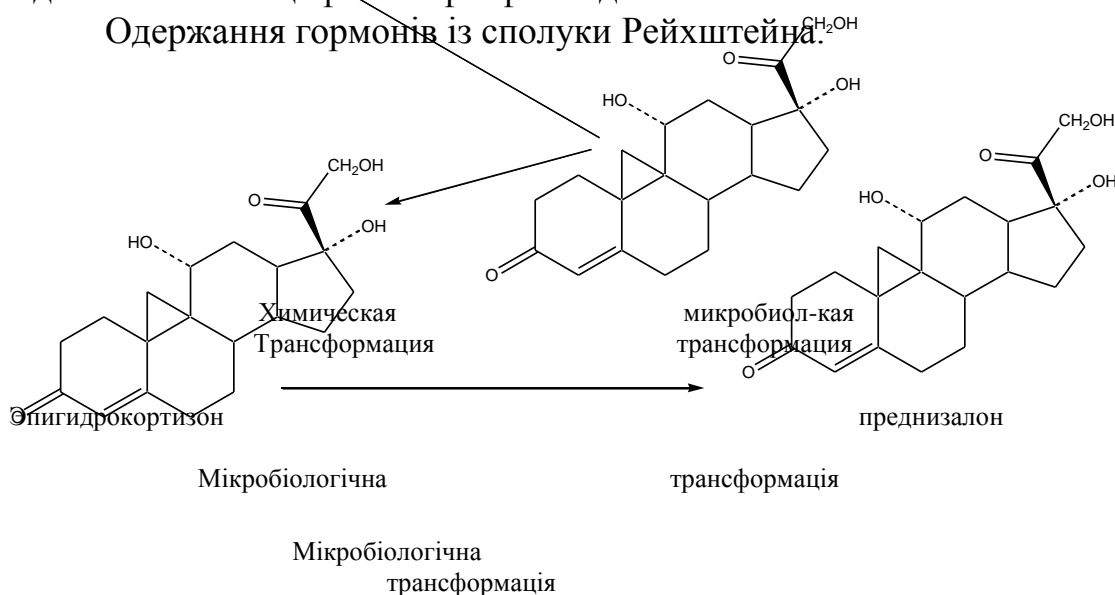
Для трансформації Д-сорбіту в L-сорбозу потрібно провести окисний процес, каталізаторами якого в біохімічній реакції найчастіше є дегідрогенази. Цю реакцію здійснюють більшість видів *Acetobacter-xylinum*, *suboxydans*, *mesoxydans*, *melanogenum*-остання особливо активна.

Практичне і теоретичне значення мають одержання і перетворення фізіологічно активних стероїдів, наприклад, холестерину, ергостерону, статевих гормонів (тестостерону і прогестерону), а також підниркових гормонів – кортикостерону і його похідного кортизону. Культура *Tieghemella orchidis* в умовах глибинного культивування при вмісті розчиненого в середовищі азоту 5-6 мг/л протягом доби утворює до 6 г/л сухого міцелію. Найбільшою здатністю трансформуватися володіє 17-годинна культура. За 10 годин така культура трансформує до 70% сполуки Рейхштейна S, при цьому вихід гідрокортизону складає 52%.

Методом біокаталізу одержують із арахідонової кислоти простагландини, тромбоксини, простаглінін і лейкотрієни. Ці речовини як регулятори найважливіших біохімічних процесів застосовуються і в медицині.

Арахідонова кислота може бути одержана із масел ферментативно, за допомогою специфічних фосфоліпідів.

Одержання гормонів із сполуки Рейхштейна.



Сполуки РейхштейнаS		
Мікробіологічна		
трансформація		
гідрокортизон		преднізолон

### Особливості процесів біотрансформації.

Перспективним направленням у біокаталізі органічних сполук є використання двофазних систем: вода – органічний розчинник, що не змішується з водою. У такому середовищі помітно покращуються мермодинамічні умови реакцій. Двофазні системи дають правильні результати при трансформації малорозчинних у воді сполук, таких як стероїди.

При біотрансформації органічних сполук важливе значення мають різноманітні регуляторні механізми, у тому числі індукція і репресія, а також здатність штамів до мутацій, що може призводити до змін трансформуючих властивостей.

Суттєве значення має також проникливість цитоплазматичних мембран, яку іноді регулюють під час вирощування культури.

Так при конвенсії пуринів або перимединів у відповідні нуклеотиди за допомогою *Brevibacterium ammoniagenes* ріст культури лімітують іонами марганцю. Метод лімітації по іонах марганцю дозволяє змінити проникнення дріжджів *Saccharomyces cerevisia* і одержати із 10 г аденозину 16 г АТФ у вигляді натрієвої солі.

Бактеріальні клітини *Zymomonas mobilis* із збільшеним проникненням конвентують сахарозу в два продукти – сорбіт і глюконову кислоту, при каталітичній дії знову відкритого ферменту глюкозо-фруктозо-трансгідрогенази.

У деяких випадках культуру вирощують на одному субстраті, а конверсію виробляють на іншому. Прикладом такого кометаболізму служить *Pseudomonas* sp., яку вирощують на н-гексадекані, а потім, використовують для перетворення н-амілбензену в фенілакрилову кислоту, при цьому вихід дорівнює 100%.

Необхідно відмітити, що практично всі біокаталітичні трансформації здійснюються при високому коефіцієнті конверсії, який складає 0,9-1,0%, як видно із таблиці.

Одержання гормонів, вакцин та інших препаратів.

Гібридома – це клітинний гібрид, які одержують злиттям нормальної антитілоутворюючої клітини (лімфоциту) і пухлинної клітини, володіє здатністю до синтезу моноклональних (однорідних) антитіл бажаної специфічності (властивість лімфоциту), і до необмеженому росту в штучному середовищі, що забезпечує гібридній клітині своєрідне “безсмертя”. Моноклональні антитіла є ідеальними за специфічністю реагентами на ту чи іншу органічну субстанцію.

Після відкриттів Дженера і Пастера вакцини довгий час виробляли із органів хворих тварин (лімфатичні вузли, селезінка). Тепер більшість вакцин одержують мікробіологічним способом. У наш час випускають більше 100 різноманітних бактеріальних і вірусних профілактичних і лікувальних препаратів. Для одержання протитуберкульозної вакцини БЦЖ, наприклад, збуджувач *Mycobacterium tuberculosis* культивують глибинним методом на картопляно-ліцеринному середовищі. Ослаблені клітини ліофілізують у захисному середовищі.

Живу вакцину поліеміліту Себіна готують із ослаблених вірусів поліоми і розмножують на диплоїдних клітинних культурах людини. Нові можливості одержання вакцини відкриває генетична інженерія. Щоб організм не перевантажувати і не вводити в нього небажані речовини, надається можливість за допомогою рекомбінантних мікроорганізмів продукувати лише один необхідний антиген. Для цього в клітини бактерій і дріжджів вводять необхідний ген. Таким шляхом вже одержані вакцини проти ящура, гіпатиту В, сказу, грипу та інших хвороб.

Для виробництва вакцинних білків – антигенів можна вважати перспективними дріжджі і клітини тварин, причому дріжджі значно простіше культивувати, ніж клітини тварин. У зв'язку з цим увагу заслуговує робота Д.Рутера, який за допомогою плазмід ввів у клітини *Saccharomyces cerevisiae* ген антигену HBsAg гепатиту В.

Для одержання вакцин та інших імунопрофілактичних і діагностичних засобів широко використовують культури такнин шкір тварин.

Системи культивування тварин тканин і клітин можна поділити на дві групи: перша – моношарові, коли клітини розвиваються на поверхні стінок посуду (пляшок, матриць) або поверхні спеціальних носіїв, занурених у живильне середовище; друга – культивують суспендованні у середовищі клітини.

Моношарові культури у виробничій практиці вирощують у ролерно-пляшкових апаратах, що вміщені у термостатовані камери, число пляшок у кожній установці досягає 700, об'єм культивування досягає сотні літрів.

Інша більш сучасна система моношарового культивування клітин тварин розроблена А.Везелем, який у 1987 році довів, що клітини тварин добре розвиваються на сферичних частках (мікроносіях) розміром 0,2 мм, виготовлених із ДЕАЕ – сефадексу А 50 і вкритих колодіоном.

Мікроносії можуть біти не тільки суспендовані, але й закріплені за типом “фіксованого” шару.

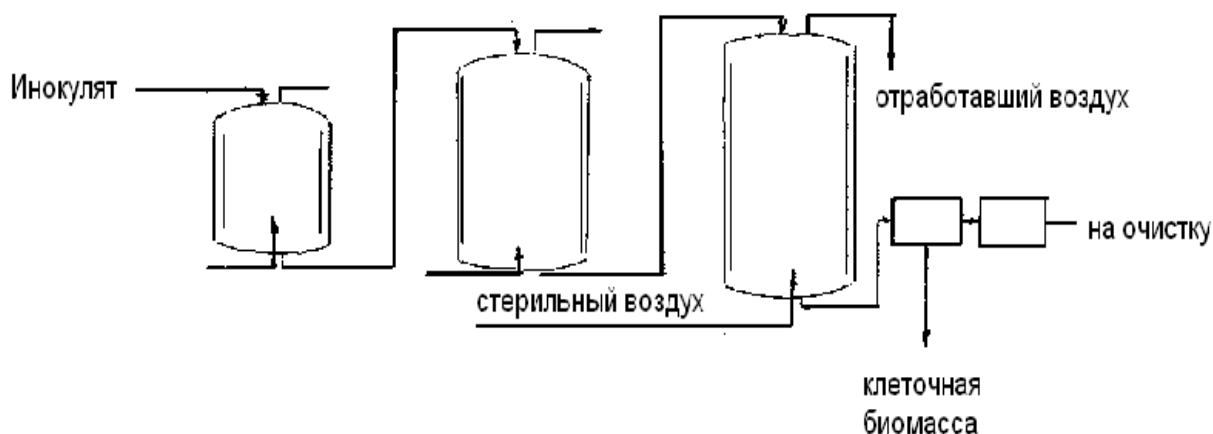
Другий варіант культивування клітин тварин у суспензованому виді у багатьох випадках схожий з звичайним глибинним культивуванням мікроорганізмів. Специфіку цієї системи можна добре побачити на прикладі одержання моноклональних антитіл.

