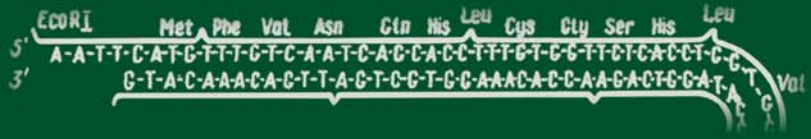
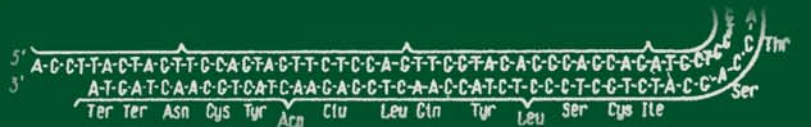
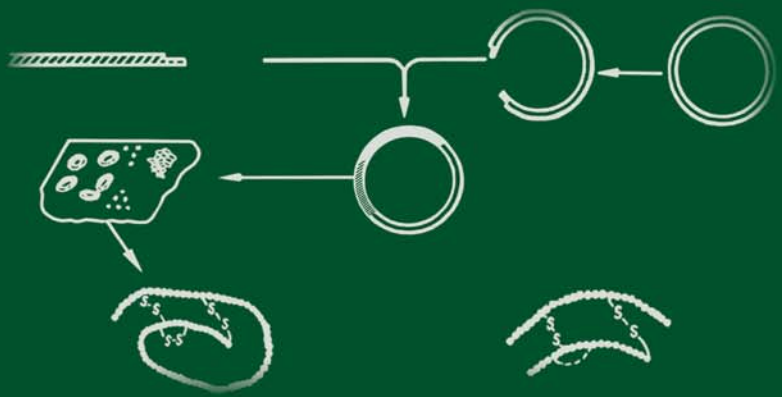


Біотехнологія





Фірма «ІНКОС»

БІОТЕХНОЛОГІЯ

За редакцією доктора біологічних наук,
академіка УААН В.Г. ГЕРАСИМЕНКА

Підручник

Затверджено Міністерством аграрної політики України
як підручник для підготовки спеціалістів
в аграрних вищих навчальних закладах

Київ
«Фірма «ІНКОС»
2006

ББК 24.2я73
УДК 547(075.8)
Г 37

Затверджено Міністерством аграрної політики України як підручник для підготовки спеціалістів із спеціальностей «Біотехнологія виробництва і переробки продукції тваринництва» та «Ветеринарна медицина» в аграрних вищих навчальних закладах 3-4 рівнів акредитації (лист від 5.07.2005 р. № 18-1-1-13/836)

Автори: *В.Г. Герасименко,* д-р біол. наук, проф., засл. діяч науки і техніки України, академік УААН*; М.О. Герасименко,* канд. с.-х. наук, ст. наук. співроб., доц; *М.І. Цвіліховський,* д-р біол. наук, проф., чл.-кор. УААН; *І.Я. Коцюмбас,* д-р вет. наук, проф.; *М.О. Захаренко,* д-р біол. наук, проф., Заслужений прац. освіти України, *А.Ф. Ображей,* канд. ветер. наук, ст. наук. співроб., чл.-кор. УААН; *А.М. Головко,* д-р ветер. наук, проф., чл.-кор. УААН.

За редакцією В.Г. Герасименка

Рецензенти: *Б.Т. Стегній,* д-р ветер. наук, проф., чл.-кор. УААН (Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини УААН, м. Харків);
В.А. Яблонський, д-р біол. наук, проф., чл.-кор. УААН (Національний аграрний університет, м. Київ)

Г 37 **Біотехнологія**: Підручник / В.Г. Герасименко, М.О. Герасименко, М.І. Цвіліховський та ін.; Під общ. ред. В.Г. Герасименка. — К.: Фірма «ІНКОС», 2006. — 647 с.

ISBN 966-8347-34-X

Підручник складається із двох частин — загальної біотехнології і спеціальних біотехнологій. Загальна біотехнологія включає розділи «Основи молекулярної біології», «Клітинна інженерія» та «Основи генетичної інженерії», які є теоретичним підґрунтям біотехнологій, що розробляються, уже розроблені і постійно удосконалюються для тваринництва, ветеринарної медицини і захисту навколишнього середовища.

Кожний із 24 розділів підручника містить контрольні питання для самоперевірки знань, а викладений в них матеріал скерований на підготовку конкурентоспроможних фахівців. В підручнику є іменний, предметний покажчики та словник термінів.

Висловлюємо щиру вдячність завідувачу сектору Інституту ветеринарної медицини УААН (м. Київ) Дерябіну О.М. за надану допомогу при оформленні розділу підручника «ДНК-вакцини».

© Герасименко В.Г., Герасименко М.О., Цвіліховський М.І., КоцюмбасІ.Я., Вербицький П.І., Захаренко М.О., Ображей А.Ф., Головко А.М., 2006

ISBN 966-8347-34-X

© Фірма «ІНКОС», 2006
© Художнє оформлення Фірма «ІНКОС», 2006

ЗМІСТ

Вступ....9

ЧАСТИНА І. ЗАГАЛЬНА БІОТЕХНОЛОГІЯ

Розділ 1. **Біотехнологія — наукова дисципліна**....15
1.1. Предмет біотехнології, історія розвитку....15
1.2. Біологічні об'єкти і методи біотехнології....17
1.3. Мета і завдання біотехнології....21
Розділ 2. **Системи GLP і GMP щодо якості біотехнологічних продуктів**....23
2.1. Система GLP....23
2.2. Система GMP....25
Контрольні питання....28
Розділ 3. **Основи молекулярної біології**....29
3.1. Нуклеїнові кислоти....29
3.1.1. Хімічний склад нуклеїнових кислот....29
3.1.2. Структура нуклеїнових кислот....35
3.2. Біосинтез білка і його регуляція....58
3.2.1. Генетичний код....58
3.2.2. Етапи біосинтезу білка....65
3.2.3. Регуляція синтезу білка....78
Контрольні питання....81
Розділ 4. **Клітинна інженерія**....84
4.1. Культура еукаріотичних клітин....84
4.2. Біотехнології гібридизації соматичних клітин....89
4.3. Біотехнологія трансплантації ядер....96
4.4. Біотехнологія перенесення генів у соматичні клітини за допомогою метафазних хромосом....106
4.5. Біотехнологія перенесення генів у еукаріотичні клітини за допомогою ДНК (ДНК технологія)....112
4.6. Введення генів. Біотехнологія трансформації статевих ембріональних клітин чужорідними генами....119
Контрольні питання....124
Розділ 5. **Основи генетичної інженерії**....127
5.1. Біотехнологія конструювання рекомбінантних ДНК....127
5.1.1. Одержання фрагментів ДНК....128
5.1.2. Плазміди і віруси як донорні переносники генетичної інформації....130
5.1.3. Конструювання рекомбінантної ДНК....143
5.1.4. Клонування молекул рекомбінантної ДНК....148
5.1.5. Експресія еукаріотичних генів у клітинах прокаріот....158
5.1.6. Перспективи і проблеми біотехнології клонування генів....166
Контрольні питання....168

Розділ 6. **ДНК-технології**.....170
Контрольні питання.....177

ЧАСТИНА ІІ. СПЕЦІАЛЬНІ БІОТЕХНОЛОГІЇ

Розділ 7. **Біотехнологія виробництва і застосування імобілізованих препаратів**.....178
7.1. Інженерна ензимологія. Завдання інженерної ензимології....178
7.2. Імобілізація біологічно активних речовин та клітин.....180
7.3. Імобілізація ферментів. Мета імобілізації.....181
7.4. Носії для імобілізації ферментів.....183
7.4.1. Органічні полімерні носії.....183
7.4.2. Носії неорганічної природи.....199
7.4.3. Місткість носія.....204
7.4.4. Модифікація носія.....205
7.4.5. Вимоги до носіїв.....206
7.5. Методи імобілізації ферментів.....206
7.5.1. Фізичні методи імобілізації.....206
7.5.1.1. Імобілізація ферментів шляхом адсорбції на нерозчинних носіях.....208
7.5.1.2. Методи механічного включення молекул ферменту в структуру носія 215
7.5.2. Хімічні методи імобілізації.....220
7.5.2.1. Основні принципи конструювання препаратів ковалентно імобілізованих ферментів.....220
7.5.2.2. Характеристика реагентів.....226
7.6. Фізико-хімічна характеристика імобілізованого фермента..231
7.7. Класифікація імобілізованих ферментів.....231
7.8. Імобілізація клітин (адгезія).....233
7.8.1. Основні методи імобілізації клітин.....235
Контрольні питання.....237
Розділ 8. **Використання імобілізованих препаратів з лікувальною метою**.....239
8.1. Імобілізація препаратів. Носії для імобілізації.....241
8.2. Методи імобілізації і застосування препаратів.....242
8.3. Терапія імобілізованими ферментами.....248
Контрольні питання.....250
Розділ 9. **Використання імобілізованих ферментів у аналітичній роботі**.....251
9.1. Аналітичні проточні реактори з імобілізованими ферментами.....254
9.2. Ферментні мікрокалориметричні датчики.....255
9.3. Ферментні електроди.....255

9.4. Біолюмінесцентний мікроаналіз....259
9.5. Біосенсори з іммобілізованими ферментами....261
9.6. Імуноферментний аналіз (ІФА) і його використання....262
Контрольні питання....273

Розділ 10. **Застосування іммобілізованих ферментів у біотехнології**....274
10.1. Біотехнологія перетворення крохмалю на глюкозу....274
Контрольні питання....278
10.2. Біотехнологія одержання сиропів з високим умістом фруктози....279
Контрольні питання....284
10.3. Біотехнологія виробництва глюкози й етанолу з целюлози....285
Контрольні питання....286
10.4. Біотехнологія одержання L-яблучної кислоти....287
Контрольні питання....287
10.5. Застосування біотехнологій з іммобілізованими ферментами у молочній промисловості....288
Контрольні питання....294
10.6. Біотехнологія виробництва D-фенілгліцину....295
Контрольні питання....295

Розділ 11. **Біотехнологія виробництва антибіотиків**....296
11.1. Виробництво β-лактамних антибіотиків....299
11.2. Модифікація β-лактамних антибіотиків....302
11.2.1. Одержання 6-амінопеніциланової кислоти (6-АПК)....302
11.2.2. Одержання 7-λ-аміноцефалоспоринової кислоти (7-АЦК)....306
11.3. Створення нової біотехнології виробництва і застосування антибіотиків....306
Контрольні питання....308

Розділ 12. **Біотехнологія виробництва гормонів**....310
12.1. Шляхи отримання гормонів....310
12.2. Отримання інсуліну....313
12.2.1. Традиційні шляхи отримання інсуліну....314
12.2.2. Нові технології одержання інсуліну....315
12.3. Отримання соматотропіну....317
12.3.1. Використання генно-інженерного соматотропіну у тваринництві....320
Контрольні питання....322

Розділ 13. **Біотехнологія виробництва інтерферонів**....323
13.1. Класи і типи інтерферонів....324
13.2. Традиційні шляхи отримання інтерферонів....325

13.3. Генно-інженерний метод отримання інтерферонів.....327
13.4. Одержання вдосконалених інтерферонів.....332
13.5. Використання екзогенного інтерферону у ветеринарній медицині і тваринництві.....333
Контрольні питання.....335

Розділ 14. **Біотехнологія одержання моноклональних антитіл (антитіл одного епітопу)**.....336
14.1. Традиційний спосіб одержання антитіл.....336
14.2. Моноклональні антитіла і гібридомна технологія.....337
14.3. Застосування моноклональних антитіл 344
Контрольні питання.....346

Розділ 15. **Біотехнологія і вакцини майбутнього**.....347
Контрольні питання.....365

Розділ 16. **ДНК-вакцини**.....366
16.1. Структура.....366
16.2. Вибір генів.....369
16.3. Методи і шляхи введення.....369
16.4. Модуляція імунної відповіді.....371
16.5. Підвищення імуногенності ДНК-вакцин.....373
Контрольні питання.....374

Розділ 17. **Біотехнологія одержання вітамінів**.....375
Контрольні питання.....385

Розділ 18. **Біотехнології одержання біологічно активних продуктів на основі металокомплексних сполук**.....386
Контрольні питання.....399

Розділ 19. **Біотехнології одержання L-амінокислот**.....401
19.1. Методи одержання L-амінокислот.....402
19.2. Біотехнологія виробництва L-метіоніну.....407
19.3. Біотехнологія виробництва L-триптофану.....408
19.4. Біотехнологія одержання L-лізину.....412
19.5. Біотехнологія одержання L-треоніну.....416
19.6. Біотехнологія одержання L-аспарагінової кислоти.....418
19.7. Біотехнологія одержання L-глутамінової кислоти.....420
Контрольні питання.....421

Розділ 20. **Біотехнологія одержання ферментів**.....423
20.1. Джерела ферментів.....425
20.2. Методи культивування мікроорганізмів-продуцентів ферментів.....431
20.3. Одержання товарних форм ферментних препаратів.....433
20.3.1. Виділення ферментів.....433
20.3.2. Очищення ферментних препаратів.....435
20.3.3. Концентрування ферментів.....437

20.3.4. Стандартизація ферментних препаратів.....437
20.3.5. Ідентифікація і індексація ферментних препаратів.....438
20.4. Промислові ферментні препарати.....438
Контрольні питання.....440
Розділ 21. **Біотехнологія виробництва білка**.....441
21.1. Виробництво білків одноклітинних організмів.....442
21.2. Мікроорганізми-продуценти білка.....445
21.3. Принципова технологічна схема одержання мікробного білка.....448
21.4. Одержання мікробного білка на відходах переробки нафти.....450
21.5. Одержання мікробіального білка на природному газі (метані).....451
21.6. Одержання мікробного білка на нижчих спиртах — метанолі і етанолі.....452
21.7. Одержання мікробного білка на гідролізатах рослинних відходів.....454
21.8. Одержання білка одноклітинних водоростей.....455
21.9. Отримання високобілкових кормових препаратів із сировини, що постійно відновлюється.....457
21.9.1. Ферментація у зануреній культурі або глибинне культивування мікроорганізмів.....459
21.9.2. Твердофазова ферментація рослинної сировини.....460
21.10. Мікробіальний білок у харчуванні людей.....463
Контрольні питання.....465
Розділ 22. **Біотехнології утилізації і біоконверсії відходів агропромислового комплексу**.....467
22.1. Негативний вплив відходів тваринництва на навколишнє середовище.....467
22.2. Методи утилізації гною.....468
22.2.1. Традиційні методи. Використання гною як органічного добрива.....469
22.2.2. Мінералізація органічних речовин у ґрунті і водоймищах.....470
22.2.3. Включення гною до раціонів сільськогосподарських тварин.....474
22.3. Нетрадиційні методи. Біотехнологія одержання біогазу шляхом анаеробного зброджування відходів.....475
22.3.1. Біометаногенез та його етапи.....476
22.3.2. Фактори, які впливають на біометаногенез і їх оптимізація.....480
22.3.3. Техніко-технологічні аспекти виробництва біогазу.....492
22.3.3.1. Склад та розповсюдження БГУ у світі.....492

22.3.3.2. Конструкційні особливості реактора БГУ.....494
22.3.3.3. Класифікація БГУ за принципом дії.....496
22.3.3.4. Техніко-технологічні рівні БГУ.....497
22.3.4. Фракції, що утворюються в процесі біометаногенезу.....506
22.3.4.1. Біогаз, його склад та використання.....506
22.3.4.2. Шлам, його склад та використання.....509
22.3.4.3. Рідка фракція, склад і використання.....511
22.3.5. Шляхи вдосконалення біогазового виробництва.....512
22.3.6. Сучасний стан виробництва біогазу в Європі та світі.....512
22.3.7. Стан виробництва біогазу в Україні.....523
Контрольні питання.....532
Розділ 23. **Біотехнологія утилізації органічних відходів методом вермікультивування**.....535
23.1. Загальні відомості й біологічні особливості дощових черв'яків.....537
23.2. Способи вирощування черв'яків.....540
23.3. Підготовка субстрату (корму) для черв'яків.....542
23.4. Методика формування лож і техніка закладки маточного поголів'я в субстрат.....546
23.5. Умови утримання черв'яків у ложах.....547
23.6. Оцінка стану популяції черв'яків.....548
23.7. Методика розділення лож.....549
23.8. Технологія вермікультивування взимку.....551
23.9. Вермікультивування на присадибних ділянках.....553
23.10. Вермікультура, її склад та використання.....557
23.11. Біогумус, його склад і використання.....561
Контрольні питання.....564
Розділ 24. **Біотехнологія отримання біомаси одноклітинної водорості спіруліни**.....566
24.1. Загальна характеристика спіруліни.....568
24.2. Склад живильного середовища для вирощування спіруліни.....569
24.3. Хімічний склад і поживна цінність спіруліни.....571
24.4. Використання біомаси спіруліни.....575
24.5. Технологія вирощування спіруліни для використання в годівлі тварин.....577
24.6. Вирощування спіруліни для використання у фармацевтичній промисловості.....580
Контрольні питання.....585
Основна література.....586
Рекомендована література.....588
Словник термінів.....590
Іменний покажчик.....628
Предметний покажчик.....631

ВСТУП

XXI століття називають «золотим сторіччям» біології. Це стосується і одного з її напрямів — біотехнології.

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

Власне, ще з давніх часів людство використовує окремі біотехнологічні процеси у різних сферах практичної діяльності. Однак лише з 70-х років минулого сторіччя біотехнологія як самостійна наука сформувалась на базі молекулярної біології, клітинної та генетичної інженерії, широкого використання методів мікробіології, біохімії, біоорганічної хімії та інших наук. Нині **нова біотехнологія** є одним з пріоритетних напрямів сучасної науки, які забезпечують прискорення науково-технічного прогресу, а також дійовим засобом для подолання сировинних, продовольчих, енергетичних, екологічних та економічних проблем. Її використовують при розв'язанні багатьох практичних питань, пов'язаних з підвищенням ефективності охорони здоров'я людей і тварин, збільшенням продовольчих ресурсів та забезпеченням промисловості сировиною, використанням рентабельних поновлювальних джерел енергії і організації безвідходних виробництв, зменшенням шкідливих антропогенних впливів на довкілля та в інших галузях діяльності людини.

Біотехнологія, як наука, є більш зрілим етапом у розвитку біології, яка нині і в майбутньому займатиметься створенням цілого з елементів, вивчених раніше *(Глеба Ю., 2002)*.

Могутнім підґрунтям нової біотехнології є встановлення Ейвері О. (1944) біологічної ролі ДНК. Було доведено, що ця полімерна хімічна сполука є носієм спадкової інформації. Згодом Кріком Ф., Уотсоном Д. (1953) було зроблено епохальне відкриття: встановлено структурну організацію ДНК у вигляді подвійної спіралі. Завдяки цій події наступні кроки, що було

здійснено у напрямку з'ясування біохімічних механізмів функціонування ДНК, привели до повного розуміння молекулярних основ біологічної специфічності.

Найвидатнішим досягненням біотехнології на початку нового XXI століття стало завершення створення детальної карти генома людини, що дозволить краще зрозуміти взаємозв'язок людини з іншими організмами нашої планети, збагнути, що робить людей схожими один з одним і що відрізняє нас від інших організмів, озброїть нас більш досконалими підходами для з'ясування причин виникнення хвороб і пошуку нових методів лікування.

Викликає подив той факт, що довжина послідовності нуклеотидів у ДНК людини лише втричі перевершує цей параметр у черв'яка Caenorhabditis elegans і водночас свідчить про складність механізмів контролю розвитку, які необхідно вивчити для пояснення такого складного явища, як поява людини *(Дей П., 2002)*.

Упродовж 60 останніх років, які охоплюють час від відкриття Ейвері О., крім згаданого вище, в біології зроблено надзвичайно важливі відкриття: розроблено технологію одержання рекомбінантних молекул ДНК, яка є основою генної інженерії, гібридомну технологію, секвенування геномів бактерій, дріжджів, нематоди, рослинного організму арабідопсиса, а також людини. Зроблено перші кроки генної терапії і успішні спроби клонування тварин, конструювання штучних хромосом, розроблено умови і створено можливості для перенесення генів, що дозволяє долати видові бар'єри, які обмежують можливості класичної селекції, розшифровано структуру нуклеосоми і комплексу РНК — полімерази.

Понад 30 років тому розроблено методи локалізації генів з елементами, які контролюють експресію, а ще важливішим є розробка прийомів перенесення цих елементів будь-якому мікроорганізму або рослині, що дає можливість модифікувати організми таким чином, щоб одержати нові лінії зі зміненими властивостями, які відповідають нашим бажанням. У свою чергу, функціонування модифікованого організму дозволить отримати інформацію про поведінку в геномі конкретного гена, тобто ідентифікувати функції генів (функціональна геноміка), про взаємодію генів і контролюючих експресію цих генів послідов-

ностей, що дає можливість використати нові властивості для забезпечення потреб людства.

Важливим досягненням, яке дозволяє здійснювати генно-інженерні маніпуляції, є відкриття ферментів, за участю яких здійснюються операції «розрізання» і «зшивання» фрагментів ДНК.

Вражаючими також є швидкість і розмах, з якими наукові дослідження трансформуються у процес одержання нових фармацевтичних препаратів або сільськогосподарських продуктів. Ліки, одержані завдяки біотехнології, наприклад, інсулін, соматотропний гормн, інтерферони або вакцина проти поліомієліту, дають можливість створення більш ефективних препаратів з меншими побічними діями, оскільки вони будуть спрямовані на специфічні молекули-мішені, які зазнали змін у процесі захворювання.

У сільському господарстві вражає швидкість сприйняття американськими фермерами генетично модифікованих (ГМ) культур сільськогосподарських рослин для виробництва продуктів харчування і підвищення їх якості. Яскравим прикладом є розробка біотехнології синтезу вітаміну А у «золотому рисі». Близько двох третин усіх продовольчих товарів торгової мережі США містять ГМ-інгредієнти. Однак у багатьох розвинених країнах (зокрема країнах ЄС) використання ГМ-продукції зустрічає сильну опозицію. Натомість діабетики, не задумуючись, використовують для лікування інсулін, одержаний завдяки модифікованим мікроорганізмам.

Використання генетичної інженерії дасть можливість отримати ГМ-рослини не тільки для виробництва продуктів харчування, але й для вирішення екологічних проблем — для очищення забруднених хімічними речовинами і токсичними металами територій (фіторемедітація) та використання ГМ-рослин як «фабрик» або «реакторів» для виробництва фармацевтичних білків (у першу чергу вакцин) та інших біологічно активних речовин.

Встановлено можливість елімінації із забруднених ґрунтів кадмію і свинцю за допомогою окремої лінії індійської гірчиці (Brassica Juncea); за участю аеробних і анаеробних мікроорганізмів здійснювати утилізацію пестицидів, алканів, бензолу, толуолу, ксилолу, поліциклічних ароматичних вуглеводнів.

Внаслідок проведених глибоких фундаментальних генно-інженерних досліджень було доведено можливість переміщення генів від однієї таксономічної групи живих організмів до іншої попри їх статеву несумісність. Це одна із суттєвих переваг біотехнологічного підходу для вирішення прикладних питань, яка дозволяє гени, що цікавлять дослідника, з елементами, які контролюють їх експресію, перемістити з одного до іншого організму і забезпечити їх експресію. Так, джерелом генів засухо- і холодостійкості рослин можуть бути клітини тварин або бактерії.

З урахуванням таких унікальних властивостей хлоропластів, як їх спроможність набагато інтенсивніше, ніж E.coli або рослини з перенесеними в їх ядра генами, синтезувати і накопичувати білки, вчені працюють над розробкою відповідної біотехнології *(Малига П., 2002)*.

Створено нові методи і технології генетичної інженерії рослин для розробки біотехнології виробництва фармацевтичних білків, перш за все антитіл *(Глеба Ю., 2002)*, експресії соматотропного гормона людини в хлоропластах тютюну, фармацевтичних і діагностичних препаратів та оральних вакцин рослинами *(Малига П., 2002)*.

Існує думка про можливість одержання біологічно активних речовин шляхом трансформації рослин вірусами *(Блюм Я., 2002)*. Рослини тютюну використовуються для виробництва вакцинального препарату, який має бути специфічним для кожного хворого на неходжкиновську лімфому (різновидність раку), шляхом перенесення за допомогою вірусного вектора гена, що асоційований з лімфомою пацієнта, для синтезу специфічного білка. При цьому слід зазначити, що вартість одержаного таким чином терапевтичного білка є набагато нижчою, ніж при використанні для цієї мети культури клітин ссавців *(Ервін Б., 2002)*.

Використання генів, що кодують біосинтез білкової оболонки вірусів, та вбудовування їх в геном рослин забезпечують ефективний захист останніх від шкідників *(Кентлі М., 2002)*.

На думку Пітера Дея (США), учасника електронного «круглого столу» з визнаними у світі науковими авторитетами у сфері біотехнології і генетики, який був організований в Україні *(проф. Блюм Я.Б.)* у 2001р., біотехнологія стане одним із найбільш важливих засобів для впровадження стійкого збалансова-

ного виробництва, що буде необхідним у новому сторіччі для того, щоб забезпечити населення Землі, яке швидко зростає, продуктами харчування. Нині у світі голодують понад 800 млн чоловік, переважно у країнах Південної Азії і Африки. Бідність є причиною недоїдання трьох чвертей населення Землі, яке проживає у сільській місцевості. Біотехнологія дає нам новий потужний інструмент, який доповнює уже існуючі способи підвищення продуктивності сільського господарства і, як наслідок, стимулювання економічного росту в бідних країнах.

У менш розвинених країнах (порівняно з Європою), в тому числі в Україні, біотехнологія могла б стати таким же трампліном у світ багатства і добробуту, яким стала для багатьох азіатських країн електроніка і комп'ютерна технологія *(Блюм Я., Глеба Ю., 2002)*.

США і ЄС є найпотужнішими світовими центрами наукових досліджень в галузі біотехнології. Китай, Бразилія та Індія стали на шлях прискореного впровадження досягнень генної інженерії перш за все у галузі сільськогосподарського виробництва, зокрема рослинництва *(Кентлі М., 2002)*. На сьогодні США зберігають свої чільні позиції, за ними або поряд іде Західна Європа, а Китай останнім часом здійснив величезний ривок вперед, особливо у сфері сільськогосподарської біотехнології. Сьогодні на Китай припадає 6 % світових посівів генетично модифікованих сільськогосподарських культур.

На думку Блюма Я. (2002), незважаючи на значне відставання України від лідерів, у нас поки що зберігається критичний потенціал для розвитку знань і технологій та їх впровадження у виробництво.

Для використання досягнень нової біотехнології в галузях агропромислового комплексу України необхідна підготовка висококваліфікованих фахівців з молекулярної біології, генетичної і клітинної інженерії для забезпечення наукоємного виробництва. Вирішення цього питання потребує забезпечення навчального процесу необхідною літературою.

Наразі в Україні немає вітчизняного україномовного підручника з біотехнології у тваринництві і ветеринарній медицині для студентів аграрних вищих закладів освіти. Навчальний посібник з біотехнології, виданий 1989 року, не відповідає сучасним вимогам, і, крім того, є російськомовним.

Підготовлений підручник складений згідно з вимогами Програми з біотехнології і позбавлений недоліків попереднього видання.

Завданням курсу є вивчення студентами сучасного стану біотехнології, фундаментальних основ і практичного використання її розробок у ветеринарній медицині, тваринництві, екології та суміжних галузях народного господарства.

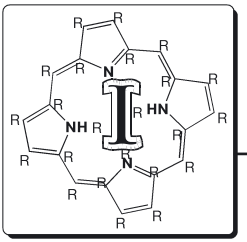
Під час вивчення курсу загальної біотехнології студенти засвоюють основи клітинної і генетичної інженерії як метод конструювання, спрямований на одержання нової генетичної інформації за допомогою гібридизації і реконструкції клітин, створення гібридних (рекомбінантних) ДНК, а також практичні напрями використання культури клітин, рекомбінантних ДНК для отримання біологічно активних речовин.

Важливим розділом спеціальної біотехнології є інженерна ензимологія, яка базується на використанні іммобілізованих ферментів. Шляхом іммобілізації одержано нові форми препаратів біологічно активних речовин з пролонгованою дією, які використовуються як для виробництва біотехнологічної продукції, так і самостійно як профілактичні та лікувальні засоби.

У спеціальній біотехнології вивчаються промислові біотехнології одержання профілактичних, діагностичних, лікарських, кормових і біологічно активних речовин — антибіотиків, гормонів, інтерферонів, білків, незамінних амінокислот тощо, які використовуються у ветеринарній і гуманній медицині, тваринництві та харчовій промисловості.

При вивченні курсу біотехнології передбачено також засвоєння біоконверсних технологій, які забезпечують утилізацію та біоконверсію відходів тваринництва і рослинництва у біогаз, високоякісне органічне добриво і білково-вітамінні кормові добавки, сприяють захисту навколишнього середовища від антропогенного забруднення та дозволяють підтримувати санітарно-гігієнічне й екологічне благополуччя довкілля.

Знання, які одержать студенти при вивченні як фундаментальних основ біотехнології, так і діючих біотехнологій, дадуть можливість підготувати конкурентоспроможного фахівця для роботи в умовах агропромислового виробництва, для прискорення входження України у світове освітнє співтовариство, світову організацію торгівлі, Євросоюз тощо.



Частина

Загальна біотехнологія

Розділ 1.

БІОТЕХНОЛОГІЯ – НАУКОВА ДИСЦИПЛІНА

1.1. ПРЕДМЕТ БІОТЕХНОЛОГІЇ, ІСТОРІЯ РОЗВИТКУ

Біотехнологія — це наука про використання хіміко-біологічних процесів і біологічних об'єктів (мікроорганізмів, культур клітин і тканин рослинного і тваринного походження, ферментних препаратів та інших біологічно активних речовин) у промисловому виробництві. Назва її походить від грецьких слів bios — життя, teken — мистецтво, logos — наука.

Відповідно до визначення Європейської федерації біотехнологів (ЄФБ, 1984) біотехнологія базується на інтегральному використанні біохімії, мікробіології, молекулярної біології, клітинної та генетичної інженерії з метою промислової реалізації властивостей мікроорганізмів, культур клітин і тканин. Уже у самому визначенні предмета відображено його місцерозташування як прикордонного, завдяки чому результати фундаментальних досліджень у сфері біологічних, хімічних і технічних дисциплін набувають прикладного значення.

Біотехнологія — одна з найдавніших і водночас одна з наймолодших наук і галузей промисловості.

Людство здавна опанувало на практиці різні процеси біотехнології. Ще з біблейських часів було відоме виноробство, випікання хліба, а дещо пізніше — одержання кисломолочних продуктів, квашеної капусти, медових алкогольних напоїв, силосування кормів тощо. Стародавні народи інтуїтивно використовували прийоми і способи виготовлення продуктів, які сьогодні ми відносимо до біотехнологічних.

Значний поштовх у розвитку біотехнології пов'язаний з видатними дослідженнями великого французького вченого Луї Пастера (1822–1895) — основоположника наукової мікробіології. Він розкрив мікробну природу бродіння, довів можливість життя у безкисневих умовах, експериментально спростував уявлення про самовільне зародження живих істот, створив наукові основи вакцинопрофілактики і вакцинотерапії, запропонував метод стерилізації, названий його ім'ям, — пастеризацією тощо.

Починаючи з другої третини XX століття розпочалось впровадження крупномасштабного герметизованого обладнання, яке забезпечує проведення процесів у стерильних умовах. Особливо потужний поштовх у розвитку промислового біотехнологічного обладнання був відмічений у період становлення і розвитку виробництва антибіотиків (період Другої світової війни 1939–1945 рр., коли виникла гостра необхідність у протимікробних препаратах для лікування хворих з інфікованими ранами). У цей час були вирішені основні завдання з конструювання, створення і впровадження у практику біореакторів, які використовуються й нині.

Однак термін «біотехнологія» прижився лише з середини 70-х років XX ст., коли біотехнологія пережила своє друге народження у зв'язку з появою генетичної інженерії. Власне становлення біотехнології як самостійної науки розпочалося з 1972 р., коли П. Берг зі співробітниками у США створили першу рекомбінантну молекулу ДНК.

Звичайно, без фундаментальної роботи Ф. Кріка і Дж. Уотсона (1953) щодо встановлення структури ДНК було б неможливо досягнути сучасних результатів у сфері біотехнології. З'ясування механізмів функціонування і регуляції ДНК, виділення і вивчення специфічних ферментів привело до формування чіткого наукового підходу, до розробки біотехнологічних процесів на основі генно-інженерних робіт.

Уже в 1982 р. надійшов у продаж людський інсулін, синтезований кишковими паличками, які містили штучно вмонтовану інформацію про цей гормон. Згодом з'явились інші генно-інженерні препарати: інтерферони, соматотропний гормон людини, інтерлейкін-2 та ін.

У цей період були одержані суперпродуценти антибіотиків, ферментів, амінокислот, вітамінів; розроблені та впроваджені екологічно чисті безвідходні технології; розроблена і впроваджена у практику спеціальна апаратура; здійснена автоматизація і комп'ютеризація біотехнологічних процесів тощо.

Протягом останніх 10–15 років минулого століття проходив бурхливий розвиток біотехнології, визначались сфери пріоритетного впровадження конкретних результатів технологічних розробок.

1.2. БІОЛОГІЧНІ ОБ'ЄКТИ І МЕТОДИ БІОТЕХНОЛОГІЇ

До **хіміко-біологічних процесів** належать ті з них, в яких використовують біологічні об'єкти різної природи (мікробної, рослинної або тваринної), наприклад, при виробництві продукції різноманітного призначення — антибіотиків, вакцин, ферментів, кормового і харчового білка, гормонів, амінокислот, біогазу, органічних добрив тощо.

Об'єкти біотехнології дуже різноманітні й діапазон їх розповсюджується від організованих частин (вірусів) до людини (рис. 1.1.).

Біооб'єкти характеризуються такими показниками, як рівень структурної організації, здатність до розмноження (або репродукції), наявність або відсутність власного метаболізму при культивуванні у належних умовах. Що стосується **характеру** біооб'єктів, то під цим слід розуміти їх структурну організацію. В такому випадку біооб'єкти можуть бути молекулами (ферменти, імуномодулятори, нуклеозиди, оліго- і поліпептиди тощо), організованими частинами (віруси, фаги), одноклітинними (бактерії, дріжджі) і багатоклітинними особинами (нитчасті вищі гриби, рослинні тканини, одношарові культури клітин

ссавців), цілими організмами рослин і тварин. Але навіть при використанні біомолекули як об'єкта біотехнології її початковий біосинтез здійснюється у більшості випадків відповідними клітинами. Отже, можна стверджувати, що об'єкти біотехнології належать або до мікробів, або до рослинних і тваринних організмів.

Таким чином, незалежно від систематичного положення біооб'єкта на практиці використовують або природні організовані частинки (фаги, віруси) і клітини з природною генетичною інформацією, або клітини з штучно заданою генетичною інформацією, тобто у будь-якому випадку використовують клітини — чи то мікроорганізм, рослина, тварина або людина.

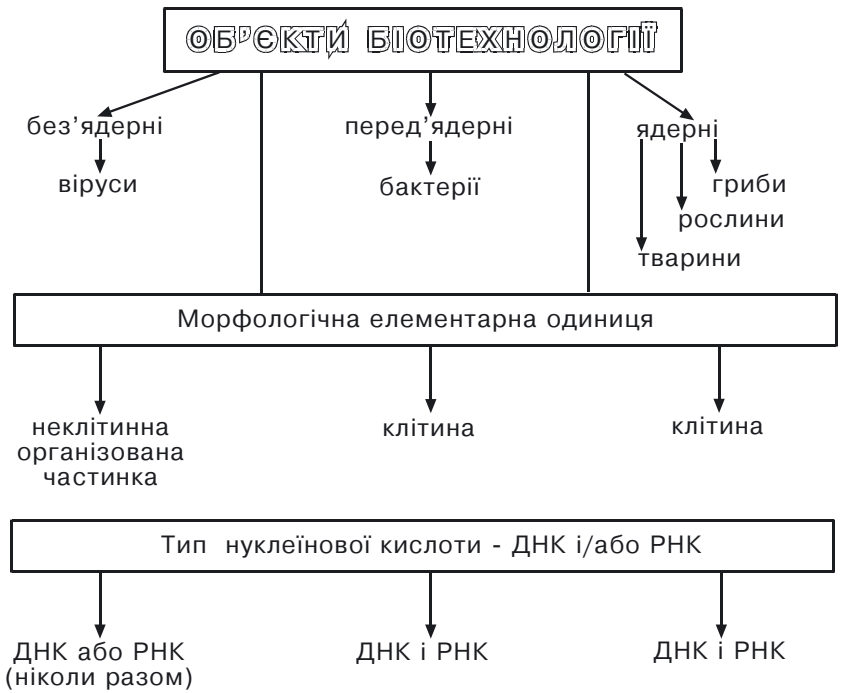


Рис 1.1. ***Класифікація об'єктів біотехнології*** *(за Єліновим Н.П., 1995)*

Нині більшість об'єктів біотехнології становлять мікроби, світ яких дуже великий і різноманітний. До них належать усі прокаріоти — бактерії, актиноміцети, рикетсії, синьо-зелені водорості й частина еукаріот — дріжджі, нитчасті гриби, простіші й водорості (рис. 1.2). Мікробами серед рослин є мікроскопічні водорості, а серед тварин — мікроскопічні найпростіші.

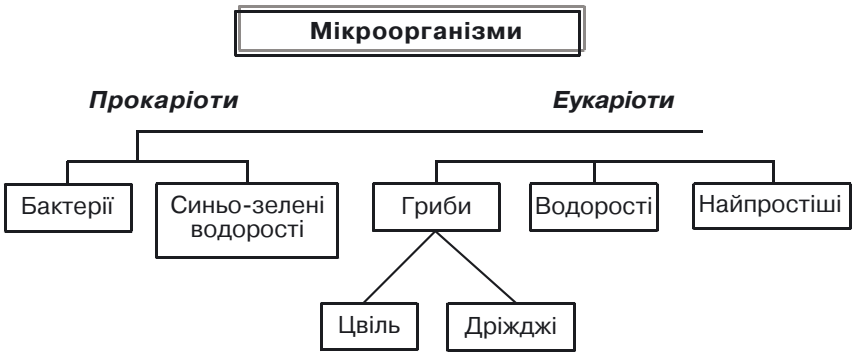


Рис. 1.2. ***Класифікація мікроорганізмів***
(за Дж. Бейлі, Д. Олліс, 1989)

Основою сучасного біотехнологічного виробництва є мікробіологічний синтез, тобто синтез різноманітних речовин за допомогою мікроорганізмів. Об'єкти рослинного і тваринного походження ще не знайшли широкого розповсюдження через їх високу вимогливість до умов культивування, що значно здорожчує виробництво.

Для реалізації біотехнологічних процесів важливими параметрами біооб'єктів є: чистота, швидкість розмноження клітин і репродукції вірусних частин, активність і стабільність біомолекул або біосистем.

При використанні ферментів (в ізольованому або іммобілізованому стані) як біокаталізаторів виникає необхідність охорони їх від деструкції банальною сапрофітною мікрофлорою, яка може проникати у сферу біотехнологічного процесу ззовні внаслідок нестерильності системи, наприклад, через негерметичність обладнання.

Швидкість розмноження клітин і репродукція вірусних частин прямо пропорційно відбиваються на збільшенні біомаси і утворенні метаболітів.

Активність і стабільність перебування біооб'єктів в активному стані — найважливіші показники їх придатності для тривалого використання в біотехнології.

Головною ланкою біотехнологічного процесу, який визначає його сутність, є клітина. Саме в ній синтезується цільовий продукт. За влучним висловом Овчіннікова Ю.А. (1985), клітина — це мініатюрний хімічний завод, який працює з колосальною продуктивністю, з граничною узгодженістю і за заданою програмою. В ній щохвилинно синтезуються сотні найскладніших сполук, включаючи гігантські біополімери, у першу чергу білки.

Узагальнена схема одержання біотехнологічної продукції наведена на рис. 1.3.

Методи біотехнології. Біотехнології притаманні свої специфічні методи. Це крупномасштабне глибинне культиву-

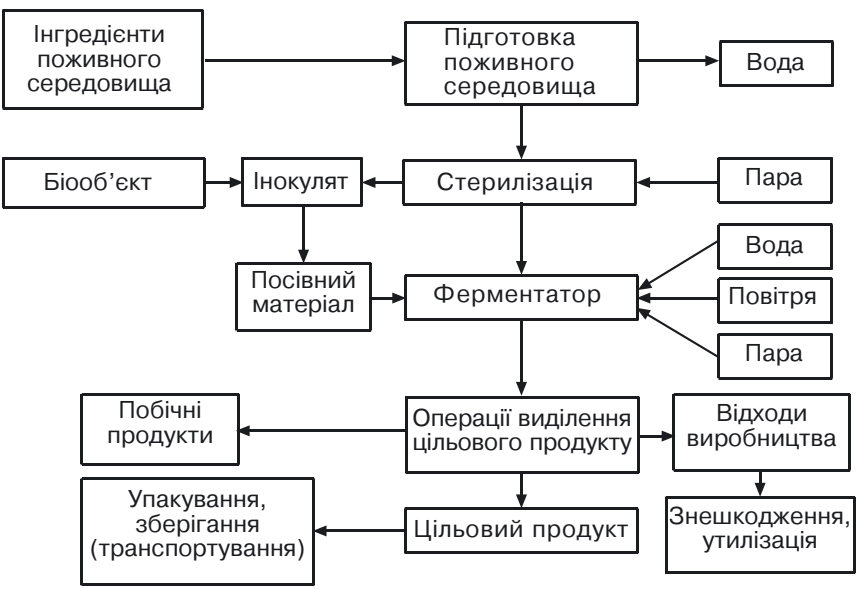


Рис. 1.3. ***Приблизна узагальнена схема процесів у біотехнології*** *(за Єліновим Н.П., 1995)*

вання біооб'єктів у періодичному, напівбезперервному або безперервному режимі та вирощування клітин рослинних і тваринних тканин в особливих умовах. Біотехнологічні методи культивування біооб'єктів виконуються у спеціальному обладнанні, наприклад, у ферментерах вирощують бактерії і гриби при одержанні антибіотиків, ферментів, органічних кислот, деяких вітамінів тощо.

У подібних ферментерах вирощують деякі клітини людини (бласти) для одержання білка-інтерферону, а також деякі види рослинних клітин. Однак останні частіше вирощують у стаціонарних умовах на середовищі з ущільненою (наприклад, агаризованою) підкладкою у скляних або поліетиленових ємностях.

Інші методи, які використовують у біотехнології, є спільними, наприклад з методами в мікробіології, біохімії, органічній хімії й інших науках. Особливо потрібно виділити методи клітинної і генетичної інженерії, які покладено в основу сучасної біотехнології.

Відмінністю методів, які використовуються у біотехнології, є те, що вони повинні виконуватись, як правило, в асептичних умовах (від грецького a — ні, septicos — гнилісний), тобто з уникнення можливості потрапляння у середовище, де культивується біооб'єкт, патогенних і сапрофітних мікроорганізмів.

Патогенні види становлять безпосередню небезпеку для задіяних у виробництві людей і для споживачів кінцевих продуктів; сапрофітні види можуть виступати конкурентами за поживні субстрати, антагоністами, продуцентами токсичних речовин, включаючи пірогени.

1.3. МЕТА І ЗАВДАННЯ БІОТЕХНОЛОГІЇ

Першочерговими завданнями біотехнології є створення:

- ❒ нових біологічно активних речовин і лікарських препаратів для гуманної і ветеринарної медицини (інтерферонів, інсуліну, гормонів росту людини, моноклональних антитіл, вакцин тощо) для ефективної профілактики, діагностики і лікування людей і тварин;

- засобів захисту рослин від хвороб і шкідників; бактеріальних добрив і регуляторів росту рослин; нових високопродуктивних і стійких до несприятливих факторів зовнішнього середовища сортів і гібридів сільськогосподарських рослин, одержаних методами генетичної і клітинної інженерії;
- цінних кормових добавок і біологічно активних речовин (кормового білка, амінокислот, ферментів, вітамінів тощо) для застосування у тваринництві з метою підвищення продуктивності тварин;
- нових технологій одержання цінних продуктів для використання у харчовій, хімічній, мікробіологічній та інших галузях промисловості;
- безвідходних і екологічно безпечних технологій утилізації і біоконверсії сільськогосподарських, промислових, побутових відходів для одержання енергоносіїв (біогазу), високоякісного органічного добрива, білкових та вітамінних кормових добавок;
- удосконалення і оптимізація апаратури для біотехнологічних процесів з метою досягнення максимальних виходів кінцевих продуктів;
- підвищення техніко-економічних показників біотехнологічних процесів порівняно з існуючими.

На шляху вирішення поставлених завдань біотехнологію чекають немалі труднощі, пов'язані з виключною складністю організації живого. Будь-який біооб'єкт — це цілісна система, в якій не можна змінити жоден з елементів, не змінюючи інших, не можна довільно перекомбінувати їх. Будь-який вплив на об'єкт викликає не тільки бажані, але й побічні ефекти. Перебудова геному відразу відбивається на багатьох ознаках організму. Окрім цього, екосистема — це свого роду цілісна система, і зміна одного з її компонентів позначається на інших компонентах.

Успіхи, досягнуті у сфері генетичної і клітинної інженерії на найпростіших біологічних системах (прокаріотних організмах), дають надію на подолання цих труднощів.

Розділ 2.

МІЖНАРОДНІ СИСТЕМИ GLP І GMP ЩОДО ЯКОСТІ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ПРОДУКТІВ

Система GLP — це зведення правил, які регламентують проведення стандартизації лікарських препаратів та інших біологічно активних речовин, а система GMP — їх виробництво.

2.1. СИСТЕМА GLP

З метою організації якісного проведення доклінічних випробувань лікарських та інших біологічно активних речовин (харчових добавок, агрохімікатів тощо) у промислово розвинених країнах (Англія, Німеччина, США, Франція, Японія та інші) затверджені єдині правила системи GLP (Good Laboratory Practice). Існує група GLP у Європейському центрі з екології і токсикології хімічної промисловості; у США система GLP діє з червня 1979 р. Головним в такій системі є наступне:

1) завчасна розробка стандартної методики проведення випробувань або SOP (Standart Operating Procedure) стосовно усіх його етапів;
2) призначення керівника і відповідальних за кожен вид випробувань;
3) кожному відповідальному виконавцю доручається чітко виконувати усі операції у відведених йому межах;
4) результати виконання операцій мають бути внесені у спеціальний протокол, датовані і підписані;
5) у разі виконання складних операцій, щоб уникнути помилок, рекомендується удаватися до подвійної перевірки;
6) в установленому порядку виконавець доповідає керівнику про перебіг випробувань. Керівник повинен бути компетентним в усіх справах, пов'язаних з випробуваннями;

7) фактичні дані, записи і препарати (речовини) мають зберігатися у повному порядку, щоб завжди можна було знайти необхідне;
8) остаточний звіт за змістом має відображати отриманні дані, а також супроводжуватись обговоренням, складеним відповідальним виконавцем; на звіті проставляються дата і підписи (відповідального виконавця і осіб, які підтверджують зміст звіту);
9) повинна бути служба якісної оцінки випробувань — QAU (Quality Assuarance Unit). Особи, задіяні у цій службі, зобов'язані проводити внутрішню інспекцію в установленому порядку і за необхідності видавати рекомендації щодо вдосконалення процесів проведення випробувань.

На систему GLP спираються у випадках випробування речовин: на мікробне зображення; на пірогенність; гостру, підгостру і хронічну токсичність, на специфічну токсичність (канцерогенність), антигенність, лікарську залежність, пошкодження зародкових клітин; подразнення слизових оболонок шкіри і в місці введення речовини; мутагенність, тератогенність — від грецького teratos — чудовисько, урод; цитотоксичність; на безпечність для макроорганізму при введенні in vivo (абсорбція, розподіл, швидкість виведення, метаболізм); проводять фармакологічні випробування з оцінкою фармакокінетики (дія лікарської речовини, яка вивчається, на організм) і фармакодинаміки (вивчення сили дії лікарської речовини).

У зв'язку з необхідністю проведення згаданих випробувань створюють спеціальні групи: загальну (в тому числі і для контролю за гігієною і санітарією працюючих), мікробіологічну, для вивчення метаболізму, проведення загальнофармакологічних випробувань та загальних клінічних досліджень; патологоанатомічну, проведення експериментів на тваринах, обробки даних (з включення управління ЕОМ), з підготовки проб, аналітичну, з управління дослідженням і, за необхідності, інші. На кожну групу затверджується керівник, який не повинен поєднувати свої прямі обов'язки з роботою в групі інспекцій.

Додержання вимог системи GLP має бути підкріплено досконалістю організації усіх допоміжних служб і достатнім матеріальним забезпеченням. Бажано мати окреме приміщення для

проведення біологічних випробувань, де експериментальні тварини розміщувалися б у відповідних приміщеннях: для гнотобіонтів, заражених, контрольних, призначених для роботи з радіоізотопами, для карантинізації тощо.

У роботі з тваринами мають враховуватися усі інфекційні захворювання, які можуть вплинути на результати експериментів. При цьому необхідно мати на увазі і той факт, що окремі збудники інфекційних захворювань можуть передаватися від людини до тварин і навпаки. До них належать віруси сказу, лімфоцитарного хоріоменінгіту, деякі бруцели, сальмонели, мікобактерії туберкульозу, дизентерійна амеба тощо.

Схвалений препарат (речовина) після лабораторних передклінічних випробувань за системою GLP і подальшої клінічної перевірки дозволяється до випуску в умовах промислового виробництва.

2.2 СИСТЕМА GMP

Для забезпечення виготовлення високої якості продукту Всесвітня організація охорони здоров'я (ВООЗ) у 1968 р. затвердила «Вимоги до практики якісного виробництва при виготовленні і контролі якості ліків і до спеціалістів у сфері фармації». Роком пізніше ці вимоги, які ввійшли (з невеликими змінами і уточненнями) у правила системи GMP (Good Manufacturing Practice), були рекомендовані Асамблеєю ВООЗ для міжнародної торгівлі, а в 1971 р. вони були видані як додатки до другого видання Міжнародної Фармакопеї.

GMP — це єдина система вимог з контролю якості лікарських засобів з початку переробки сировини до виробництва готових препаратів, включаючи загальні вимоги до приміщень, обладнання і персоналу. З 1975 р. правила GMP розширені і вони стосуються різних хімічних і біологічних речовин, ветеринарних препаратів; вихідних матеріалів для використання в дозованих формах, якщо вони включені у законодавства країн-експортерів і країн-імпортерів; і, насамкінець, інформації про безпеку і ефективність перерахованих речовин, матеріалів, препаратів.

З урахуванням видання в 1987 р. провідних вказівок Міжнародної Організації Стандартизації (ISO) серії ISO 9000–9004 за системами якості виникла необхідність переглянути існуючі вимоги GMP. У 1991 р. на спеціальній конференції у Москві був переглянутий проект вимог GMP, який включає три частини:

1. «Управління якістю у промисловому виробництві лікарських засобів: філософія і основні складові».
2. «Практика якісного виробництва і контроль якості».
3. «Додаткові і допоміжні напрями».

Перша частина містить 12 розділів, які стосуються організації контролю за якістю виробництва, санітарії і гігієни, укладення контрактів, стандартних робочих методик, оформлення необхідної документації тощо.

Друга частина містить два розділи — виробництво і контроль якості. Стосовно виробництва лікарських засобів вказано, що воно має грунтуватися на принципі чіткого додержання методів ведення технологічного процесу згідно з нормативно-технічною документацією з метою одержання продукту необхідної якості і згідно з дозволом на його виготовлення і продаж. По можливості уникати будь-яких відхилень від методик або інструкцій. За наявності таких відхилень необхідно погодження, дозвіл і підпис призначеної відповідальної особи, а за необхідності залучення служби відділу контролю якості.

Операції з різними продуктами не повинні виконуватись в одному і тому ж приміщенні, поки не буде усунений ризик перемішування або перехресного забруднення.

Доступ у виробничі приміщення можуть мати лише особи, які зайняті на виробництві. Уникати виготовлення немедичної продукції у зонах і на обладнанні, призначеному для виготовлення фармацевтичної продукції. При роботі з сухими матеріалами і продуктами необхідно дотримуватися правил техніки безпеки для попередження виникнення, накопичення і розповсюдження пилу, що може призвести до перехресного забруднення продуктів, що виготовляються, або до їх мікробного забруднення. Мікроби можуть потрапляти у повітря і на частинки пилу із інших матеріалів і продуктів при їх виготовленні, із заб-

руднених обладнання і одягу, шкіри працюючих. Запобігти цьому можна шляхом виготовлення кожного цільового продукту в роздільних зонах (пеніциліни, живі вакцини й інші БАР) або, у крайньому випадку, виготовлення їх у часі порізно; забезпечення відповідними повітряними шлюзами; захисного технологічного одягу; використання засобів ефективної деконтамінації обладнання, стін та ін.; використання «закритих систем» виробництва тощо.

Необхідно перевіряти правильність і надійність з'єднання трубопроводів й іншого обладнання, яке використовується для транспортування продуктів (матеріалів) з однієї зони в іншу. Дистильована або деіонізована вода, яка надходить по трубах, має відповідати санітарно-мікробіологічним нормативам. Операції з технічного обслуговування або ремонту не мають впливати на якість продукції.

Контроль якості продукції стосується процесу забору проб, проведення досліджень, документації та ін. Всі дослідження мають проводитися згідно з затвердженими інструкціями для кожного матеріалу або продукту.

Забір проб здійснюють таким чином, щоб не забруднити їх або не піддати небажаному впливові, який позначиться на якості продукту або, навпаки, щоб матеріал, який відбирається, не був токсичним (шкідливим) для здоров'я оператора.

Для кожної партії продукту до випуску має бути лабораторна документація з підтвердженням відповідності кінцевого продукту специфікаціям.

Із кожної партії цільового продукту залишають проби на зберігання терміном, який перевершує на рік строк придатності продукту. Проби мають зберігатись у такій кількості, щоб можна було за необхідності провести щонайменше два повторних дослідження.

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

Необхідно пам'ятати про те, що особи, які мають підвищену чутливість до конкретної речовини (діючої або допоміжної) не повинні входити у групу виконавців. Для них допустима робота у відділі або цеху упаковки, де відсутній контакт з алергеном.

У 1991 р. затверджені правила GMP стосовно виробництва і контролю якості лікарських засобів. Ці правила відповідають Міжнародній системі GMP і включають наступні розділи: вступ, термінологія, персонал, будинки і приміщення, обладнання, процес виробництва, відділ технічного контролю, атестація і контроль виробництва, окремі вимоги до стерильних лікарських засобів і описані особливості їх виробництва.

Додержання правил GMP забезпечує випуск якісних продуктів і гарантує безпеку споживачам. У 1995 р. за пропозицією Міжнародної фармацевтичної федерації (FIP) ВООЗ затвердила GPP (Good Pharmacy Practice).

Державним департаментом ветеринарної медицини України проводяться заходи щодо гармонізації існуючої законодавчо-нормативної бази з вимогами Європейського фармацевтичного законодавства шляхом введення в дію стандартів, які регламентують процес виробництва ветеринарних препаратів, дістриб'юторську діяльність, а також інспекцію виробництва фармацевтичної продукції. Одним із етапів розробки стандартів є їх переклад українською та російською мовами, який здійснюється провідними вченими і спеціалістами України.

Контрольні питання

1. Що таке біотехнологія і на чому вона базується?
2. Коли виникла біотехнологія і завдяки чому вона пережила своє друге народження?
3. Які біологічні об'єкти використовуються у біотехнології? Їх класифікація.
4. Які методи використовуються у біотехнології?
5. Що є завданням біотехнології?
6. Які існують міжнародні системи правил, що регламентують проведення стандартизації лікарських препаратів та інших біологічно активних речовин та їх виробництво?
7. Що таке система GLP і для чого вона застосовується?
8. Що таке система GMP і як вона реалізується?

Розділ 3.

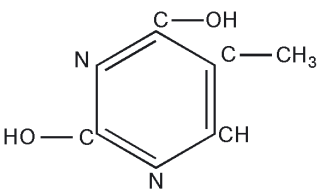
ОСНОВИ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ

3.1. НУКЛЕЇНОВІ КИСЛОТИ

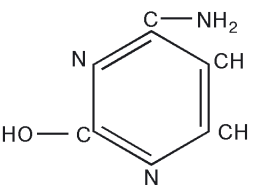
Усі живі організми є носіями двох типів нуклеїнових кислот (НК): рибонуклеїнових (РНК) і дезоксирибонуклеїнової (ДНК). У вірусах присутній тільки один з двох названих типів НК: РНК чи ДНК. НК належать до макромолекулярних сполук, розмір молекул яких коливається в широких межах. Так, молекулярна маса транспортних РНК (тРНК) складає близько $2{,}5 \cdot 10^4$, тоді як молекулярна маса ДНК досягає колосальних величин — 10^6–10^9. Біологічна роль НК полягає у збереженні, реплікації, рекомбінації та передачі генетичної інформації.

3.1.1. Хімічний склад нуклеїнових кислот

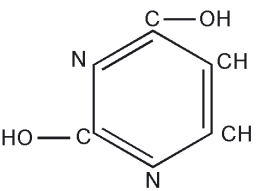
До складу молекул НК входять атоми азоту (15–16 %), фосфору (8–10 %), вуглецю, кисню і водню. З метою ідентифікації компонентів, що входять до складу НК, і їхнього кількісного визначення ДНК і РНК піддають ферментному або найчастіше кислотному гідролізу, у результаті чого виявляють пуринові (у молекулі пурину шестичленне кільце піримідину і п'ятичленний гетероцикл імідазолу знаходяться в конденсованому стані, утворюючи біциклічне похідне) (аденін і гуанін) і піримідинові (тимін, цитозин і урацил) азотисті основи, моноцукри — пентози (рибозу і дезоксирибозу) та фосфорну кислоту:



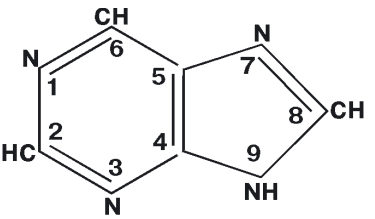
Тимін (5-метил-2,4-діоксипіримідин)



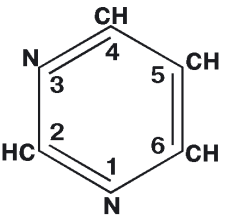
Цитозин (2-окси-4-амінопіримідин)



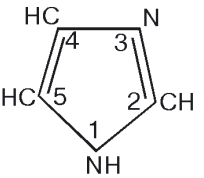
Урацил (2,4-діоксипіримідин)



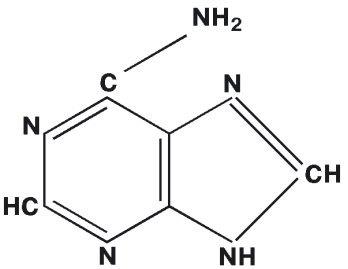
Пурин



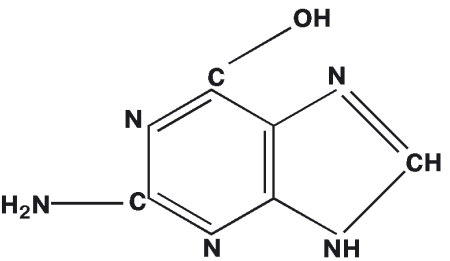
Піримідин



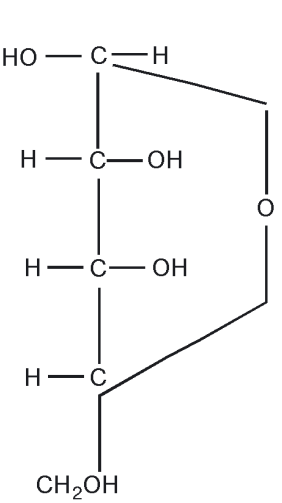
Імідазол



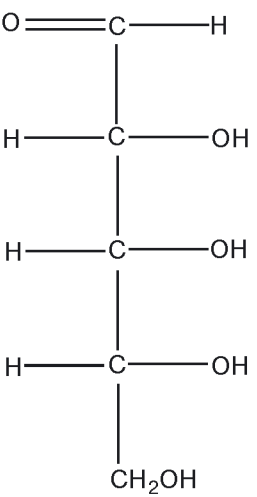
Аденін (6-амінопурин)



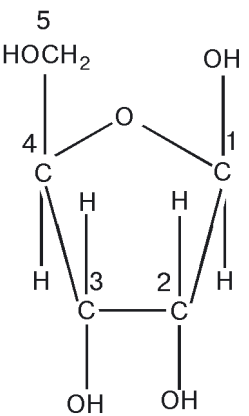
Гуанін (2-аміно-6-оксипурин)



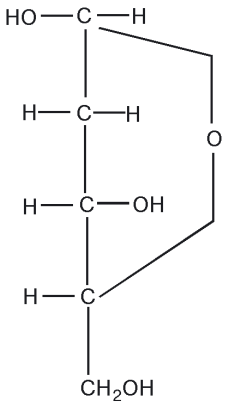
β-D-рибоза



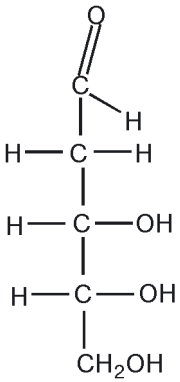
D-рибоза



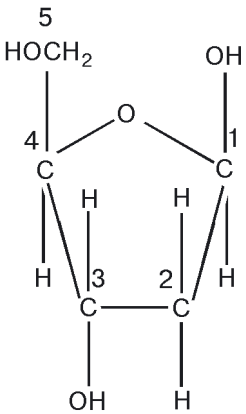
β-D-рибофураноза



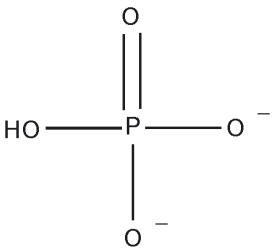
β-D-2-дезоксирибоза



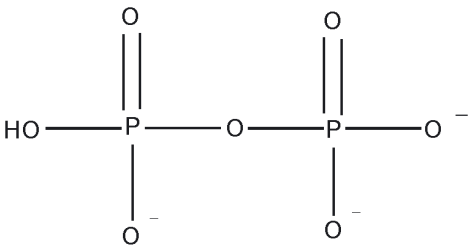
2-дезоксирибоза



β-D-2-дезоксирибофуранова



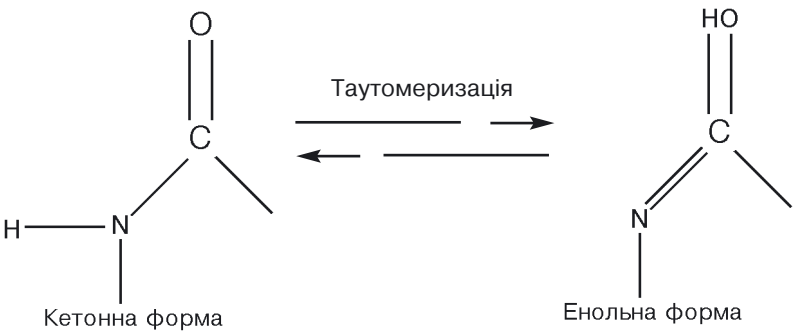
Неорганічний фосфат
($Ф_н$, або Pi)



Неорганічний піфосфат
($ФФ_н$, або PPi)

Крім названих похідних пурину і піримідину, в гідролізатах НК міститься кілька десятків інших основ (1-метиладенін, 1-метилгуанін, N_2-диметилгуанін, N_6-диметиладенін, N_7-метилгуанін, 5-метилцитозин, 5-оксиметилцитозин, 4-тіоурацил, дігідроурацил та ін.), які через малу кількість отримали назву екзотичних, або мінорних компонентів. Їхня біологічна роль, очевидно, зводиться до захисту НК від руйнівної дії ферментів. Особливо багато мінорних основ у складі тРНК (близько 60).

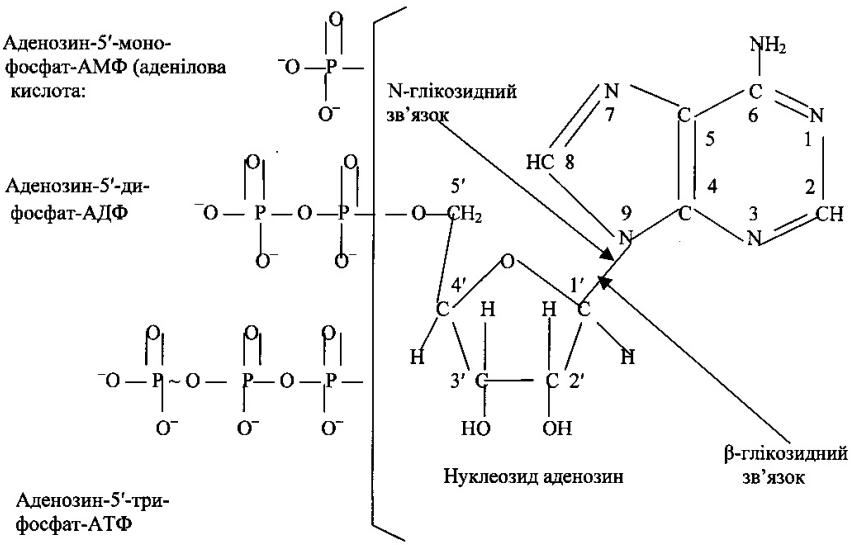
Азотисті основи, що містять ОН-групи (гуанін, цитозин, тимін і урацил), здатні до кето-енольних таутомерних перетворень і залежно від реакції середовища можуть знаходитися в енольній (лактимній) чи кетонній (лактамній) формі:



За фізіологічних умов більш стабільними є кетоструктури; у кетоформі азотисті основи входять до складу нуклеїнових кислот.

З п'яти вищеназваних пуринових і піримідинових азотистих основ до складу ДНК входять аденін, гуанін, цитозин і тимін. Вони містяться і в РНК, але замість тиміну присутній урацил. Назва НК залежить від пентози, що входить до її складу: у ДНК вуглеводний компонент представлений дезоксирибозою, у РНК — рибозою. Ця відмінність у будові рибози і дезоксирибози (заміна у другого вуглецевого атома рибози ОН-групи на Н) сприяє зміцненню зв'язку між другим і третім атомами вуглецю і створює сприятливі умови для компактного укладання молекули ДНК.

При ферментному гідролізі НК утворюються продукти, що складаються із залишків азотистих основ, рибозного чи дезоксирибозного компонентів та фосфорної кислоти:



Атоми вуглецю пентози мають цифрові позначення зі штрихом, щоб можна було відрізнити їх від вуглецевих атомів, що входять у пуринові чи піримідинові гетероцикли.

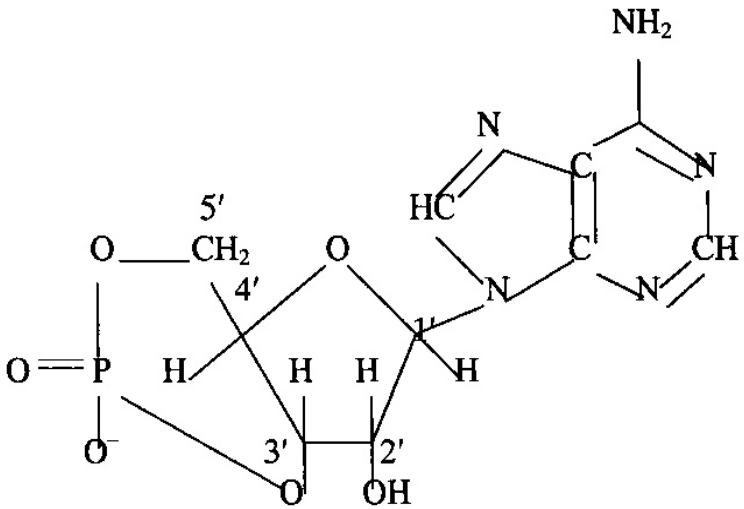
Сполуки, що складаються із залишків тієї чи іншої азотистої основи, пентозного (рибозного чи дезоксирибозного) компонента і фосфорної кислоти, називаються нуклеотидами. Вони є мономерними одиницями олігонуклеотидів і полінуклеотидних структур НК. Відщеплення від нуклеотида фосфорної кислоти супроводжується утворенням відповідного нуклеозида. Продукти фосфорилювання нуклеозидів, зокрема нуклеозидтрифосфати, використовуються для біосинтезу ДНК і РНК. Нуклеозиди і нуклеотиди одержують назви за азотистими основами, що входять до їх складу. Якщо вуглеводний компонент нуклеозиду представлений дезоксирибозою, то перед назвою відповідного нуклеотида ставиться префікс дезокси, наприклад дезоксигуанозин-5-трифосфат (д-ГТФ). Дані за номенклатурою нуклеотидів, нуклеозидів і азотистих основ представлені в табл. 3.1.

Таблиця 3.1.

Номенклатура азотистих основ, нуклеозидів і нуклеотидів

Азотисті основи	*Нуклеозиди*	*Нуклеотиди*		
		Повна назва	*Скорочена назва*	
			українська	*міжнародна*
Аденін	Аденозин	Аденілова кислота (аденозин-монофосфат)	АМФ (А)	AMP (A)
Гуанін	Гуанозин	Гуанілова кислота (гуанозин-монофосфат)	ГМФ (Г)	GMP (G)
Цитозин	Цитидин	Цитидилова кислота (цитидин монофосфат)	ЦМФ (Ц)	CMP (C)
Тимін	Тимідин	Тимідилова кислота (тимідин монофосфат)	ТМФ (Т)	TMP (T)
Урацил	Уридин	Уридилова кислота (уридинм онофосфат)	УМФ (У)	UMP (U)

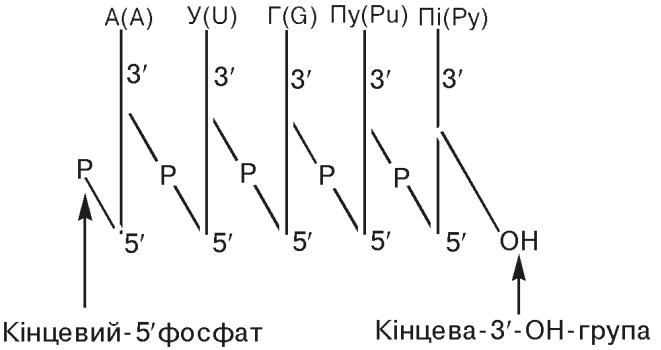
Існують нуклеотиди, що мають циклічну будову. Це насамперед циклічні аденозинмонофосфати (цАМФ чи cAMP), гуанозинмонофосфати (цГМФ чи cGMP) і цитозинмонофосфати (цЦМФ чи cCMP). Циклічні АМФ і ГМФ утворюються з відповідних нуклеозидтрифосфатів під дією ферментів аденілатциклази і гуанілатциклази. Біологічне значення цАМФ полягає в його контролі за активністю ферментів (вторинний медіатор); роль первинного регулятора виконує адреналін, що активує аденілатциклазу. Механізм дії цГМФ і цАМФ подібний, однак при дії на той самий фермент цГМФ чинить протилежний ефект, тобто є інгібітором ферментів. Даних про біологічну активність цЦМФ поки що мало відомо:



Аденозин-3′,5′-цикломонофосфат (цАМФ, або cAMP)

3.1.2. Структура нуклеїнових кислот

Первинна структура. Залишки нуклеотидів у полінуклеотидному ланцюзі з'єднані фосфодіефірними зв'язками між 5′-ОН-групою пентози одного нуклеотиду і 3′-ОН-групою пентози іншого нуклеотиду. При скороченому зображенні формул НК вуглеводний компонент має вигляд вертикальних ліній, над якими знаходяться символи азотистих основ. Іноді обмежуються позначенням приналежності азотистих основ до пуринів (Пу, Pu) чи піримідинів (Пі, Ру). Фосфодіефірні зв'язки між залишками сусідніх нуклеотидів мають вигляд косих ліній, посередині яких знаходиться хімічний знак фосфору (Р):



У таких і ще більш скорочених формулах полінуклеотидів 5′-кінець нуклеотидного залишку прийнято розташовувати ліворуч:

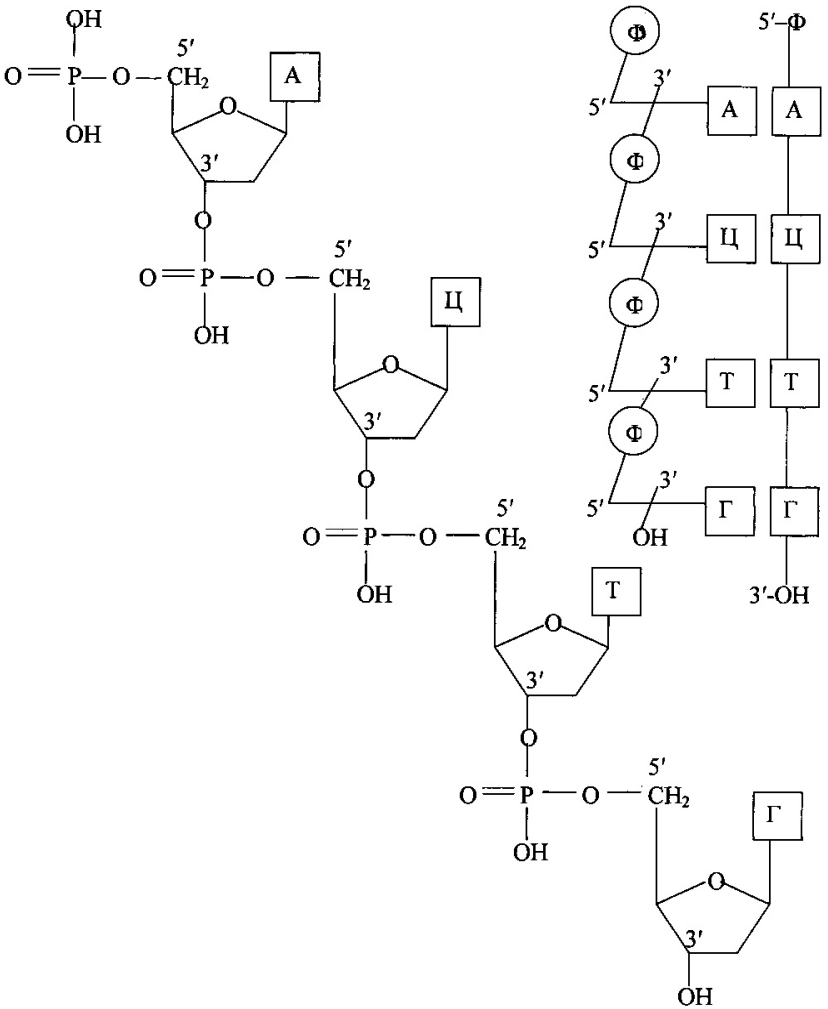
5′ – Г – У – Г – Ц – А – А У – Ц – Г – Ц – Ц – А – 3′,

чи

5′ – G – U – G – C – A – A U – C – G – C – C – A – 3′.