Широке застосування моноклональних антитіл у медицині призвело до необхідності збільшення цього виробництва.

Щоб одержати 1 кг моноклональних антитіл, потрібно 20 тис. мишей, а методом глибинної ферментації така ж кількість антитіл може бути вироблено за допомогою гібридомних клітин за 10 діб в апараті об’ємом 7 куб. м.

Для культивування гібридомних клітин застосовують синтетичні середовища спеціального складу. Середовища і повітря стерилізують за допомогою фільтрації. Апаратура для культивування гібридомних клітин така ж як і для культивування мікроорганізмів. Однак у цих умовах механічне перемішування не бажано – краще використовувати ерліфтну систему аерації.

Гібридомні клітини розвиваються нормально при ступені насиченості середовища киснем від 8 до 100% від повного насичення. Бажано, щоб реактор був виготовлений із скла або рівної нержавіючої сталі. Процес ферментації довготривалий, тому дуже важливо забезпечити умови, які не допускають змішування клітин. Концентрація клітин після ферментації досягає більше 10 на 1 мл середовища. Фірма “Селтек” реалізувала процес культивування гібридомних клітин в ерліфтному біореакторі (об’єм дорівнює 1000 л).



Ерліфтна система для глибинної ферментації клітин гібридоми (Fairtlough, 1985 )

1,2,3 – ерліфтні біореактори об’ємом 10, 100, 1000л;

4 – центрифуга;

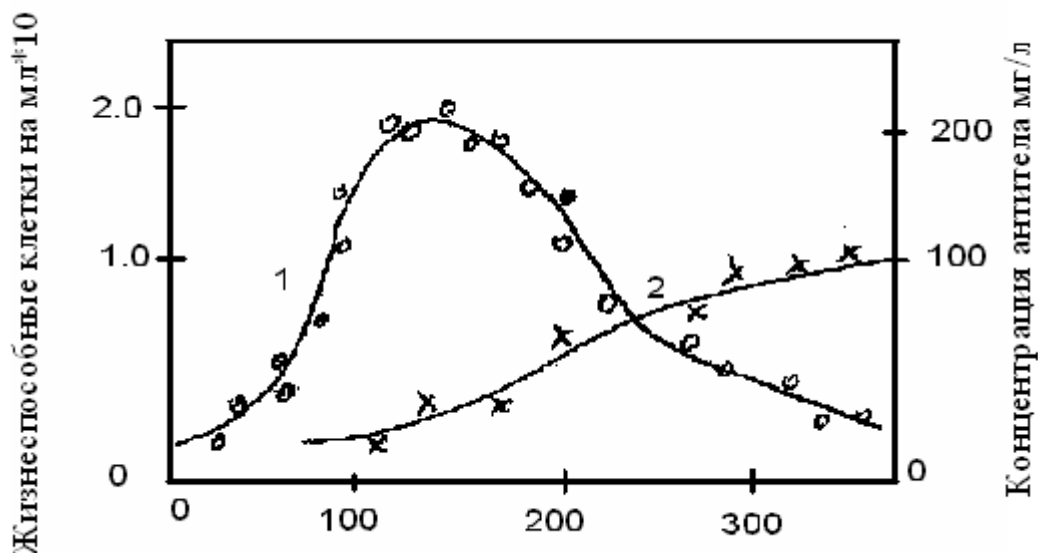
5 – ультрафільтраційні установки.

Інокулят розмножують у реакторі об’ємом 10 л, потім 100 л і закінчують у реакторі об’ємом 1000 л.

При одержанні IgG антитіл за допомогою мишачих гібридомних клітин, що мають період подвоєння 20 г досягнута концентрація клітин.

$2 \cdot 10^6$  на 1мл середовища за 200 годин ферментації. Біосинтез антитіл спочатку проходить паралельно з ростом культури і досягає максимуму у фазі відмирання клітин. У ферментаторі об'ємом 1000 л за 250-400 годин культивування одержують 150 г антитіл.

Річне виробництво моноклональних антитіл у такій системі складає 3-5 кг.



Динаміка росту клітин гібридоми (1) і утворення антитіл (2)

По закінченню ферментації клітинну біомасу відокремлюють фільтруванням або центрифугуванням. Супернатант (фільтрат) концентрують ультрафільтрацією – до концентрації антитіл 1г/л рідини. Подальша очистка препарату досягається методами осадження, іонообмінної хроматографії. Методи глибинного культивування гібридомних клітин мають ряд переваг, а саме, змінюючи об'єм реакторів, можна одержати будь-яку кількість моноклональних антитіл, причому економічно це більш вигідно, ніж при використанні тварин.

## Культура клітин, тканин і органів рослин

### Лекція 13

#### Вступ. Методи культивування *in vitro* клітин і тканин вищих рослин

План:

1. Історія культивування ізолюваних клітин, тканин і органів рослин.
2. Основні поняття і термінологія. Значення культури *in vitro* рослин для вирішення фундаментальних і прикладних проблем біології.
3. Загальні вимоги до лабораторії. альных и прикладных проблем биологии.
4. Підготовка і методи культивування рослинного матеріалу *in vitro*.

#### 1.Історія культивування ізолюваних клітин, тканин і органів рослин.

У кінці минулого – початку нашого століття німецькі вчені Vöchting (1892), Rechinger (1893) і Haberlandt (1902) намагалися вирощувати ізольовані із рослин шматочки тканин, групи клітин, волоски на розчинах сахарози. Ростучих *in vitro* тканин вони не одержали. Haberlandt спостерігав збереження живими клітин мезофілу листу протягом декількох днів. Rechinger назвав мінімальний розмір сегменту органу рослини, здатного до каллусогенезу. Не досягнувши експериментальних успіхів, ці дослідники виголосили ряд ідей, що підтверджених значно пізніше. Vöchting показав, що полярність властива і для окермої клітини. Haberlandt всунув гіпотезу про тотипотентність будь-якої живої клітини рослини.

Декілька пізніше ботаніки були захоплені іспіхами культивування тканин тварин (Harrison, 1907; Carrel, 1911, 1913). Однак спроби Czech (1927) і Prát (1927) за аналогією виростити ізольованні тканини рослини на рослинних екстрактах були невдалі. У 1922 р. американський дослідник Robbins і незалежно від нього німецький учений Kotte показали можливість культивування на синтетичному живильному середовищі меристеми кінчиків кореня томатів і кукурудзи.

Початок учпішного розвитку методу культури тканин і кулеток вищих рослин поклали роботи французького дослідника Gautheret і американського White (1932, 1934). Вони показали що якщо кінчики культивованих коренів періодично пересаджувати на свіже живильне середовище, то вони можуть рости і культивуватися необмежено довго.

У період між 1940-1960 pp. у послідовники Gautheret і White закріплюють успіх. Збільшується число видів рослин, тканини яких вирощуються *in vitro*. Список, наведений у класичній монографії з культури тканини, написаної Gautheret (1959), включає вже 142 види вищих рослин. Розроблені сполуки ряду живильних середовищ, що дозволило одержувати довготривалі пересадочні культури із різних органів і тканин рослин.

Середовище Мурасиге і Скуга (MS, 1962) найбільш універсальне і багатоцільове середовище для більшості рослин; середовище Гамборга і Евелєга (середовище B5, 1968); середовище Уайта (1939) застосовується для укорінення пагонів і нормального росту стеблевої частини після регенерації. Середовище Нич (1974), Китайське середовище (N6) рекомендуються для індукції андрогенезу в культурі пиляків і для індукції морфогенезу у злаків. Середовище Као і Михайлюка (1975) використовується для культивування одиничних ізольованих протопластів і клітин.

Вивчено значення макро- і мікроелементів для підтримання ростової активності калусної тканини. Виявлена потреба тканевих культур у вітамінах і стимуляторах росту. Дослідами Skoog, Miller (1955), був відкритий новий клас стимуляторів росту рослин – цитокініни. У залежності від концентрації і співвідношення стимуляторів можна було посилювати тиск клітин експланту, підтримувати ріст калусної тканини, індукціювати морфогенез. У цей період було оцінено значення наутральних екстрактів типу ендосперма кокосового горіха, каштану, кукурудзи та інших рослин для підтримання

неорганізованного росту і стимуляції процесів органогенезу і соматичного ембріогенезу в культурі каллусних тканин і клітинних суспензій (Steward, 1962). У цей період був розроблений метод одержання і вирощування великої кількості клітинних суспензій (1959), а також метод культивування окремої, виділеної із суспензії клітини, ділення якої індуює за допомогою тканини-“няньки” (Jones, 1960; Павлова, Бутенко, 1969).

Найбільш важливою подією у період 1960-1975 рр. Була розробка професором Ноттингемського університету (Англія) Cocking (1960) методу одержання ізольованих протопластів із тканин кореня і плодів томатів шляхом обробки їх сумішшю пектолітичних і целюлітичних ферментів, виділених із культуральної рідини грибів. Ізольованні протопласти були вжиті для розробки методів гібридизації соматичних клітин шляхом злиття протопластів за допомогою поліетиленгліколю (ПЕГ). Перші соматичні гібриди стали моделями для вивчення поведінки ядерного і цитоплазматичних геномів – партнерів у гібридних клітинних лініях і у потомстві соматичних гібридів рослин, що регенерували із гібридних клітин (огляд Бутенко, 1979; Глеба, 1980).