Гідроліз полінуклеотидного з'єднання приведе до утворення гуанілової кислоти як кінцевого нуклеотида з вільним фосфатом у 5′-кінці і вільного аденозину в 3′-кінці.

Послідовність розташування чи порядок чергування залишків мононуклеотидів у полінуклеотидному ланцюзі визначає первинну структуру ДНК і РНК. В утворенні первинної структури беруть участь глікозидний зв'язок, що з'єднує азотисті основи з пентозою, ефірний зв'язок між рибозою чи дезоксирибозою і фосфорною кислотою та фосфодіефірний зв'язок між нуклеотидами. Усі ці зв'язки ковалентні, досить міцно стабілізують первинну структуру. При цьому встановлено, що нуклеотиди в полінуклеотидні ланцюги зв'язані в ДНК і РНК за допомогою 3′, 5′-фосфодіефірних зв'язків. Послідовність нуклеотидів у полінуклеотидному ланцюзі ДНК подається у вигляді різних варіантів схем:

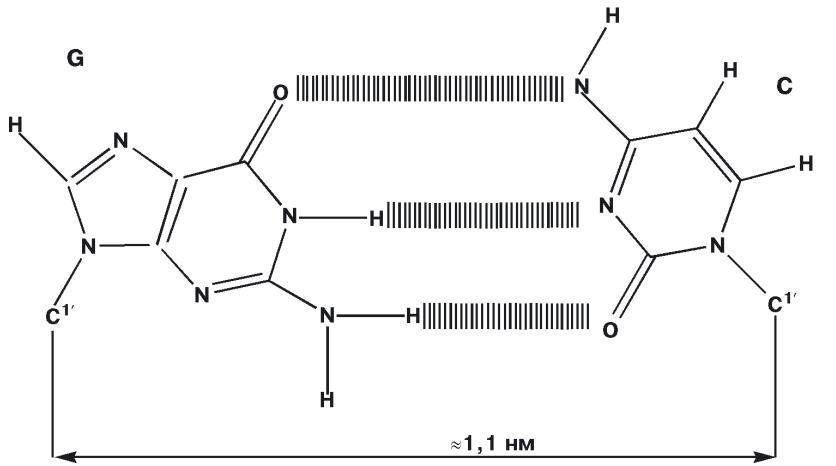


Взаємодії між пурин-піримідиновими парами основ, що забезпечують зв'язок поліпептидних ланцюгів у ДНК, представлені на рис. 3.1. Розгалужень у поліпептидному ланцюзі ДНК не виявлено.

Питання щодо встановлення первинної структури ДНК пов'язано з величезними труднощами, які полягають у тому, що молекулярна маса навіть найменших молекул ДНК обчислюється мільйонами дальтон. З огляду на це за ініціативою і участю

Гуанін — — — — Цитозин
— — — —
— — — —

(три водневі зв'язки)



Аденін — — — — Тимін
— — — —

(два водневих зв'язки)

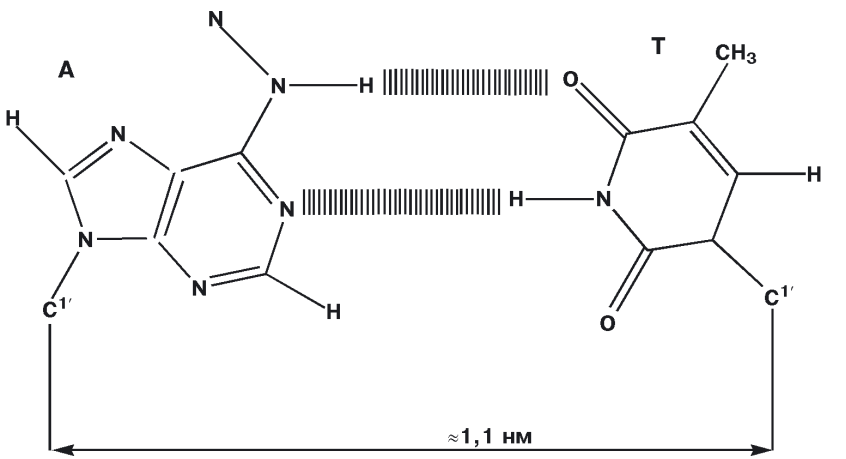


Рис. 3.1. ***Пурин-піримідинові пари основ у ДНК***
(за Бохінські Р., 1986)

СРСР і США у 1988 році було розпочато виконання важливої Міжнародної програми «Геном людини», кінцевою метою якої стало визначення повної генетичної карти людини і розшифрування нуклеотидних послідовностей не тільки в екзонних, але й в інтронних фрагментах ДНК. У 2001 році, але вже без участі СРСР, який на цей час припинив своє існування, вперше було опубліковано відомості про первинну структуру ДНК людини. У вирішенні цього питання брали участь тисячі науковців з більш ніж 20 країн світу. Вони встановили, що у 23-х парах хромосом ядра соматичної клітини людини знаходяться близько 3,2 млрд. мононуклеотидних пар, не враховуючи нуклеотидний склад мітохондрій. Цікавим є повідомлення про те, що загальна довжина ДНК у ядрах всіх клітин людини досягає астрономічної величини -10^{11} км, що майже в 1000 разів перевершує відстань від Землі до Сонця.

Вторинна структура. При вивченні хімічного складу нуклеїнових кислот були встановлені значні розходження у відносному вмісті азотистих основ у різних ДНК, однак молярне співвідношення між аденіном і тиміном, а також між цитозином і гуаніном у всіх досліджених ДНК залишалося рівним приблизно 1:1, тобто число залишків аденіну дорівнює числу залишків тиміну, а число залишків гуаніну — числу залишків цитозину. На основі цих даних Чаргаффом Є. (1950) була висунута концепція про спарювання основ у ДНК, чи правило комплементарності, відповідно до якого азотисті основи взаємодіють між собою при біосинтезі молекул ДНК у будь-яких організмах: аденін — з тиміном, а гуанін — з цитозином.

Франклін Р. та Уілкінс М. методом рентгеноструктурного аналізу одержали дані, з яких випливало, що молекули ДНК, напевно, мають будову спіралі, що складається з декількох ланцюгів.

Модель ДНК у вигляді подвійної спіралі була запропонована в 1953 р. Уотсоном Дж. та Кріком Ф. на підставі аналізу отриманих Франклін Р. та Уілкінсом М. картин рентгенівської дифракції волокон ДНК. Уотсон Дж. та Крік Ф. встановили, що ДНК — це подвійна спіраль, що складається з двох антипаралельних полінуклеотидних ланцюгів. У запропонованій структурі найважливішим моментом є спарювання азотистих основ

антипаралельних ланцюгів шляхом утворення між ними водневих зв'язків, що можуть виникнути тільки за умови, що по ходу біспіральної структури ДНК аденін утворить пару з тиміном, а гуанін — з цитозином. З'єднані за допомогою водневих зв'язків азотисті основи називають комплементарними, а процес виборчої взаємодії аденіну з тиміном, гуаніну з цитозином — комплементарністю. Схему спарювання азотистих основ вже можна вважати експериментально доведеною. Послідовність нуклеотидів у ланцюгах біспіральної структури ДНК комплементарна, але не ідентична. Стійкість біспіральної структури ДНК забезпечується за рахунок двох водневих зв'язків між тиміном і аденіном і трьох водневих зв'язків між цитозином і гуаніном (рис. 3.2). Комплементарність окремих азотистих основ приводить до того, що комплементарними виявляються дезоксирибонуклеотидні ланцюги ДНК у цілому. Зі схеми випливає, що в одному ланцюзі зв'язок між нуклеотидами йде в напрямку 5′→3′, а в іншому — у протилежному напрямку — 3′–5′. Антипаралельна спрямованість комплементарних ланцюгів має біологічну основу при реплікації і транскрипції ДНК.

Крім водневих зв'язків між атомами водню, азоту і кисню в комплементарних азотистих основах у стабілізації біспіральної структури ДНК важливу роль відіграють так звані стекинг-взаємодії, що виникають між азотистими основами в зв'язку з гідрофобними силами, що діють на відстані ван-дер-ваальсового радіуса.

Рентгеноструктурний аналіз волокон і кристалів показав, що існує три типи подвійної спіралі ДНК (А-, В- і Z-форма) і один тип подвійної спіралі РНК. А- і В-ДНК є правозакрученими спіралями, а Z-ДНК — лівозакручена форма. В-форма ДНК стійка при відносній вологості, що перевищує 92 %; якщо ж вологість зменшується нижче 75 %, більшість дезоксирибонуклеотидних послідовностей приймає А-форму. Обидві форми нагадують гнучкі сходи, спірально закручені навколо центральної осі. Залишки дезоксирибози і фосфатні групи, що чергуються, слугують поручнями «драбини», а сходинками є комплементарні пуринпіримідинові пари основ.

Місця приєднання азотистих основ до залишків дезоксирибози в комплементарних ланцюгах ДНК розташовані не чітко

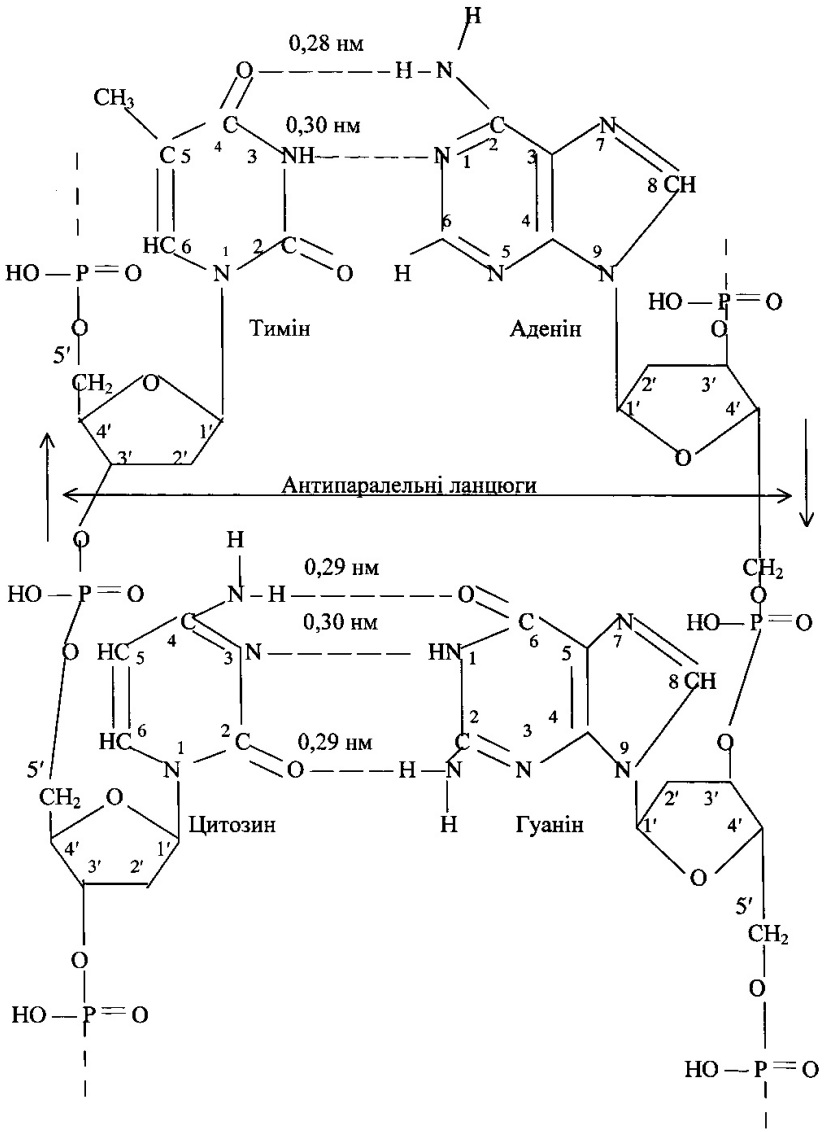


Рис. 3.2. ***Антипаралельні комплементарні ланцюги фрагмента ДНК***
(за Березовим Т.Т. та Коровкіним Б.Ф., 1983)

один проти одного стосовно осі спіралі. Це позначається на всій конформації ДНК. З того боку від осі спіралі, де кут між дезоксирибозними кільцями менше 180°, міститься жолоб, іменований малою чи глікозидною борозною (у її бік спрямовані глікозидні зв'язки, що з'єднують дезоксирибозні залишки з азотистими основами); з протилежного боку знаходиться велика борозна, або неглікозидний жолоб. У біспіральній структурі ДНК фосфатні групи складають ніби стінки великого і малого жолобів, а «краї» пуринових і піримідинових основ утворюють дно. На дні великої борозни знаходяться атоми азоту і кисню, що можуть з'єднуватися водневими зв'язками з бічними ланцюгами амінокислотних залишків білка і відігравати важливу роль у процесі розпізнавання.

У пуринових і піримідинових основах, що утворюють комплементарні пари, розташування груп, здатних до утворення водневих зв'язків, різне. У парі А-Т у напрямку від аденіну до тиміну спочатку розташовується атом азоту — акцептор водню, далі — NH_2-група — донор водню і, нарешті, атом кисню — знову акцептор. У комплементарній парі G—C спочатку йде атом азоту — акцептор, далі кисень — знову акцептор і потім NH_2-група — донор водню. У зв'язку з тим, що кожну комплементарну пару можна розглядати у протилежному напрямку Т-А і С-G, то можливі чотири варіанти сполучень донорських і акцепторних угруповань у ланцюзі ДНК, що можуть розпізнаватися репресором чи іншими регуляторними білками. Отже, інформація, закодована в ДНК у вигляді послідовності азотистих основ, з боку великої борозни може бути розшифрована будь-якою іншою великою молекулою. Мала борозна менш інформативна й у В-формі ДНК вона відіграє іншу роль.

А- і В-форми ДНК відрізняються між собою в основному розташуванням і кутом нахилу пари основ стосовно осі спіралі. У В-формі площини основ майже перпендикулярні осі спіралі, що проходить через центри пар основ. Мала борозна вужча за велику через несиметричність місць приєднання азотистих основ до залишків дезоксирибози, а глибина обох борозен приблизно однакова. В А-формі ДНК площина пари основ відхиляється від перпендикуляра до осі спіралі на 13–19°; пари основ зміщені до зовнішньої поверхні, внаслідок чого вісь спіралі ле-

жить у великій борозні, не проходячи через пари основ. Така конфігурація А-форми ДНК зумовила значні розбіжності в глибині борозен: мала борозна виявляється неглибокою, а велика навпаки — глибокою. У В-ДНК на один виток спіралі припадає у середньому 10 пар основ, відстань по осі між сусідніми парами — 0,34 нм; в А-формі ДНК до складу витка входить близько 11 пар основ, а відстань у зв'язку з цим зменшено до 0,29 нм; відстань між витками (крок спіралі) дорівнює 3,4 нм (для моделі Кріка-Уотсона і В-форми) і 2,8 нм — для А-форми. Z-форма містить близько 12 залишків у одному витку. Діаметр подвійної спіралі — 1,8 нм (2 нм між атомами фосфору) для моделі Кріка-Уотсона й А-форми; для В-форми — 1,7 нм. Названі параметри, отримані при вивченні волокон ДНК, є усередненими.

Дані, отримані при дослідженні кристалів ДНК і оброблені математичним шляхом, свідчать про наявність значних відхилень від середніх значень. Порівняння моделі Кріка-Уотсона з характеристиками В- і А-форм ДНК показує, що за кількістю пар основ, які входять в один виток, за розташуванням площини пар основ щодо осі спіралі В-форма збігається з моделлю Кріка-Уотсона; зрушення пар основ щодо осі і наявний у зв'язку з цим центральний канал, розташування дезоксирибозних залишків більше відповідають їхній конформації в А-спіралі ДНК. Такі параметри, як кут спірального обертання (кут повороту між двома сусідніми парами основ), кількість пар азотистих основ, що містяться в одному витку, відстань між сусідніми парами основ по осі спіралі і деякі інші, визначені при рентгеноструктурному аналізі і передбачені на підставі досліджень волокон ДНК, добре узгоджуються.

Викликають інтерес і вимагають пояснення значні відхилення від середніх показників локальних значень кута спірального обертання, кута «пропелера» (кут «пропелера» вимірює поворот двох основ пари в протилежних напрямках навколо з'єднуючої їхньої подовжньої осі), кута «відкриття» (в А-формі спіраль ДНК обгинає центральну вісь, внаслідок чого між парами основ існують щілини, що відкриваються в малу борозну на зразок міхів акордеона) та інших параметрів. Локальні значення кута спірального обертання для В-ДНК коливаються від 28 до 42°, а для А-форми ДНК — від 16 до 44°. На підставі цих

даних висловлюється думка, що такі варіації в конформації спіралі розпізнає репресор чи інший регуляторний білок. Крім того, передбачається, що послідовність залишків нуклеотидів впливає не тільки на генетичну інформацію, але й на регуляцію її експресії, а локальний перехід визначених регуляторних ділянок, скажімо, з правоспіральної B-конформації в лівоспіральну Z-форму зможе істотно впливати на доступність генетичної інформації і на процес її зчитування (наприклад, зміною ступеня суперспіралізації ковалентно замкнутих кільцевих ДНК). ДНК у B-формі знаходиться в процесі реплікації (синтез ДНК на молекулі ДНК), а гібрид ДНК–РНК, що утвориться на певний час, у процесі транскрипції, імовірно, має структуру A-спіралі.

Вторинна структура РНК поки що вивчена недостатньо. Наявність гідроксилу у другого вуглецевого атома рибози призводить до того, що РНК, очевидно, не може утворювати подвійну спіраль B-типу. У гіпотетичній подвійній спіралі B-типу відстань між атомом кисню 2′-гідроксильної групи рибози і деякими з навколишніх її атомів стає настільки малим, що B-форма РНК стереохімічно неможлива; в A-формі 2′-OH-група рибози розташовується на поверхні спіралі й у зв'язку з цим віддалена від сусідніх атомів. Отже, самокомплементарні двонитчасті ділянки в тРНК повинні бути варіантами A-спіралі. Короткі самокомплементарні двонитчасті ділянки в РНК (так звані шпильки), швидше за все, також мають бути виражені A-формою. Поки що є один приклад B-форми РНК: це синтетичний гібрид, що складається з ланцюга аденілових рибонуклеотидів у ланцюзі тимідилових дезоксирибонуклеотидів. Даних про Z-форму РНК поки що немає. Найбільш ймовірно вторинною структурою всієї молекули тРНК є модель, запропонована Холлі, плоске зображення якої за формою схоже на листок конюшини (рис. 3.3).

Третинна структура. Для вивчення третинної структури ДНК необхідно мати її в інтактному (неушкодженому) вигляді. На сьогодні таким чином виділені деякі ДНК вірусів, мітохондрій і хлоропластів. Довжина двоспіральної молекули в хромосомі людини у витягнутому стані могла б досягти 8 см; насправді її довжина 5 нм. Таке надзвичайно ощадливе упакування досягається за рахунок суперспіралізації вторинної

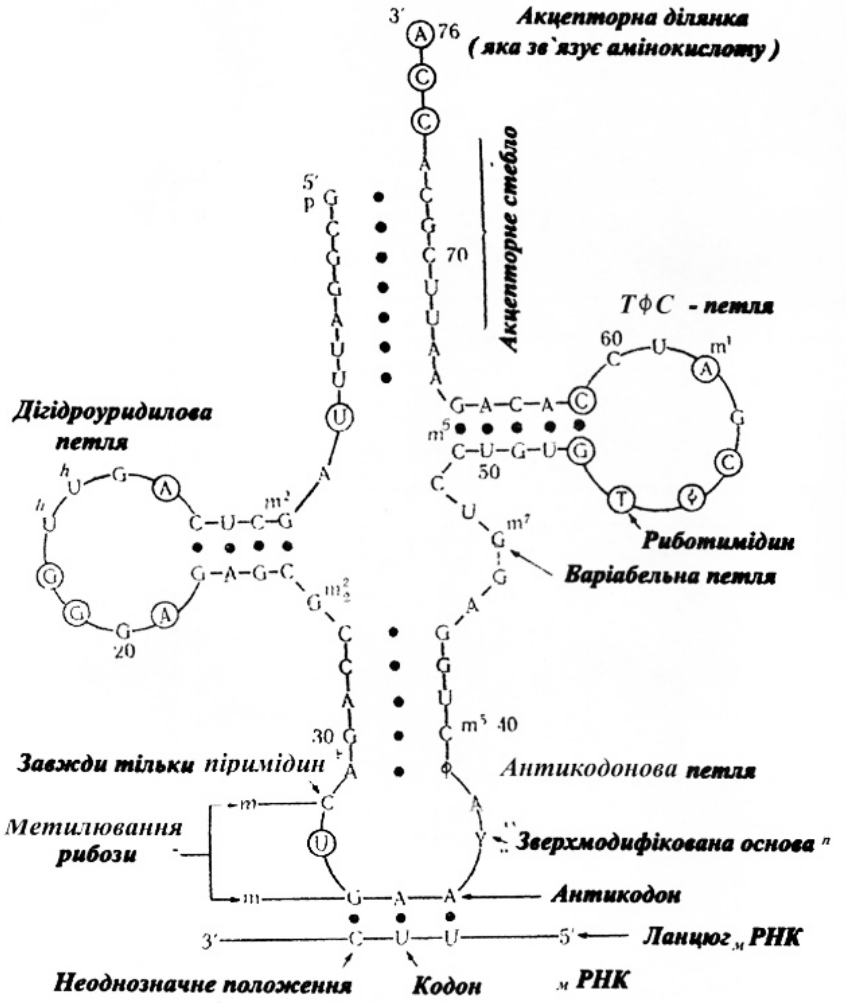


Рис. 3.3. ***Схема молекули фенілаланінової тРНК***
(за Мецлером Д., 1980)

структури. Ступінь суперспіралізації (наявність додаткових супервитків чи суперспіралей) встановлюється за зміною константи седиментації. Суперспіралі часто зустрічаються в кільцевих молекулах ДНК. Так, хромосома E.coli — це єдине замкнуте кільце. Кільцеві молекули ДНК часто виявляються в мітохондріях, деяких вірусах, ядрі еукаріот. Кільцеві молекули, як правило, закручуються самі на себе, утворюючи суперспіральні молекули із супервитками. Скручування подвійної спіралі самої на себе призводить до утворення суперскрученої правозакрученої структури. Це явище називається негативною суперспіралізацією. У результаті суперспіралізації на кожен супервиток припадає 20–25витків подвійної спіралі. Завдяки суперспіралізації дуже довга молекула ДНК (1360 мкм в E.coli і 990 тис. мкм у людини) упаковується в малому об'ємі бактеріальної клітини чи ядрі клітини еукаріот. Виділено ферменти ДНК-топоізомерази, що каталізують процес суперспіралізації (ДНК-гірази), а також переводять суперспіралізовані структури в релаксований стан (ДНК-розплітази); факт перебування ДНК у стані суперспіралізації підтверджений за допомогою методу електронної мікроскопії. Процес суперспіралізації ДНК у еукаріот проходить за участю гістонових білків, серед яких залежно від вмісту лізину й аргініну розрізняють п'ять основних класів (табл. 3.2).

Таблиця 3.2.

Вміст лізину і аргініну в гістонах, %

Гістон	*Лізин*	*Аргінін*
H1	24,8	2,6
H2a	10,9	9,3
H2b	16,0	6,4
H3	9,6	13,3
H4	10,8	13,7

Полікатіонна природа гістонів забезпечує їхню взаємодію з поліаніонним пентозофосфатним каркасом і поряд з водневими зв'язками стабілізує структуру ДНК еукаріот. У ДНК мітохондрій, хлоропластів і прокаріотичних клітин фактором, що стабілізує структуру цих поліаніонних макромолекул, є неорганічні

катіони, а не білок. Значний внесок у стабілізацію структури ДНК вносять гідрофобні взаємодії в щільно упакованих азотистих основах, укладених у серцевині спіралі. Взаємодія ДНК із гістонами приводить до формування нуклеосом — структурних одиниць хроматину (рис. 3.4). У кожній нуклеосомній часточці

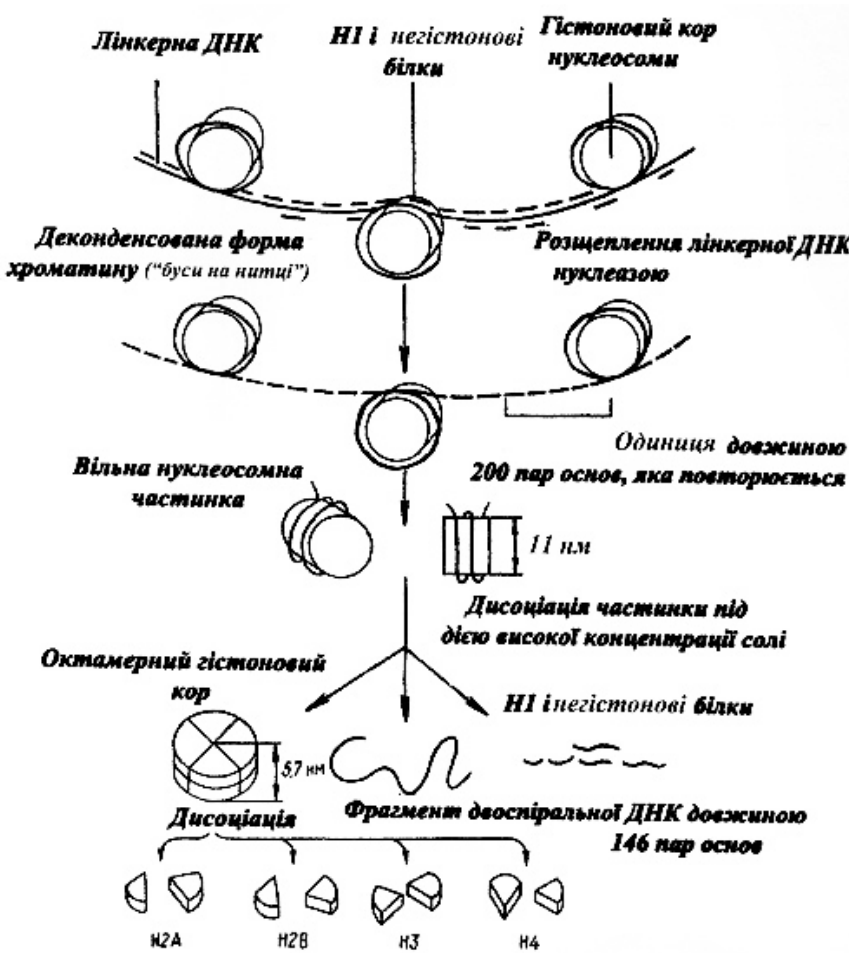


Рис. 3.4. ***Схема будови нуклеосоми***
(за Албертсом Б. та ін., 1986)

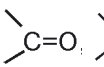
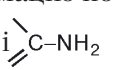
фрагмент ДНК довжиною 100–200 нуклеотидних пар закручений навколо гістонового кора, що являє собою октамерну структуру, до складу якої входить по дві молекули кожного з гістонів H2a, H2b, H3 і H4. Сусідні нуклеосоми зв'язані між собою ділянками лінкерної ДНК (спейсерні ділянки) довжиною близько 50 пар основ; спейсерні ділянки включають по одній молекулі гістона H1, а також негістонові білки. Висловлюється думка про можливу участь гістонів у регулюванні генної активності. Структурна гетерогенність хроматину і зв'язана з його структурою функціональна активність значною мірою обумовлені ковалентними модифікаціями (ацетилювання, фосфорилювання, метилювання й ін.) амінокислот гістонових білків. Суперспіралізовану молекулу ДНК можна перевести у відкриту (релаксовану) кільцеву форму, розірвавши один чи обидва ланцюги подвійної спіралі за допомогою короткочасної обробки її ферментом. Релаксована форма молекули, що утворюється, седиментує повільніше. Суперспіральність впливає на в'язкість розчинів ДНК і на електрофоретичну рухливість макромолекул. У деяких випадках наявність супервитків можна спостерігати за допомогою електронного мікроскопа. ДНК являє собою динамічну структуру, що легко модифікується. Перехід суперспіральної ДНК у відкриту кільцеву молекулу є необхідним етапом процесу реплікації.

Суперспіральна структура ДНК може бути також виявлена розривом спіралі (одного чи обох ланцюгів) під впливом інтеркаліруючих з'єднань (інтеркаляція — це вбудовування плоских ароматичних кілець між парами основ ДНК). До реагентів, які викликають інтеркаляцію, належать деякі лікарські препарати, барвники й інші речовини. Застосування таких речовин пов'язане з певним ризиком, тому що інтеркалюючі сполуки мають мутагенну дію. В міру зростання ступеня інтеркаляції відбувається розкручування витків вторинної структури ДНК: кожне інтеркалююче кільце викликає розкручування спіралі на 26°. В інтактних клітинах інтеркалюючими агентами можуть бути ароматичні кільця бічних ланцюгів амінокислот при взаємодії білків з ДНК. Зміна в щільності супервитків, викликана інтеркаляцією чи зміною іонного оточення, може мати біологічне значення щодо генетичної регуляції і насамперед у дотриманні послідовності

у взаємодії ДНК із внутрішньоклітинними ферментними системами. Можливі й інші способи укладання ДНК у просторі.

Одноланцюгові рибонуклеїнові кислоти (інформаційна, рибосомна і транспортна) при фізіологічних значеннях pH, іонної сили і температури мають велику кількість комплементарних ділянок (так званих шпильок), що визначають стійкість їхньої третинної структури. Плоска структура нативних молекул тРНК, що нагадує за формою листок конюшини, за рахунок укладання різних частин перетворюється в компактну структуру.

У деяких фагів молекула ДНК побудована з однієї спіралі; у той же час є віруси, у яких РНК складається з двох ланцюгів і за структурою нагадує ДНК.

Таким чином, варто наголосити, що спіраль ДНК містить інформацію двох типів, що кодується і зчитується по-різному: власне генетична інформація, що визначає структуру білка, та інформація, що є свого роду «інструкцією» для вибіркового читання того чи іншого фрагмента запису. В основі збереження і реалізації інформації обох типів лежать фізико-хімічні процеси, багато в чому обумовлені функціональними групами, що входять до складу нуклеїнових кислот. Іонізовані фосфатні групи, що входять до складу нуклеїнових кислот, обумовлюють їхній негативний заряд, завдяки чому ДНК в організмі знаходиться у вигляді комплексів з білками, які несуть позитивний заряд (гістони і протаміни), поліамінами і металами. Наявність вільних OH-груп біля другого вуглецевого атома рибозного залишку РНК значною мірою визначає конформацію полімерних макромолекул. Полярні групи  і  азотистих основ нуклеїнових кислот здатні утворювати водневі зв'язки з білками, а також між комплементарними азотистими основами в біспіральній структурі ДНК. У зв'язку з цим ДНК і РНК є реакційно здатними сполуками. Порівняно легко проходять реакції метилювання азотистих основ, завдяки чому уявлення про ДНК як про ланцюг, що містить тільки чотири види нуклеотидів, варто вважати спрощеним. Метильовані азотисті основи гідроксилюються і виникають їх оксиметильні похідні. Метилювання відбувається після синтезу полінуклеотида. Метилювання і гидроксилювання метильних похідних мають біологічний сенс.

Метилювання захищає ДНК від впливу ферментів при потраплянні в клітину вірусів. Крім того, існує припущення, що метильовані азотисті основи є маркерами деяких специфічних ділянок генетичних копій. Модифікації в молекулі РНК досить розповсюджені. Між азотистими основами здійснюється стекинг-взаємодія, вбудовуються плоскі ароматичні кільця бічних ланцюгів амінокислот та інших ароматичних з'єднань (інтеркаляція). Під впливом азотистої кислоти NH_2-група азотистих основ переходить в ОН-групу:

$$-NH_2 \xrightarrow{HONO} N= \underset{|}{C}-OH \xrightarrow{Таутомеризація} NH-\underset{|}{C}=O,$$

у зв'язку з чим цитозин перетворюється в урацил, аденін — у гіпоксантин, гуанін — у ксантин; реагує з NH_2-групою формальдегід. Гідроксиламін ($H_2N–OH$) вступає в реакцію навіть з тими карбонільними ($-C{=}{=}O$) групами, особливо в піримідинах, що є частиною циклічної структури. Урацил і тимін більшою, а цитозин, які входять до складу нуклеїнових кислот, меншою мірою, під впливом ультрафіолетових променів димеризуються і гідруються. Це в остаточному підсумку може викликати мутагенний ефект.

Діапазон змін дезоксирибонуклеотидного складу ДНК у живих організмів дуже широкий: у представників прокаріот цитозину і гуаніну міститься 22–74 %; в еукаріотичних організмів — 28–58, а в ссавців — 35–45 %. За вмістом цитозину і гуаніну в ДНК іноді стверджують про філогенетичну спорідненість організмів. Слід при цьому враховувати високу фотохімічну чутливість тиміну до ультрафіолетового світла, у зв'язку з чим високий вміст гуаніну і цитозину спостерігається в бактерій, що живуть у добре освітлених місцях, і низьке — у тих, що живуть у захищеному від сонця середовищі.

Нуклеотидний склад ДНК в організмів одного виду не залежить від віку, умов харчування й інших факторів. Чіткою сталістю характеризується також кількісний вміст ДНК у розрахунку на одну клітину незалежно від того, з яких тканин вона виділена (винятковими є статеві клітини, де ДНК міститься удвічі менше, ніж у соматичних клітинах); у клітинах однієї тка-

нини в різних видів тварин кількість ДНК має істотні розходження (пікограм на одну клітину): у людини — 6,8; курки — 2,3; крокодила — 5,0; коропа — 3,5; дріжджів — 0,05; кишкової палички — 0,014; вірусу віспи птахів — $2{,}7 \cdot 10^{-4}$; фага Х174 — $2{,}6 \cdot 10^{-6}$.

Реплікація ДНК. Побудова моделі двоспіральної молекули ДНК дозволило Д. Уотсону і Ф. Кріку в тому ж 1953 р. сформулювати гіпотезу про механізм реплікації цієї макромолекули. У своєму припущенні, що підтвердилося експериментально в дослідах зі стабільним ^{14}N і важким ^{15}N ізотопами азоту (Месельсон М. і Сталь Ф., 1958), Д. Уотсон і Ф. Крік посилалися на важливі властивості структури і функції ДНК — специфічності спарювання основ і комплементарності ланцюгів. Таким чином, підтвердилося припущення про те, що реплікація ДНК напівконсервативна; при такому способі реплікації один з ланцюгів кожної дочірньої молекули ДНК синтезується заново, а другий ланцюг походить від батьківської молекули. Подвійна спіраль може бути розділена на вихідні комплементарні ланцюги шляхом нагрівання розчину ДНК (рис. 3.5), або за рахунок іонізації азотистих основ при додаванні кислоти чи лугу. При

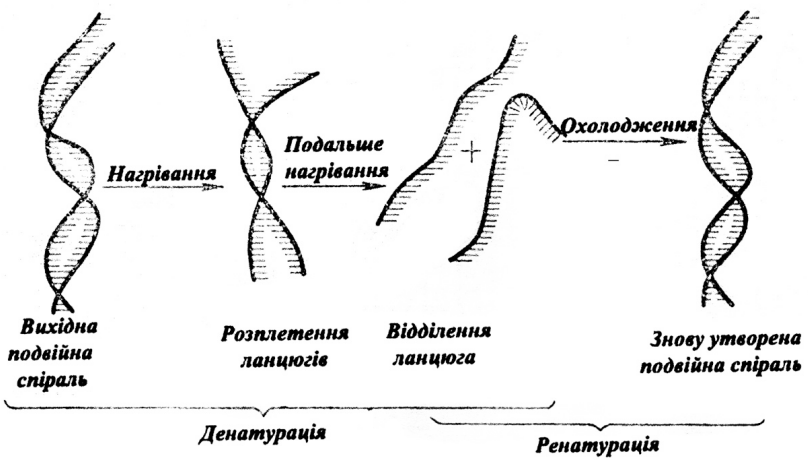


Рис. 3.5. ***Схема денатурації і ренатурації ДНК***
(за Бохінські Р., 1987)

нагріванні подвійна спіраль при чітко визначеній температурі розкручується майже миттєво — цей процес називається плавленням, а температура, за якої відбувається поділ половини подвійної спіралі, називається температурою плавлення (Тпл), що залежить від співвідношення G-C- і A-T-пар основ. Перевага G-C-пар, з'єднаних трьома водневими зв'язками, обумовлює підвищення Тпл. Ділянки ДНК, у яких A-T-пари переважають, плавляться раніше. Охолодження розчину нижче Тпл призводить до спонтанного утворення вихідної подвійної спіралі. Ця властивість подвійної спіралі, пов'язана з руйнуванням і відновленням водневих зв'язків між комплементарними азотистими основами в комплементарних ланцюгах, відіграє істотну біологічну роль.

У складному процесі реплікації ДНК беруть участь багато білків, що виконують ферментативну функцію. У результаті Корнбергом А. і його співробітниками (1965) був виділений, очищений до гомогенного стану і докладно вивчений фермент ДНК-полімераза I, яка бере участь у реплікації. Для здійснення біосинтетичної функції поряд із ДНК-полімеразою I у середовищі повинні бути присутні: повний набір дезоксирибонуклеозид-5′- фосфатів (dАТФ, dГТФ, dТТФ, dЦТФ), іони магнію, затравний ланцюг з вільним 3′-ОН-кінцем (роль затравки виконує попередній ланцюг ДНК чи РНК), матричний ланцюг, у ролі якої може бути одно- чи дволанцюгова ДНК (матричну функцію дволанцюгова ДНК виконує за умови порушення цілісності її дезоксирибозофосфатного каркаса). Синтез полінуклеотидного ланцюга здійснюється в результаті нуклеофільної атаки 3′-ОН-кінцем матриці найближчого до рибозного залишку атома фосфору тільки того дезоксирибонуклеозидтрифосфату, основа якого комплементарна відповідній основі матричного ланцюга. При цьому утвориться фосфодіефірний зв'язок і звільняється ФФн, гідроліз якого задовольняє енергетичні потреби реакції полімеризації. Елонгація ланцюга йде в напрямку 5′>3′. Протягом однієї секунди молекула ДНК-полімерази подовжує ланцюг приблизно на 10 нуклеотидних залишків:

$$(\text{ДНК})_n \text{ залишків} + \text{dNTP(дНТФ)} \rightleftharpoons (\text{ДНК})_{n+1} + \text{PPi(ФФн)}.$$

ДНК-полімераза I проявляє також 3′→5′-екзонуклеазну і 5′→3′-нуклеазну активність. У першому випадку ДНК-полімераза I завжди видаляє з 3′-ОН-кінця некомплементарні залишки основ, перед тим як здійснити приєднання чергового нуклеотида, тобто вона здійснює функцію редагування; видалений нуклеотид при цьому не має бути включений до складу подвійної спіралі (Страйер Л., 1985). У випадку прояву 5′→3′-нуклеазної активності ДНК-полімераза I гідролізує ДНК тільки на ділянках двоспіральної структури починаючи з 5′-кінця. Таким шляхом здійснюється елімінація піримідинових димерів, що утворюються при ушкодженні ДНК ультрафіолетовим випромінюванням. Слідом за ДНК-полімеразою I були виділені і вивчені ДНК-полімерази II і III. Вони, як і ДНК-полімераза I, здійснюють синтез ДНК, починаючи з 3′-ОН-кінця в напрямку 5′→3′, використовуючи для цього ті самі дезоксирибонуклеозидтрифосфатні попередники; крім того, ДНК-полімераза III є, як і ДНК-полімераза I, 5′→3′ — нуклеазою. Участь ДНК-полімераз у процесі реплікації полягає в тому, що ДНК-полімераза III забезпечує синтез більшої частити новоутвореної ДНК; внесок ДНК-полімерази I зводиться до видалення затравки і заповнення прогалин. Про біологічну роль ДНК-полімерази II поки що відомо небагато. У механізмах реплікації і репарації ДНК бере участь ще один фермент, відкритий у 1967 р., — ДНК-лігаза, що каталізує утворення фосфодіефірного зв'язку за наявності вільної ОН-групи в 3′-кінці ланцюга ДНК і фосфатної групи в 5′-кінці цього ж ланцюга в каркасі двоспіральної структури ДНК. Завдяки цій реакції усуваються одноланцюгові розриви. Участь ДНК-лігази необхідна також для нормального синтезу ДНК, репарації ушкоджень цієї макромолекули і для з'єднання (сплайсингу) ланцюгів у біотехнології одержання рекомбінантних ДНК.

Було підтверджено експериментальне припущення про чітку локалізацію місця реплікації ДНК. У ДНК E.coli таким місцем є унікальна послідовність поблизу гена. Ділянка, в якій одночасно відбуваються розплетення і реплікація ДНК, називається реплікаційною вилкою, від якої одночасно в двох протилежних напрямках здійснюється біосинтез дочірніх ланцюгів ДНК. Зустріч реплікаційних вилок у точці, діаметрально проти-

лежній початку реплікації, свідчить про те, що полімеризація в обох напрямках проходить з однаковою швидкістю.

ДНК-полімерази I, II і III синтезують дочірні ланцюги ДНК у напрямку 5′→3′. Оскільки батьківські ланцюги антипаралельні, напрямок синтезу в одній з дочірніх ланцюгів має бути 3′→5′, що суперечить раніше викладеній точці зору. Протиріччя розв'язалося, коли Оказакі Р. визначив, що частина дочірньої ДНК синтезується у вигляді фрагментів довжиною приблизно в 1000 нуклеотидних залишків кожний. Той з дочірніх ланцюгів, що синтезується в напрямку 5′→3′, називається ведучим і синтезується безперервно; ланцюг, що складається з фрагментів Оказакі, називається відстаючим і також синтезується в напрямку 5′→3′. У міру синтезу фрагменти Оказакі з'єднуються між собою за допомогою ДНК-лігази, що дозволяє одержати загальний напрямок росту ланцюга 3′→5′. При цьому процес синтезу і ведучого, і відстаючого ланцюгів ДНК починається з 3′-кінця РНК-затравки, що містить вільну ОН-групу. Процес синтезу короткого ланцюга (близько10 нуклеотидів) РНК-затравки на матриці однієї з ланцюгів ДНК каталізується особою РНК-полімеразою (праймазою), що не потребує затравки. 3′–ОН-кінцева група затравки використовується надалі для нарощування ланцюга ДНК за допомогою ДНК-полімерази III, а олігонуклеотидний фрагмент РНК-затравки гідролізується ДНК-полімеразою I; за участю цього ферменту заповнюються відповідними нуклеотидними послідовностями прогалину, що утворилися після видалення РНК-затравки, а ДНК-лігаза зшиває кінці фрагментів. Обов'язкова умова реплікації — необхідність розплетення подвійної спіралі батьківської ДНК у ділянці реплікаційної вилки. У ході розплетення на поділ однієї пари основ за участю ферменту rep (хелікази) витрачається енергія приблизно двох молекул АТФ. Потім одноланцюгові ділянки стабілізуються ОЦ-білком, що їх зв'язує. Позитивні супервитки, що виникають при розплетенні кільцевої ДНК, долаються за участю ферменту ДНК-гірази, яка відіграє роль молекулярного шарніра за рахунок введення в батьківську ДНК негативних супервитків. Складний механізм реплікації необхідний для забезпечення його високої надійності. За даними генетичного аналізу одна помилка з'являється при зчитуванні 10^9–10^{10} пар азотистих основ *(Страйєр Л., 1985)*.

Синтез РНК. Процес транскрипції в клітинах прокаріот каталізується однією РНК-полімеразою. До складу транскрипційного апарату в клітинах еукаріот входять три РНК-полімерази, одна з яких (РНК-полімераза II) транскрибує гени, що кодують білки; РНК-полімераза I бере участь у біосинтезі високомолекулярної рибосомної РНК, а РНК-полімераза III — у синтезі низькомолекулярних РНК (рибосомна 5S-РНК, тРНК і ін.). Процес транскрипції, початок якого визначається специфічною послідовністю ДНК (промотор), триває в напрямку 5′→3′. Закінчення транскрипції регламентується другою специфічною нуклеотидною послідовністю ДНК (сигнал термінації). РНК-полімерази як бактеріального, так і еукаріотичного походження мають приблизно однакову молекулярну масу — 500 тис., однак будова прокаріотичної РНК-полімерази простіша. До її складу входить п'ять поліпептидних ланцюгів, натомість як РНК-полімераза еукаріотичних клітин складається з 9–11 поліпептидних субодиниць.

На вміст РНК-полімераз у клітині впливає такий інтегральний показник функціонального стану клітини чи організму, як швидкість росту. Однак дані (Албертс Б., та ін., 1986) свідчать про те, що в одній клітині вищих еукаріот знаходиться приблизно 40 тис. молекул РНК-полімерази I і II; кількість молекул РНК-полімерази I приблизно удвічі менше. Середня довжина нуклеотидної послідовності, синтез якої здійснений за участю РНК-полімерази II на транскрипційній одиниці (ділянка ДНК, обмежена специфічним промоторним сигналом і сигналом закінчення транскрипції для РНК-полімерази II), складає в середньому 8 kb. Ця величина більш ніж у 6 разів перевищує той обсяг інформації, що необхідний для синтезу білкової молекули середньої довжини (400 амінокислотних залишків).

Із сумарної кількості РНК, що міститься в цитоплазмі клітини ссавців, 95–97 % — це рибосомна РНК, а близько 3–5 %, або 360 тис. молекул, складає іРНК, тобто одна молекула іРНК припадає на десяток рибосом.

Упакування знову синтезованих молекул РНК шляхом взаємодії з білками додають їм на мікрофотографіях подібності з ДНК-білковими комплексами у складі нуклеосом. Про функціональне значення цієї взаємодії немає переконливих даних.

Висловлюється припущення, що утворення комплексів РНК з ядерними білками необхідно для забезпечення процесингу первинних РНК-транскриптів і їх наступного переміщення в цитоплазму. Полінуклеотидні послідовності, швидкість росту яких складає 30 нуклеотидів за секунду й у біосинтезі яких бере участь РНК-полімераза II, утворюють фракцію гетерогенної ядерної РНК (гяРНК). Багато молекул цієї фракції, що знаходяться у ядрі, піддаються ковалентним модифікаціям, набуваючи при цьому функціональної спеціалізації. Процес ковалентних модифікацій включає добудовування (кепірування) 5′-кінця РНК, синтезованого РНК-полімеразою II, і приєднання до 3-ОН-кінця цієї ж молекули РНК за допомогою полі(А)-полімерази полінуклеотидного фрагмента, що складається з 100–200 залишків аденозинмонофосфату. Названі ковалентні модифікації, що приводять до утворення первинного РНК-транскрипта, очевидно, необхідні для нормального процесингу РНК і транспорту зрілих молекул іРНК із ядра в цитоплазму. Приблизно через 30 хв первинні транскрипти РНК-полімерази II виявляються в цитоплазмі. Їхня загальна кількість складає близько 5 % тієї маси РНК, що входила у фракцію гяРНК. Решта 95 % первинних транскриптів РНК-полімерази II приблизно протягом години від моменту їхнього синтезу руйнуються у ядрі. При цьому розміри первинних транскриптів РНК зменшуються з 6–8 тис. нуклеотидних залишків (фракція гяРНК) до 1,5 тис. (цитоплазматична іРНК). Досягається це в ході процесингу РНК і перетворення її в зрілу іРНК за рахунок відщеплення інтронів (некодуючих послідовностей) розміром від 0,1 до 10 kb, кількість яких може досягати кількох десятків (понад 50 у гені α-ланцюга прокологена). Фрагменти РНК, що залишилися після видалення інтронних послідовностей, з'єднуються між собою у стик (сплайсинг) і у вигляді зрілих іРНК, що складає 1–2 % нуклеотидних послідовностей геному, транспортуються в цитоплазму і транслюються. РНК-транскрипти прокаріот транслюються в тому вигляді, у якому вони синтезуються (рис. 3.6).

Висловлюється думка про можливу участь малих ядерних рибонуклеопротеїнових часток (мяРНП) у механізмі відщеплення інтронних послідовностей і сплайсингу РНК. Важливо

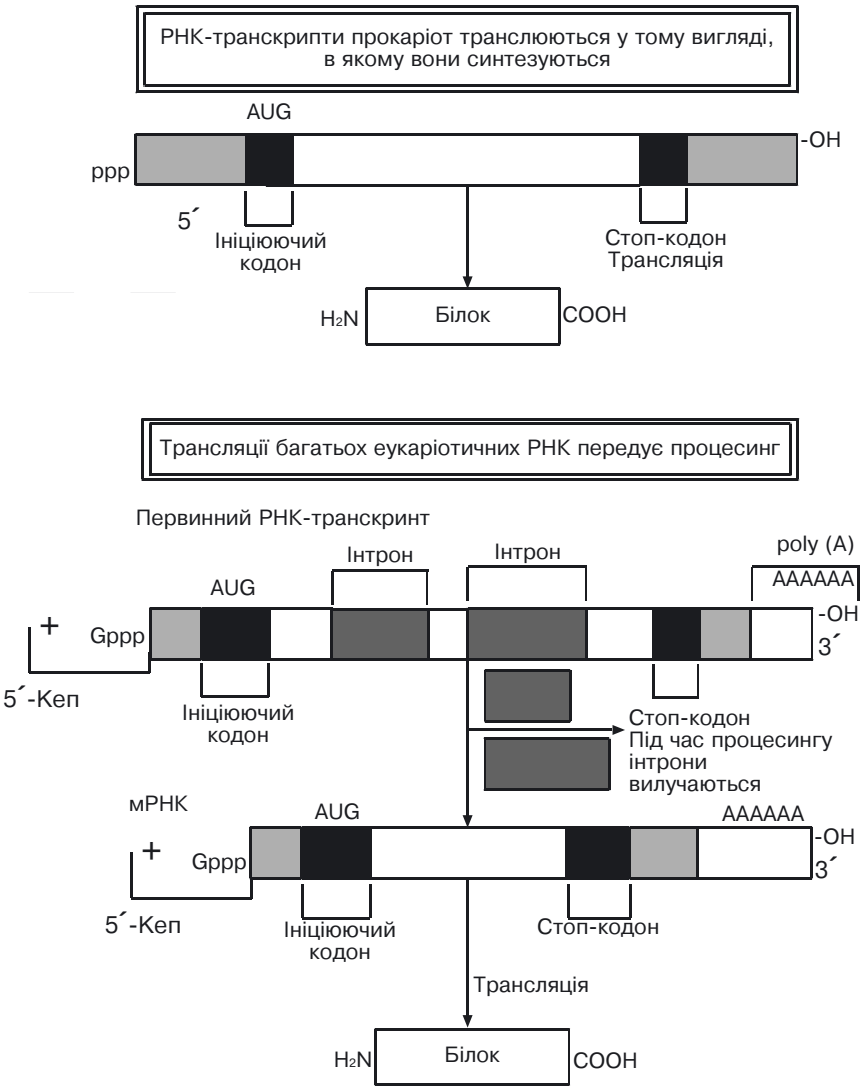


Рис. 3.6. ***Первинна структура прокаріотичних і еукаріотичних РНК транскриптів***
(за Албертс Б. та ін., 1986)

дотримуватися оптимального співвідношення між конкретними генними продуктами для забезпечення визначеного рівня метаболічної активності. Так, деякі білки (гемоглобін еритроцитів, міоглобін м'язових клітин), що містяться в клітині у великій кількості, кодуються генами, представленими в гаплоїдному геномі поодинокими екземплярами. Однак за рахунок трансляції, коли за участі однієї молекули іРНК протягом 1 хв утвориться близько десяти молекул білка, а протягом одного клітинного циклу більше 10^4 білкових молекул, досягається високий рівень гемоглобіну і міоглобіну в спеціалізованій клітині. В іншому випадку кінцевим продуктом генів є рибосомні і транспортні (рРНК і тРНК) НК, потреба в яких досить висока (за один обіг клітинного циклу необхідно синтезувати близько 10^7 молекул кожної з чотирьох типів рибосомних РНК–28S, 18S, 5,8S і 5S, яких би вистачило для збірки 10^7 рибосом). Вихід з цього положення досягається за рахунок кількості копій генів, що кодують відповідні рРНК і тРНК (у гаплоїдних клітинах людини до 200 копій генів рРНК, у жаби Xenopus — близько 600).

Розташовані гени у вигляді тандемно повторюваних дезоксирибонуклеотидних послідовностей, розділених ділянками (спейсерами), що не транскрибуються. Первинними транскриптами РНК-полімерази I при транскрибуванні генів рРНК є 45S-РНК (13 kb), з яких утворюється по одному примірнику молекул 28S-РНК (близько 5 kb), 18S-РНК (2 kb) і 5,8S-РНК (0,16 kb), що використовуються при збірці рибосоми, а певна кількість маси первинного транскрипту РНК-полімерази I (близько 6 kb) розщеплюється у ядрі. Місцем утворення рибосом є ядерце. Однак після виходу з ядра в цитоплазму процес дозрівання рибосом продовжується. РНК-полімеразою III транскрибуються кластери тандемно повторюваних генів 5S-РНК, а також гени різних тРНК *(Албертс Б. і ін., 1985)*.

3.2. БІОСИНТЕЗ БІЛКА І ЙОГО РЕГУЛЯЦІЯ

3.2.1. Генетичний код

Про те, що ДНК є генетичним матеріалом, стало відомо завдяки дослідженням Ейвері О.Т. та співробітників (1944), що викликали трансформацію бактерій очищеними екстрактами

ДНК пневмококів, а також роботами Херші А.Д. і Чейза М., які дослідили, що при зараженні бактеріальної клітини усередину проникає тільки ДНК бактеріофага, а його білкова оболонка залишається зовні. Зусиллями вчених (біохіміків, біофізиків, генетиків, хіміків і ін.) на початку 50-х років XX ст. була розшифрована просторова структура ДНК; хімічний склад цих макромолекул був визначений трохи раніше. Приблизно в цей же час вдалося визначити послідовність амінокислот у білку інсуліні, що складається тільки з 51 амінокислотного залишку. Таким чином, було переконливо доведено, що ДНК — це довгий нерозгалужений полімер, який складається з повторюваних у різній послідовності чотирьох мономерних структур — дезоксирибонуклеотидів, азотисті основи яких представлені аденіном (A), цитозином (C), гуаніном (G) і тиміном (T). Мононуклеотиди з'єднані між собою ковалентними фосфодіефірними зв'язками, що йдуть від 5′-атома вуглецю одного залишку дезоксирибози до 3′-атому вуглецю наступного пентозного залишку і утворюють ланцюг — лінійну послідовність.

Методом рентгеноструктурного аналізу було встановлено, що ДНК має форму спіралі, яка складається з двох ланцюгів, розташованих таким чином, що азотисті основи виявляються усередині подвійної спіралі (сходинки кручених сходів), а дезоксирибозофосфатний каркас виявляється зовні (поручні цієї драбини). Оптимальне упакування лінійних послідовностей мономерів у полінуклеотидній структурі подвійної спіралі досягається за рахунок взаємодії однієї великої пуринової основи (аденіну чи гуаніну), кожна з яких утворена шляхом конденсації шестичленного і п'ятичленного гетероциклів, з меншою за розміром піримідиновою основою (тиміном чи цитозином), які є шестичленними гетероциклами.

Результати модельних дослідів показали, що між гуаніном (G) і цитозином (C), а також між аденіном (A) і тиміном (T) утворюється більше ефективних водневих зв'язків, чим за будь-яких інших сполучень нуклеотидів. Комплементарне спарювання A з T і G із C в подвійній спіралі ДНК пояснило раніше отримані результати біохімічних досліджень ДНК про кількісну рівність A з T і G із C, тобто співвідношення між азотистими основами в наведених парах у всіх досліджених ДНК складало 1:1.

У результаті біохімічного аналізу білків, що є продуктами мутантних генів, було показано, що послідовність чотирьох мономерних структур (аденіну, гуаніну, тиміну і цитозину) у ДНК і двадцятьох амінокислотах у білках колінеарна, тобто послідовність нуклеотидів у ділянці ДНК, що кодує білок, відповідає послідовності амінокислот у цьому білку. Отже, такий стан справ порушив питання, яке стало головним у молекулярній біології, про механізм такого біохімічно складного перетворення, як переведення послідовності нуклеотидів ДНК у послідовності амінокислот білка. Потік інформації від ДНК до білка символічно можна подати так:

$$\text{ДНК} \xrightarrow{\textit{Транскрипція}} \text{РНК} \xrightarrow{\textit{Трансляція}} \text{Білки} \rightarrow \text{Регуляція метаболізму}$$

Подана схема привернула увагу вчених і надалі сприяла стрімкому розвитку біохімічної генетики. Синтез молекул РНК називається транскрипцією ДНК; утворена на матриці ДНК на одному з її ланцюгів, РНК-копія містить у собі увесь обсяг інформації цієї ділянки ДНК; РНК зберігає здатність до утворення водневих зв'язків між комплементарними основами, тому що урацил, присутній у РНК замість тиміну, спарюється з аденіном так само, як і тимін. Натомість транскрипція відрізняється від реплікації. РНК-копія після завершення її синтезу звільняється від ДНК-матриці, слідом за чим відбувається відновлення вихідної подвійної спіралі ДНК; знову синтезовані молекули РНК мають одноланцюгову структуру, вона коротше ДНК і відповідає довжині тієї ділянки ДНК, якої достатньо для кодування одного чи декількох білків. Одні ділянки ДНК (гени) використовуються для синтезу РНК тисячі разів, тоді як інші не транскрибуються зовсім.

У клітинах еукаріот багато з тих молекул РНК, що утворилися під час транскрипції, перш ніж перетворитися на інформаційну РНК (іРНК) і потрапити в цитоплазму, піддаються значним хімічним змінам. У свою чергу, у цитоплазмі на кожній молекулі іРНК можуть синтезуватися тисячі копій відповідного поліпептидного ланцюга. Якщо при цьому врахувати, що швидкість, з якою проходить процес білкового синтезу, надзвичайно висока (поліпептидний ланцюг, що складається зі ста аміноки-

слотних залишків, у клітині кишкової палички створюється протягом 5 с), то інформація, що міститься у невеликій ділянці ДНК, здатна реалізуватися у вигляді великої кількості певного білка. Так, на матриці одного гена, що кодує фіброїн, відбувається синтез 10^4 молекул іРНК, на кожній з яких одержується 10^5 молекул фіброїну, що є основним компонентом шовку. У цілому за чотири доби одна клітина шовкосинтезуючої залози виробляє 10^9 молекул фіброїну *(Албертс Б. і ін., 1986)*.

Правила переведення послідовності нуклеотидів, що входять у полінуклеотидну структуру ДНК, в амінокислотну послідовність білків (генетичний код) були розшифровані на початку 60-х років XX ст. Ніренбергом М., Маттеї Г., Ледером Ф. та іншими дослідниками. У більш ранніх генетичних експериментах було показане кодування амінокислот триплетами нуклеотидів (кодонами). У цьому випадку з чотирьох азотистих основ (A, T, G, C) можна скласти 64 (4^3) різні триплетні комбінації, яких цілком достатньо для кодування 20 амінокислот. Якщо ж з цього набору скласти сполучення по два нуклеотиди (дублетний код), то цієї кількості явно бракує для кодування всього набору амінокислот. Інкубацією у пробірках суміші, що складається з різних синтетичних полірибонуклеотидів, екстракту з кишкової палички, двадцяти амінокислот, з яких тільки одна мала радіоактивну мітку, вдалося установити весь набір триплетів для кодування усіх амінокислот. Крім того, за допомогою тринуклеотидів з відомою послідовністю азотистих основ була розшифрована нуклеотидна послідовність у всіх кодонах, що обумовлює зв'язування різних аміноацил-тРНК.

Варто також відзначити роботи Корани Х.Г., який запропонував метод хімічного синтезу полі- та олігонуклеотидів, і Холлі Р.У., що розшифрував структуру тРНК з антикодовою ділянкою.

Донедавна наявний фактичний матеріал свідчив про універсальність генетичного коду, тобто у всіх організмах — вірусах, прокаріотах і еукаріотах ті самі нуклеотидні триплети кодували однакові амінокислоти. В останні роки при вивченні процесу біосинтезу білка в мітохондріях були виявлені відхилення від універсального коду (табл. 3.3).

Таблиця 3.3.

Невідповідність генетичного коду мітохондрій універсальному коду *(за Бохінські Р., 1987)*

Кодони	*УГА*	*АУА*	*АГУ*	*АГГ*	*АУУ*
Універсальний код	Термінація	Іле	Арг	Арг	Іле
Мітохондріальний код	Три	Мет і ініціація	Термінація	Термінація	Іле і, можливо, і ніціація

Для генетичного коду характерна ще його виродженість; у даному випадку це означає, що амінокислоті відповідає більш ніж один кодон. Наприклад, аргініну, лейцину і серину відповідає по шість; гліцину, проліну, валіну, тирозину й аланіну — по чотири, а триптофану і метіоніну — по одному кодону. Внаслідок виродженості генетичного коду помилки, що виникають при реплікації і транскрипції в деяких випадках не супроводжуються перекручуванням генетичної інформації і порушенням експресії, що має біологічне значення. В усіх випадках дво-, три- і чотириразової виродженості зміна відбувається тільки в третьому нуклеотиді триплету. Так, якби аланін кодувався тільки одним триплетом ГЦУ, то будь-яка зміна нуклеотидної послідовності в ньому при реплікації або транскрипції неминуче супроводжувалася б заміною у відповідній поліпептидній структурі аланіну іншою амінокислотою з усіма наслідками, що з цього випливають. Однак завдяки чотириразовій виродженості тільки заміни, що стосуються перших двох нуклеотидів кодона, ведуть до зміни його значення. Специфічність кодонів визначається головним чином його першими двома нуклеотидами. Що стосується третього нуклеотида, який займає положення на 3′-кінці олігонуклеотидної структури, то його специфічність виражена слабше *(Ленінджер А., 1985; Бохінські Р., 1987)*.

Точність синтезу поліпептидного ланцюга досягається за рахунок комплементарного розпізнавання азотистих основ 5′→3′-орієнтованої послідовності кодона іРНК, що має 3′→5′-напрямок послідовності азотистих основ антикодону тРНК.

Слід зазначити, що кількість каталізуючих реакцію активування амінокислот аміноацил-тРНК-синтетаз відповідає кількості різних видів амінокислот, з яких синтезуються білки; що стосується тРНК, то їхня кількість як мінімум повинна досягати 32, тому що деякі амінокислоти здатні взаємодіяти з двома, а то й з трьома різними тРНК, які, у свою чергу, пізнають і зв'язують один, два чи навіть три кодони іРНК. Кодон-антикодонове пізнавання (кодон розташовується на іРНК і має 5′→3′-орієнтацію, антикодон — на тРНК і орієнтований у напрямку 3′→5′) передбачає відхилення від класичної взаємодії й утворення водневих зв'язків між парами азотистих основ A — T, G — C і A — U у ДНК і РНК. Це відхилення сформульоване Кріком Ф. у гіпотезі коливань, біологічний зміст якої має багато спільного з явищем виродженості генетичного коду. Гіпотеза коливань зводиться до здатності третьої азотистої основи, розташованої з боку 5′-кінця антикодону (тРНК), змінювати своє просторове положення, натомість як дві перші основи, що знаходяться в 3′-кінці антикодону, фіксовані більш жорстко. Зміна просторової орієнтації, що знаходиться на 5′-кінці антикодону азотистої основи обумовлює його здатність до утворення не відповідних класичним (A — T, G — C і A — U) взаємодій між парами основ. Установлено, що третім від 3′-кінця антикодону може бути U, G чи I (рибонуклеозид інозин, у якому азотистою основою виступає гіпоксантин, що утворюється при відщепленні від аденіну його 6-аміногрупи). В табл. 3.4 подано можливі варіанти поєднання пар основ у зв'язку з явищем коливань.

Як видно з табл. 3.4, якщо в антикодоні в положенні коливання знаходиться гіпоксантин (у складі інозину), можливе розпізнавання й утворення водневих зв'язків трьох пар: I — A, I — C і I — U (але така комплементарна взаємодія виявляється більш слабкою порівняно з виникаючою взаємодією при утворенні звичайних пар G — C і A — U); у випадку перебування у позиції коливання G чи U кількість можливих сполучень обмежується двома: G — C, G — U і U — A, U — G. Нові комбінації пар основ не виникають, якщо такими, що коливаються, є аденін і цитозин. У цьому випадку відбувається утворення зв'язків за класичним принципом: A — U; C — G (рис. 3.7).

Таблиця 3.4.

Можливі поєднання пар основ між 5′-кінцем антикодону (тРНК) і 3′-кінцем кодону (іРНК), визначені гіпотезою коливань

(за Бохінські Р., 1987)

Основа на 5'-кінці антикодона (тРНК)	*Основа на 3'-кінці кодона (іРНК)*
I	A, C або U
G	C або U
U	A або G
A *	U
C *	G

* Гіпотеза не передбачає нових комбінацій, якщо ці основи знаходяться в антикодоні.

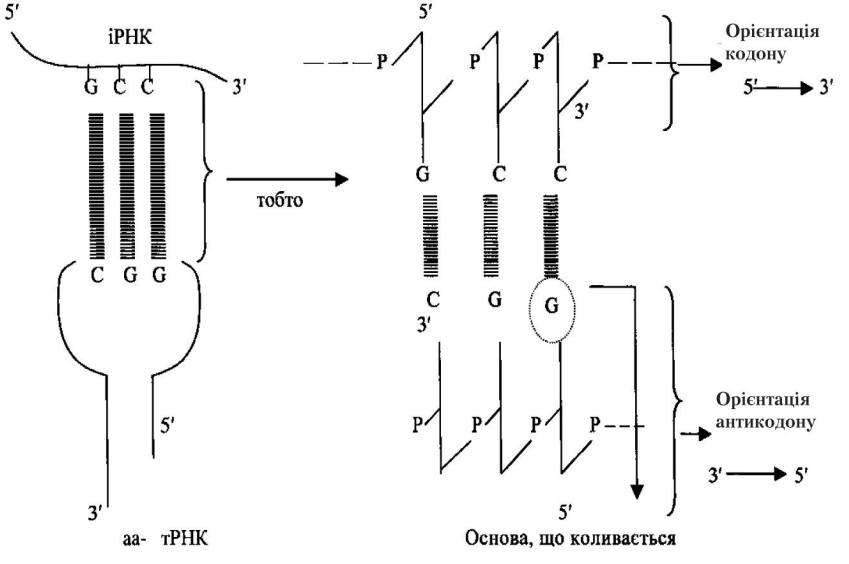


Рис. 3.7. ***Схема кодон-антикодонових взаємодій у світі гіпотези коливань***

(за Бохінські Р., 1987)

Утворення слабких водневих зв'язків при кодон-антикодоновому дізнаванні можна показати на прикладі однієї з аргіні-

нових тРНК, антикодон якої (5′) I — C — G (3′) здатний взаємодіяти з трьома різними аргініновими кодонами:

Кодон	(5′)C — G — A(3′)	(5′)C — G — U(3′)	(5′)C — G — C(3’)
	— — —	— — —	— — —
	— — —	— — —	— — —
	— —	— —	— —
Антикодон	(3′)G C I(5′)	(3′)G C I(5′)	(3′)G C I(5′)

Дві перших основи кодонів (C — G) утворюють міцні (позначені трьома рисками) уотсон-кріковські пари з відповідними азотистими основами антикодону. Азотисті основи, що знаходяться у третьому положенні, (A, U, C) аргінінових кодонів утворюють слабкі водневі зв’язки (дві риски) із залишком інозину (I) в антикодоні. На підставі цього й інших прикладів кодон-антикодонових взаємодій Крік Ф. дійшов висновку, що основи більшості кодонів, які знаходяться у третьому положенні, мають деякий ступінь свободи при утворенні пари з відповідною азотистою основою антикодонів, тобто, за термінологією Кріка Ф., основи, що коливаються. Біологічний зміст явища полягає в тому, що воно дозволяє звести до мінімуму виникаючі помилки. Завдяки неміцності зв’язку, що утвориться між основою, яка коливається, відповідною основою антикодону, тРНК легше звільняється з комплексу іРНК у процесі білкового синтезу. У випадку залучення в сильну уотсон-кріковську кодон-антикодонову взаємодію усіх трьох пар основ міцність зв’язку стала б моментом, що лімітує швидкість білкового синтезу через уповільнення процесу вивільнення тРНК із комплексу з іРНК *(Ленинджер А., 1985; Бохинськи Р., 1987)*.

3.2.2. Етапи біосинтезу білка

У синтезі білка беруть участь близько трьохсот різних макромолекул, представлених у клітинах еукаріот більш ніж 70-ма рибосомними білками, 20-ма ферментами активації амінокислот і більш ніж десятьма допоміжними ферментами, майже 100 ферментами, що беруть участь у процесі дозрівання білків (процесингу), а також транспортними і рибосомними РНК у кількості, що перевищує сім десятків. Сьогоднішнім знанням про механізм синтезу білка передували відкриття, зроблені на початку

50-х років XX ст. колективом під керівництвом П. Замечника: білкові молекули утворюються з амінокислот у фракції рибонуклеопротеїдних часток, що знаходяться в цитоплазмі (рибосомах). У 1957 р. Замечник П. і Хогланд М. дослідили, що активація амінокислот і їхнє приєднання до молекули тРНК — ферментативний процес, у якому беруть участь специфічні аміноацил-тРНК-синтетази. Крім того, Крік Ф. обґрунтував роль тРНК у цьому процесі: одним кінцем вона з'єднується з карбоксильною групою активованої амінокислоти, а іншою ділянкою (антикодоном) — із триплетною нуклеотидною послідовністю іРНК, що кодує відповідну амінокислоту. Складний процес біосинтезу білка можна розглядати поетапно (табл. 3.5).

Таблиця 3.5.