Розроблений метод культури меристем (Morel, 1959;), що дозволяє швидко і з високим коефіцієнтом клонально розмножувати їх у асептичних умовах.

Велике значення для фундаментальних і прикладних проблем набуло відкриття індукції андрогенезу при культивуванні ізольованих пиляків (Guha, Maheshwari, 1964) і використання андрогенезу для одержання гаплоїдних і дигаплоїдних ліній.

У період з 1976 р. і до цього часу продовжувався швидкий розвиток техніки *in vitro*, вивчення біології культивованих об'єктів і утворення технологій на їх основі. Розробка методів електорозлиття ізольованих протопластів (Zimmerman et al., 1984) і різноманітних методів селекції гібридних клітин. Методи мутагенезу і клітинної селекції, одержання соматоклональних варіантів і експериментальних гаплоїдів використовувалися для створення нових форм і сортів важливих сільськогосподарських рослин, розроблений ефективний метод переносу генів для дводольних рослин (Schell et al., 1982).

## **2. Основні поняття і термінологія. Значення культури *in vitro* рослин для вирішення фундаментальних і прикладних проблем біології.**

До числа методів сучасної науки, що допомагають вирішувати деякі фундаментальні і прикладні задачі біології, слід віднести методи, основані на культивуванні *in vitro* органів, тканин, клітин і ізольованих протопластів вищих рослин. Це наступні клітинні технології: оплодотворіння *in vitro*; культура незрілих гібридних насінних зачатків і зародків; регенерації рослин із тканин летальних гібридів; експериментальна гаплоїдія; клональне розмноження нових сортів, гібридів, ліній (включаючи утворення штучного насіння); кріозбереження генофонду.

До цього списку можна додати клітинні технології, які пропонують принципово нові шляхи для створення генетичного різноманіття і відбору форм з пошукуваними ознаками. До цієї групи входять такі види технологій: клітинна селекція та інженерія; гібридизація соматичних клітин; переніс чужерідних цитоплазматичних і ядерних генів.

Дані методи виявляють революціонізуючий вплив на селекційний процес. Традиційні прийоми селекції засновуються на чотирьох еволюційних принципах: гібридизація, рекомбінація, мутація, відбір. Всі ці принципи з успіхом реалізуються в *in vitro*. Біотехнологічні методи підвищують ефективність селекції перш за все шляхом розширення генетичного базису, швидкого утворення нових вихідних форм з корисними для їх втягування в селекційні програми.

Застосування і подальший розвиток даних клітинних технологій допомагає вирішенню таких важливих завдань генетики і селекції, як створення форм культурних рослин з великою толерантністю до ряду хвороб, шкідників і несприятливих факторів середовища при зберіганні ними збільшення кількості та якості продукту; розширення і збереження генетичного різноманіття; створення безвірусного і здорового посадкового матеріалу; створення декоративних культур і сортів рослин.

Оплотворення *in vitro* і ембріокультура дозволяють долати програмну і постгамну несумісність при відділеній гібридизації та одержувати життєздатні міжвидові і міжпродові гібриди. Іншим методом створення комбінації генів, які не можна одержати статевим шляхом через сувору несумісність, є соматична гібридизація, основана на злитті протопластів. Метод культури статевих клітин дуже перспективний для одержання гаплоїдних рослин. Нові можливості розширення генетичного базису культури статевих клітин дуже перспективний для одержання гаплоїдних рослин. Нові можливості розширення генетичного базису відкриваються при індукціюванні мутацій і проведення селекцій на клітинному рівні. Одиничні генетично унікальні рослини, яким властиві цінні ознаки, можна швидко тиражувати методом мікроклонального розмноження. Рослини-регенеранти, що одержані з каллусу, помітно відрізняються від вихідного матеріалу. Це явище використовується для створення нових рослинних форм “сомаклональних варіантів”, які також розширюють генетичну різноманітність для селекції. Генетичні маніпуляції безпосередньо на рівні ДНК методами генної інженерії дозволяють здійснити генетичну трансформацію і створити принципово нові форми рослин. Крім того культуру клітин рослин використовують у промисловому одержанні економічно цінних метаболітів; у вирішенні питань фізіології і біохімії рослин та інших областей біології.

Культитивування ізольованих клітин і тканин рослин в умовах *in vitro* – метод збереження життєздатності і розмноження органів або їх частин, ділянок тканин і окремих клітин поза організмом. Вирощування *in vitro* клітини і тканини є біологічною моделлю, на якій в умовах, що контролюються, близьких до природних, надається можливість вивчення механізмів міжклітинних взаємодій, контактів, їх регуляторної ролі. Звільнення клітини з-



під впливу материнського організму є науковою основою методу вивчення її різноманітних потенціальних можливостей.

Практично всі методичні прийоми культури тканин *in vitro* засновуються на трьох основних принципах:

- ізолювання експланту (клітина, шматочок тканини, орган);
- розміщування експланту в контролюючі, підібрані умови;
- дотримування стерильності матеріалу, який вирощують.

Основна термінологія:

*in vitro* – вирощування живого матеріалу “усклі”, на штучних живильних середовищах в асептичних умовах.

*Культура зародків* – стерильне вирощування на живильному середовищі незрілих або зрілих ізолюваних зародків.

*Експлант* – фрагмент тканини або органу, інкубіруючий на живильному середовищі самостійно або використовуваний для одержання первинного каллуса.

*Культура експлантов* – інкубація в стерильних умовах на живильних середовищах, що викликають або не викликають проліферацію фрагментів, ізолюваних із різних органів рослин.

*Культура клітин (суспензійна культура)* – вирощування окремих клітин або невеликих груп їх і зважувальному стані у рідкому середовищі при використанні апаратури, що забезпечує їх аерацію і переміщення.

*Каллус* – тканина, що виникла шляхом неорганізованої проліферації клітин органів рослин.

*Культура каллусних тканин* – вирощування в довготривалій пересадочній культурі тканин, що виникли шляхом проліферації клітин ізолюваних фрагментів, органів або самих органів (пиляки, насінні зачатки і т.д.) рослин. *Субкультивування* – перенесення інокулюми (транспланту) в іншу культуральну посудину на сіже живильне середовище.

*Органогенез* – процес виникнення *de novo* в неорганізовано зростаючій масі каллусних клітин, зародків органів (коренів і пагонів).

*Соматичний ембріогенез* – процес утворення зародкоподібних структур (ембріоїдів) у культурі тканин і клітин шляхом, що нагадує нормальний соматичний ембріогенез.

*Ембріоїд* – зародкоподібна структура, що викла шляхом соматичного ембріогенезу.

*Андрогенез* – процес виникнення рослин із мікроспор або пилкового зерна або через гаметичний ембріогенез, або з утворенням каллусу.

*Гіногенез* – процес виникнення рослин із клітин зародкового мішку.

*Гаплоїд* – ядро, клітина, організм, що характеризується набором хромосом, який представляє половину повного набору, властивого виду (символ  $n$ ).

*Дигаплоїд* – ядро, клітина, організм, що характеризується подвоєним гаплоїдним набором хромосом.

*Соматональні варіації і варіанти* – фенотипічне вираження непостійності ядерного і органельних геномів рослинних клітин Від істинних

генних мутацій відрізняються більшою чистотою виникнення і комплексністю змін (зміни в структурі генів, хромосом, геномів).

*Клітинна селекція* – метод виділення мутантних клітин і соматоклональних варіацій за допомогою селективних умов.

*Соматична гібридизація* – система, що втягує до генетичної комбінації хромосоми і гени ядра і органелл позасексуальним циклом. Наприклад, шляхом злиття ізольованих протопластів. Призводять до появи гібридних клітинних ліній і соматичних гібридів рослин.

*Ізольований протопласт* – рослинна клітина, що позбавлена клітинної стінки за допомогою ферментативної руйнації або механічним способом. Злиття ізольованих протопластів – формування однієї клітини із двох і більше об'єднанням їх поверхневих мембран.

*Культура ізольованих протопластів* – вирощування клітин, що позбавлені стінок, в рідкому або на агаризованному середовищі, яка містить у значенні додаткового компонента осмотично активна речовина (стабілізатор) в оптимальній для даного виду концентрації. При регенерації стінок у ізольованих протопластів перетворюється в культуру клітин.

*Соматичний гібрид* – рослина, одержана шляхом гібридизації соматичних клітин.

*Цирид* – рослина, одержана при злитті ізольованого протопласту з цитопластом, протопластом з інактивованим ядром або з енуклеїрованим протопластом.

*Клональне мікророзмноження* – одержання *in vitro*, нестатевим шляхом рослин, генетично ідентичним вихідному.

### 3. Загальні вимоги до лабораторії

В основному для роботи з культурою тканин рослин необхідно наступне:

- 1) місце для приготування середовища;
- 2) стерильна кімната або ламінар-бокс для стерильної пересадки;
- 3) кімната з постійною температурою або термостат для вирощування каллусних культур ( $25 \pm 2$  °C);
- 4) качалки для суспензійних культур клітин.

Необхідне таке обладнання: автоклав, рН-метр, інструменти (пінцети, скальпелі), лабораторний посуд, хімічні реактиви для приготування живильних середовищ, стерилізуючі розчини, дистиллятор.

Основна вимога до проведення всіх маніпуляцій – дотримання умов стерильності. Тому перед виконанням всіх робіт у ламінарному боксі проводять стерилізацію ультрафіолетом протягом 30 хвилин з наступним протирання рук і робочих поверхностей 78-80% етанолом. Для роботи необхідно мати інструменти і посуд, простерилізовані або у сушильній шафі (2-2,5 години при температурі), або автоклавіруванням (1,2 атм. протягом 25 хв.). Крім того, під час роботи повинна бути запалена спиртівка, а робочі інструменти періодично прокалюються в її полум'ї.

Для культивування найбільш зручною є система полиць з трубчатими люмінесцентними лампами.

Каллусні культури вирощуються у пластикових і скляних чашках Петрі, у пробірках і колбах, або в баночках із кришечками, що закручуються.

#### **4. Підготовка і методи культивування рослинного матеріалу *in vitro*.**

Підготовка і стерилізація рослинного матеріалу.

Основною умовою успішного одержання і вирощування каллусних і особливо суспензійних культур є стерилізація рослинних об'єктів, яка заключається у знищенні грибних і бактеріальних спор на зовнішній поверхні без ушкодження внутрішніх тканин. Вигляд речовини, що стерилізується, її концентрація і тривалість застосування залежить від щільності і чутливості тканини. Речовина, що стерилізується повинна легко видалятися із тканини промиванням дистильованою водою або піддіватися розкладу.

Перш ніж почати стерилізацію тканини, її попередньо очищують, обробляють етанолом, що підвищує дію стерилізуючих речовин. Для цих же цілей додають незначну кількість детергенту (порошки, мило) в стерилізуючий розчин (особливо у випадку погано змочуваних) опушених або вкритих воском тканин.

Для поверхневої стерилізації матеріалу застосовується невеликий набір хімічних речовин. Найбільш часто вживають сполуки, що містять активний хлор (гіпохлорид натрію або кальцію, хлорне вапно, хлорамін, сулему, перекис водню, етиловий спирт). Або ж використовують бром, сірчану кислоту, в особливих випадках користуються антибіотиками.

Для роботи беруть експланти, що знаходяться в потрібному "біологічному стані". Молоді тканини більш придатні для культивування. Крім того, іноді необхідно брати експлант на певній стадії розвитку тих чи інших органів (клітин), як наприклад, у культурі пиляків і пилку, культурі насінного зачатку і зародків. Можливо, необхідно провести передобробку низькими або високими температурами (одержання гаплоїдних рослин у культурі пиляків і пилку) і т.п.

Живильні середовища.

Компоненти живильних середовищ для вирощування культур тканин рослин можна поділити на шість груп:

- 1) основні неорганічні живильні речовини (макроеlementи);
- 2) мікроеlementи;
- 3) джерела заліза;
- 4) органічні добавки (вітаміни);
- 5) джерело вуглецю;
- 6) органічні добавки (регулятори росту рослин).

Крім С, О і Н для росту тканини необхідний азот у вигляді нітратної або амонійної солі в концентраціях 2-25 мМ; фосфор – у вигляді ортофосфату Іони натрію, хлору і сульфату потрібні для культивування тканин, очевидно, у невеликих концентраціях; іони калію, кальцію, магнію.

Оскільки живлення культивованих тканин є гетеротрофним, джерело вуглецю вводиться до складу середовища найчастіше у вигляді сахарози або глюкози (20-40 г/л). Але для деяких тканин оптимальним джерелом вуглецю служить фруктоза, манноза, галактоза, рибоза та інші.

Залізо вводиться у вигляді неорганічних солей (хлорид або сульфат заліза), солей органічних кислот (лимоннокисле залізо) або залізо в хелетованій формі в комплексі з ЕДТА.

Дуже важливу роль у складі живильного середовища відіграють регулятори росту (ауксини і цитокініни).

Ауксини: 1)  $\beta$  – індолілоцтова кислота (ІОК) у концентрації 1-30 мг/л; 2)  $\alpha$  – нафтилоцтова кислота (НОК) – 0,1-2 мг/л; 3) 2,4 – дихлорфеноксиоцтова кислота (2,4-Д) – менше 1 мг/л.

На початку другої світової війни був відкритий ауксин. Спочатку його одержали із верхівки колеоптилю (безколірного чохла), що захищає перший молодий листок кукурудзи. Це тоді була воістинну каторжна праця: за 10 днів вісім лаборанток німецького біохіміка-фанатика Ф.Кегля переробили 100 000 проростків і одержали в результаті кількість активної речовини, достатнє лише для встановлення кислої природи ауксину. Для того, щоб таким шляхом добути із колеоптилій кукурудзи 250 мг ауксину, лаборанткам потрібно було б пропрацювати, без перерви на сон і їжу, близько 400 років.

На щастя, через короткий відрізок часу був знайдений чисельне і доступне джерело ауксину. Ним виявилася людська сеча. Як встановили дотошні хіміки, у середньому кожний житель планети кожного дня може дати для потреб біохімії, фізіології сільського господарства приблизно 1-2 мг ауксину.

Під назвою ауксин об'єднаний цілий ряд речовин – регуляторів росту. Найважливіший із них одержав назву гетероауксину і являє собою  $\beta$  - індолілоцтову кислоту, або ІОК. ІОК у великій кількості утворюється мікроорганізмами – дріжджами, грибами і бактеріями.

Цитокініни: кінетин (0,001 – 10 мг/л), зеатин, бензиламінопурин (БАП), що проявляють більш високу активність, ніж кінетин, абсцизова кислота, гіббереллову кислоту.

При різноманітному співвідношенні ауксину і цитокініни можна направляти морфогенетичні процеси в бік каусогенезу, ембріогенезу, ризогенезу, утворення паростків. Так, наприклад., співвідношення А/Ц = 3/0,2 веде до розвитку каллусу, 3/0,02 – до ризогенезу із каллусу, 3/1 – розвитку паростків, 0/0,2 – не призводить до розвитку каллусу із експланту.

Іноді до живильного середовища додають рослинні екстракти та інші живильні речовини, що володіють активуючими ріст властивостями. Наприклад, кокосове молоко, картопляний, дріжджевий і кукурудзяний екстракти, гудролізат козеїну.

До складу середовищ як обов'язковий компонент входять вітаміни: (В1), піридоксин (В6), нікотинова кислота (РР), аскорбінова кислота (С), фолієва кислота, біотин, рибофлавін (В2) та ін.и др.

Після введення до середовища всіх компонентів доводять рН до певного рівня, в основному, до 5,5-6,0. Середовища готують рідкі і тверді (агаризованні). Середовища стерилізують автоклавируванням (протягом 20-25 хвилин при 1 атм. і  $T=25\text{ C}$ ); рідкі середовища, що містять речовини, які руйнуються при нагріванні, стерилізують фільтруванням через мембранні фільтри.

Середовища Мурасіге-Скуга (МС), Шенка-Хільдебрандта, Гамборга (В5), N6 – відносяться до найбільш вживаним у роботі з культурами клітин рослин. Не менш важливе значення мають фізичні фактори культивування: умови аерації, осмотичний тиск у клітинах, температурний фактор (для ферментів оптимум 24-27 C), умови освітлення.

Підбір середовища є основним фактором успішного проведення експерименту, так як деякі середовища характеризуються видоспецифічністю.

Культура ізолюваних клітин, тканин і органів рослин зводиться до трьох основних методів:

1) Одержання калусної тканини. Для індукціювання калусної тканини стерильні експланти (листя, черешки, гіпокотили та ін.) розміщують на живильне середовище. При цьому деференційованні клітини рослин під впливом індукторів клітинних ділень – ауксинів і цитокінінів, переходять у деференційний стан і поновлюють міриستمатичну активність. Після утворення калусу в стерильних умовах його відокремлюють і розташовують на новому живильному середовищі. Дану культуру калусної тканини можна підтримувати необмежено довгий час, періодично ділячи на фрагменти.

2) Клітинні суспензії. Рослинні суспензійні культури складаються із одиночних клітин і клітинних агрегатів, що ростуть в аеріруємому рідкому живильному середовищі. Основним способом одержання суспензійної структури є поміщення шматочка калусу або певної кількості гомогенної тканини в рідке середовище, що перемішується.

Оптимальною вважається калусна тканина пухкого типу. Звичайно тривалість пасажу складає 21-28 днів, популяція клітин при цьому складає  $10^6 - 5 \cdot 10^6$  клітин/мл. Концентрація клітин у мл суспензії, тобто щільність клітинної популяції – один із найважливіших показників клітинної системи в суспензії (визначається підрахунком у камері Горяєва).

3) Регенерація рослин. Одержання рослин-регенерантів із культивованих протопластів, клітин, тканин є найбільш складним завданням, що стоїть перед експериментатором.

При індукції органогенезу в культурах тканин розрізняють дві фази цього процесу: а) дедиференціація (утворення каллаусу) і б) особисто диференціація – формування зачатків органів.

Як правило, спонтанний або індукційований морфогенез спостерігається в недавно введеної в культуру тканини. У більшості випадків здатність до органогенезу втрачається при багаторазових пересадках калусу. При тривалому культивуванні змінюється число хромосом, що призводить до еуплоїдії, а не уплоїдії, виникають різноманітні хромосомні порушення.

Органогенез і регенерація рослин використовуються для клонування цінного матеріалу, для одержання великих популяцій рослин із однієї генетичної лінії. Органогенез гаплоїдних клітин, пилку або каллусів дозволяє одержати гаплоїдні рослини.

### **Лекція №13**

#### **Прикладні аспекти біотехнології рослин**

План:

1. Біотехнологія одержання вторинних метаболітів із використанням рослинних клітин-продуцентів.
2. Клональне мікророзмноження і оздоровлення рослин.
3. Збереження генофонду вищих рослин. Кріобанки.