Компоненти, що беруть участь на різних етапах біосинтезу білка в E.coli *(за Ленінджером А., 1985)*

Етапи трансляції	*Необхідні компоненти*
Активація амінокислот	20 амінкислот, 20 аміноацил-тРНК-синтетаз, 20 або більше тРНК, АТФ, Mg^{2+}
Ініціація поліпептидного ланцюга	іРНК, N-формілметіоніл-тРНК, що ініціює кодон в іРНК (AUG), 30S-рибосомна субчастина, 50S-рибосомна субчастина, ГТФ, Mg^{2+}, фактори ініціації (IF=1, IF=2, IF=3)
Елонгація	70S-рибосома (ініціюючий комплекс), набір аміноацил-тРНК, відповідних кодонам іРНК, Mg^{2+}, фактори елонгації (Tu, Ts, і G), ГТФ, пептидилтрансфераза
Термінація	АТФ, термінуючий кодон іРНК, фактори звільненя поліпептида (R_1, R_2 і S)
Згортання і процесинг	Специфічні ферменти і кофактори

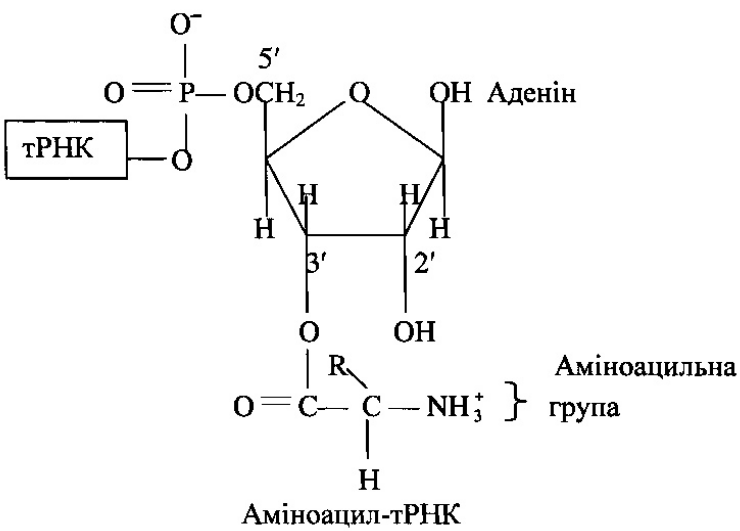
Активація амінокислот. На першому етапі трансляції, що проходить у всіх типах клітин у цитозолі, здійснюється АТФ-залежне перетворення амінокислот на аміноацил-тРНК. Реакція двостадійна: 1. з амінокислоти й АТФ утворюється аміноациладенілат — активована сполука, що являє собою змішаний ангідрид, у якому карбоксильна група амінокислоти з'єднана з фосфатною групою аденілової кислоти (АМФ); 2. аміноацильна група (залишок амінокислоти) аміноациладе-

нілату (аміноацил-АМФ) переноситься на молекулу відповідної тРНК з утворенням аміноацил-тРНК — активованої проміжної сполуки, що бере участь у синтезі білка. Процес активації амінокислот і їхнє наступне приєднання до тРНК каталізуються специфічними аміноацил-тРНК-синтетазами, що називаються ще активуючими ферментами. Кожний з ферментів строго специфічний як стосовно тРНК, так і щодо відповідної їй амінокислоти. Двостадійний процес активації амінокислот здійснюється в каталітичному центрі ферменту:

$$\text{1. Амінокислота + АТФ} \xrightarrow[\text{синтетаза } (Mg^{2+})]{\text{Аміноацил-тРНК-}} \text{Аміноацил-АМФ + ФФн;}$$

$$\text{2. Аміноацил-АМФ + тРНК} \xrightarrow[\text{синтетаза } (Mg^{2+})]{\text{Аміноацил-тРНК-}} \text{Аміноацил-тРНК + АМФ}$$

В усіх випадках на другій стадії активована амінокислота приєднується до залишку аденілової кислоти або аденінового нуклеотиду (А) у триплеті ССА на 3′-кінці молекули тРНК.



Перенесення аміноацильної групи на 2′- чи 3′-ОН-групу рибозного залишку аденінового нуклеотиду ССА-послідовності на 3′-кінці тРНК залежить від амінокислоти й аміноацил-тРНК-синтетази, що каталізує утворення аміноацил-тРНК. Активована амінокислота може дуже швидко переміщатися з 2′- у 3′-положення і назад. Стадія активації і перенесення певної амінокислоти каталізується однією і тією самою аміноацил-тРНК-синтетазою. На активацію кожної амінокислоти витрачається енергія двох високоенергетичних фосфатних зв'язків, що робить сумарну реакцію активації амінокислот практично незворотною. У ході перетворення амінокислот в аміноацил-тРНК-комплекси підвищується реакційна здатність мономерних компонентів, що використовуються у реакції полімеризації; при взаємодії амінокислоти зі специфічною тРНК здійснюється добір необхідних для синтезу поліпептидного ланцюга відповідних амінокислот. Позбавлені спроможності впізнавати кодони в іРНК, амінокислоти набувають цієї функції у складі аміноацил-тРНК; одночасно активовані карбоксильні групи амінокислот стають реакційно здатними й утворюють пептидні зв'язки ( ) з аміногрупами сусідніх амінокислот.

Молекули тРНК відіграють роль кінцевих адапторів, що переводять інформацію, укладену в нуклеотидній послідовності іРНК, на мову білка. Не менше значення у процесі декодування має і другий набір адапторів — молекул аміноацил-тРНК-синтетаз.

Таким чином, генетичний код розшифровується за допомогою двох взаємозалежних наборів адапторів, що здійснюють високоспецифічну функцію, у результаті чого кожна амінокислота може зайняти місце, яке визначене її триплетною нуклеотидною послідовністю у молекулі іРНК, тобто своїм кодоном.

На етапах ініціації поліпептидного ланцюга, елонгації і термінації для здійснення реакцій білкового синтезу необхідні рибосоми.

Рибосома. Найкраще вивчені рибосоми E.coli. Їхня кількість у прокаріотичній клітині перевищує $1{,}5 \cdot 10^4$, діаметр —

18–20 нм, маса коливається у межах 2500–2800 кДа, коефіцієнт седиментації — 70S. У рибосомах прокаріот міститься 65 % рРНК і 35 % білка. Рибосоми становлять майже чверть сухої маси клітини. Рибосоми еукаріотичних клітин значно більші бактеріальних (діаметр — приблизно 21 нм, маса — майже 4000 кДа, коефіцієнт седиментації — 80S, співвідношення між білком і рРНК дорівнює приблизно 1:1, а їхня кількість у еукаріотичній клітині — ~10^5). Синтез білків, що входять до складу рибосомної структури, відбувається в цитоплазмі, самозборка рибосомних субодиниць — у ядерці за рахунок взаємодії молекул білків і рРНК за участю іонів магнію. Рибосоми прокаріот і еукаріот складаються з двох субчастин неоднакового розміру. У рибосом прокаріот коефіцієнт седиментації більшої субчастини 50S, а меншої — 30S, їхня маса — відповідно 1800 і 1000 кДа; у рибосом еукаріот коефіцієнт седиментації більшої субчастини знаходиться на рівні 60S, меншої — 40S.

Велика субчастина (50S) прокаріотичної рибосоми містить одну молекулу 23S-рРНК (~3200 нуклеотидів), одну молекулу 5S-рРНК (~120 нуклеотидів) і 34 білка; менша субчастина (30S) — 21 білок і одну молекулу 16S-рРНК.

Подібно до бактеріальної рибосоми, рибосома еукаріотичної клітини дисоціює на велику (60S) і малу (40S) субчастини, що, у свою чергу, можуть дисоціювати на складові їхніх білків і РНК. До складу більшої субчастини входять три молекули РНК (28S, 7S і 5S) і понад 40 різних рибосомних білків; мала субчастина містить одну молекулу 18S-рРНК і приблизно 33 різних рибосомних білків.

Білки великої і малої субчастин рибосоми прокаріот мають нумерацію. У 50S-субчастині — від L1 до L34 (від англ. Large — велика), у 30S-субчастині — від S1 до S21 (від англ. Small — мала). Усі білки, що входять до складу рибосом E. coli, індивідуалізовані, у більшості з них встановлені амінокислотна послідовність, первинна структура, молекулярна маса, що коливається в межах 6,5–75 тис., визначені також нуклеотидні послідовності рРНК E.coli.

Усі рРНК і більшість білків еукаріотичних рибосом також виділені в чистому вигляді і вивчені. Рибосомні 30S- і 50S-субчастини при відповідних умовах можуть бути реконструйовані

у функціонально активні структури з набору індивідуальних компонентів (білків і рРНК), отриманих при дисоціації субчастин, шляхом самозбірки цих макромолекул; для мимовільного утворення 50S-субчастин необхідна присутність у системі в зібраному вигляді 30S-субчастини.

Висловлюється думка *(Ленинджер А., 1985),* що рРНК виконують роль каркасів для упорядкованого розташування рибосомних поліпептидів, ферментативні й інші специфічні функції яких поки що не встановлені для всіх білків. За даними рентгеноструктурного аналізу й електронної мікроскопії, субчастини в рибосомі розташовані несиметрично, мають неправильну геометричну форму і з'єднані один з одним таким чином, що між ними залишається борозна, через яку проходить молекула іРНК у процесі синтезу поліпептидного ланцюга, а також друга борозна, що утримує зростаючий поліпептидний ланцюг. У першій борозні розміщується 35 нуклеотидів РНК, а в другій — приблизно 30 амінокислот. Рибосоми мітохондрій і хлоропластів відрізняються від цитоплазматичних рибосом еукаріот; вони мають більшу подібність з 70S-частками прокаріотичних організмів.

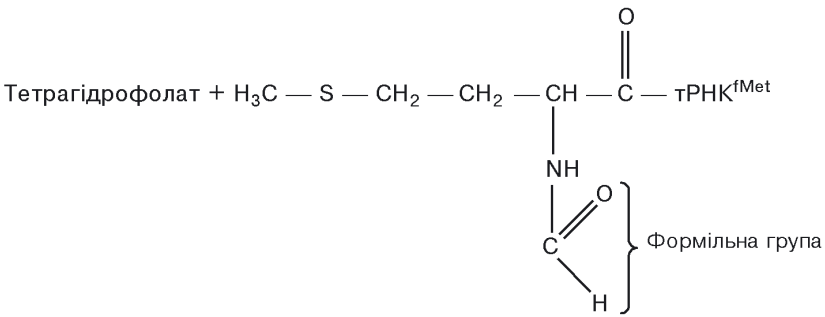
Синтез білків у мітохондріях, хлоропластах і бактеріях проходить за загальною схемою *(Ленинджер А., 1985; Страйер Л., 1985; Албертс Б. та ін., 1986).*

Ініціація поліпептидного ланцюга. Було встановлено, що в E.coli й інших прокаріот N-кінцевою амінокислотою при збірці поліпептидного ланцюга завжди є залишок N-формілметіоніну. Цей та інший факти стали підставою для припущення про значення формільованого метіоніну як ініціатора в процесі синтезу поліпептидного ланцюга. Формільований метіонін одержується в результаті двох послідовних реакцій. При цьому варто вказати на існування двох тРНК: $тРНК^{Met}$ і $тРНК^{fMet}$, що здійснюють акцепцію метіоніну, а також звернути увагу на те, що фермент формілтрансфераза (трансформілаза) не спроможний формілювати метіонін, що знаходиться у вільному стані. Однак і в комплексі з тРНК не завжди можливе формілювання залишку метіоніну. Ця реакція можлива тільки в тому випадку, коли тРНК виявляється специфічною $тРНК^{fMet}$:

Метіонін + тРНК^{fMet} + АТФ $\xrightarrow{\text{Метіонін-тРНК-синтеза}}$ Метіоніл - тРНК^{fMet} + АМФ + ФФн;

N^{10}-формілтетрагідрофолат +

+ Метіоніл-тРНК^{fMet} $\xrightarrow{\text{формілтрансфераза}}$



N-формілметіоніл-тРНК^{fMet}, або фМет-тРНК^{fMet}.

Комплекс метіоніну з іншою тРНК — метіоніл-тРНК (тРНК^{Met}) не формілюється і використовується для включення метіоніну у внутрішні ділянки синтезованого поліпептидного ланцюга. Хоча первинна структура тРНК^{fMet} і тРНК^{Met} різна, загальним для них є наявність того самого антикодону UAC, завдяки чому обидві тРНК здатні взаємодіяти з кодоном AUG. Однак антикодоновий триплет комплексу фМет — тРНК^{fMet} взаємодіє з кодоном AUG тільки в тому випадку, якщо той розташований на початку кодуючої послідовності іРНК. Розташування кодону AUG усередині нуклеотидної послідовності іРНК передбачає взаємодію з ним неформільованого Мет-тРНК^{Met}. Наявність N-формільної групи в залишку метіоніну в складі ініціаторного комплексу фМет-тРНК^{fMet} обумовлює взаємодію останнього з особливим місцем ініціації на рибосомі, з яким не вступає в реакцію ні Мет-тРНК^{Met}, ні жодна інша аміноацил-тРНК; блокування аміногрупи метіоніну формільним залишком перешкоджає включенню такої амінокислоти у внутрішні ділянки поліпептидного ланцюга.

У поліпептидних ланцюгах, синтезованих у рибосомах еукаріотичних клітин, N-кінцевою амінокислотою завжди є

метіонін, що приєднується за допомогою спеціальної ініціюючої метіоніл-тРНК; у мітохондріях і хлоропластах еукаріот так само, як і в бактеріях, синтез білка починається з N-формілметіоніну, що підтверджує висловлену точку зору про походження цих субклітинних структур, які знаходяться в клітинах еукаріот, від бактерій.

На етапі ініціації поліпептидного ланцюга істотним моментом є тристадійний процес утворення ініціюючого комплексу (рис. 3.8). Спочатку в результаті взаємодії 30S-субчастини і фактора ініціації IF-3 утворюється структура, у якій білок IF-3 перешкоджає її асоціації з 50S-субчастиною. Приєднання до 30S-субчастини іРНК досягається за допомогою особливого ініціюючого сигналу, що являє собою багату пуриновими основами (A, G) послідовність, центр якої знаходиться на відстані приблизно 10 нуклеотидів від 5′-кінця ініціюючого кодона (5′) AUG(3′) іРНК, тож трансляція не може розпочатися безпосередньо на 5′-кінці іРНК. Перший трансльований кодон, як правило, розташовується на відстані майже 25 нуклеотидів від 5′-кінця. Ініціюючий сигнал, представлений короткою ділянкою (6–10 нуклеотидів) іРНК, у результаті взаємодії з комплементарною послідовністю нуклеотидів, розміщених із 3′-кінця 16S-РНК 30S-субчастини, сприяє фіксуванню іРНК у потрібному для ініціації положенні. Завдяки цій взаємодії забезпечується правильне розташування ініціюючого кодону AUG на 30S- субчастині. Потім до комплексу, що складається із 30S-субчастини, фактора IF-3 і іРНК, приєднуються раніше зв'язані з формілметіоніл-тРНК^{fMet} білковий фактор ініціації IF-2 і ГТФ (2-а стадія). У результаті подальшого приєднання до 50S-рибосомної субчастини раніше виниклої макромолекулярної комплексної структури, що складається з 30S-субчастини, білкового фактора ініціації IF-3, іРНК, ГТФ, білкового фактора ініціації IF-2, N-формілметіоніл-тРНК^{fMet}, виникає функціонально активна 70S-рибосома. При її утворенні на стадії приєднання 50S-субчастини молекула ГТФ, яка зв'язана з IF-2, гідролізується до ГДФ і Фн, які разом з IF-3 і IF-2 утворюють комплекс. Таким чином, точне місце початку синтезу білка (кодон AUG, генетичний сигнал ініціації) визначається в результаті спарювання лідерної послідовності азотистих основ з боку

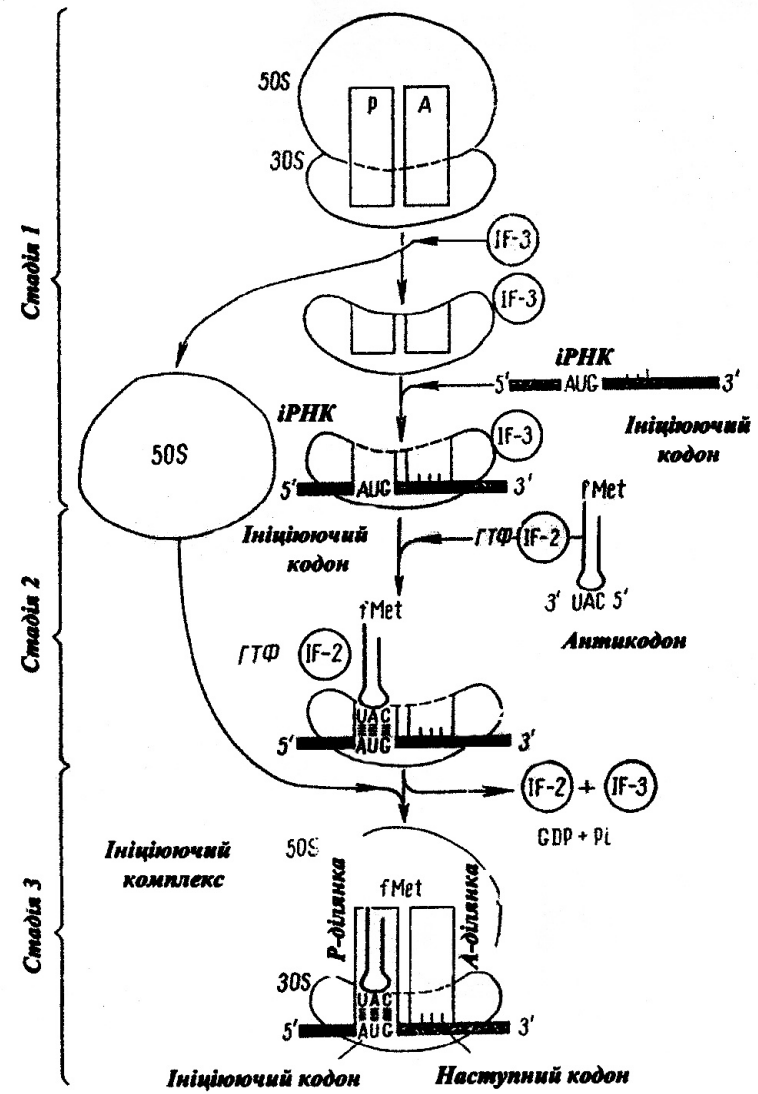


Рис. 3.8. ***Схема тристадійного процесу утворення ініціюючого комплексу***
(за Ленінджером А., 1985)

5'-кінця кодона AUG іРНК із нуклеотидною послідовністю, що розташовується з 3′-кінця 16S-рРНК 30S-субчастини, а також комплементарною взаємодією кодона AUG іРНК з антикодоном (3′)UAC(5') N-формілметіоніл-тРНК^{fMet}.

Для надання правильного положення у функціонально активному ініціюючому 70S-комплексі N-формілметіоніл-тРНК^{fMet} останній приєднується до пептидильної ділянки (Р-ділянки) 70S-комплексу; друга ділянка для приєднання аміноацил-тРНК називається аміноацильною (А-ділянка). Утворюються вони за рахунок сполучення специфічних ділянок 30S- і 50S-субодиниць. У такому стані (Р-ділянка зайнята ініціюючою фМет-тРНК^{fMet}, А-ділянка — вільна) ініціюючий комплекс готовий до продовження процесу трансляції.

Елонгація. Елонгація синтезу поліпептидного ланцюга є циклічним процесом, що включає три стадії. Цикл починається взаємодією ГТФ з одним із трьох факторів елонгації — Tu, що є розчинними білками цитоплазми. Аміноацил-тРНК, антикодон якої комплементарний наступному за ініціюючим кодоном у напрямку 5′–3′ іРНК, взаємодіючи з ГТФ-Tu утворює потрійний комплекс аміноацил-тРНК — Tu — ГТФ, що за допомогою активованого фактора елонгації (Tu — ГТФ) вводиться у вільну А-ділянку функціонально активної 70S-рибосоми і зв'язується з цією ділянкою. Правильність положення аміноацил-тРНК контролюється двічі (рис. 3.9). З одного боку, це комплементарна кодон-антикодонова взаємодія, з іншого — специфічний

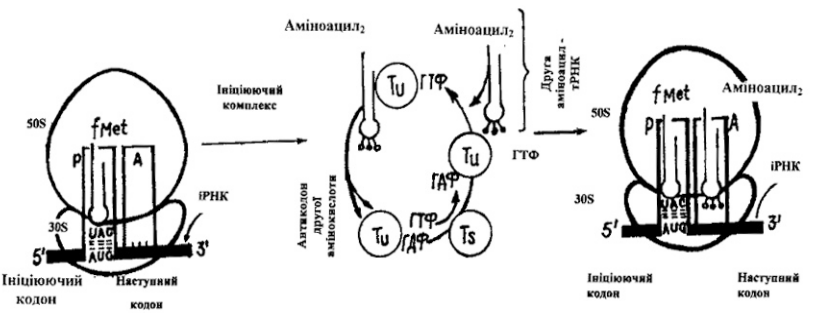


Рис. 3.9. ***Схема першої стадії елонгації***
(за Ленінджером А., 1985)

зв'язок між ділянками молекул тРНК і рРНК. Тільки при дотриманні цієї умови процес елонгації може продовжитися.

Наступна реакція — гідроліз ГТФ і елімінація з 70S-рибосоми Tu — ГДФ-комплексу. Залишок ГДФ з останнього витісняється іншим фактором елонгації Ts. Новий комплекс Tu-Ts розпадається під впливом ГТФ, а ГТФ-Tu, що утворюється, знову доставляє комплементарну аміноацил-тРНК в А-ділянку, що звільнилася, 70S-рибосоми. ГТФ-Tu не вступає в реакцію з фМет-тРНК^{fMet}, у зв'язку з чим вона не потрапляє в А-ділянку і внутрішні кодони AUG не зчитуються з ініціюючої тРНК. До моменту початку другої стадії циклу елонгації Р-ділянка виявляється зайнята фМет-тРНК^{fMet}, а в А-ділянці розташовується відповідна аміноацил-тРНК. Усе підготовлено для вступу залишків амінокислот у реакцію й утворення пептидного зв'язку (рис. 3.10).

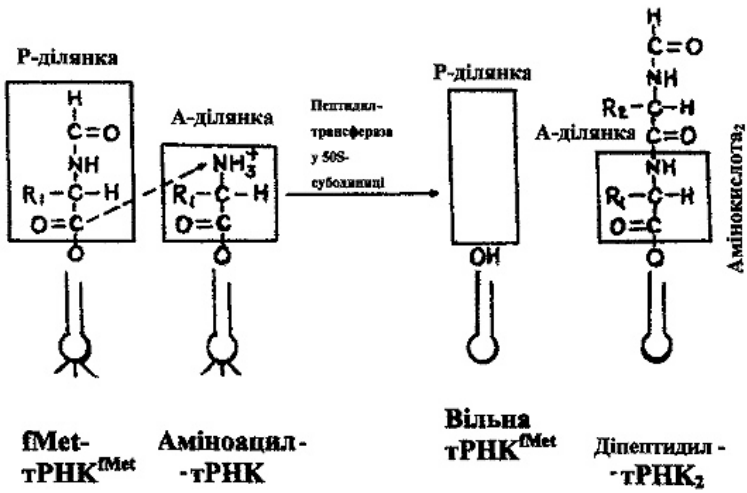


Рис. 3.10. ***Схема утворення пептидного зв'язку*** *(за Ленінджером А., 1985)*

Цю реакцію каталізує пептидилтрансфераза, що є одним з білків 50S-субодиниць, активність якої реалізується в присутності K^+. Активований залишок формілметіоніну, що знаходиться у складі фМет-тРНК^{fMet} і розташований у Р-ділянці,

переноситься на аміногрупу аміноацил-тРНК, що займає А-ділянку. Нова сполука, що виникла внаслідок цієї реакції (діпептидил-тРНК), включає залишки двох амінокислот, з'єднаних пептидним зв'язком, і розташовується в А-ділянці 70S-рибосоми; у Р-ділянці залишається звільнена від активованого амінокислотного залишку ініціююча тРНК^{fMet}.

Третя стадія елонгації — транслокація — пов'язана з трьома переміщеннями (рис. 3.11). У зв'язку з переміщенням 70S-рибосоми на відстань в один кодон уздовж іРНК у напрямку її 3′-кінця; діпептидил-тРНК, що знаходиться в А-ділянці, переміщується в Р-ділянку, завдяки чому вільна тРНК відокремлюється від Р-ділянки й надходить до цитоплазми. Таким чином, у пептидильній ділянці виявляється діпептидил-тРНК, а аміноацильна ділянка знову підготовлена для зв'язування чергової аміноацил-тРНК, антикодон якої комплементарний наступному кодону іРНК, що знаходиться в зоні аміноацильної ділянки 70S-рибосоми.

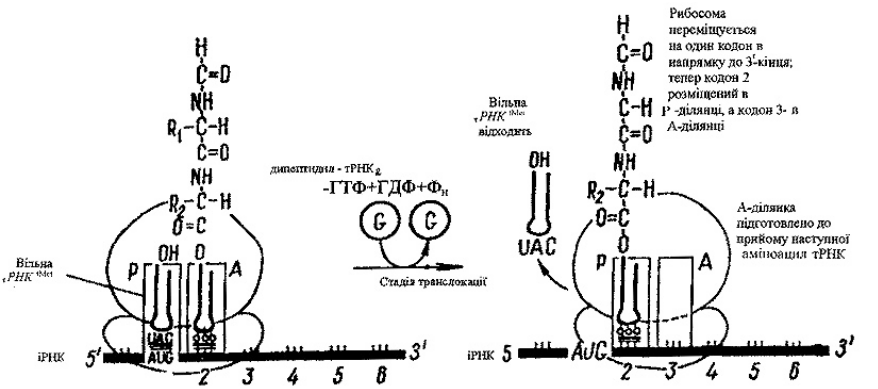


Рис. 3.11. ***Схема транслокації***
(за Ленінджером А., 1985)

Починається новий тристадійний цикл елонгації, у результаті завершення якого буде утворена трипептидил-тРНК. Переміщення рибосоми уздовж іРНК на один кодон називається

транслокацією. Пересування здійснюється за участю третього фактора елонгації G, чи транслокази, і енергії, що утвориться при гідролізі ще однієї молекули ГТФ. На утворення однопептидного зв'язку (приєднання однієї амінокислоти) витрачається енергія гідролізу двох молекул ГТФ.

Термінація. У синтезі поліпептидного ланцюга настає момент, коли А-ділянка рибосоми зайнята одним з кодонів UAA, UGA чи UAG. У цьому випадку кодон-антикодонової взаємодії не відбувається, тому що нормальні клітини не містять тРНК з антикодонами, комплементарними сигналам термінації. Термінуючі триплети не кодують амінокислот і називаються в зв'язку з цим безглуздими кодонами.

З високою специфічністю термінуючі триплетні послідовності іРНК вступають у взаємодію з білковими факторами звільнення R_1, R_2 і S (рилізинг-факторами); перший з них розпізнає кодон UAA чи UAG, другий — UAA чи UGA. Взаємодія одного з рилізинг-факторів з термінуючим кодоном в місці розташування аміноацильної ділянки 70S-рибосоми активує пептидилтрансферазу і змінює її специфічність, у результаті чого настає гідролітичне відщеплення поліпептиду від поліпептидил-тРНК, акцепція активованим пептидильним залишком H_2O і вивільнення знову синтезованої білкової молекули, відділення від Р-ділянки, що звільнилася, тРНК, дисоціація 70S-рибосоми на 30S- і 50S-субодиниці і їхня підготовка до синтезу нової білкової молекули *(Ленинджер А, 1985; Страйер Л., 1985)*.

На одній молекулі іРНК одночасно можуть знаходитися декілька функціонально активних рибосом; при цьому одна рибосома на іРНК займає місце, еквівалентне 80 нуклеотидам. Завдяки такій можливості ефективність використання іРНК значно збільшується. Кілька рибосом, що одночасно знаходяться на одній і тій самій іРНК, формують полірибосомну структуру чи полісому, у складі якої кожна з рибосом функціонує автономно і синтезує свій поліпептидний ланцюг.

Упаковка і процесинг поліпептидного ланцюга. Первинна структура (послідовність амінокислот) є визначальним моментом у формуванні тривимірної структури, завдяки якій білок стає функціонально активним. Однак нерідко білкова молекула набуває біологічно активної конформації тільки в

результаті процесингу чи ковалентної (посттрансляційної) модифікації, що проходить у різних білків по-різному і включає реакції видалення чи приєднання атомних груп. Так, формільна група, що входить до складу N-кінцевого N-формілметіоніну, у білків бактеріального походження в ході процесингу деформілюється. Під дією особливих амінопептидаз відбувається гідролітичне відщеплення одного чи декількох N-кінцевих амінокислотних залишків, у зв'язку з чим у багатьох остаточно сформованих білках їх не вдається знайти. У процесі посттрансляційного дозрівання відщеплюються поліпептидні N-кінцеві лідерні послідовності, що виконують роль специфічних сигналів, за допомогою яких білок досягає місця свого призначення. Дуже часто N-кінець поліпептидного ланцюга піддається модифікаційним змінам ще тоді, коли синтез решти поліпептидного ланцюга продовжується.

З інших найбільш розповсюджених реакцій, за участю яких відбувається модифікація поліпептидної структури і тим самим здійснюється вплив на формування її остаточної конформації, варто назвати ацетилювання аміногрупи N-кінцевої амінокислоти, фосфорилювання НО-груп залишків оксіамінокислот (серину, треоніну, тирозину), що призводить до збільшення негативного заряду відповідних білків, карбоксилювання залишків аспарагінової і глутамінової кислот, метилювання залишків лізину і карбоксильних груп деяких залишків глутамінової кислоти, приєднання бічних вуглеводних ланцюгів, додавання простетичних груп, а також утворення дисульфідних містків.

3.2.3. Регуляція синтезу білка

Здатність бактерій швидко пристосовуватися до умов, що змінюються, і ощадливо використовувати різноманітні поживні речовини досягається контролем білкового синтезу на рівні транскрипції за рахунок зміни швидкості утворення іРНК. Інший шлях регуляції швидкості протеїносинтезу здійснюється на рівні трансляції. Механізм його вивчений недостатньо і для бактерій він має другорядне значення.

У клітинах еукаріот провідну роль відіграє контроль біосинтезу білка на рівні трансляції. За рахунок регуляції швидкості синтезу ферментів у клітині створюється таке співвідношен-

ня їхніх концентрацій, яке забезпечує оптимальний рівень метаболізму, адекватний умовам навколишнього середовища. При цьому варто враховувати ту обставину, що деякі ферменти незалежно від напруги метаболізму містяться в клітинах бактерій у постійній концентрації (конститутивні ферменти); кількість інших, залежно від умов, змінюється в тисячу і більше разів (індуковані ферменти).

У першому випадку як приклад можна назвати ферменти гліколізу, у другому — β-галактозидазу, що здійснює гідролітичне розщеплення лактози на глюкозу і галактозу.

Молекулярні і генетичні механізми регуляції швидкості білкового синтезу в прокаріот були розроблені Жакобом Ф. та Моно Ж. (1961–1964) і сформульовані в гіпотезі оперона, що одержала повне підтвердження в результаті прямих біохімічних досліджень. Було виявлено, що клітини E.coli у середовищі, що містить замість глюкози лактозу, починають синтезувати у великих кількостях, які перевищують первинний вміст більш ніж у 10^3 разів, β-галактозидазу і два інших зв'язаних з нею функціонально ферменти — β-галактозидпермеазу і білок А. Лактоза в даному процесі виступає як індуктор, а сам процес має назву координованої індукції.

Для пояснення механізму дії індуктора Жакоб Ф. Та Моно Ж. запропонували схему (рис. 3.12). На ній три структурних гени (lac-гени) z, y і a та ланцюг ДНК, що їм передує, включає дві регуляторні ділянки — промотор (p) і оператор (o), а також регуляторний ген i, який кодує білок-репресор, розташовані поруч. Ці гени були названі опероном. Крім lac-оперона у бактерій ідентифіковані й інші, переважаючі за складністю лактозний. Так, his-оперон кодує дев'ять ферментів, необхідних для біосинтезу амінокислоти гістидину.

Транскрипція lac-оперона може індукуватися лактозою. Індуктор взаємодіє з другим специфічним центром білка-репресора (першим центром білок-репресор зв'язується з опероном). Утворення індуктор-репресорного комплексу призводить до зниження спорідненості репресора до оператора і відділення комплексу від оператора. Звільнена від білкової репресії ділянка ДНК (оперон) стає доступною для РНК-полімерази, за допомогою якої здійснюється транскрипція z-, y- і a-генів, потім

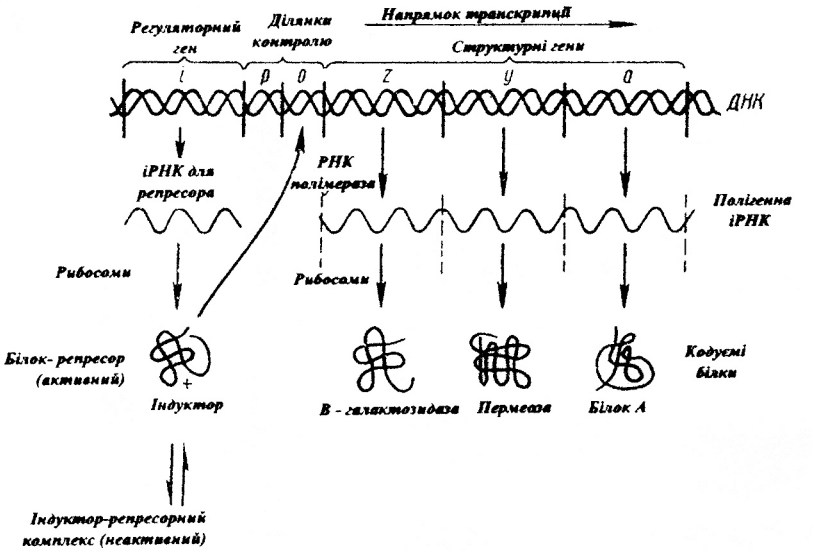


Рис. 3.12. ***Схема регуляції синтезу білка***
(за Жакобом Ф. та Моно Ж., 1964)

відбувається трансляція іРНК, завдяки чому з'являється доступ до нового джерела вуглецю й енергії — лактози. Заміна лактози в традиційному поживному середовищі для E.coli субстратом D-глюкозою, що легко метаболізується, супроводжується дисоціацією комплексу індуктор-репресор, що веде до відновлення в останнього властивої йому високої спорідненості до взаємодії з оператором та інгібування процесу транскрипції структурних генів lac-оперону.

Молекулярна маса виділеного Гілбертом У. та Мюллер-Хіллом В. (1967) lac-репресора — майже 150 тис., а в клітині E.coli, як правило, знаходиться лише близько 10 молекул цього білка. До складу деяких оперонів входить ще промотор, що включає 85 пар нуклеотидних залишків; розташований він між інгібіторною ділянкою (ген і) та оператором. Частина промотора, що розташована ближче до оператора (близько 40 пар залишків нуклеотидів), є місцем зв'язування РНК-полімерази. Функціональна роль нуклеотидної послідовності, що знахо-

диться з боку і-гена (близько 38 пар залишків азотистих основ), полягає в зв'язуванні особливого білка, що активує катаболітний ген, — БАК, чи САР (від англ. catabolite protein activator). Під контролем САР-ділянки знаходиться місце зв'язування РНК-полімерази. Коли в середовищі відсутня глюкоза, білок САР і циклічний АМФ, (цАМФ чи сАМР) утворюють комплекс, який при з'єднанні із САР-ділянкою ДНК, створює необхідні стеричні умови для надходження РНК-полімерази в ділянку первинного зв'язування і подальшого просування ферменту через зону вільного від інгібування оператора (індуктор-репресорний комплекс не здатний інгібувати оператор) до lac-генів і їх транскрипції.

Наявність у середовищі глюкози в кількості, що забезпечує потребу клітини, супроводжується зменшенням умісту сАМР; створюється перешкода для утворення САР–сАМР-комплексу, що не дозволяє РНК-полімеразі зв'язатися з оператором і розпочати транскрипцію структурних z-, y- і a-генів. Таким чином, сАМР виконує роль зонда, що чутливо реагує на наявність в середовищі глюкози. Концентрація сАМР залежить від відношення активностей аденілатциклази, яка каталізує реакцію утворення сАМР з АТФ, і фосфодиестерази, що здійснює гідроліз сАМР. Описаний механізм регуляції синтезу ферментів дозволяє клітинам прокаріот підтримувати метаболізм на рівні, що забезпечує досягнення максимального ККД.

Контрольні питання

1. Носіями яких видів нуклеїнових кислот є усі живі організми?
2. Яка біологічна роль нуклеїнових кислот?
3. Хімічна будова нуклеїнових кислот.
4. Від чого залежить хімічний склад нуклеїнових кислот?
5. Хімічна будова пуринових основ.
6. Хімічна будова піримідинових основ.