#### **1. Біотехнологія одержання вторинних метаболітів з використанням клітин-продуцентів.**

Важливим напрямком, який інтенсивно розробляється за останні роки за допомогою методу культури тканин, є вивчення здатності рослинної клітини до синтезу *in vitro* різноманітних груп речовин вторинного обміну. Це має велике значення для вивчення біогенезу сполучення вторинного обміну і для управління цими процесами з метою одержання потрібної кількості речовин, що володіють різними корисними для людини властивостями.

Більшість із речовин вторинного походження широко використовуються в промисловості для визначення смаку різноманітних продуктів, у медицині – як важливі лікарські сполуки, в парфюмерній промисловості – у значенні легко летючих ароматичних домішок або як метаболіти, антиметаболіти, антибіотики, біологічно активні сполуки різного характеру дії і т.п. Тому в ряді випадків необхідно накопичити в рослині і одержати ці речовини у великій кількості, що дуже важко здійснити за допомогою звичайних методів.

Основними причинами, по яким культивування клітин рослин часто розглядають у значенні альтернативного шляху синтезу природних хімічних сполук, є:

- ізольованість від впливу різноманітних факторів навколишнього середовища, включаючи кліматичні умови, географічні і сезонні обмеження, а також пошкодження шкідниками;
- чіткість систем виробництва, що випускають необхідні продукти в намічені строки і в потрібній кількості, забезпечуючи таким чином, суворий контроль за забезпеченням ринку;
- більш високий вихід і якість продукції;
- зменшення площі ґрунту, що використовується під сільськогосподарськими культурами.

Світ рослин визначає благополуччя людства. Його біосинтеичні можливості великі: відомо близько  $2 \times 10^4$  речовин, що одержані із рослин. Число знову відкритих речовин зростає зі швидкістю близько 1600 на рік. Однак цікаво відмітити, що різноманітні речовини, синтезовані рослинами асоційовані з певними групами або родинами рослин. Так, наприклад, алкалоїд кодеїн, що одержують із *Paraver somniferum*, використовується в фармації як болезапокійлива речовина. А дігосин, що одержують із *Digitalis lanata*, використовується як тонізуючий серцеву діяльність засіб.

Культура клітин як джерело речовин рослинного походження.

Культуру клітин можна використати для одержання природних речовин рослинного походження чотирма основними способами:

- нові шляхи синтезу вже відомих речовин, наприклад, кодеїну, хініну, піретроїдів;
- синтез нових продуктів із тих рослин, які важко вирощувати або впроваджувати, наприклад, тебаїн із *Paraver bracteatum*;
- використання культури клітин як джерела зовсім нових речовин, наприклад, рутакультин із культур *Ruta*;
- використання культури клітин в значенні систем для біотрансформації: як самого процесу з одержанням кінцевого продукту, так і окремої ланки хімічного процесу, наприклад при синтезі дігосину.

Продукти, що одержують із культур клітин.

Серйозне використання культури клітин рослин як джерела промислового одержання продуктів природного синтезу, розпочалося в 1956 році працями Рутє і Нікеля. А 1974 рік став зворотнім у технології культивування клітин. У цей час значно виросло число повідомлень про синтез значної кількості специфічних і необхідних вторинних метаболітів у культурі.

Крім того, поширилося коло речовин, що одержують у культурі *in vitro* всіх типів, тобто калусної, органної і тканинної.

Нижче перераховані речовини, що одержуються в культурі клітини рослин: алкалоїди, алергени, антилейкомічні, антипухлинні, антивірусні і арматичні речовини, білки, вітаміни, смакові добавки, гормони, інсектициди, масла, наркотики, нуклеотиди, органічні кислоти, пігменти, сахара, ферменти, феноли і багато інших.

На ступінь накопичення вторинних метаболітів у культурах клітин рослин впливають такі фактори:

Зовнішні умови культивування: світло, температура, швидкість обертання посудини для культивування;

➤ внутрішні умови культивування: компоненти середовища, аерація і перемішування культури, рН середовища;

➤ Попередня обробка клітин перед культивуванням.

Створивши сприятливі умови культивування *in vitro* можна одержати вихід вторинного метаболіту рослин у кількості, що синтезує *in vivo*, а іноді й вище.

Для вивчення вторинних метаболітів рослин майже завжди використовують три основні типи культур *in vitro*. Це культура органів, каллусна (що звичайно росте на твердому середовищі) і суспензійна культури клітин.

Якісний і кількісний аналіз вторинних метаболітів завжди проводять як у культуральному середовищі, так і в клітинах, оскільки деякі метаболіти можуть екскретуватися із клітин у живильне середовище. Вихід метаболіту звичайно вимірюють масою продукту на одиницю маси клітин або об'єму середовища.

Однією із найбільш цікавих особливостей методу культури є можливість одержувати нові хімічні сполуки, що не спостерігалися у вихідній рослині. При культивуванні в клітинах можуть виникати ті біохімічні процеси, які відбувалися на більш ранніх етапах еволюції.

Зміна вторинного метаболізму у культурах клітин викликано різноманітними факторами. По-перше, відсутністю диференціювання тканини у деяких каллусних і суспензійних культурах. Наприклад, коріння каллуси *Atropa beladonna*, що диференціюються, можуть синтезувати тропанові алкалоїди, у той час як недиференційованні культури із того ж рослинного матеріалу не здатні їх синтезувати. Іноді знижений вихід вторинних метаболітів у культурах виявляли як наслідок органогенезу.

По-друге, біосинтетичний потенціал культур клітин, одержаних із різних частин рослин, очевидно, розрізняється, хоча, в цілому виникнення експланту не впливає на здатність клітинних і тканинних культур протягом довгого часу продукувати вторинний метаболіт.

Третім фактором може бути структурна перебудова геномів культивованих клітин, викликаючи таким чином, зміни вторинного метаболізму в цих клітинах.

Біотрансформація – інший спосіб ефективного використання синтетичної здатності рослинної клітини при промисловому виробництві хімічних сполук. Спектр можливих перетворень з використанням як клітин рослин, так і ізолюваних ферментів дуже великий і включає гідроліз, становлення, одержання гідроксильних форм, окислення, приєднання водню і т.п. (наприклад, гідроксилювання  $\beta$ -метилдигітоксину в  $\beta$ -метилдигітоксин).

## **2. Клональне мікрозмноження та оздоровлення рослин.**



Вивчення процесу експериментального морфогенезу *in vitro* на всіх рівнях організації від окремої клітини до верхівки пагона призвело до створення технології клонального мікророзмноження рослин, яка в ряді випадків уже стала комерційною.

Клональне мікророзмноження – використання техніки *in vitro* для швидкого одержання рослин, ідентичних вихідному. Перевагами мікроклонального розмноження рослин у порівнянні з традиційними методами є:

- 1) значно більш високі коефіцієнти розмноження, що розрахунково досягли  $10^5$ - $10^6$  мериклонів у рік, при 5-100 рослинах від одного, звичайно традиційно одержаних за цей термін;
- 2) мініатюризація процесу, що призводить до економії площ, зайнятих маточними рослинами й тими, що розмножуються;
- 3) оздоровлення посадкового матеріалу від хвороб рослин
- 4) перевага, що в умовах *in vitro* часто розмножуються й укорінюються ті рослини, які зовсім не розмножуються або погано звичайними способами;
- 5) одержання, у залежності від цілей дослідження, як генетично однорідного матеріалу, так і соматоклональних варіантів;
- 6) можливість відбирати рослинний матеріал з ознаками, що цікавлять дослідника;
- 7) можливість вести розмноження рослин протягом всього року.

Процес клонального мікророзмноження можна поділити на декілька етапів:

- 1) вибір рослини-донора, ізолювання і стерилізація експланту, створення умов для його росту на живильному середовищі *in vitro*;
- 2) власне розмноження шляхом: а) стимуляції розвитку всіх пазушних бруньок експланту в результаті подавлення апікального домінування як первинного, так і всіх пагонів, що знову виникають; б) мікрочерешкування пагона, що зберігає апікальне домінування; в) стимуляції утворення мікробульб і мікроцибулин; г) індукції утворення адвентивних бруньок тканинами листя, стебла, чешуками і донцем цибулин і т.п.;
- 3) укорінення розмножених пагонів і адаптації рослин із пробірки до умов *in vitro*;
- 4) вирощування витягнутих із культуральних посудин рослин в умовах теплиці у ґрунті або у штучному субстраті. Підготовка до реалізації або висаджування в поле.

У цілому метод мікроклонального розмноження оснований на індукційованому цитокінінами розростанні верхівок і пазух меристем, кожна з яких дає початок осередку пагонів. Після формування осередку його поділяють на більш мілкі групи пагонів, переносять на свіже середовище, і процес повторюється.

Швидкість мікроклонального розмноження варіює в залежності від виду рослини, але часто можливо одержувати із одиної бруньки до декількох мільйонів рослин на рік.

Основними факторами, що можуть впливати на процес мікроклонального розмноження, є тип експланту, склад живильних середовищ і умови культивування.

Вихідним матеріалом можуть слугувати верхівки і пазухи меристеми стебла, молоде листя, елементи суцвіття і квітки, цибулин і бульб цибулин. Ідеальним матеріалом для одержання більшості пагонів є апікальні і пазушні бруньки здорових рослин і тих, що активно ростуть.

У значенні живильних середовищ у більшості випадків використовують різноманітні модифікації середовища Мурасиге-Скуга (МС), хоча деякі групи рослин можуть мати індивідуальні потреби у живильних речовинах культури, можуть рости на агаризованих або на рідких живильних середовищах, на мостиках із фільтрувального паперу.

У залежності від комбінації умов культивування вихідної тканини можна викликати розвиток пазушних клітин, ідуціювати появу адвентивних бруньок або стеблевих пагонів безпосередньо із клітин експланту або із каллусу.

Для індукції багатьох пагонів *in vitro* у значенні експланту звичайно використовують бруньки верхівок і пазух. У той же час широке застосування знайшла культура меристем. Недивлячись на деякі труднощі в роботі (необхідність маніпулювання мініатюрними експлантами, низький процент виживання *in vitro*), культури апікальних меристем широко використовуються для створення рослинного матеріалу, вільного від патогенів.

У ряді випадків фективним способом розмноження *in vitro* може бути соматичний ембріогенез, тобто процес формування зародкоподібних культур (ембріодів), що розвиваються із соматичної клітини і здатних давати початок всій рослині. Соматичний ембріогенез може бути індукційованим двома різними шляхами: прямим і непрямим. У ході прямого ембріогенезу соматичні зародки формуються безпосередньо у тканині експланту без проліферації каллусу, рослини, що таким чином сформувалися ідентичні батьківській формі. Непрямий шлях соматичного ембріогенезу пов'язаний з формуванням ембріодів із дедиференційованих каллусних клітин.

Серед рослин, що ргенерували шляхом непрямого соматичного ембріогенезу, нерідко зустрічаються форми, які відрізняються від початкових. Виникаючи таким чином соматоклональні варіанти можуть бути використані у подальшій селекційній роботі.

Для використання мікроклонального розмноження придатні експланти листа у пасльонових і краснокочанної капусти, у цвітної капусти і нарцису – частинки суцвіть, у лілейних, ірисових і амариллісових – експланти із цибулин, бульб, листя суцвіть і насінних зачатків, у глоксинії – висічка із листя і цвітніжок, у герані при одержанні диплоїдних рослин – експланти пиляків.

Виникає і ряд технічних труднощів:

- 1) більшість рослин продукують зайву кількість фенольних речовин, продукти окислення яких викликають потемніння тканини і культурального середовища і часто затримують ріст;
- 2) виникнення “скловидності” (витрифікації або “вбирання води”). Іноді розвиваються розбухші, скривлені листя, які безпороготно стають прозорими і некротичними, що може призвести до загибелі культури;
- 3) бактеріальне зараження.

Області застосування клонального мікророзмноження різноманітні і мають тенденцію до розширення.

- Створення потрібної для селекціонера кількості копій унікальних генотипів (ліній, гібридів, мутантів, трансгенних рослин);
- Масове одержання оздоровленого посадкового матеріалу;
- Економічно вигідне швидке розмноження у культурі тканин цінних селекційних сортів квітів (орхідей, агав, бегоній, хризантем, цекламену, лілій, нарицису та ін.);
- Новою областю застосування клонірування у стерильному середовищі верхівок пагонів та інших експлантів стало розмноження порід чагарників, плодових культур і ананасу.

Одержання безвірусного посадкового матеріалу.

Невеликий розмір експланту, що застосовується для клонального мікророзмноження, поверхнева стерилізація його, асептичне перенесення на живильне середовище і субкультивування в умовах, які виключають інфіціювання, призводять до оздоровлення одержаних рослин від нематод, грибних і бактеріальних патогенів. Але цього недостатньо для оздоровлення створеного клональним мікророзмноженням посадкового матеріалу від вірусів, мікоплазм і т. п.

Найбільш ефективний для досягнення цієї мети спосіб – культивування меристем стебла або органів стеблевого походження. У важких випадках метод культури меристем доповнюють термотерапією.

Зона, вільна від вірусних частинок, дуже різноманітна для різних вірусів. Це залежить також від виду і сорту рослини. Так, при вичленовуванні під біокулярним мікроскопом апікальної мерисистеми картоплі величиною 0,2 мм (конус наростання пексу з одним листовим зачатком) серед одержаних рослин тільки 10% були вільні від Х-вірусу, але 70% від Y-вірусу картоплі.

Оздоровленні застосуванням мерисистеми культури рослини розмножують далі звичайним методом клонального мікророзмноження. Винятком є техніка мікропрививок, які застосовують для оздоровлення цитрусових рослин, персика, іноді яблуні.

### **3. Збереження генофонду вищих рослин. Кріобанки.**

Важливим внеском у практику сільського господарства стала технологія збереження у культурі *in vitro* генофонду, який використовується у селекції, або у вигляді ростучих колекцій (пробірочних рослин, що періодично

субклонується, оздоровлених методом культури меристем) або у вигляді клітинних і меристемних колекцій, які зберігаються після глибокого заморожування у кріобанках, у рідкому азоті ( $T = -196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Мета колекцій і банків – забезпечити селекціонера у будь-який час генотипом, який несе шукані ознаки, потрібні для його роботи.

Колекції видів і сортів, що ростуть, у тому числі й старих селекційних сортів, застосовують для зберігання генофонду не тільки рослин, які розмножуються вегетативно, але й тих, що розмножуються насінням. Останнє важливе для підтримки маркірувальних ізогенних ліній і ліній з ЦМС, гетерозисних гібридів, унікальних генотипів, властивості яких будуть утрачені при статевому розмноженні.

Періодичне субкультивування трудомістке і здорожує технологію. Період без пересадок (субклонування можна видалити до 6-24 місяців, помістивши колекції в умови низьких позитивних температур ( $1-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) при інтенсивності освітлення 4000-5000 лк. Вибір температури визначається холостійкістю виду рослини. Так, для депонування колекції картоплі, використовувалася температура  $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ , яблуні –  $1\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Ріст рослин можна також затримати додаванням до живильного середовища осмотиків – манніту і сорбіту, підвищенням концентрації сахарози або внесенням у живильне середовище речовин, що затримують ріст (гідразид малеїнової кислоти, абсцизова кислота, 2,2-метилгідразид янтарної кислоти). Останнім часом для затримки росту колекції почали застосовувати такі методи, як зниження атмосферного тиску (до  $0.04\text{ мм. рт.ст.}$ ) і гіпоксія.

Кріозбереження генофонду рослинного матеріалу в рідкому азоті є більш удосконаленим методом у порівнянні з описаними вище. Він гарантує стабільне збереження генетичних характеристик об'єктів практично протягом будь-якого строку. Його можна застосовувати для збереження генофонду віз ізольованих протопластів до зародків і насіння. Добре організована робота кріобанку менш трудомістка, ніж підтримання і депонування колекцій, що ростуть. Метод дозволяє зберігати без змін мутантні, гібридні, трансформовані здатні до морфогенезу клітини різних рослин, меристеми і кінчики пагонів, зиготичні і соматичні зародки, пилки, насіння, у тому числі й ті, що не виносять збезводнення.

Метод заморожування і зберігання в рідкому азоті меристем розроблений для багатьох рослин, наприклад, для персика, яблуні, полуниці, арахісу, рапсу.

Найбільш проста техніка кріозбереження пилку. Підсушений пилки розміщують у запечатані пластмасові ампули, що використовуються при зберіганні, і прямо переносять в рідкий азот. Пилки п'яти випробованих сортів картоплі, розмножена після 1-3 років зберігання у рідкому азоті, мала високу життєздатність, фертильність і була ефективно використана у схрещуваннях. Кріобанк пилки робить можливим схрещування сортів, що розрізняються за часом цвітіння, які характеризуються короткочасністю фази збереження пилкової фертильності або варіабельності її властивостей під впливом несприятливих умов.

Значно більш складна технологія кріозбереження культивованих клітин, ізолюваних меристем, кінчиків пагонів, зародків. Труднощі пов'язані з необхідністю захистити заморожувані клітини і тканини від осмотичного струсу і механічної руйнації структур у результаті утворення і росту кристалів льоду, а також забезпечити життєздатність їх при відтаванні і рекультивації.

Кріозбереження у рідкому азоту дозволяє досягти потрібного результату, однак у наш час ці методи недостатньо розвинуті для універсального застосування.

Методи кріозбереження в цілому включають декілька етапів: спочатку орган, який підлягає заморожуванню, ізолюють, потім клітини обробляють кріопротектором, що допомагає збереженню складових частин органу при переведенні на низькі температури. Після цього орган проводять через етап заморожування, який може здійснюватися при різноманітних швидкостях, що контролюються, іноді до температури рідкого азоту ( $-196^{\circ}\text{C}$ ). Далі орган кладуть на збереження до морозильної камери з рідким азотом. Одним із найбільш критичних факторів, що впливає на виживання клітин у процесі заморожування до  $-196^{\circ}\text{C}$ , є вміст води, оскільки утворення льоду – одна із головних причин невідтворюваних ушкоджень клітин.

Кріопротектори – це речовини, які на етапі заморожування повинні зменшувати ушкодження клітин від осмотичного і механічного струсу. Їх відбирають за принципом найменшої токсичності і оптимального ефекту. Це речовини, що проникають у клітини – диметилсульфоксид або гліцерин, або високомолекулярні речовини, які не проникають – декстран, поліетиленгліколь, полівініл піролідон. Концентрацію і час дії оптимізують емпірично у залежності від об'єкту.

## Лекція 15

### **Тема: Біотехнологія виробництва тварин з використанням методів трансплантації і кріоконсервації**

Сучасний стан сільськогосподарської науки, а саме біотехнології відтворення тварин, передбачає збільшення поголів'я тварин з високим генетичним потенціалом. Підвищення продуктивності тварин, тісного взаємозв'язку і взаємозбагачення теорії і практики. Використовуючи методи трансплантації, кріоконсервації сперми та імбріонів, мікрохірургічний розподіл зародків, можна одержувати більшу кількість потомства з господарсько-корисними ознаками.