7. Яка відмінність у будові ДНК і РНК?
8. Яка відмінність функцій ДНК і РНК?
9. Основна функція ДНК.
10. Які сполуки називаються нуклеотидами?
11. Хімічна будова нуклеозидів.
12. Назвіть типи РНК і їх функції.
13. Які рівні структурної організації мають нуклеїнові кислоти?
14. Чим визначається первинна структура нуклеїнових кислот?
15. Вторинна структура нуклеїнових кислот.
16. Що таке генетична карта людини?
17. Коли вперше було встановлено первинну структуру ДНК людини?
18. Що таке правило комплементарності?
19. Що зумовлює комплементарність основ фрагментів ДНК?
20. Коли і ким була запропонована вторинна структура ДНК?
21. Що таке вторинна структура ДНК?
22. Чим забезпечується стабільність біспіральної структури ДНК?
23. Які типи подвійної спіралі є у ДНК та РНК?
24. Чим відрізняються між собою різні ДНК?
25. Яку особливість має третинна структура нуклеїнових кислот?
26. Чим зумовлена третинна структура нуклеїнових кислот?
27. За участю яких ферментів відбувається суперспіралізація ДНК у еукаріот?
28. Назвіть білки, які беруть участь у суперспіралізації ДНК.
29. Які амінокислоти переважають у складі білків, що забезпечують суперспіралізацію ДНК?
30. Що таке нуклеосоми?
31. Способи укладання ДНК у просторі.
32. Чим зумовлюється укладання ДНК у просторі?
33. Яку інформацію містить спіраль ДНК?
34. Що таке нуклеофільні групи?
35. Які групи називаються електрофільними?
36. Як відбувається реплікація ДНК?
37. За участю яких ферментів відбувається реплікація ДНК?
38. Що є обов'язковою умовою реплікації ДНК?

39. Що таке реплікаційна вилка?
40. Що означає транскрипція РНК?
41. Які ферменти беруть участь у забезпеченні процесу транскрипції?
42. Що таке РНК-транскрипти?
43. Яка відмінність у трансляції прокаріотичних та еукаріотичних РНК-транскриптів?
44. Що називається генетичним кодом?
45. Яка особливість будови гена?
46. Коли і ким був розшифрований генетичний код?
47. Чи є генетичний код універсальним для всіх організмів?
48. За участю яких чинників відбувається проходження інформації від ДНК до білка?
49. Що таке кодон-антикодонове пізнавання і взаємодія?
50. Сутність гіпотези коливань.
51. Назвіть етапи біосинтезу білка.
52. Що таке активація амінокислот і місце її локалізації?
53. Які компоненти клітин беруть участь у біосинтезі білка?
54. Що таке адаптори?
55. Що таке рибосома?
56. Як відбувається ініціація поліпептидного ланцюга?
57. Що таке ініціюючий комплекс?
58. Стадії формування ініціюючого комплексу.
59. В чому полягає процес елонгації?
60. Що таке транслокація?
61. Що таке термінація?
62. Що таке процесинг поліпептидного ланцюга?
63. Як відбувається упаковка і процесинг поліпептидного ланцюга?
64. Назвіть основні чинники, що впливають на упаковку і процесинг поліпептидного ланцюга.
65. Назвіть шляхи регуляції синтезу білка.
66. Назвіть молекулярні і генетичні механізми регуляції швидкості білкового синтезу в прокаріот.
67. Яка роль індукторів і механізм їх дії?

Розділ 4.

КЛІТИННА ІНЖЕНЕРІЯ

4.1. КУЛЬТУРА ЕУКАРІОТИЧНИХ КЛІТИН

Досягнуті молекулярною біологією і генетичною інженерією успіхи останнім часом значною мірою стали можливими завдяки застосуванню порівняно простих (а тому доступних широкому колу експериментаторів), відтворених і результативних методів, де як об'єкти дослідження широко використовуються бактерії, нижчі гриби і бактеріофаги. При цьому мікробні клітини і фаги розмножуються in vitro на агаровому середовищі, утворюючи відповідно колонії і бляшки, які являють собою потомство однієї особи (мікробної клітини чи вірусної частки). Розробка методів, що дозволяють одержувати і надалі підтримувати культури клітин еукаріотичних багатоклітинних організмів, у яких одноклітинний організм цілком зберігає геном вихідного виду й одночасно в багатьох відносинах поводить себе як мікроорганізм, є свого роду фундаментом, на якому зводиться будова клітинної інженерії і біотехнології.

Однією з основних властивостей клітинних культур є обмежена тривалість життя навіть за умови постійного перенесення їх на свіже поживне середовище (після 50–100 поділів клітинні культури гинуть). Не є винятком і такі клітини, які добре переносять культивування — фібробласти. Чим менше вік джерела, з якого отримані клітини для культивування в культурі, тим більше разів вони здатні ділитися перш ніж загинути. Так, якщо донором є плід, то кількість поділів клітин, що знаходяться у культурі, досягає 50; однак тільки до 30 разів діляться клітини, взяті для культивування у немовляти.

Для пояснення старіння і загибелі клітин запропоновано кілька гіпотез, одна з яких пов'язує старіння з нагромадженням соматичних мутацій, порушенням транскрипції і трансляції, біосинтезом значної кількості неактивних чи частково активних

молекул, що призводить до збільшення кількості аномальних продуктів обміну. Однак наводяться дані про те, що віруси в старій і молодій клітинній культурах розмножуються однаково успішно. У зв'язку з цим висловлюється думка про те, що апарат біосинтезу білка клітини-хазяїна, що бере участь у процесі репродукції вірусів, функціонує в старих культурах клітин так само добре, як і в молодих.

Гіпотеза запрограмованої загибелі клітин передбачає, що смерть клітин — це результат реалізації генетичної програми. Наявні експериментальні дані підтверджують, що загибель клітин у культурі й організмі настає після кількості поділів, які збігаються, і є наслідком реалізації генетичної програми. Висловлюється думка, що однією з причин загибелі клітин, у яких порушене співвідношення між швидкістю поділу й інтенсивністю обміну, є нагромадження ліпофусцину, що утворюється внаслідок розпаду білкових структур, ліпідів і гему. У клітинах, що діляться, накопичується ліпофусцин, який розподіляється між дочірніми клітинами. Крім того, речовини, що входять до складу ліпофусцинових гранул, використовуються повторно (*Зенгбуш П.*, 1984). Процесу нагромадження ліпофусцину в загибелі клітин відведена важлива роль, але нема пояснення, чому настільки тривале життя в культурі ракових клітин. Анеуплоїдні (клітини, у яких число хромосом у ядрах не є кратним гаплоїдному набору), а також багато ліній пухлинних клітин є винятком з цього правила.

З 1951 р. культивується лінія анеуплоїдних (60–70 хромосом) пухлинних клітин, відомих як клітини HeLa. Вони були отримані з пухлинної тканини померлої від раку матки негритянки. На сьогодні ця культура клітин в умовах лабораторій за показниками росту перевершує інші лінії, отримані згодом від хворих на рак людей білої раси. Фермент глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа негрів і людей з білою шкірою при гель-електрофорезі поводиться неоднаково, що покладено в основу маркірування клітин HeLa. Що стосується рослинних клітин, то наявні дані до розмноження черешками свідчать про необмежену здатність клітин рослин до поділу.

Для підтримки функціонально активного стану клітин у культурі важливою була розробка відтворених умов культиву-

вання, особливо необхідність стандартизації складу поживного середовища. Так, у середовище для культивування фібробластів миші вводили кінську сироватку, екстракт із курячих ембріонів і солі. Ігол М.Г. (1955) запропонував багатокомпонентну суміш, відому як середовище Ігла (табл. 4.1).

Таблиця 4.1.

Склад середовища Ігла

Компоненти	*Концентрація*		*Компоненти*	*Концентрація*	
	мг/л	*мМ*		*мг/л*	*мМ*
Солі (збалансований сольовий розчин Ерла)					
NaCl	6800	100			
KCl	400	5	*Вітаміни*		
$CaCl_2$	200	1	Біотин	1	10^{-3}
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	200	0,5	Холінхлорид	1	10^{-3}
$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$	150	1	Інозит	2	$2 \cdot 10^{-3}$
$NaHCO_3$	2000	20	Нікотинамід	1	10^{-3}
Амінокислоти			Фолієва кислота	1	10^{-3}
Arg–HCl	21	0,1			
Cys	12	0,05	Пантотенат кальцію	1	10^{-3}
Gln	292	2,0			
His–HCl	9,5	0,05	Рибофлавін	0,1	10^{-4}
Ile	26	0,2	Тіамін	1	10^{-3}
Leu	26	0,2	*Добавки*		
Lys–HCl	36	0,2	Глюкоза	1000	5
Met	7,5	0,05	Пеніцилін	0,005%	
Phe	18	0,1	Стрептоміцин	0,005%	
Thr	24	0,2	Феноловий червоний	0,0005%	
Trp	4	0,02			
Tyr	18	0,1	Сироватка (діалізована)	5%	
Val	24	0,2			

Відомі модифікації цього поживного середовища, а також прописи середовищ, запропоновані іншими авторами. Якщо ви-

моги до складу поживного середовища з боку клітин не дуже суворі, то допустимі коливання реакції середовища невеликі (оптимум pH знаходиться у межах 7,2–7,4); зменшення чи збільшення pH на 0,2–0,4 супроводжується загибеллю клітин у культурі. При тривалому культивуванні зростають вимоги до буферних розчинів. Перевага надається гліцилгліциновому, трис-(гідроксиметил)-амінометановому і 4-(2-гідроксиетил)-1-піперазинетансульфокислотному (ГЕПЕС) буферам. Вплив сироваткового компонента середовища Ігла на функціональний стан клітин у культурі тим ефективніший, чим менше вік тварини, від якої ця сироватка отримана (краще використовувати сироватку ембріонів).

Для забезпечення стерильності, що є наджорстко контрольованою умовою, останнім часом практикується використання стерильного пластмасового посуду (флаконів, чашок, піпеток) одноразового використання. У зв'язку з тим, що поділ деяких типів клітин у культурі настає лише тоді, коли вони прикріплені до субстрату, матеріал варто піддавати спеціальній обробці при підготовці до процедури культивування.

Зростаючі в культурі і прикріплені до субстрату клітини найчастіше сплющені і мають витягнуту веретеноподібну форму; клітини, що ростуть у суспензії, мають, як правило, сферичну форму.

Клітинну масу для культивування одержують шляхом трипсинової обробки відповідного органу; останній розпадається на окремі клітини, що з дотриманням усіх обмежень, викликаних необхідністю дотримання стерильності, переносять на поживне середовище для культивування. Поодинокі еукаріотичні клітини, які не здатні ділитися, швидко гинуть. Враховуючи таку властивість при культивуванні вдаються до створення шару живильних клітин, для чого призначені для клонування клітини наносять на шар клітин, що втратили після опромінення здатність ділитися, але ще на певний час зберегли метаболізм. Цього виявляється достатньо, щоб нанесені на цей шар клітини почали ділитися. Однак кількість клітин, що вступили у фазу поділу, віднесена до кількості нанесених на живильне середовище завжди менша 100 %. При додаванні до живильного середовища деяких речовин-мітогенів здатність клітин до поділу підвищується.

Серед мітогенів розрізняють групу речовин (фактори росту), що містяться у сироватці крові в незначних кількостях, які мають властивості гормонів. Ідентифіковані фактори росту нервів (ФРН), епідермісу (ФРЕ), фібробластів (ФРФ) є білковими речовинами, молекулярна маса яких коливається від 6045 (ФРЕ) і 13,4 тис. (ФРФ) до 130 тис. (ФРН). Спектр їх дії набагато ширший, ніж стимулювання мітозу.

Крім факторів росту, мітогенною дією володіють речовини, названі лектинами. Їхньою загальною властивістю є здатність специфічно зв'язувати залишки цукрів. Залежно від кількості ділянок, з якими вступають у взаємодію цукри, розрізняють дво- і полівалентні лектини. Основним джерелом лектинів є бобові (1,5–3 % усіх білків), хоча з бактерій, безхребетних (равлик) і хребетних (електричний вугор) також виділені ці речовини. З насіння рицини отриманий рицин, з конвалії мечоподібної — конканавалін А (Con A), з насіння квасолі — фітогемаглютинін (ФГА). При насиченні моноцукрами середовища, що містить лектини, останні втрачають здатність взаємодіяти з вуглеводовмісними рецепторами поверхні, тому що специфічні ділянки лектинів, з якими могли б вступити в реакцію вуглеводні рецептори клітинної стінки, займають раніше додані моноцукри. Клітини в культурі ведуть себе по-різному. Одні (фібробласти) легко піддаються культивуванню, інші (клітини епітелію, нейрони) поділяються значно важче.

Визначальним параметром поводження клітин у культурі є так зване контактне гальмування, чи регуляція клітинного росту, що залежить від кількості клітин на одиниці площі. Максимальна щільність, що може бути доступна для нормальних клітин у культурі, досягає $10^4/см^2$ особин; кількість ракових клітин на два порядки вища ($10^6/см^2$). Крім того, нормальні клітини, що ростуть на субстраті, являють собою моношарове утворення: ріст клітин пухлини характеризується безладністю, у зв'язку з чим виникає багатошарове утворення. Висловлюється думка, що причиною гальмування клітинного поділу є вилуження мікросередовища. Мітогени (речовини, що стимулюють клітинний поділ) і халони (речовини, що гальмують процес поділу) також виступають як регулятори клітинного росту. Такі властивості клітин, як адгезія (зчеплення клітин між собою і субстра-

том) і контактне гальмування, значною мірою залежать від характеру розподілу на клітинній поверхні і рухливості в мембрані вуглеводовмісних рецепторних молекул. За допомогою лектинів, що сприяють аглютинації клітин, установлено, що рецептори на поверхні пухлинних клітин розподілені нерівномірно (вони утворюють скупчення). Розподіл рецепторів на клітинній поверхні, їх кількісні і якісні характеристики значною мірою призводять до того, що адгезія і контактне гальмування в ракових клітинах проявляються слабше, а аглютинації під дією лектинів вони піддаються легше, ніж нормальні диференційовані клітини.

4.2. БІОТЕХНОЛОГІЇ ГІБРИДИЗАЦІЇ СОМАТИЧНИХ КЛІТИН

Причиною встановленого ще в минулому столітті факту багатоядерності клітин як патологічних (пухлини, ділянки з запаленням, що утворюються при коров'ячій віспі та ін.), так і нормальних (м'язові волокна) тканин могло бути, з одного боку, поділ ядер без одночасного поділу клітин (наприклад, формування плазмодія слизуватого гриба Physarium), з іншого — злиття декількох клітин (міобластів) і утворення багатоядерної клітини — м'язового волокна. Злиття відбувається не тільки серед диференційованих клітин у багатоклітинних організмах, але й між клітинами в культурі. Зливатися можуть клітини різного типу, що належать до того самого виду (наприклад, мишачі фібробласти і мишачі лімфобласти), так і клітини тварин різних видів (наприклад, миша/людина; хом'як/курка; комар/людина). У першому випадку батьківські клітини, що зливаються, розрізняються між собою за морфологічними, біохімічними, імунологічними або функціональними властивостями, а продукти злиття є внутрішньовидовими гібридами. В другому випадку утворюються міжвидові гібриди, а вихідні батьківські клітини, від злиття яких ці гібриди з'являються, насамперед відрізняються генотипічно, а іноді й фенотипічно. Багатоядерні клітини (полікаріони), що утворяться в результаті злиття клітин двох різних типів (А і В), представлені трьома

комбінаціями — АА, ВВ і АВ. Полікаріони, що містять ядра тільки одного клітинного типу (АА і ВВ), називаються гомокаріонами; полікаріони, у складі яких присутні ядра обох батьківських типів (АВ), належать до гетерокаріонів. Злиття в гетерокаріонах ядер після злиття клітин є результатом виникнення клітинного гібрида (рис. 4.1).

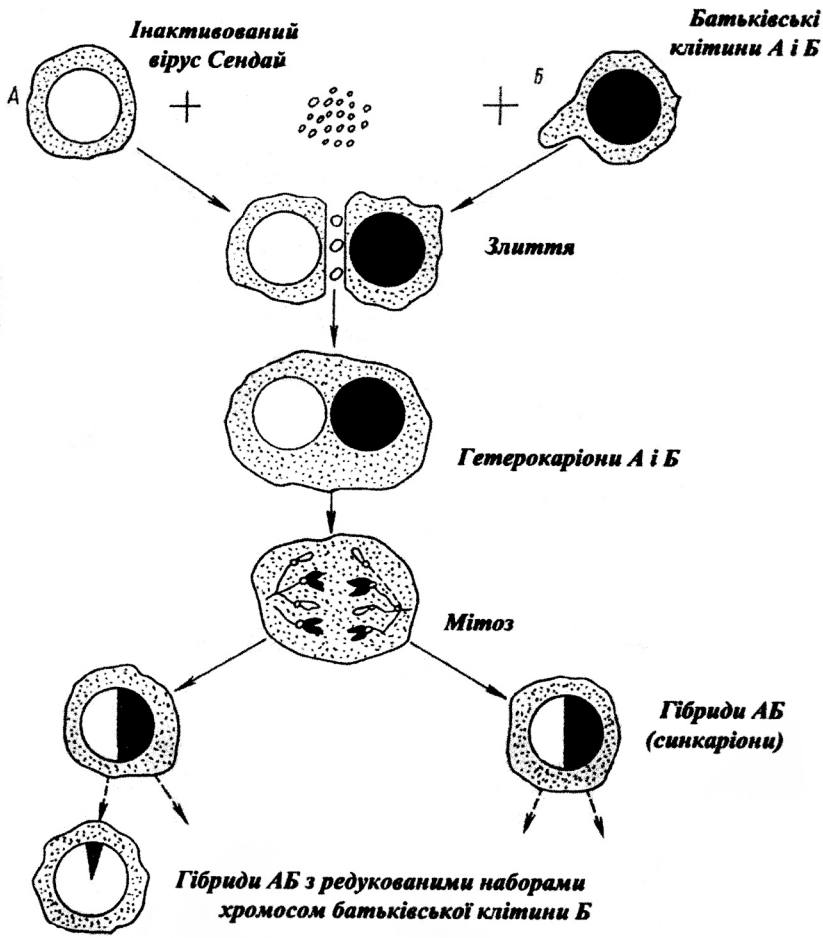


Рис. 4.1. ***Схема злиття двох одноядерних клітин А і Б, які належать тваринам двох різних видів***
(за Рінгерцем Н. та Севіджом Р., 1979)

Овчинников Ю.А. (1982) знайшов вирішення проблеми за допомогою методу гібридизації соматичних клітин. Гібридизація широко використовується в генетиці, біології клітини, біології розвитку, вірусології, біології пухлин та інших галузях біологічної науки, а також на практиці.

Метод одержання і культивування гібридних клітин може бути використаний для вирішення практичних питань охорони здоров'я, тому що за продуктами експресії хромосоми, що залишилися в геномі синкаріона з батьківської клітини людини, визначаються ознаки генетичних спадкових захворювань. За допомогою методу гібридизації соматичних клітин вдається реактивувати онкогенний вірус. При злитті клітин-вірусоносіїв з нормальними, але чутливими до пухлинного вірусу клітинами в синкаріонах, що утворилися, настає реактивація вірусу, який інтенсивно розмножується в кількостях, достатніх для його виявлення.

Цей методичний прийом використовують для виявлення в пухлинних клітинах онкогенного вірусу. Утворення синкаріонів, наступне вивчення клітинних гібридів у культурі, а також при введенні їхньої суспензії тваринам та поява пухлин, що спостерігається не у всіх випадках, подає необхідну інформацію для з'ясування механізмів виникнення раку. Наприклад, вирішувати питання про злоякісність або доброякісність одержаного з пухлинної і нормальної клітин синкаріона можливо, очевидно, залежно від наявності чи відсутності в гібридній клітині певних хромосом.

Антисироватки зі специфічними антитілами, отриманими звичайними методами, широко й успішно використовувалися для ідентифікації, очищення або для руйнування певних клітин, що знаходяться в оточенні клітинних популяцій, які розрізняються між собою. Специфічні антисироватки використовувалися при вивченні клітинних ліній і факторів, що беруть участь у процесах проліферації і диференціації, а також для ідентифікації компонентів синапсів, що являють собою місця міжклітинної взаємодії у нервовій системі.

За допомогою методик з використанням антисироватки була встановлена специфічна локалізація калмодуліну, клатрину і тубуліну в синаптичних ділянках, що дозволило сформулювати

більш обґрунтовану думку про функції цих молекул, що беруть участь в забезпеченні життєдіяльності всіх клітин. Крім того, за допомогою антисироваток у місцях нервово-м'язового з'єднання були виявлені специфічні для цієї ділянки антигени, що відіграють важливу роль у функціонуванні цього синапсу. Стає очевидною потенційна можливість методу застосування антисироваток для розкриття механізмів диференціації нерва і м'яза в цій спеціалізованій ділянці.

Антисироватки виявилися найбільш ефективними реагентами, а їхнє застосування дало можливість виявляти локалізацію клітин, що синтезують і містять нейропептиди і непептидні медіатори, а також ферменти, що беруть участь у їхньому біосинтезі. Висока чутливість імуноцитохімічних методів дозволила ідентифікувати і визначити локалізацію більше двох десятків медіаторів.

Участь багатьох органічних молекул у регуляції специфічних клітинних функцій вдалося встановити також за допомогою імунологічних досліджень. Потенційні можливості методу неможливо реалізувати через недоліки, властиві антисироваткам, отриманим у результаті імунізації тварин гетерогенними імуногенами. Ефективність антисироваток зменшується через наявність не тільки молекул, які цікавлять у даний момент дослідника, але й інших антигенів. Так, є підстави вважати, що окрема клітина імунної системи, що синтезує імуноглобулін (Ig), і її нащадки відтворюють тільки один вид антитіл. Ця унікальна властивість імунної системи була покладена в основу при розробці методу щодо зниження гетерогенності стандартних антисироваток. Імунізацію тварин проводять гетерогенними чи поліспецифічними антигенами. Однак надалі в культурі вирощують клони окремих синтезуючих імуноглобулін клітин, що продукують окремі моноспецифічні чи моноклональні антитіла, вільні від домішок антитіл до сторонніх антигенів. Ідентифікація клітин, які утворюють антитіла, не має особливої складності; що стосується розмноження їх у культурі, то, як було сказано раніше, це вдається зробити протягом нетривалого часу. Гібридні клітини, отримані злиттям пухлинних і секретуючих імуноглобулін клітин імунної системи — гібридоми, поєднують у собі здатність до тривалого розмноження в культурі зі

здатністю біосинтезу моноклональних антитіл. Уперше гібридоми були отримані шляхом злиття антитілоутворюючих клітин селезінки (спленоцитів) миші, імунізованої баранячими еритроцитами, з мієломними клітинами, у яких була відсутня гіпоксантинфосфорибозилтрансфераза (фермент, що бере участь у реакціях метаболізму пуринів). Щоб збільшити імовірність злиття батьківських клітин і підвищити вихід гібридом, як допоміжний засіб використовують віруси з аглютинуючими властивостями. Вірусні частки накопичуються на поверхні батьківських клітин, що вступають у контакт; на поверхні контактуючих клітин з'являється велика кількість мікроворсинок, що у місцях дотику зливаються, утворюючи цитоплазматичні містки. Зони злиття поступово розширюються, заповнюючи всю площу мембрани в ділянці клітинного контакту.

Köhler G., Milstein C. (1975), що першими запропонували спосіб одержання гібридом, для злиття батьківських клітин використовували вірус Сендай, що належить до групи вірусів парагрипу, інактивованого ультрафіолетовим випромінюванням. Замість вірусів використовуються ліпіди, іони кальцію в лужному розчині (pH 10,5), фосфоліпаза С. Останнім часом знайшов широке застосування поліетиленгліколь. Такі речовини, як цитохалазин В, інгібітори енергетичного обміну, а також засоби, що викликають місцеву анестезію, навпаки, блокують процес злиття клітин.

Клітини селезінки, що не взяли участі в утворенні гібридом, через певний час гинули, тому що не були здатні до проліферації і виживання в культурі. Мієломні клітини, що залишилися у культурі, під впливом доданого в середовище аміноптерину гинули, тому що процес синтезу пуринів de novo припинявся. Гібридомні клітинні лінії були життєздатними в культурі завдяки присутності гена, що кодує біосинтез ферменту гіпоксантинфосфорибозилтрансферази, за участю якого гіпоксантин перетворюється на пуринові нуклеотиди. Гени батьківської мієломи забезпечують гібридомній культурі постійний поділ.

Лінія гібридомних клітин, що синтезує антитіла проти баранячих еритроцитів, була ідентифікована методом їхнього гемолізу. Крім того, виявилося, що в популяції гібридомних клітин кількість клонів, продукуючих антитіла проти баранячих

еритроцитів, у 100 разів перевищувало кількість клонів у вихідній батьківській популяції спленоцитів (10 % у гібридомній популяції проти 0,01 % у популяції спленоцитів). Цей приклад указує на здатність стимульованих антигеном клітин забезпечувати одержання функціонально активних гібридів.

При гібридомній технології придатною є така система добору, за якої життєдіяльними залишалися б тільки гетерокаріони. З цією метою підбираються вихідні батьківські клітинні лінії, що мають дефекти в генах, які перешкоджають їх поділу і росту. Одночасно внаслідок взаємної комплементації гетерокаріони зберігають здатність до поділу *(Зенгбуш П.)*.

Найбільш розповсюдженою є система добору за допомогою селективного середовища, що містить гіпоксантин, аміноптерин і тимідин (середовище ГАТ). Вихідні батьківські клітинні лінії, використані для одержання клітинних гібридів, містять дефектні ферменти; гіпоксантингуанозинфосфорибозилтрансферазу (ГГФРТ), резистентну до 8-азагуаніну (АГ), чи тимідинкиназу (ТК), резистентну до 5-бромдезоксиуридину (БдУ). Вихідні батьківські клітини не можуть рости в середовищі, що містить гіпоксантин — перетворений пурин, тимідин — перетворений пірімідин і аміноптерин (середовище ГАТ). Аміноптерин блокує синтез гіпоксантину і тимідину, а під час відсутності ферменту ГГФРТ і (чи) ТК клітини не можуть використовувати ці речовини, що містяться у середовищі. З вихідних ліній батьківських клітин, що знаходяться в середовищі ГАТ, резистентних до АГ ($ГГФРТ^-/ТК^+$) і резистентних до БдУ ($ТК^-/ГГФРТ^+$), здатність до поділу будуть зберігати лише клітинні гібриди, утворені в результаті злиття вихідних клітинних ліній. Лінії $ГГФРТ^-$ і $ТК^-$ вже отримані для мишей, пацюків, золотавого і китайського хом'яків, а також для людини. За методикою, аналогічній описаній, з використанням поліетиленгліколю замість вірусу Сендай для індукування процесу злиття батьківських клітин отримані антитіла для великої кількості антигенів. На кількість у селезінці В-лімфоцитів, що взаємодіють з певним антигеном, впливає тривалість інтервалу між останньою імунізацією тварини і моментом узяття спленоцитів. Остання обставина впливає на чистоту утворення гібридом, що синтезують відповідні антитіла.

Крім описаних, є дані про можливість одержання гібридом шляхом злиття з мієломними клітинами селезінкових клітин, імунізованих антигенами in vitro. Кількість антигену для одержання імунної відповіді в цьому випадку значно зменшується. Для перетворення лінії клітин, що секретує антитіла, немає потреби проводити їхню гібридизацію з мієломними клітинами. За допомогою вірусу Епштейна-Барра можлива пряма трансформація клітин, які секретують антитіла, специфічні до дифтерійного і правцевого токсинів. Тривала підтримка у функціонально активному стані клітинної культури Т-лімфоцитів за допомогою додаткових ростових факторів свідчить про те, що в недалекому майбутньому можна буде одержувати безперервно клони В-лімфоцитів, які спроможні до безперервного поділу.

Як зазначає Овчинников Ю.А. (1982), гібриди є тільки одним з варіантів використання культури клітин у біотехнології. За допомогою гібридомної біотехнології можлива регуляція імунної відповіді за рахунок одержання моноклональних антитіл заданої специфічності.

Моноклональні антитіла є тим видом біотехнологічної продукції, яку з успіхом використовують як у науково-дослідній роботі, так і для задоволення потреб виробництва. Моноклональні антитіла застосовуються при проведенні ідентифікації молекул, що цікавлять дослідника, для очищення потрібних антигенів (для детального аналізу їхньої структури і функцій), для з'ясування механізмів диференціації клітин в онтогенезі і поділу різних типів клітин імунної системи. Моноклональні антитіла, що секретуються культурою гібридомних клітин, є високоефективним і високочутливим діагностичним препаратом. Вони можуть використовуватися як профілактичні та лікувальні засоби, а також для одержання імуносорбентів, ферментних препаратів, інтерферонів, гормонів та інших біологічно активних речовин (можна використовувати культури тваринних і рослинних клітин).

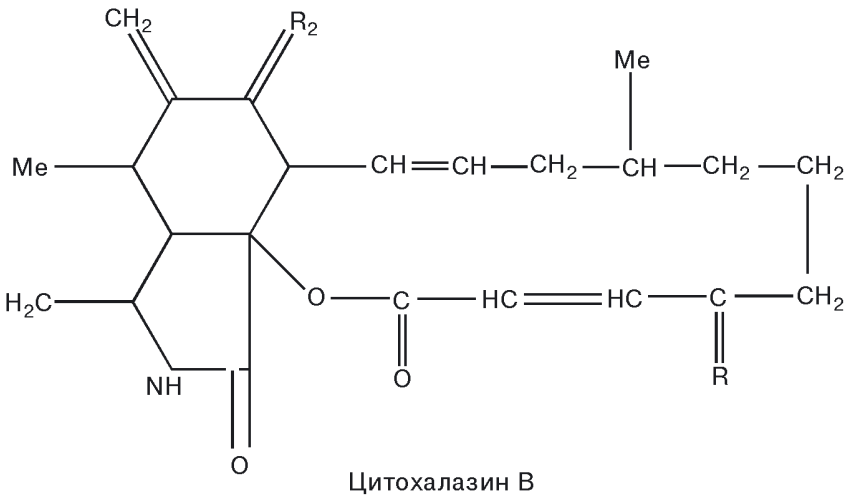
4.3. БІОТЕХНОЛОГІЯ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ ЯДЕР

Більшість досліджень, виконаних в останні роки з гібридизації соматичних клітин еукаріотичних організмів (переважно ссавців) у клітинній культурі, переконливо довели, що в гібридній клітині, які має змішаний геном у зв'язку з гетерогенною природою батьківських клітин, відбуваються стабільні зміни в експресії генів синкаріона порівняно з процесом експресії у вихідних батьківських клітинах. Так, при злитті клітин щурячої гепатоми, що синтезує і екскретує альбумін, з мишачими фібробластами, що не секретують цей білок, були отримані гібридні клітини, частина клонів яких синтезували альбумін тільки пацюка, чи тільки миші, або альбуміни обох вихідних батьків (пацюка і миші).

На підставі результатів цього й інших подібних експериментів з гібридизації соматичних клітин було висловлене припущення про те, що в клітинах ссавців є речовини, здатні прямо чи побічно впливати на клітинне ядро, змінювати його функціональний стан за допомогою позитивної або негативної регуляції експресії певної частини генів. Однак комплекс об'єктивних причин (гетерогенність генома найчастіше зі значним дефіцитом хромосом, а також із хромосомними перебудовами, що відбулися, які знаходяться в оточенні гетерогенної цитоплазми), властивих методу гібридизації соматичних клітин, не дозволив ідентифікувати речовини, що беруть участь в експресії генома, а також установити їхню хімічну будову і механізм дії. До цього часу вчені мали у своєму розпорядженні дані про те, що речовини, які містяться в цитоплазмі тварин, беруть участь у регулюванні експресії генів клітинного ядра.

Виявилося, що в ядрах попередньо вилучених з диференційованої клітини і поміщених у цитоплазму яйцеклітини починалися процеси клітинного диференціювання і в багатьох випадках розвивався нормальний організм, тобто ядра спеціалізованих клітин містили повний обсяг необхідної для розвитку повноцінного організму інформації. Так, злиття ядер, вилучених з клітин кишкового епітелію пуголовка, з позбавленої ядра яйцеклітиною в багатьох випадках приводило до розвитку жаби. Ці експерименти, виконані на амфібіях, показали, що цито-

плазма регулює активність ядра; у спеціалізованих клітинах багато функцій ядра гальмуються компонентами цитоплазми. Інгібуючий вплив, що надходив до ядра з боку цитоплазми диференційованої клітини, опинившись у придатному за хімічним складом цитоплазматичному оточенні (яйцеклітина), усувається, і в ядрах можуть знову проходити процеси, що визначають клітинну диференціацію *(Gurdan J.B., 1977)*. Експерименти з трансплантації ядер були проведені на амфібіях. У розробці методів пересадки клітинних ядер ссавців істотну роль відіграло використання цитохалазинів — речовин, синтезованих грибами.



Цитохалазин В

Висловлюється думка, що цитохалазин В, руйнуючи структуру мікрофіламентів, сприяє унікальному розташуванню ядра, коли воно залишається з'єднаним із клітиною тонкою стеблинкою цитоплазми. При центрифугуванні в більшості таких клітин розривається «пуповина» стеблинки й утворюються енуклейовані (без'ядерні) клітини (цитопласти); ядра, що відокремилися при центрифугуванні (каріопласти, чи міні-клітини), оточені тонким шаром цитоплазми і плазматичною мембраною.

Ефективність енуклеації контролювали, забарвлюючи (наприклад, за методом Гімза) клітинний моношар, що знаходиться на поверхні однієї з чашок або дисків.

Наступна операція, спрямована на одержання популяції цитопластів, — відділення їх від цілих клітин, що залишилися, тому що в деяких випадках (лінія клітин мишачої гепатоми Нера-2) ефективність енуклеації не перевищує 50 %. З цією метою, енуклейовані (цитопласти) і цілі клітини, що містяться на поверхні пластикових чашок і скляних дисків, знімали, обробляли трипсином, внаслідок чого в 1 мл сольового розчину з фосфатним буфером містилося 10^6 цілих клітин і цитопластів. Клітинно-цитопластичну суміш нашаровували на 14 мл лінійного градієнта ренографіну-76, який знаходився в центрифужній пробірці, об'ємна концентрація якого змінювалася від 15 до 30 %, і центрифугували при 1000 g і температурі 25 °С протягом 5 хв. Чітко розмежовані шари цілих клітин і цитопластів видаляли з центрифужної пробірки і використовували за призначенням.

Отримані в градієнті щільності ренографіну-76 цитопласти не забарвлювалися трипановим синім, що слугувало контролем ефективності поділу. Вони зберігали здатність знову прикріплюватися до поверхні культуральної чашки і могли використовуватися надалі для реконструювання життєздатних клітин шляхом злиття з гетерологічними каріопластами.

Методи енуклеації, застосовані для одержання каріопластів, відрізняються від тих прийомів, що забезпечують успіх при одержанні цитопластів. Клітини, призначені для виділення каріопластів, за 2 дні до енуклеації висівають на вирізані з культуральних флаконів пластикові пластинки, які перед поміщенням у 50-мілілітрову центрифужну пробірку, заповнену звичайним поживним середовищем, складали так, щоб їхні поверхні з прикріпленими клітинами знаходилися зовні. Мишачі фібробластні лінії А9 центрифугували при 9,5 тис. g і 35 °С протягом 15 хв. Призначення цієї процедури зводилося до того, щоб в осаді каріопластів, який має бути отриманий, зменшити кількість цілих клітин. Після відокремлення слабко прикріплених до субстрату клітин, пластинки з клітинами моношару, що залишилися, переносили в пробірки, де концентрація цитохалазину В з розрахунку на 1 мл звичайного поживного середовища досягає 10 мкг. Вміст пробірок інкубували при 37 °С протягом 15 хв; тривалість центрифугування при 35 °С і 7 тис. об./хв — 45 хв. Надосадову рідину, що утворилася, зливали, а осад, представле-

ний в основному каріопластами, ресуспендували в звичайному поживному середовищі.

У виготовлених за описаною методикою препаратах каріопластів знаходяться фрагменти цитоплазми, каріопласти, що загинули, та цілі клітини. Відокремлення фрагментів цитоплазми проводиться осадженням у градієнті фіколау 1–6% концентрації при 1 g і 37 °С протягом 90 хв у зволоженій атмосфері, що містить 5 % CO_2. Фрагменти цитоплазми, що знаходяться у верхньому шарі, відсмоктують і видаляють, а осад каріопластів, що утворився після вилучення і розведення поживним середовищем, знову осаджують центрифугуванням і ресуспендують у свіжому живильному середовищі. Цілі клітини (їх 0,4–4 %) видаляють шляхом дворазового 90-хвилинного інкубування суспензії каріопластів у культуральних чашках.