У 1890 р. у Кембриджському університеті Вольтером Хілом відчиситопородної ангорської крольчихи було одержано два 4-клітинних ембріони і той час перенесено в матку крольчихи бельгійської породи, покритою самцем тієї ж породи. Через місяць вона народила четверо бельгійських і двоє довгошерстних ангорських крільчат. З часу цих подій ми відраховуємо еру трансплантації ембріонів.

У СРСР праці з трансплантацій ембріонів розпочалися у 1936 році на кроликах у ВІЖе, а у кінці 40-х на початку 50-х років у країні був досягнутий великий успіх у трансплантації ембріонів сільськогосподарських тварин: у березні 1950 року у Полтаві у Всесоюзному НДІ свинарства вперше у світі одержані А.В.Квасницьким поросята-трансплантати і у тому ж році у Всесоюзному НДІ вівчарства і козівництва А.Й.Лопиріним і Н.В.Логіною перші ягнята-трансплантати.

Перше теляко-трансплантат було одержане при хірургічній трансплантації у США в 1951 р., а в 1964 р. там же родилося перше у світі теля після безкровної трансплантації. Це відзначило новий поворот у розвитку подальших подій, бо нехірургічний метод значно спростив і здешевив одержання трансплантатів і дозволив перейти до практичного його використання у скотарстві на рівні з штучним заплідненням.

Саме ця обставина і стало поштовхом до нового періоду небувало бурхливого розвитку трансплантації ембріонів сільськогосподарських тварин, тоді як лабораторні стали використовуватися, голочним чином, лише у значенні дешевої моделі для обробки основних методичних прийомів.

Метод трансплантації ембріонів має велику цінність для здійснення таких генетичних програм, як прискорене одержання цінних родин, лінії типів тварин у звичайних стадах (чередах), розповсюдження у породі мутантних генів (наприклад, стійкість до будь-якого захворювання) або, навпаки, вияв носіїв рецесивних генів і своєчасне усунення (вибраковка) із стада (череда).

Так детальний аналіз експериментальних даних вітчизняних і зарубіжних дослідників незаперечно свідчить про доцільність одержання двойні у корів не

тільки м'ясного, але й молочного направлення. Доведено, що це спадково обумовлена ознака, прояв якої залежить від дії пари рецесивних генів, і що можна проводити успішну селекцію на багатоплідні отелення. Однак тварини, що систематично приносять двойню, зустрічаються рідко, тому і темпи такої селекції не можуть бути високими. У той же час прискорене розмноження потомства від таких тварин за допомогою стимуляції, суперовуляції і трансплантації ембріонів може швидко підняти генетичний потенціал і дозволить сформувати стада багатоплідних корів. Одержання двойні у корів методом трансплантації ембріонів має ще й ту перевагу, що вона попереджує ембріональну смертність, яка дуже часто зустрічається при розвитку двох плодів у корови в одному маточному розі.

Великою культурною та історичною цінністю людства є існуючі у природі дикі й домашні тварини, збереженням яких сьогодні турбується цивілізований світ. Зникають або знаходяться під загрозою зникнення не тільки види диких тварин, але й багаточисельні породи сільськогосподарських. Виникає це з різних причин: змінюється попит на продукцію і створюються породи нової направленості, не вистачає ресурсів на утримання низькорентабельних рідких порід, не рідко диктує свої умови мода. В останні десятиріччя роботи у тваринництві по удосконаленню існуючих порід шляхом полігібридного схрещування розвернулися настільки широко, що вже погрожують збереженню первинних порід, більшість з яких стали досить малочисельними.

Вважаю, однак, що збереження рідких порід у вигляді невеликих популяцій – захід, який дорого коштує і притому може мати наслідки нарощування інбридингу та явища дрейфагенів. Метод трансплантації ембріонів відкрив цілком нові перспективи. Його розвиток повів за собою розробку методу глибокого заморожування ембріонів, і тепер використання цієї технології визнається кращим варіантом збереження генетичних ресурсів поряд із заморожуванням сперми виробників.

Трансплантація ембріонів – перенесення їх із репродуктивного тракту самки-донора в репродуктивний тракт самки-реципієнта (при названій матері) – базується на здатності преімплантаційного ембріону деякий час зберігати життєздатність поза материнським організмом і на явищі толерантності останнього до зародку, який розвивається в ньому.

Імунологічна толерантність ембріонів і матки настільки велика, що у них можуть нормально розвиватися не тільки особисті ембріони, які несуть чужі для матері батьківські антигени, але припускають міжпородний і іноді навіть міжвидовий обмін ембріонами між самками.

Трансплантація включає одержання ембріонів, їх оцінку, зберігання (і транспортування), підготовку синхронних за фазами статевого циклу донорів і реципієнтів і введення ембріонів в репродуктивний тракт реципієнтів.

Для викликання більшого росту і дозрівання фолікулів у корів і телиць використовуються різноманітні гормональні препарати, що володіють фолікулостимулюючою активністю. Одержувати ембріони від донора можна або хірургічним, або нехірургічним шляхом. Останній має ту перевагу, що дозволяє використовувати донора багаторазово, майже без зниження його відтворюючої здатності

Біологічна якість ембріонів, що трансплантуються має особливе значення, бо якщо воно низьке, то при інших ідеальних умовах результат пересадки буде нульовим.

Ембріоселекція – це новий напрямок сільськогосподарської діяльності біології, що виникло і розвивається у зв'язку з трансплантацією ембріонів. Щорічно у світі пересажується багато тисяч ембріонів великої рогатої худоби, однак вихід телят трансплантатів залишається мальчисельним. На сьогоднішній день 60% успішних пересадок вважається високим показником, якого досягли лише деякі зарубіжні країни, і навіть при цьому вартість одного теляти трансплантанту складає, за різними даними, у середньому близько 1,5 тисячі доларів.



Серед факторів, що визначають результативність трансплантації та її економічний ефект, на перше місце потрібно поставити якість ембріонів. Оцінюють і відбирають ембріони за морфологічними ознаками, за відповідністю розвитку фактичного віку ембріонів, відношення до тест-забарвникам, інтенсивності обміну речовин і за здатністю досягає відповідної стадії розвитку в культурі *in vitro*. Вищим критерієм життєздатності ембріону є народження розвинутого з нього в результаті трансплантації нормального приплоду. Саме цим показником і користуються постійно для визначення об'єктивності того іншого методу оцінки ембріонів.

Зберігання ембріонів при субнулевих температурах, очевидно, найбільш перспективний метод, так як він забезпечує практично необмежений термін їх зберігання, а тим самим можливість створення банків ембріонів і гамет для збереження генофонду домашніх і диких тварин. Крім того, наявність банків ембріонів знімає необхідність штучної синхронізації донорів і реципієнтів, так як у розташуванні дослідника надходять ембріони будь-яких стадій розвитку і відкривається можливість виключно точного вибору ступеня синхронності пересадок, який вимагається у відповідності з видом тварин. Врешті, значно усрощується транспортування ембріонів.

Заморожування ембріонів та яйцеклітин ссавців – молодий розділ кріобіології, що нараховує приблизно більше 15 років. Уперше одержана виживаємість мишачих ембріонів після циклу заморожування – відтаювання у 1972 році. Ці ж ембріони викорисовувалися як основна модель в експериментах по вивчення факторів, які визначають виживаємість ембріонів ссавців протягом охолодження, заморожування, зберігання і відтаювання. Першу вдалу пересадку 12-денного заморожено-відтаянного ембріону корови здійснили у 1973 році. До цього часу метод заморожування і довгого зберігання розроблений для вівців, крис, кроликів, кіз і ряду інших видів ссавців. Способи кріоконсервації ембріонів різноманітних видів розрізняються, в основному, значеннями оптимальних швидкостей зниження температури і віком зародку, найбільш устійким до дії низьких температур.

До розробки методу трансплантації ембріонів прогрес експериментальної біології надзвичайно утримувався тим, що ембріони ссавців удається культивувати поза організмом тільки на преімплантаційних стадіях розвитку. Трансплантація відкрила можливість постнатального вивчення результатів направленного втручання у хід ембріогенезу. Вперше дослідник побачив кінцевий результат реконструкції ембріону: народження життєздатних монозиготних близнюків, химер і трансгенних тварин.

Саме у цьому ми бачимо основну цінність і головне призначення методу трансплантації ембріонів, у цьому і його перспектива: без нього не можна довести до кінцевого результату, що використовується в народному господарстві, досягнення ембріоінженерії і генетичної інженерії. І чим досконаліше буде метод трансплантації ембріонів, чим надійніше і технічно простіше він стане, тим краще буде результат.

Трансплантація ембріонів виявила великий вплив на розвиток інших методів експериментальної біології: кріоконсервації ембріонів, культури їх *in vitro*, визначення статі в ембріоні доімплантаційних стадій розвитку, культури і запліднення *in vitro* ооцитів.

Успіхи наукових досліджень невід'ємно пов'язані з їх практичною віддачею, і у цьому плані важливо вчасно помітити і правильно оцінити можливий економічний ефект у перспективі. Трансплантація ембріонів довгий час не виходила за рамки наукових досліджень, але коли одержала визнання перспективних її розробок для підйому зотехнічної науки на якісно новий ступінь, вона швидко прийняла комерційний характер у багатьох країнах. Зараз, судячи з літературних даних, вартість теляти, одержанного методом трансплантації, коливається від 500 до 3000 доларів, а вартість теличок від донорів корів-редордистів досягає 30 тис., а бичків – 130 тис. доларів.

Майбутні трансплантації ембріонів також нерозривно пов'язані з культурою і заплідненням ооцитів *in vitro* – тою базою, яка звільняє метод від утримуючої його розмах у залежності від експериментального матеріалу. Від

успіху трансплантації залежить майбутнє клонірування і генної інженерії, до розгляду суті і можливості яких ми тепер перейдемо.

Поняття реконструкції ембріонів охоплює широкий діапазон експериментальних робіт в області ембріології, пов'язаних з корінною переробкою їх фенотипу або генотипу. Сюди відносяться багаточисельні праці по з'ясуванню механізмів диференціювання клітин, контролю темпів їх дріблення, виникнення клітинної полярності в ембріоні та ін. З реконструкцією ембріону пов'язаний експериментальний аналіз впливу різноманітних екзогенних факторів фізичної і хімічної природи на просторову організацію його дріблення. Піком роботи з конструкції ембріону є ювелірні маніпуляції з ним при введенні в яйцеклітину або зиготу чужерідних ембріональних або ракових клітин, ядер соматичних клітин, білкових фракцій, ДНК і її фрагментів (генів).

Реконструювати ембріон можна також шляхом об'єднання 2 вихідних екземплярів одного або різних видів у єдиний мозаїчний організм (аллофенні тварини або химери). Можливий і прямо протилежний шлях: одержання декількох організмів з ідентичним генотипів шляхом розподілу ембріону на декілька рівних частин, що розвиваються у багатозиготних близнюків (ембріонні клони).

Клон – це група генетично ідентичних клітин або організмів, що розвиваються вегетативним шляхом у результаті ділення єдиної клітини – попередника. Це визначення може бути прийнято з тією обмовкою, що при одержанні ембріональних клонів за методом розподілу на частини зиготи, яка дробиться, ми все ж таки маємо справу з продуктом злиття гамет, отже, нема підстав стверджувати, що це вегетативне розмноження у звичайному розумінні.

Спочатку клони були одержані на рослинних об'єктах. З метою клонірування будь-якої рослини його тканина попередньо дезагрегує за допомогою протеолітичних ферментів і потім проводять посів клітинної суспензії на живильний субстрат з наступним виділенням одиночних клітин, що дають початок клонам. Аналогічні прийоми використовують і для

одержання клітинних клонів тваринних тканин, із яких на відміну від рослинних клонів, неможливо виростити організм. Для одержання генетично однорідних організмів тварин шляхом клонування обов'язковим є використанням жіночої гаметі – яйцеклітини (як мінімум її цитоплазму) або ж ембріону до імплантаційних стадій розвитку.

Метод пересадки ядер соматичних клітин в енукейованні яйцеклітини був уперше розроблений у 1952 році на амфібіях. Здійснювався він у 4 етапи: механічна активація незапліднених яєць уколом скляної голки, мікрохірургічна енукліація. Дисоціація клітин ембріону-донора або тканини дорослого організму та ін'єкція ядер в яйце з попередньою руйнацією оболонки соматичної клітини-донора шляхом піпеттування. Протягом багатьох років метод успішно використовувався ембріологами для визначення здатності ядер різноманітних клітин стимулювати розвиток зародка. Удосконаливши методику активації та енукліації яйцеклітин видатний англійський ембріолог Д.Гордон у 1961 році вперше в історії одержав клон статевозрілих хребетних тварин шляхом пересадки ядер одного пуголовка до багаточисельних енуклійованні яйцеклітини африканської шпоркової жаби. Всі особі (особини) клону були однієї статі, однієї розцвітки шкіри і несли один генетичний маркер. Розвиток нормальних, здатних до розмноження, дорослих тварин виявилось краще, як вважає Д.Гордон, доказом наявності статевого комплексу генів у пересажених ядрах. Одночасно це переконливий доказ здатності цитоплазми яйцеклітини, що активує.

Реконструювання клітин на основі злиття клітинних фрагментів – нове направлення експериментальної біології, засноване на одержанні клітинних фрагментів ядра і цитоплазми та їх наступним об'єднанням в єдину життєздатну клітину. На базі цього методу виконані дослідження механізму пертеногенетичного розвитку яєць мишей. Цей метод можна застосовувати і для одержання ембріональних клонів, які поки що обмежуються монозиготними парами.

Ідентичні двійні, трійні або четвертні, які одержані розподілом одного вихідного ембріону на відповідне число частин, справедливо можуть бути названі клонами, хоча і багаточисельними, бо вони представляють популяцію генетично однорідних організмів, що розвинулися із єдиної клітини попередниці – зіготи. Перший у світі ембріональний клон телят був одержаний у 1981 році S.M. Willadsen & C. Polge. Ембріони на стадії восьми бластомерів були зібрані хірургічним шляхом від телиць на третій день естрального циклу. Частини зародків на стадії ранньої бластоцисти були трансплантовані в матку телиць-реципієнтів на сьомий день циклу. У наслідок цього народилася 1 монозиготна трійня і 2 пари монозиготних двойнят телят. У наш час поліковані (пораховані) монозиготні пари лоша́т поні, кіз, свиней, вівців.

Ембріональні клони перш за все є безцінним матеріалом для біологічних досліджень, так як вони підвищують до остаточної точності і достовірності результати досліджень типу контроль – досвід. Разом з тим вирішується проблема утримання широких груп аналогів, що може мати відчутний економічний ефект, особливо коли мова йде про сільськогосподарських тварин. Однояйцеві близнюки потрібні для генетичних досліджень, наприклад, для оцінки змін фенотипу, обомовлених факторами зовнішнього середовища і генетичними перебудовами, для дослідження явищ імбрідингу і гетерозису, виявлення рецесивних летальних генів. Для фізіолога надзвичайний інтерес представляє дослідження різновікових ідентичних близнюків дотирування одержання яких легко досягнуто при глибокому заморожуванні однієї половини ембріону і наступних його трансплантацій реципієнту в потрібний час. Ембріональне клонірування відкриває зовсім нові можливості комплексного пренатального вивчення біохімічних і фізіологічних особливостей потенціальних потомків у зв'язку з їх каріотипом, дозволяє вивчити вплив генетичних аномалій на ранній ембріональний і постнатальний розвиток. Воно прямо пов'язане з інтенсивно розробленими в останні роки способами раннього визначення статі ембріону та їх сортирування для наступної трансплантації. Отже, цей методичний прийом попереджає

утворення фримартинів, що істотно знижують результативність одержання двійні у корів. Трансплантацією ембріональних клонів можна значно прискорити розмноження мутантів і трангенних тварин, ніж звичайної селекції. Існує ще й інша можливість використання ембріональних клонів у практиці тваринництва, яка визнається сьогодні більшою кількістю дослідників. Це виділення із клону одиночного екземпляру і доведення його до дорослого стану з метою визначення господарської цінності при одночасному заморожуванні для тривалого зберігання всіх інших членів клонів – ембріонів. При цьому передбачається, що буде можливим попереднє подальше розмноження збережених членів клону трансплантацією ядер їх клітин в енукейованні яйцеклітини. При цьому, ембріони будуть розморожені, розмножені і трансплантовані лише у тому випадку, якщо член клону, який перевіряється, виявиться високоцінним за дослідженням показника. Пряме практичне значення має і попереднє сортирування ембріону за статтю при трансплантації, бо вона дозволяє одержувати бажане потомство у залежності від мети селекції і комерційного попиту.

Генетичні химери – продукт об'єднання декількох різних ембріонів, тому вони володіють складним комбінованим генетипом. Генетичних химер як тих, що несуть клітини всіх батьківських фенотипів називають також аллофенними. Прикладом химер єдиного виникнення є фримартини – безплідні телиці із різностатевих двійнят у великої рогатої худоби, гетерогенні зо антигенами і клітинах крові. Існує точка зору, що генетичні химери можуть утворюватися на дуже ранніх стадіях ембріогенезу внаслідок паталогії запліднення або спонтанного злиття ембріонів, які скинули зону пелюциду. Для всіх химер природного походження характерний химеризм лише у межах одного-двох видів тканин, тоді як у штучно створених химер всі тканини є найціннішим об'єктом біології розвитку. На них вивчають процеси ембріональної перебудови зародка, що складається із клітин з різним генотипом, часто при цьому використовується один нормальний. Інший мутантний генотипи. Останні дозволяють вивчити не тільки механізм і супінь

прояву генетичного ефекту окремих мутантних генів, але й з'ясувати число клонів, що формують різноманітні тканини та органи. Для імунологів химери представляють інтерес своєю толерантністю, пов'язаною з тією обставиною, що об'єднання чужерідних клітин виникає до диференціювання імунної системи. Тисячі аллофенних мишей, які були одержані за останні 25 років у різних лабораторіях, дозволили вивчити багато питань механізму клітинного розвитку і походження окремих тканин, диференціювання статі, імунологічної взаємодії у розвитку, причин високої ембріональної смертності партеногенетичних особень, механізму імплантації та ін. На сьогодні одержано внутрішньовидові і міжвидові химери не тільки лабораторних тварин – мишей, хом'яків, крис, але й с/г – корів, кіз, вівців.

Генетична інженерія – це новий розділ молекулярної генетики, який виник у 70-х роках ХХ ст. у результаті розробки методів виділення, очистки та синтезу окремих генів, а також переносу їх із однієї генетичної системи до іншої. Під генетичною системою у даному випадку мають на увазі будь-який вид живих організмів, що володіє специфічним набором генів. Генетична інженерія – це реконструкція спадковості живих організмів для одержання нових форм, що володіють наперед запрограмованими ознаками, з використанням методів гібридизації молекул спадковості. При цьому не має ніякого значення еволюційна відділеність видів.