Інкубування протягом 3 годин дозволяє різко зменшити забруднення каріопластів цілими клітинами, що обов'язково для усіх експериментів з трансплантацією ядер.

Наступна операція — відокремлення життєздатних каріопластів від тих, що загинули. Вона включає ресуспендування осаду в поживному середовищі до концентрації 10^7 міні-клітин у 1 мл, нашаровування суспензії на Ficoll-paque (розчин містить 5 % фіколу і 9 % діатризоату натрію), що знаходиться в центрифужних пробірках, і обережне додавання зверху 1 мл середовища так, щоб додане середовище і суспензія каріопластів утворили два самостійних шари. Наступне центрифугування при 800 об./хв (130 g) протягом 75 хв при кімнатній температурі дозволяє одержати осад, що на 99 % складається із загиблих каріопластів; на межі живильного середовища і Ficoll-paque знаходиться шар, що складається на 98 % з життєздатних каріопластів.

Для очищення каріопластів використовують й інші методи, зокрема частки танталу розміром 1–3 мкм. До часу енуклеації практично всі клітини містять більш ніж по 12 часток танталу. У зв'язку з тим, що щільність танталу більш ніж у 15 разів перевершує щільність клітини, компоненти, що містять частки танталу, осаджуються значно швидше каріопластів, у яких тантал відсутній. Очищення каріопластів іноді здійснюється за допомогою цитофлуориметра-сортера.

Властивості цитопластів і каріопластів. Установлено здатність цитопластів синтезувати білки, підтримувати реплікацію вірусу везикулярного стоматиту і поліовіруса, синтез РНК і білка, контрольований вірусом сказу, звільняти вірус SV40 із трансформованих клітин. Цитопласти містять усі види органел, властиві нормальній клітині, зберігають характерну для цілих клітин здатність прикріплюватися до субстрату й утворювати складчасту мембрану, пересуватися і здійснювати піноцитоз.

Навколо каріопластів знаходиться шар, на частку якого припадає близько 10 % клітинної цитоплазми, що містить компоненти ендоплазматичного ретикулума, деяка кількість мітохондрій і рибосом; центріолі в каріопластів, на відміну від цитопластів, відсутні.

Близько 10 % каріопластів деяких клітинних ліній здатні відновлювати весь обсяг утраченої при енуклеації цитоплазми і знову перетворюватися на життєздатні клітини.

Здатність каріопластів регенерувати втрачену в процесі енуклеації цитоплазму і формувати життєздатні колонії клітин залежить від кількості цитоплазми, що оточує ядро. У фракції каріопластів, біля ядер яких зосереджено 2–4 % тієї кількості цитоплазми, що міститься в інтактній клітині (дрібні каріопласти), тільки один з 10^6 очищених елементів може сформувати життєздатну колонію клітин.

Трансплантація ядер і реконструювання клітин. Після енуклеації клітин моношар цитопластів у пластикових чашках діаметром 60 мм чи скляних дисках діаметром 14 мм інкубують у поживному середовищі при 37 °С протягом 1–2 годин, а потім — 20 хв і охолоджують до 4 °С. При цій температурі моношар двічі відмивають розчином Ерла (pH 8,0), потім 20 хв. обробляють 0,5 мл охолодженого розчину Ерла з вірусом Сендай, інактивованим опроміненням протягом 5 хв (ультрафіолетовою лампою на відстані 15 см), після чого шар цитопластів знову двічі промивають тим же розчином, який потім видаляють.

Каріопласти, суспендовані в сольовому розчині на фосфатному буфері, додають до моношарової культури цитопластів з таким розрахунком, щоб на один цитопласт припадало 100 каріопластів. Для адсорбування каріопластів на цитопластах, по-

критих вірусними частками, інкубують при 4 °С протягом 45 хв; через кожні 3–5 хв чашки злегка погойдують. Для злиття каріопластів і цитопластів чашки чи скляні диски переносять у термостат і витримують там при 37 °С протягом 45 хв. Після закінчення цього часу моношар на чашках кілька разів інтенсивно відмивають розчином Ерла чи поживним середовищем без сироватки, щоб видалити каріопласти, які не злилися. Потім у чашки наливають поживне середовище, придатне для культивування того типу клітин, що були використані як донори каріопластів. Цитопласти, що не злилися з ядрами, гинуть і приблизно через 2 дні відокремлюються від поверхні чашки.

Для одержання незабруднених цитопластами культур рекомендується центрифугування гібридних клітин у градієнті щільності ренографіну.

Використання поліетиленгліколю для стимулювання процесу злиття каріопластів і цитопластів при конструюванні клітинних гібридів обмежене через його токсичність, що значно перевищує токсичність вірусу Сендай.

Для ідентифікації гібридних клітин, визначення ефективності трансплантації ядер і наявності батьківських клітин у гібридній популяції використовують мутантні клітинні лінії.

Ефективність реконструювання клітин за рахунок злиття каріопластів і цитопластів залежить від багатьох факторів. Так, тільки близько 10 % цитопластів, отриманих шляхом енуклеації клітин пацюка лінії НТС, зливалися з каріопластами, виділеними з клітин миші лінії А9. Коли гібридизації піддавали цитопласти, отримані з фібробластів курячих ембріонів, і каріопласти, що являли собою перебуваючі у спокої ядра еритроцитів, ефективність реконструювання перевищувала 90 %. Висока ефективність злиття ізольованих перебуваючих у спокої ядер еритроцитів птахів з енуклейованими цитопластами, а також досвід щодо активування ядер еритроцитів птахів, зокрема курей, шляхом злиття цих еритроцитів із клітинами HeLa чи з іншими клітинами, що мають активний метаболізм, дозволили досліджувати роль ядерно-цитоплазматичних взаємодій в експресії генів гібридних еукаріотичних клітин. Виявилося, що не всі гібриди, що утворилися, були життєздатними. Приблизно 9 % реконструйованих клітин можуть рости і ділитися *(Хайтауер М.,*

Льюкас Дж., 1985). У гібридних клітинах відразу після злиття починаються морфологічні зміни. Через кілька днів реконструйовані гібридні клітини майже не відрізняються від вихідних батьківських, які було використано як донори ядер.

Трансплантація ізольованих інтерфазних ядер, укладених у ліпідну оболонку, у соматичні клітини. У літературі є дані про введення молекул, у тому числі ДНК, у клітини за допомогою «тіней» еритроцитів *(Рекстейнер М., 1985)* і ліпосом *(Штраубингер Р., Папахаджопулос Д., 1985)*. Так, Сєровим О.Л. (1985) у лабораторії генетичних основ онтогенезу Інституту цитології і генетики СО АН СРСР була виконана експериментальна робота щодо включення в штучні мембрани ізольованих інтерфазних ядер з метою забезпечення збереження генетичного матеріалу від деградації та індукування процесу трансформації ізольованих ядер у реципієнтні клітини. За даними Сєрова О.Л., інтерфазні ядра, виділені з культури фібробластів норки, суспендували в багатокомпонентному буферному розчині, що включає різні концентрації KCl, NaCl, трис-HCl, ЕДТА, сахарози і спермідину.

Для створення штучної мембрани навколо ядер використовували фосфатидилетаноламін у концентрації 10–20 мг/мл і фосфатидилхолін, отриманий із жовтків курячих яєць, у концентрації 150–200 мг/мл органічного розчинника. Запропонований Сєровим О.Л. метод заснований на утворенні фосфоліпідної мембрани при проходженні ізольованих ядер через тришарову систему, що знаходиться в центрифуговій пробірці з розчином 1М сахарози, яка міститься на дні центрифугової пробірки, водним розчином 0,25 М сахарози, що формує верхній шар, і шаром органічного розчинника, що складається з хлороформу, діоксану і етилацетату в співвідношенні 0,25:0,23:0,51 і фосфатидилхоліну в концентрації 150–200 мг/мл зазначеного органічного розчинника, що займає в центрифуговій пробірці положення між верхнім і нижнім шарами сахарози.

На межі трикомпонентного органічного розчинника з верхнім сахарозним шаром молекули фосфатидилхоліну орієнтовані своїми гідрофільними кінцями убік водного шару; на межі органічного розчинника з нижнім сахарозним шаром молекули фосфоліпіду також будуть орієнтовані своїми полярними голів-

ками до водяної фази більш щільного нижнього сахарозного шару. Під час центрифугування ядра при переході з водного (0,25 М сахарози) у шар органічного розчинника на межі поділу фаз зустрічаються з полярними гідрофільними голівками молекул фосфатидилхоліну, який формує одношарову ліпідну мембрану на поверхні інтерфазних ізольованих ядер. На межі органічного шару з більш щільним шаром 1М сахарози ядра, що вже мають на своїй поверхні одношарову ліпідну мембрану, орієнтовану гідрофобними кінцями назовні, зустрічаються із шаром молекул фосфатидилхоліну, гідрофобні кінці яких спрямовані убік органічної фази і взаємодіють з гідрофобними кінцями ліпідного моношару ядер, утворюючи при цьому другий шар мембрани на поверхні інтерфазних ядер.

Сформований ліпідний бішар міцно утримується на поверхні інтерфазних ядер і не змивається при багаторазових переосадженнях шляхом центрифугування через розчин 1М сахарози. За допомогою радіоавтографії і флуоресцентної мікроскопії було показано, що ліпідний бішар рівномірно розподіляється на поверхні ядра, формуючи додаткову мембрану чи мембрани (при зазначених умовах центрифугування вільні ліпосоми в ядерну фракцію потрапити не можуть).

У результаті додаткових експериментів було показано, що штучно створена мембрана не є досконалою *(Сєров О.Л.)*. Такий висновок, зроблений на підставі виявлення виходу з ядер, оточених фосфатидилхоліновою мембраною, АТФ і проникнення в ці ядра екзогенної ДНКази. Одночасно було встановлено, що в обох випадках утворена мембрана блокувала транслокацію як макромолекул (ДНКаза), так і звичайних молекул порівняно невеликих розмірів (АТФ). Тим часом відомо, що природні ядерні мембрани проникливі навіть для полімерних молекул; штучна мембрана, створена з фосфатидилхоліну, зовсім непрониклива як для великих полярних молекул, так і для макромолекулярних структур.

У результаті проведених експериментів була висловлена думка, що фосфатидилхолін екзогенного походження формує мембранну структуру навколо ядра, у зв'язку з чим воно виявляється заключеним у ліпосому, яка, будучи додатковою мембраною, накладає певні обмеження на перенесення деяких

молекул у ядро і назад, але цілком ці процеси не припиняються. При введенні інтерфазних ядер норки, що оточені штучною мембраною, в культуру LMTK – клітин миші, які характеризуються дефіцитом ферменту тимідинкінази (ТК), установлене перенесення у реципієнтні мишачі клітини порівняно великих фрагментів ДНК із ядер норки, а більшість досліджених трансформаторів характеризувалися стабільним $ТК^+$ фенотипом.

Пропонований метод перенесення генетичного матеріалу за допомогою інтерфазних ядер, що знаходяться у ліпосомі, завдяки високій частоті трансформації в порівнянні з методом перенесення генів у складі сумарної клітинної ДНК свідчить про можливу захисну функцію ядерних білків донора, що захищають ДНК від деградації, а також про участь цих білків в інтеграції донорського хроматину і хроматину реципієнтних клітин.

Біотехнологія одержання цибридів. Цибридами називаються продукти, що утворюються при злитті цілих клітин однієї мутантної лінії з цитоплазмою енуклейованих клітин іншої клітинної лінії. Для одержання цибридів проводили енуклеацію клітин, попередньо маркірованих флуоресціюючими гранулами зеленого кольору, що додаються в поживне середовище за допомогою цитохалазину В, концентрацію якого доводили до 5 мкг/мл середовища.

Іонгкинд І. та Веркерк А. (1985) позначили фібробласти людини флуоресцентними барвниками, інкубуючи проліферуючі клітинні культури протягом 2 днів у середовищі F10 Хема, що містить у 1 мл $2–10^7$ гранул барвника, 100 мкг стрептоміцину і 100 одиниць пеніциліну, з додаванням 10 % сироватки плода корови. Під час інкубації клітини, що знаходяться у культурі, фагоцитували гранули; гранули прикріплені до зовнішньої поверхні клітинної мембрани, змивали сольовим розчином. Як показали результати проведених досліджень, маркірування флуоресціюючими гранулами сповільнює ріст клітин.

Енуклейовану суспензію клітин (цитопластів) забарвлюють також флуоресцентними бісимідазоловими барвниками фірми Hoechst; флуоресціюючі цитопласти виділяють методом сортування у потоці за допомогою клітинного сортера. Чистота фракції цитопластів досягала 99,7 %, а 90 % отриманих після сортування цитопластів мають здатність до включення ^{3}H-лейцина.

Маркіровані тим чи іншим способом цитопласти зливаються з цілими клітинами, також попередньо позначеними флуоресціюючим барвником, що відрізняється за кольором від барвника, який був використаний для позначення енуклейованих клітин (цитопластів); співвідношення цитопластів і цілих клітин при одержанні цибридів — 3:1. Як агент, індукуючий процес злиття цитопластів і цілих клітин, використовують поліетиленгліколь (ПЕГ 1000), диметилсульфоксид чи інактивований вірус Сендай. Продукти злиття (цибриди) мають двоколірну флуоресценцію. Їх виділяють за допомогою потокового клітинного сортера FACS II, оснащеного аргоновим лазером, при довжині хвилі 488 нм і постійному виході 100 мВт. Шланги сортера, через які здійснюється подача зразка, стерилізуються 70 %-ним етанолом, а несуча рідина для стерилізації пропускається через бактеріальні фільтри (Milliporе, пори 0,22 мкм). Якщо в клітинній суспензії після злиття цитопластів і цілих клітин було багато грудок, їх диспергують, пропускаючи через наконечник (діаметр 70 мкм) клітинного сортера.

Вихід фракції цибридів після проведеного сортування визначають, зливаючи контрольні цитопласти, що є носіями гіпоксантифосфорибозилтрасферазної ($ГФРТ^+$) активності, з фібробластами, отриманими від хворих на синдром Леша — Ніхана ($ГФРТ^-$). Через 20 годин після злиття клітини з двоколірною флуоресценцією (цибриди) при сортуванні зміщують на покривні скельця, інкубують 20 годин із ^3H-гіпоксантином, фіксують і досліджують радіоавтографічним методом. Включення гіпоксантину в цибридну фракцію показує, що за допомогою вірусу Сендай не менш 90 % клітин, які пройшли сортування, можна віднести до справжніх цибридів ($ГФРТ^+$).

Для визначення активності ферментів і концентрації субстратів у надто малому об'ємі матеріалу (5–10 тис. цибридів) були розроблені мікрометоди, засновані на застосуванні флуориметрії, що дозволяють виявити мікрограмові кількості речовин у незначних кількостях ліофілізованих клітин. Ультрамікрометод, заснований на проведенні мікрофлуориметрії, дає можливість вимірювати активність ферментів навіть в поодиноких клітинах. За допомогою цих методів з'явилася можливість вивчати комплементацію ферментів у цибридів чи інших клітин, а також з'ясувати роль ядра і цитоплазми в механізмі комплементації.

4.4. БІОТЕХНОЛОГІЯ ПЕРЕНЕСЕННЯ ГЕНІВ У СОМАТИЧНІ КЛІТИНИ ЗА ДОПОМОГОЮ МЕТАФАЗНИХ ХРОМОСОМ

Можливість перенесення чужорідної генетичної інформації в соматичні клітини тварин за допомогою метафазних хромосом була доведена Мак-Брайдом О.У. та Озером Х.Л. (1973). Отримані результати перенесення генів, що кодують тимідинкіназу і гіпоксантинфосфорибозилтрансферазу, у соматичні клітини за допомогою метафазних хромосом були підтверджені дослідами in vitro іншими дослідниками (рис. 4.2).

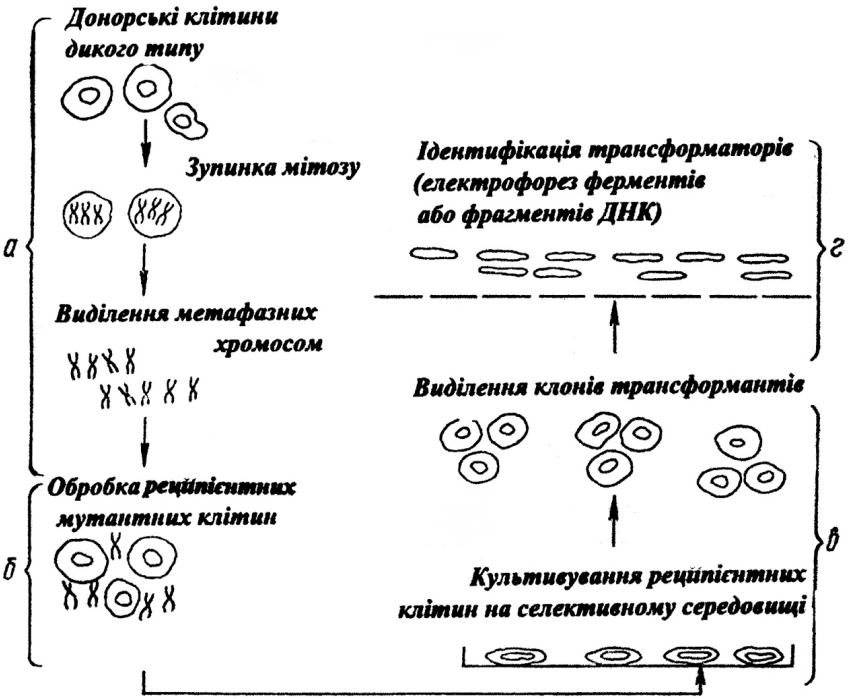


Рис. 4.2. ***Схема перенесення генів у соматичні клітини з допомогою метафазних хромосом***
(за Серовим О.Л., 1985)

З генетичного матеріалу, носіями якого є окремі ізольовані хромосоми, можливе створення «бібліотек» рекомбінантних ДНК. Цей прийом може бути використаний як для картування генів, так і для їхнього виділення. Спроможність методу ізольованих хромосом, який використовують для проведення картування, перевершує метод гібридизації соматичних клітин, але поступається за обсягом і глибиною інформації, що одержують за допомогою прийомів конструювання рекомбінантних ДНК. Ізольовані хромосоми були використані для картування гена α–глобіну людини. Отримані цим методом результати узгоджуються з раніше установленим фактом локалізації гена α-глобіну в хромосомі 16. Щоб широко використовувати метод ізольованих хромосом у вирішенні різноманітних проблем біології і пов'язаних з її досягненнями прикладних наукових напрямів (від вивчення механізмів генної регуляції до проблем медицини і галузей сільського господарства), необхідно мати достатній набір селективних середовищ. Для кожної хромосоми потрібні селектовані маркери такої специфічності і доступності, як для виділення трансформантів (трансформанти — це клітини чи клітинні клони, у яких міститься перенесений за допомогою метафазних хромосом генетичний матеріал). Чужорідний генетичний матеріал, перенесений у реципієнтні клітини, називається трансгеном. Якщо обсяг цього матеріалу такий, що його присутність у реципієнтній клітині визначається цитогенетичним шляхом, говорять про макротрансгеном. Мікротрансгеном — це та кількість перенесеного за допомогою метафазних хромосом генетичного матеріалу, що цитогенетичним шляхом установити неможливо. При цьому варто мати на увазі, що така хромосома людини, як 16, містить ген, який кодує аденінфосфорибозилтрансферазу, 17-ген, що кодує тимідинкіназу, і Х-хромосома — ген, що кодує гіпоксантинфосфорибозилтрансферазу.

Перенесення генетичного матеріалу в реципієнтні клітини є багатоступінчастим процесом. Для одержання великої кількості мітотичних клітин їх затримують у стадії мітозу (синхронізація клітин), а потім виділяють метафазні хромосоми, суспензією яких обробляють реципієнтні клітини. Наступна стадія — виділення, розмноження й аналіз трансформантів (ідентифікація ознаки донорського геному в трансформантах). Джерелом мета-

фазних хромосом (донорські клітини) найчастіше є фібробласти первинних культур чи фібробластоподібні клітини первинних ліній клітин жаби, китайського хом'ячка, миші, пацюка, людини, генотип яких відноситься до дикого типу. Еукаріотичні клітини, у яких з донорських клітин за допомогою метафазних хромосом переноситься генетичний матеріал (реципієнтні клітини), є мутантними лініями. У їхніх клітинах не реалізується гіпоксантинфосфорибозилтрансферазна, тимідинкіназна, аденозинфосфорибозилтрансферазна, аргініносукцинатсинтетазна активність. Про перенесення, що відбулося, макро- чи мікротрансгенома з донорської в реципієнтну клітину свідчить встановлення в останній раніше відсутньої ферментативної активності і здатності цих клітин рости на відповідних селективних поживних середовищах. Перенесений з донорських клітин, що є носіями таких кодуючих генами властивостей, як резистентність до високих концентрацій метатрексата, що виступає як інгібітор дегідрофолатредуктази, а також таких ознак злоякісності, як здатність рости на агаровому середовищі або при низьких концентраціях сироватки, генетичний матеріал у нормальних за цими ознаками реципієнтних клітинах обумовлює індукування властивостей, притаманних донорським клітинам. Це, з одного боку, підтверджує факт перенесення, що відбулося, а з іншого — є прийомом вивчення морфології і біохімії хромосом.

Щоб досягти успіху в перенесенні генів за допомогою метафазних хромосом, насамперед необхідно одержати в моношаровій культурі велику кількість мітотичних клітин. Для цього використовується прийом, що полягає в синхронізації клітин за допомогою введення в середовище колхіцину чи колцеміду (0,06 мкг/мл). Завдяки цьому прийому клітини затримуються на стадії мітозу і в клітинній популяції кількість їх досягає 94–97 %. Зупинені на стадії метафази клітини моношарової культури бувають слабко прикріплені до субстрату і при струшуванні легко відокремлюються від нього і спливають. Клітини ссавців культивуються в культурі при температурі 37 °С, а для вирощування курячих клітин температуру доводять до 41 °С.

Для виконання наступної операції (руйнування клітинної мембрани) метафазні клітини поміщають у гіпотонічний роз-

чин. Висока ефективність руйнування клітинних мембран і звільнення метафазних хромосом досягається при використанні гомогенізаторів типу Даунса чи шприців (5 мл) з тонкою голкою (№ 22), через яку пропускають клітинну суспензію. При виконанні цих операцій використовується нейтральний буферний розчин (pH 7), що складається з трис-HCl (0,02 моль/л), гексиленгліколю чи детергентів (тритон X-100, твін-80), а для стабілізації хромосом уводять іони Ca^{2+}; Mg^{2+}. Усі операції виконуються в стерильних умовах.

Процедура руйнування клітин контролюється фазовоконтрастним мікроскопом. Перевага надається обережному руйнуванню клітинних мембран, тому що при грубій процедурі виділення ушкоджуються не тільки клітинні мембрани, але й хромосоми, структура яких надалі не відновлюється.

Контрольованим параметром при виділенні метафазних хромосом є температурний режим. Відокремлені тим чи іншим способом синхронізовані мітотичні клітини інкубуються у свіжому середовищі при 4 °С, що приводить до інактивації трипсину, розчинення можливих залишків колцеміду і спонтанного руйнування тих мікротрубочок, що збереглися після обробки колцемідом. Це знижує здатність хромосом до агрегації і зменшує їхнє забруднення. Наступне центрифугування клітинної суспензії, видалення надосадової рідини пастерівською піпеткою і відмивання осаду нейтральним буферним розчином проводяться при 4 °С. Утворений після чергового центрифугування осад ресуспендують в охолодженому буферному розчині й інкубують 10–15 хв на водяній бані при 37 °С. Операції з руйнування клітин і звільнення метафазних хромосом здійснюються при температурі 37 °С і проводяться якнайшвидше. Для наступних етапів перенесення хромосом необхідна низька температура (4 °С). Кислі буферні системи при одержанні метафазних хромосом використовують рідше, тому що висока концентрація іонів водню в поєднанні з двовалентними катіонами сприяє агрегації залишків цитоплазми, що заважає одержанню чистих препаратів хромосом.

Щоб уникнути забруднення ізольованих метафазних хромосом інтерфазними ядрами і незруйнованими клітинами, проводять цитологічний аналіз отриманих препаратів. У препаратах

ізольованих хромосом, вільних від забруднюючих компонентів, відношення білок : ДНК дорівнює 2,2, а РНК : ДНК — менше 0,1; ізольовані метафазні хромосоми при температурі 5 °С витримують тривале зберігання без будь-яких помітних змін морфологічних властивостей, хоча молекулярна маса хромосомної ДНК неухильно зменшується, що, очевидно, є наслідком забруднення препаратів хромосом ендонуклеазами. Тому для перенесення генів, як правило, використовують метафазні хромосоми, що містять високополімерну ДНК з молекулярною масою не менше 100 млн., відразу після їхнього виділення.

Клітини-реципієнти на стадії логарифмічного росту обробляють концентрованою суспензією очищених метафазних хромосом. Відношення кількості донорських хромосом, що додаються, до кількості хромосом, що містяться в геномі реципієнтних клітин, складає 1:1. В експериментах за звичай використовується 5–10 млн реципієнтних клітин.

Частота перенесення селектованого гена-маркера ГФРТ китайського хом'яка в клітини миші складає 10^{-7}–10^{-6} у перерахунку на одну реципієнтну клітину. Для збільшення частоти перенесення генів до суспензії метафазних хромосом у нейтральному фосфатному буфері додають таку кількість хлористого кальцію, щоб його кінцева концентрація досягла 0,125–0,250 М. Відбувається спільне осадження фосфату кальцію і метафазних хромосом. При додаванні їх до моношару реципієнтних клітин підвищується ефективність перенесенню функціонального гена в 10 разів, а сполучення описаного методу з наступною інкубацією моношару реципієнтних клітин у середовищі з 7–10 % кінцевою концентрацією диметилсульфоксиду підвищує ефективність перенесення генів у 100 разів. Використання інактивованого вірусу Сендай при інкубуванні реципієнтних клітин, що знаходяться на стадії метафази, із суспензією донорських хромосом, підвищує ефективність перенесення приблизно в 10 разів, а укладення ізольованих метафазних хромосом у штучну ліпідну мембрану дозволяє довести ефективність перенесення до 10^{-5} з розрахунку на одну реципієнтну клітину.

Як уже було зазначено, реалізація потенційних можливостей методу перенесення метафазних хромосом у реципієнтні клітини значною мірою гальмується через труднощі, що вини-

кають при їхній ідентифікації. В останні роки запропоновані методи, що дозволили значно підвищити об'єктивність ідентифікації хромосом. Серед цих методів варто назвати послідовне диференціальне фарбування хромосом за Гімза й акрихіном на G/Q-смуги; поділ ізольованих метафазних хромосом на групи за їх розмірами при центрифугуванні в градієнті сахарози. Для масового виділення однотипних хромосом пропонується використання методу фракціонування в градієнті щільності з наступним сортуванням отриманої фракції методом проточної цитометрії. Отриманий таким шляхом хромосомний матеріал призначений для подальшого використання в біологічних експериментах. Фракція, збагачена після центрифугування в градієнті сахарози однотипними хромосомами, потім сортується методом проточної цитометрії, що значно підвищує ефективність цього прийому сортування.

У каріотипі більшість хромосом незначно розрізняються за кількістю ДНК, а використовувані для проточного цитометричного сортування стандартні прилади не можуть ідентифікувати хромосоми, що розрізняються за вмістом ДНК менш ніж на 3–5 %. У зв'язку з цим можна виділити не індивідуальні хромосоми, а їхні основні групи. Так, каріотип людини цим шляхом розділяється на хромосомні групи A, B, C, D, E, F, і G. Збільшення можливості методу проточної цитометрії до 1 % рівня розходжень, що виявляються у хромосомах у вмісті ДНК, дозволяє при аналізі 24 хромосом людини одержати вже не 7, а 18 окремих піків.

Донорські хромосоми проникають у реципієнтні клітини завдяки фагоцитозу. Є дані, які свідчать про те, що метафазні хромосоми потрапляють у ядро реципієнтних клітин у недеградованому стані і що ці хромосоми в геномі реципієнтної клітини можуть зберігатися тривалий час і мають здатність до автономної реплікації. Однак у лізосомах цитоплазми реципієнтних клітин значна частина донорського хромосомного матеріалу деградує на стадії проникнення.

Результати біохімічного і цитогенетичного аналізів трансформантів дозволяють говорити про два види трансформованого фенотипу. У випадку стабільного фенотипу перенесена ознака при рості трансформантів на неселективному середовищі

зберігається протягом декількох тижнів чи місяців; нестабільний фенотип при вирощуванні трансформованих клітин на неселективному середовищі втрачається. В останньому випадку незважаючи на те, що перенесений у рецепієнтну клітину генетичний матеріал метафазних хромосом знаходиться у ядрі і експресується, фізичний зв'язок його з ядром відсутній. Крім того, нестабільний фенотип у популяції трансформованих клітин губиться зі швидкістю 0,1–10 % і більше за клітинний поділ, що також свідчить про незавершеність процесу трансформації.

При більш-менш тривалому культивуванні клітини з нестабільним трансформованим фенотипом поступово переходять у стабільні трансформанти. Дані про можливість переходу сформованого стабільного фенотипу в нестабільний у літературі не наводяться. Що стосується процесу формування стабільного трансформованого фенотипу, то є підстави говорити про включення донорського генетичного матеріалу в хромосоми реципієнтних клітин з одночасним зменшенням обсягу перенесеного в реципієнтні клітини генетичного матеріалу (обсяг цього матеріалу коливається від 1 % (макротрансгеном) до 0,07–0,8 % (мікротрансгеном) і залежить від багатьох факторів).

Один із провідних спеціалістів щодо перенесення генів за допомогою метафазних хромосом Сєров О.Л. (1985) вважає, що вивчення таких питань, як механізм включення донорського генетичного матеріалу в геном реципієнтної клітини і механізм клітинної компетенції до трансформації, дозволить за допомогою спрямованого введення генетичного матеріалу здійснювати значні зміни фенотипу реципієнтних клітин.

4.5. БІОТЕХНОЛОГІЯ ПЕРЕНЕСЕННЯ ГЕНІВ У ЕУКАРІОТИЧНІ КЛІТИНИ ЗА ДОПОМОГОЮ ДНК (ДНК-ТЕХНОЛОГІЯ)

Для перенесення генів у соматичні клітини використовують як тотальну ДНК, отриману шляхом очищення препаратів ДНК зі сперми лосося, або ДНК з клітинних ліній найчастіше миші, китайського хом'ячка і людини, так і клоновані гени. При трансформації соматичних клітин, що ростуть у культурі, і му-

тантних ліній, створених на основі клітинних культур, препаратами сумарної ДНК і клонованими генами в більшості випадків як донорські маркерні гени використовуються ТК, HPRT, APRT і DFR, що кодують відповідно ферменти ТК (тимідинкінази), ГФРТ (гіпоксантинфосфорибозилтрансферазу), АФРТ (аденінфосфорибозилтрансферазу) і ДФР (дегідрофолатредуктазу). Таким чином, для трансформації клітин ссавців у культурі необхідне джерело донорської ДНК, середовище з придатним буфером і маркіровані реципієнтні клітини і (чи) придатне селективне середовище для рідких трансформантів.

При обробці клітинної культури препаратами екзогенної ДНК трансформується приблизно одна з мільйона чи одна з 100 мільйонів (10^{-6}–10^{-8}) реципієнтних клітин. Одночасно варто нагадати, що частота трансформації соматичних реципієнтних клітин при використанні як вектора метафазних хромосом була, як правило, на один-два порядки вищою. Вирішальне значення для досягнення високої частоти трансформації соматичних клітин екзогенної ДНК мають джерело високомолекулярної ДНК-носія, належним чином забуферене середовище і стан свіжовисіяних реципієнтних клітин.

В експериментах з трансформації як донорську зазвичай використовують отриману із соматичних клітин ДНК, розміри якої перевищують 100 kb, а оптимальною вважається концентрація 500 мкг/мл.

Для підвищення ефективності трансформації Сєров О.Л. (1985) пропонує обробляти DEAE-декстраном препарати очищеної вірусної ДНК, що підвищує стійкість останньої до температурної денатурації, гідролітичної дії ДНКази, що міститься в реципієнтній клітині. Це в остаточному підсумку обумовлює підвищення ефективності трансформації. В останні роки сторазового підвищення ефективності трансформації удалося досягти за рахунок обробки культури соматичних реципієнтних клітин ДНК-кальцій-фосфатним комплексом (преципітатом). Успіх трансформації залежить від реакції середовища, при якій відбувається осадження екзогенної ДНК-кальцій-фосфатним преципітатом, від концентрації ДНК, узятої для утворення комплексу, від обробки реципієнтних клітин диметилсульфоксидом, тривалості інкубації в культурі соматичних реципієнтних клітин з

кальцій-фосфатним преципітатом ДНК. Деякі з перерахованих параметрів не мають універсального трансформуючого ефекту, а збільшують число трансформованих реципієнтних клітин тільки стосовно конкретних клітинних ліній.

Схеми добору для рецесивних і домінантних генів різні. ДНК-кальцій-фосфатний преципітат проникає в реципієнтну клітину в результаті адсорбції комплексу на поверхні клітинної мембрани і активного фагоцитозу, що відбувається в перші години інкубації кальцій-фосфатного преципітату ДНК реципієнтними клітинами. При цьому встановлено, що адсорбція та фагоцитоз є енергозалежними процесами і при інгібуванні клітинного дихання вони пригнічуються. На першу годину інкубації кальцій-фосфатний преципітат ДНК виявляється на цитоплазматичній мембрані, потім у вакуолях цитоплазми, а через 8 год після початку інкубації невелика частина екзогенної донорської ДНК досягає ядра реципієнтних клітин, що знаходяться у культурі. На всіх етапах проникнення в клітину екзогенна ДНК залишається зв'язаною з кальцій-фосфатним преципітатом, а розміри і структура донорської ДНК у клітині-реципієнті зберігаються протягом 24 год з моменту початку інкубації.

Перенесення генів у складі сумарної ДНК у реципієнтні соматичні клітини можливе за допомогою таких переносників, як ліпосоми (фосфоліпідні пухирці) чи тіні еритроцитів, у які попередньо поміщають тим чи іншим способом виділений препарат нуклеїнової кислоти. Цим способом можна одержати більшу кількість трансформованих соматичних клітин, ніж при перенесенні ДНК іншими методами. Крім того, трансформація реципієнтних клітин препаратами сумарної ДНК, попередньо укладеної в ліпосоми, відрізняється порівняною простотою.

Ліпосоми мають слабку токсичність, вони здатні захищати нуклеїнові кислоти, що знаходяться всередині й інші макромолекули від деградації. Немає істотних обмежень на виготовлення ліпосом таких розмірів, що дозволили б укласти в них біополімери з молекулярною масою, що коливається в широких межах (від очищених генів до хромосом). Для забезпечення вибіркової спорідненості до певних реципієнтних клітин і збільшення здатності приєднувати до мембран певних клітинних популяцій поверхні ліпосом можна модифікувати за допомогою гліколіпідів, лекти-

нів або ковалентно зв'язаних антитіл. Висловлюється думка, що використання ліпосом для введення ДНК підвищує ефективність трансформації соматичних клітин і дозволяє проводити дослідження з трансформацією тих клітин, для яких інші способи перенесення ДНК неприйнятні.

З відомих методів виготовлення ліпосом найбільш придатним для перенесення сумарної ДНК у реципієнтні соматичні клітини є метод випарювання з оберненням фаз, коли в ліпосоми може включатися ДНК масою 10^8 дальтон. З метою підвищення ефективності перенесення ДНК ліпосомами в соматичні клітини використовують диметилсульфоксид, етиленгліколь, гліцерол, поліетиленгліколь. Остання з названих речовин підвищує здатність ДНК, що знаходиться в ліпосомах, трансформувати реципієнтні клітини в 10 разів, однак ще більш ефективними є помірні концентрації гліцеролу, у якому витримуються клітини після їхнього контакту з ліпосомами. Є дані про те, що екзогенна ДНК вірусу SV40, поміщена в негативно заряджені ліпосоми, виявляється на три порядки інфекційнішою, ніж у випадку її включення в нейтральні ліпосоми. Що стосується динаміки процесу, то найбільш ефективна трансформація соматичних клітин ДНК, укладеної в ліпосоми, відбувається в перші 30 хв інкубації. Є також приклади, що свідчать про високу ефективність трансформації рослинних протопластів препаратами очищеної ДНК Ті-плазміди, укладеної в ліпосоми.

В останні роки успішно розробляється питання про компетенцію до трансформації препаратами екзогенної ДНК реципієнтних соматичних клітин, що знаходяться у культурі. Переконливі приклади свідчать, з одного боку, про генетичну природу високої компетенції клітин до трансформації, з іншого — показують, що ефективність перенесення екзогенної ДНК залежить від фізіологічного стану реципієнтних клітин, їхньої тканинної природи і диференціації.

Перенесення клонованих і очищених генів у соматичні клітини. При вивченні процесу трансформації соматичних і статевих клітин Сєров О.Л. найчастіше використовував клонований ген ТК вірусу герпеса (Herpes simplex), для чого обробляв геномну ДНК вірусу рестрикційними ендонуклеазами HpaI і BamHI. Отримані в результаті ферментативного

гідролізу фрагменти ДНК, які містять 8,3 тис. і 3,4 тис. пар нуклеотидних послідовностей, включають ген ТК; іРНК, що утворюється при транскрипції інтактного гена ТК вірусу герпеса, являє собою послідовність, що складається майже з 1,3 тис. залишків нуклеотидів. Крім того, було встановлено, що при біосинтезі ферменту тимідинкінази 107-нуклеотидна ділянка, починаючи від 5^1-кінця, іРНК не транслюється. Фрагменти геномної ДНК вірусу герпеса, що включають ген ТК, клонують, використовуючи як вектор плазміди і фаги.

Трансформацію соматичних і статевих клітин геном ТК здійснюють за допомогою рекомбінантних ДНК, сконструйованих шляхом вбудовування фрагментів ДНК вірусу герпеса, що містять ген, який кодує тимідинкіназу. Щоб збільшити ефективність трансформації, соматичні чи статеві клітини обробляють очищеними чи клонованими генами шляхом осадження донорської ДНК кальцій-фосфатним методом. У цьому випадку вдається домогтися введення очищеного або клонованого гена в одну з кожних 10^5–10^7 оброблених реципієнтних клітин.

Більш ефективним у порівнянні з описаним методом перенесення генів є введення мікроголкою ДНК, що знаходиться в розчині, у ядра реципієнтних клітин. У цьому випадку трансформується 50–100 % оброблених клітин. Така ж частота трансформації досягається й у тому випадку, коли ядро тільки проколюється мікроголкою. ДНК, що представляє очищений чи клонований ген, у цьому випадку не вводиться безпосередньо в ядро, а використовується для обробки клітин ссавців, що знаходяться в культурі. З інших методів, за допомогою яких переносяться клоновані чи очищені гени в соматичні реципієнтні клітини ссавців, варто вказати на можливість обробки реципієнтних клітин включеними в ліпосоми препаратами ДНК чи високими концентраціями поліетиленгліколю; в останньому випадку вдається домогтися частоти трансформації, порівняної з показником, досягнутим при застосуванні методу мікроін'єкції розчину ДНК у ядро реципієнтної клітини.

Варто також звернути увагу на метод котрансформації, який набуває широкого розповсюдження при введенні в реципієнтні клітини чужорідних неселектованих генів чи фрагментів ДНК. Розробляється також спосіб трансформації реципієнтних

клітин за допомогою електричного розряду в полі високої напруги.

Якщо при трансформації як донорський використовується очищений або клонований ген, що кодує тимідинкіназу, то реципієнтними є мутантні клітини, які знаходяться в культурі, у геномі котрих відсутній ген ТК, а для поділу трансформованих і нетрансформованих клітин використовують селективне середовище ГАТ (рис. 4.3). Трансформовані геном ТК реципієнтні клітини здатні рости на середовищі ГАТ, нетрансформовані — гинуть. Істотний вплив на частоту перенесення клонованого гена ТК вірусу герпеса в еукаріотичні реципієнтні клітини робить наявність чи відсутність ДНК-носія. Трансформація клонованим геном ТК вірусу герпеса реципієнтних клітин китайського хом'ячка без ДНК-носія виявилася більш ніж у 200 разів нижчою порівняно з дослідами, у яких клонований ген ТК вірусу герпеса в реципієнтні клітини переносили за участю ДНК-носія. Роль ДНК-носія, на думку дослідників, полягає в захисті

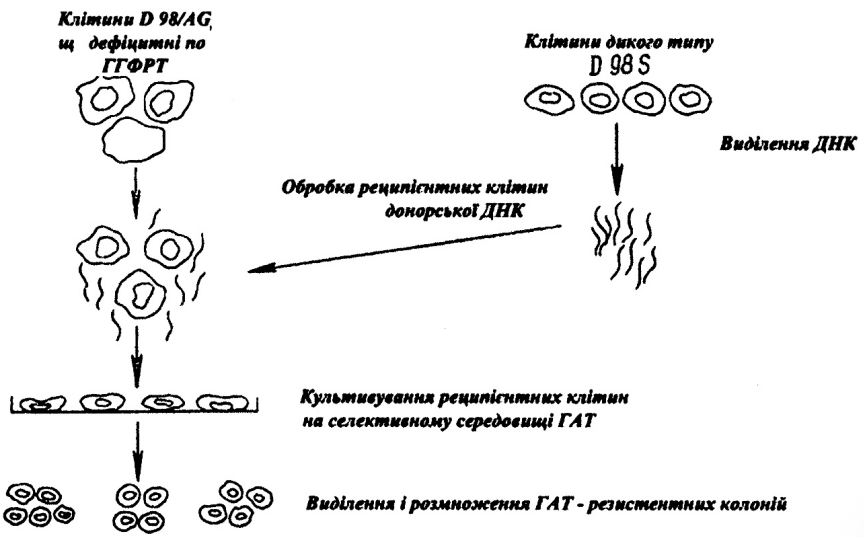


Рис.4.3. ***Схема експериментів по трансформації соматичних клітин з допомогою ДНК***
(за Шибальською Є. та Шибальським В., 1982)

клонованого чи очищеного гена, що переноситься, від деградуючого впливу гідролітичних ферментів реципієнтних клітин. Успіх введення очищених чи клонованих генів у соматичні клітини за допомогою кальцій-фосфатного методу значною мірою залежить від концентрації донорської ДНК. Хоча чимало механізмів участі ДНК-носія в забезпеченні успіху трансформації реципієнтних клітин очищеним чи клонованим генетичним матеріалом, а також роль ДНК-носія у формуванні трансгенома залишаються нез'ясованими, факт зміни структури очищених чи клонованих генів, введених у реципієнтні клітини в присутності ДНК-носія, вважається установленим. Установленим, мабуть, варто вважати також те, що структурні зміни екзогенного клонованого генетичного матеріалу при формуванні трансгенома спостерігаються лише в тому випадку, якщо одночасно в реципієнтну клітину надходить ДНК-носій. Роль останньої полягає в тому, що структурні зміни, яким піддаються селектовані гени від подальшої деградації захищаються ДНК-носієм шляхом включення селектованого генетичного матеріалу в структуру ДНК-носія і створення трансгенома, що має нові властивості. За відсутності ДНК-носія селектовані гени, в яких під впливом в основному ферментативної дії клітин-реципієнтів відбулися структурні зміни, елімінують, а в реципієнтній клітині залишаються введені інтактні очищені чи клоновані гени.

У зв'язку з цим у трансформованих клітинах одночасно можуть знаходитися інтактні молекули екзогенної ДНК і молекули ДНК, в яких відбулися структурні зміни. Трансформовані за допомогою сумарної ДНК реципієнтні клітини характеризуються фенотипом, що може мати стабільний чи нестабільний прояв. Є дані, які свідчать про те, що стабілізація трансформованого фенотипу є наслідком ампліфікації донорського гена чи включення цього гена в геном реципієнтної клітини, хоча поряд з цим є можливість функціонування механізмів, що перешкоджають включенню екзогенної ДНК у геном клітини-реципієнта.

Появу стабільних трансформантів спостерігали при інтеграції донорського генетичного матеріалу, у тому числі ДНК клонованих генів, у хромосоми реципієнтних клітин, що приводило до дестабілізації останніх і виникнення у зв'язку з цим великої кількості хромосомних перебудов. В утворених у резуль-

таті інтеграції донорських генів, введених у геномний матеріал реципієнтних клітин як за допомогою тотальної ДНК, так і очищених чи клонованих генів, у стабільних трансформантах через їхню нестійкість настає процес дестабілізації. Цей процес не завжди є наслідком втрати інтегрованого донорського гена, іноді змінюється експресія донорського гена, у зв'язку з чим трансформований фенотип не реалізується.

Взаємозв'язок між станом трансгеному (стабільне — нестабільне), частотою інтеграції донорського генетичного матеріалу в геном реципієнтної клітини і частотою порушення стабільності трансгеному в стабільних трансформантах, з одного боку, та ступенем диференціації і станом каріотипу реципієнтних клітини — з іншого, прослідковується досить чітко. Так, лінії реципієнтних клітин, що мають змінені гетероплоїдні каріотипи (фібробластоподібні клітини), здатні зберігати у своїх геномах донорський генетичний матеріал, що автономно реплікується, з нестабільним трансформованим фенотипом і дестабілізувати трансформований фенотип у стабільних клонах. Навпаки, у реципієнтних клітинах із близьким до нормального чи нормальним каріотипом (статеві клітини) немає умов, що сприяють перебуванню трансгеному в нестабільному автономному стані. Тому при трансформації реципієнтних статевих клітин екзогенною ДНК спостерігається велика кількість стабільних трансформантів.

4.6. ВВЕДЕННЯ ГЕНІВ. БІОТЕХНОЛОГІЯ ТРАНСФОРМАЦІЇ СТАТЕВИХ ЕМБРІОНАЛЬНИХ КЛІТИН ЧУЖОРІДНИМИ ГЕНАМИ

Успіхи молекулярної біології, генетичної і клітинної інженерії дозволили вже сьогодні вирішувати питання спрямованої трансформації еукаріотичних організмів, у тому числі ссавців. Стратегічна мета спрямованої трансформації: конструювання геномів вищих організмів (рослин і тварин). Одним із прийомів генетичної і клітинної інженерії є введення генів у статеві клітини. Внаслідок трансформації статевих клітин відбуваються фенотипічні зміни трансформанта на рівні усього організму, а

також передача генетичної інформації, що набула зміни, від батьків до нащадків.

Сєров О.Л. наводить дані про виявлення донорського генетичного матеріалу в організмі, що розвився з трансформованих статевих клітин, поводження трансгеному і насамперед експресію донорського гена в ході розвитку реципієнтної клітини (статевої), зміни фенотипу, у тому числі і на рівні цілого організму, що обумовлено присутністю в геномі реципієнта трансформанта (донорського генетичного матеріалу).

Гордон Д.В. зі співробітниками (1980) вперше успішно трансформували запліднену яйцеклітину миші клонованим геном ТК вірусу герпеса.

Для введення донорського генетичного матеріалу використовували реципієнтні яйцеклітини протягом 12–14 год на початку запліднення. Яйцеклітини, що знаходяться в цей час на стадії двох пронуклеусів, вилучали з яйцеводів вимиванням. За донорський матеріал слугували рекомбінантні ДНК, сконструйовані на основі плазмід (pST6, pST12, pST9 і ін.), до складу яких входив ген ТК вірусу герпеса, що кодує тимідинкіназу і ту ділянку вірусу SV40, який містить нуклеотидні послідовності, що несуть на синтезованій іРНК сигнали початку реплікації, і нуклеотидні послідовності, що є промотором ранніх білків.

Наступний етап трансформації — введення в пронуклеус заплідненої реципієнтної яйцеклітини за допомогою мікроголки і мікроманіпулятора 1 мкл розчину рекомбінантної ДНК. Як вказує Сєров О.Л., з оброблених у такий спосіб яйцеклітин тільки 6–10 % здатні до подальшого розвитку, а з цієї кількості приблизно половина досягає зрілого віку. Аналіз рестрикційного спектра ДНК народжених із трансформованих яйцеклітин мишенят дозволив зробити висновок про те, що плазміди можуть виконувати векторну функцію при введенні клонованих генів у статеві клітини, а з трансформованих яйцеклітин развиваються особини, що протягом внутрішньоутробного і постнатального онтогенезу зберігають донорський генетичний матеріал.

Пізніше була показана можливість трансформації запліднених яйцеклітин за допомогою мікроін'єкцій клонованих генів β-глобіну людини і вірусу герпеса, що кодує тимідинкіназу (ТК). У цьому випадку експериментатори вводили в запліднену

яйцеклітину близько 2,5 тис. копій плазмід PtkHβl, до складу рекомбінантної молекули ДНК якої входив фрагмент із 7,9 тис. нуклеотидних пар, що кодує β-глобін людини (ген β–глобіну людини), і фрагмент ДНК, який містить нуклеотидну послідовність з 3,6 тис. пар нуклеотидів, що кодує ТК вірусу герпеса.

В отриманих із запліднених трансформованих яйцеклітин ген β-глобіну людини знаходився в кількості 3–50 копій, а ген, що кодує тимідинкіназу вірусу герпеса — у кількості 3–20 копій. Крім того, виявлення донорського генетичного матеріалу (ген ТК вірусу герпеса) у складі фракції високомолекулярної ДНК, виділеної з клітин реципієнтного організму, дає підстави вважати, що донорський генетичний матеріал був інтегрований у геном реципієнта. У дослідних мишей, одержаних із ін'єкційованих чужорідним генетичним матеріалом (плазміда PtkHβl, гени ТК вірусу герпеса і ген β-глобіну людини) запліднених яйцеклітин, чітко виявлявся також ген β-глобіну людини.

У ході цих експериментів був установлений факт передачі донорського генетичного матеріалу, знайденого в клітинах селезінки мишей, що розвинулися з трансформованих чужорідних ДНК яйцеклітин, в організм потомства, отриманого при спарюванні трансформантів з нормальними мишами. Дуже важливим моментом варто вважати виявлення функціональної активності чужорідних генів, які знаходяться в організмі трансформантів, що виявляється насамперед експресією цих генів.

Прямий шлях уведення клонованих генів у ембріони, що знаходяться на ранніх стадіях розвитку, без використання вірусних чи плазмідних векторів дав позитивні результати. Донорські гени у функціонально активному стані (вони експресувались) були виявлені в соматичних клітинах, отриманих із запліднених яйцеклітин після їхньої трансформації фрагментом ДНК, що кодує ген кролячого β-глобіну. При трансформації запліднених яйцеклітин або ембріонів на ранніх стадіях розвитку чужорідним генетичним матеріалом у складі плазмідних векторів чи без них, далеко не всі клітини рослинного чи тваринного організму-трансформанту, що розвинулись із трансформованої запліднені яйцеклітини чи ембріона, містять чужорідний ген.

Існує така імовірність, що чужорідний ген виявиться не тільки в соматичних, але й у деяких статевих клітинах організму чи особин, що розвинулися з трансформованої запліднені яйцеклітини або трансформованого на ранній стадії розвитку ембріона. Присутність фрагментів чужорідної ДНК, що представляє нуклеотидну послідовність того чи іншого гена, у статевих клітинах часто призводить до того, що деяка частина потомства, отриманого від певної особи, успадкує разом з іншими генами батьків внесений чужорідний гетерологічний ген. У такому випадку цей ген уже буде присутній у всіх клітинах, у тому числі й у статевих, а отже, передаватиметься наступним поколінням і у випадку прояву його функціональної активності обумовлюватиме фенотипічні зміни організму. Аналіз результатів досліджень дозволив Сєрову О.Л. зробити висновок про те, що найбільш вузьким місцем при трансформації статевих клітин є експресія гетерологічних генів у трансформантів. У зв'язку з цим пропонується конструювання таких векторів рекомбінантних ДНК, до складу яких, крім клонованих чужорідних генів, входили б нуклеотидні послідовності, що здійснюють регуляцію генної активності. Для досягнення цієї мети проводяться дослідження з включенням в рекомбінантні ДНК, поряд з чужорідними клонованими генами, промоторних ділянок вірусів, які адаптовані до життєдіяльності в клітинах еукаріотичних організмів і мають тісний структурний взаємозв'язок з їх геномами. При конструюванні здатного до експресії реплікону в складі вектора пропонується використовувати промоторні й інші регуляторні послідовності ДНК вищих організмів.

На підтвердження наводиться приклад створення рекомбінантної кільцевої молекули, сконструйованої з використанням генетичного матеріалу плазмід і фагів, у якій успішна експресія клонованого гена в трансформантах досягалася за рахунок убудовування по ходу транскрипції перед клонованим геном нуклеотидної послідовності вірусу SV40, що містить сигнал початку реплікації і промоторні нуклеотидні послідовності ранніх чи пізніх білків. Пропонується як промотори чужорідних клонованих донорських генів використовувати кінцеві послідовності ДНК вірусів. Є позитивні приклади експресії чужорідних генів (ген ТК вірусу герпеса), промоторна ділянка яких є

промотором гена МТ1 миші (ген МТ1 кодує білкові речовини металотіонеїну, синтез якого індукується ртуттю, кадмієм і іншими важкими металами). У клітинах печінки і нирках мишачого потомства, що розвинулося із запліднених яйцеклітин, трансформованих рекомбінантними ДНК, до складу яких входили плазміди рМК і ген ТК вірусу герпеса, з яким по ходу транскрипції з'єднаний промотор гена МТ1 миші, виявляли високу активність ферменту тимідинкінази вірусу герпеса. Цей факт свідчить про експресію гена ТК вірусу герпеса за участю промотора гена МТ1 миші, тобто промотора еукаріотичного гена. Експресія прокаріотичного гена ТК вірусу була встановлена не тільки в потомства, що народилося з трансформованої заплідненої яйцеклітини, але й в окремих особин з потомства, отриманого при спарюванні трансформованих мишей з інтактними тваринами. При цьому функціональний стан клонованого гена, що кодує тимідинкіназу вірусу герпеса, ін'єкційованого в запліднену яйцеклітину миші у вигляді рекомбінантної ДНК, сконструйованої на основі плазміди рМК, і промоторної ділянки еукаріотичного гена МТ1 миші, визначається регуляторною ділянкою промотора гена МТ1 миші: солі кадмію стимулюють експресію гена ТК вірусу герпеса, а метилування промоторної ділянки (гена МТ1 миші), навпаки, гальмує цей процес.

Зусиллями *(Палмитер Р.Д. та ін., 1982, 1983, Дибан А.П., Городецький С.І., 1983)* були сконструйовані рекомбінантні ДНК, що складаються з клонованих генів гормона росту пацюка і людини, промоторної ділянки гена МТ1 миші та плазмідного вектора. Введені в реципієнтні запліднені яйцеклітини шляхом мікроін'єкцій у пронуклеус рекомбінантні ДНК проявляли свою фізіологічну активність як у мишей-трансформантів, так і їхніх нащадків.

Клонований донорський ген гормона росту пацюка і людини експресувався у печінковій тканині трансформантів, що означало підвищення вмісту гормону росту в сироватці крові, а також по фізіологічній дії додаткових генів соматотропного гормону, які передаються спадково, що проявлялося прискореним ростом трансформованих мишей і перевищенням середньої маси тіла тварин у 1,8 раза. Це дуже важливо для тваринництва.

Контрольні питання

1. Що таке клітинна інженерія?
2. Які проблеми вирішуються за допомогою клітинної інженерії?
3. Яка основна властивість еукаріотичних клітинних культур?
4. Назвіть нині існуючі гіпотези старіння і загибелі клітин.
5. Які параметри умов культивування впливають на функціональний стан клітин у культурі?
6. На яких типах поживних середовищ вирощуються клітини?
7. Назвіть основні складові поживного середовища.
8. Додаванням яких речовин до поживного середовища можна підвищити здатність клітин до поділу?
9. Як називаються речовини, що підвищують здатність клітин до поділу?
10. Що таке контактне гальмування (топоінгібування)?
11. За участю яких факторів здійснюється регуляція росту клітин у культурі?
12. Якими методами можна отримати клітинну масу для культивування?
13. Які ферменти використовуються для руйнування клітинної стінки?
14. Що таке гібридизація соматичних клітин?
15. Які клітини називаються гібридними?
16. Де застосовується метод соматичної гібридизації?
17. Які властивості має гібридома?
18. Хто є основоположниками гібридомної технології?
19. Назвіть основні чинники, що збільшують або, навпаки, блокують процес злиття клітин.
20. Які методи добору гібридних клітин ви знаєте?
21. Що таке цитопласти?
22. Що означає термін каріопласти?
23. Що таке енуклеація?

24. Які методи енуклеації застосовуються для одержання каріопластів?
25. Назвіть властивості цитопластів і каріопластів.
26. Як проводиться трансплантація ядер?
27. Як відбувається процес реконструювання клітин?
28. Від чого залежить ефективність реконструювання клітин?
29. Назвіть етапи введення ізольованих інтерфазових ядер, укладених у ліпідну оболонку, у соматичні клітини.
30. Що таке цибриди?
31. Назвіть основні технологічні прийоми отримання цибридів.
32. Суть та потенційні можливості методу перенесення екзогенного генетичного матеріалу в реципієнтну клітину за допомогою метафазних хромосом.
33. Що таке «бібліотеки» рекомбінантних ДНК та сфера застосування цього прийому?
34. Що таке макротрансгеном?
35. Що означає мікротрансгеном?
36. Назвіть чинники, які впливають на процес проникнення донорських хромосом у реципієнтні клітини.
37. Стадії перенесення генетичного матеріалу в реципієнтні клітини.
38. За допомогою яких критеріїв здійснюється контроль перенесення генетичного матеріалу з донорської клітини за участю метафазних хромосом?
39. Яка ДНК використовується для перенесення генів у соматичні клітини?
40. Наявність яких основних чинників необхідна для трансформації клітин ссавців у культурі?
41. Як досягається підвищення ефективності трансформації?
42. Які існують схеми добору для рецесивних і домінантних генів?
43. Які переносники використовуються для трансплантації генів у складі сумарної ДНК у реципієнтні соматичні клітини?
44. Назвіть методи перенесення клонованих генів у соматичні клітини.

45. Що таке спрямована трансформація?
46. З якою метою проводиться спрямована трансформація еукаріотичних організмів, в тому числі ссавців, шляхом введення генів у статеві клітини?
47. Коли вперше була успішно проведена трансформація яйцеклітини?
48. Які клітинні елементи було використано як донорський матеріал при трансформації яйцеклітини?
49. Що є вектором при введенні клонованих генів у статеві клітини?
50. Назвіть етапи трансформації.
51. Яке середовище використовується для розділення трансформованих і нетрансформованих клітин?
52. Які наслідки трансформації?
53. Наукове значення трансформації.
54. Прикладне значення трансформації.

Розділ 5.

ОСНОВИ ГЕНЕТИЧНОЇ ІНЖЕНЕРІЇ

5.1. БІОТЕХНОЛОГІЯ КОНСТРУЮВАННЯ РЕКОМБІНАНТНИХ ДНК

Найбільших успіхів біологічна наука досягла за останні сорок років, коли дослідники знайшли шляхи проникнення усередину живої клітини з метою вивчення біологічних процесів на рівні молекулярних взаємодій. Стало очевидним, що в кінцевому підсумку механізми, які в основі багатьох біологічних явищ визначаються функціонуванням спеціальних молекул усередині і поза клітиною, а розкриття молекулярних механізмів біологічних процесів та вивчення молекулярних взаємодій складає предмет молекулярної біології.

Молекулярні біологи за досить короткий термін опанували прийоми, що дозволяють маніпулювати біологічними молекулами, досліджувати їх і вносити зміни в первинну структуру. Вивчення життя як кінцевого продукту еволюції перестало бути вищою метою біологічних досліджень. Завдяки новій технології, новим підходам з'явилася можливість за рахунок внесення змін у головні біологічні молекули створювати варіанти живих систем, що не могли з'явитися шляхом природної еволюції.

Успішний розвиток молекулярної біології сприяв виникненню генетичної інженерії, що є біотехнологічним прийомом спрямованого конструювання рекомбінантних молекул ДНК на основі ДНК, узятих з різних джерел (*Алиханян С.И., 1980; Овчинников Ю.А., 1982)*. Біотехнологія — це використання біологічних процесів і агентів для промислових цілей *(Овчинников Ю.А., 1982)*.

Становленню технології одержання рекомбінантних молекул ДНК і клонування генів передувало створення методів молекулярної біології, за допомогою яких молекулу ДНК уда-

ється розрізати на фрагменти, модифікувати, знову реконструювати в одне ціле, розмножити макромолекулу й одержати велику кількість її копій. Використовуючи рекомбінантну молекулу ДНК, можна синтезувати молекули РНК, а потім одержати білок необхідного розміру, будови і властивостей. Одержання білка — одна з головних цілей біотехнології.

Точно вказати, де закінчується молекулярна біологія і починається генетична інженерія, а також, які методичні прийоми притаманні тільки генетичній інженерії чи біотехнології, неможливо.

5.1.1. Одержання фрагментів ДНК

Вивчення загальних біохімічних властивостей клітинної ДНК хоча й давало певну інформацію, однак установити деталі її генетичної організації було неможливо. У середині 70-х років XX ст. були широко поширені два методи, використання яких істотно спростило аналіз ДНК. В основі одного з цих методів лежить відкриття гідролітичних ферментів — рестрикційних ендонуклеаз (рестриктаз), що викликають розщеплення ДНК на фрагменти в місцях, які мають специфічні нуклеотидні послідовності, що є у молекулі ДНК.

Для вирішення питань молекулярної біології рестриктази одержують з бактеріальних клітин. Так, фермент рестрикційна ендонуклеаза EcoRI розщеплює ДНК тільки в тих місцях, де є GAATTC-нуклеотидна послідовність; рестриктаза SmaI гідролізує ДНК у місцях CCCGGG-послідовності нуклеотидів, а місцем ферментативної дії BamHI є GGATTC-сполучення нуклеотидів. Другі рестриктази гідролізують інші нуклеотидні послідовності. Послідовності, які пізнаються і гідролізуються цими й іншими рестрикційними ендонуклеазами, ймовірно зустрічаються уздовж дволанцюгової структури ДНК. Ферменти рестрикції дозволяють перетворити макромолекулу ДНК у набір фрагментів, що включають від декількох сотень до декількох тисяч пар азотистих основ. Фрагменти, що розрізняються між собою за молекулярною масою, можна одержати в ізольованому вигляді за допомогою електрофорезу в гелі, а потім провести аналітичне дослідження кожного з виділених фрагментів.

Другим методичним прийомом є порівняно швидке визначення нуклеотидної послідовності утворених під впливом рестриктаз фрагментів ДНК і макромолекули в цілому. Однак у цьому випадку виникають певні труднощі через те, що кількість пар азотистих основ, які складають нуклеотидну послідовність ДНК, навіть у бактеріальній клітині завелика. Що стосується геному ссавців, який має набагато більший розмір, то він складається приблизно з 2,5 млрд. пар азотистих основ; останні, у свою чергу, формують окремі інформаційні блоки-гени. Кількість їх у геномі ссавців досягає 50–100 тис.

Є дані, що кожен ген визначає структуру білка. У зв'язку з цим доцільним було провести дослідження нуклеотидної послідовності в молекулі ДНК біологічних об'єктів, геном яких за розміром набагато менший, ніж геном клітини еукаріот. Об'єктами були використані віруси. У 1979 р. удалося визначити повну послідовність нуклеотидів у геномі вірусу мавп SV40. Установлено, що геном цього вірусу складається з 5243 пар азотистих основ, організованих у п'ять окремих генів. Вибір об'єкта виявився вдалим ще й тому, що аналіз окремих генів не був ускладнений присутністю великого надлишку неспоріднених послідовностей. Крім того, у клітині внаслідок розмноження вірусу одночасно знаходиться декілька сотень тисяч копій його геному, що значно полегшує процедуру відокремлення вірусної ДНК від ДНК клітини-хазяїна. Завдяки тому, що генетичний код трансляції послідовності нуклеотидів у послідовність амінокислот уже був розшифрований, стало можливим побудувати послідовність амінокислот у молекулах білків, що кодовані усіма п'ятьма генами вірусу SV40.

Одночасно зі з'ясуванням послідовності нуклеотидів у молекулі ДНК вірусу SV40 було знайдено ділянки, що не належать до ділянки структурного гена, тобто ділянки, що не кодують білки, а беруть участь у регуляції експресії генів і реплікації вірусної ДНК.

Молекулярні біологи розробили методи виділення генів донорських організмів, уведення генів у векторну молекулу й одержання рекомбінантних (гібридних) ДНК, забезпечення самовідтворення рекомбінантних ДНК, тобто їхньої реплікації, перенесення гібридних ДНК в організм реципієнта (клітини-хазяїна) і забезпечення експресії чужорідних генів.

5.1.2. Плазміди і віруси як донорні переносники генетичної інформації

У молекулярній біології і генетичній інженерії як вектор (переносник) генів, що не мають аналогів у ДНК клітині-реципієнта, і тому не здатні брати участь у гомологічній рекомбінації, найчастіше використовують плазміди і фаг λ. Плазміди — це невеликі кільцеві молекули позахромосомної ДНК, що, на відміну від класичних генів, знаходяться в цитоплазмі бактеріальних клітин і клітин деяких дріжджів. У зв'язку з цим плазміди часто називають екстрахромосомними генетичними елементами. Автономне існування плазмід пов'язане з тим, що механізми, які лежать в основі їхньої реплікації, незалежні від механізмів, що регулюють розмноження бактеріальної хромосоми. Плазміди мають здатність вбудовуватися в геном клітини-хазяїна і знаходитися нескінченно довго в інтегрованому з ДНК бактерії стані. У цьому випадку генетичний матеріал плазміди поводиться подібно хромосомним генам бактерії, у які вона вмонтувалася. Відомі сьогодні плазміди розрізняються між собою розмірами, що є наслідком неоднакового обсягу генетичної інформації, що міститься у них; різними механізмами регуляції їхньої реплікації, що залежать від розходжень у ферментних системах, що забезпечують ці механізми. Залежно від молекулярної маси плазміди поділяються на дрібні (середня молекулярна маса $5x10^6$) і великі (приблизно встановлена гранична молекулярна маса $150–10^6$ — $170–10^6$).

До складу молекули плазмідної ДНК входить від 2250 до 400 тис. пар нуклеотидів. У клітинах бактерій кращою є конфігурація ДНК у вигляді дволанцюгових ковалентно закритих кільцевих надспіральних і дволанцюгових відкритих кільцевих молекул ДНК. Конфігурація дволанцюгової ковалентно закритої кільцевої структури, що при скручуванні перетворюється у надспіраль, характеризується високою стійкістю і зберігається в конформаційно зміненому стані навіть при впливі несприятливих факторів (наприклад, лужних розчинів). Плазміди в бактеріальних клітинах найчастіше знаходяться у вигляді ковалентно закритих кільцевих надспіральних структур і відкритих кільцевих молекул ДНК. Відкриті кільцеві молекули утворюються внаслідок розриву фосфодиефірних зв'язків в одному з

ланцюгів. Вони не утворюють надспіральної структури, знаходяться в релаксованому (розслабленому) стані, менш стабільні при впливі несприятливих факторів, а в лужних розчинах дволанцюгова структура швидко деградує через розрив водневих зв'язків.

У бактеріальній клітині одночасно можуть знаходитися плазміди одного чи різних типів. Кількість копій дрібних плазмід буває, як правило, більше десяти; великі плазміди в більшості випадків представлені однією чи двома копіями з розрахунку на одну бактеріальну клітину. Визначено, що на долю плазмід припадає близько 1–10% клітинної ДНК. Так, якщо виходити з того, що в клітині E.coli міститься 10 дрібних плазмід, молекулярна маса кожної з яких $5 \cdot 10^6$, а молекулярна маса хромосомної ДНК $2 \cdot 10^9$, то в плазмідах виявляється зосереджено 2 % клітинної ДНК. Обсяг інформації, зосереджений у дрібних плазмідах, дозволяє їм кодувати молекули двох великих білків; у великих плазмідах можливості, що кодують, достатні для більш ніж 200 великих білків. Наявність деяких загальних ознак з помірними фагами дає підставу припускати існування однієї і тієї самої молекули ДНК у різних фазах — плазмідній і фаговій. Відомо, наприклад, що фаг λ найчастіше функціонує, убудовуючи свою молекулу ДНК у хромосомну ДНК бактеріальної клітини; фагова ДНК може також відтворюватися автономно, як розмножуються плазміди. Крім бактерій, дрібні кільцеві молекули ДНК (діаметр 1,1–2 мкм) зустрічаються в цитоплазмі клітин еукаріот (дріжджах, Neurospora, Euglena, трипаносомах, у клітинах тютюну, дрозофіли, шпорцевої жаби, а також у культурах клітин мишей, мавп, людини). На сьогодні вивчені фізико-хімічні властивості цих ДНК, однак їх походження і біологічна роль поки не визначені.

У 50-і роки XX ст. зусиллями Д. Ледерберга була виявлена екстрахромосомна генетична структура бактерій, що спочатку була відома як фактор фертильності, кон'югації, генетичного перенесення. Для позначення цієї структури був запропонований символ F. Клітини, що є носіями цього фактора, стали називати клітинами F^+; у тих випадках, коли в клітині названий фактор був відсутній, її позначали F^-. Крім того, стало відомо, що при кон'югації бактерії двох штамів, клітини, що містять фактор

F, завжди виступають як донор генетичного матеріалу, клітини F^- — як реципієнт. Передача генетичного матеріалу від клітини-донора до клітини-реципієнта відбувається за рахунок кон'югації (аналог статевого процесу в бактерій), а структурою, що має властивості статевого фактора, виявився фактор F. Останній у зв'язку з його екстрахромосомною (цитоплазматичною) локалізацією, за пропозицією Ледерберга Д., стали називати плазмідою. У такий спосіб було встановлено, що плазміда F зумовлює тільки одну властивість бактерій, що є її носіями, — виступати як донор генетичного матеріалу. Виявлені іншими дослідниками позахромосомні фактори, подібні з F-плазмідами (плазміди Δ, T, FP, P), надають утримуючим їх клітинам здатність донорів генетичного матеріалу, а також мобілізують перенесення у клітини-реципієнти інших некон'югованих плазмід.

Плазміди детермінують стійкість бактеріальних клітин до одного чи одночасно до декількох ліків і останнім часом широко розповсюджені; їхніми носіями є майже усі види патогенних для людини і тварини бактерій.

Синтез коліцинів клітинами E.coli знаходиться під контролем плазмід Col. Розрізняють кілька видів коліцинів A, B, C, D, E та ін. Серед деяких з названих коліцинів, у свою чергу, виділяють такі варіанти як, наприклад, коліцин E1, E2, E3. Тому в назвах відповідних плазмід, крім символу Col, зазначаються назва синтезованого кишковою паличкою відповідного виду і варіанта коліцину — ColE1, ColE2 і т.д. Синтез подібних за біологічним значенням з коліцинами речовин (піоцинів) детермінується плазмідами, що містяться в псевдомонадах; стафілококові плазміди контролюють синтез стафілококцину, плазміди картопляної палички — мегацину і т.д. Загальною властивістю усіх бактеріоцинів є їх висока біологічна активність. Для гальмування життєдіяльності бактеріальної клітини достатньо декількох молекул бактеріоцину (висока ефективність поширюється лише на бактерії аналогічного чи близького виду). Коліциногенні (бактеріоциногенні) плазміди і детерміновані ними ефекти поширені серед бактерій, але не так часто, як R-плазміди.

Деякі плазміди (Ent, Hly, K88, K99) локалізуються тільки в клітинах ентеропатогенних штамів E.coli. Так, низькомолеку-

лярний термостабільний і високомолекулярний термостабільний ентеротоксини синтезуються під контролем плазмід Ent. Залежно від того, чи одна з двох плазмід знаходиться у клітині чи їхній комплекс, клітини кишкової палички синтезують один із двох названих ентеротоксинів, або обидва види ентеротоксинів одночасно. Синтез α і β-гемолізинів (білкових речовин, що викликають гемоліз еритроцитів) ентеропатогенними клітинами кишкової палички детермінується плазмідами Hlyα і H1yβ відповідно. Вони, як і плазміди Ent, можуть знаходитися у клітині як поодинці, так і обидві одночасно. У зв'язку з цим клітина синтезує один із двох названих ентеротоксинів, або обидва види одночасно. Спільне перебування у клітині плазмід К88 і К99, що контролюють синтез поверхневих антигенів 88 і 99, з плазмідами Ent підвищує патогенність таких клітин бактерій. У клітинах багатьох штамів Pseudomonas putida локалізовані плазміди, кожна з яких детермінує біосинтез ферменту для утилізації якогось одного класу вуглеводнів. Так, плазміди SAL розщеплюють саліцилову кислоту, XYL — ксилол і толуол, NAN — нафталін, CAM — камфору, OCT — октан, гексан і декан. Усі названі плазміди вдається ідентифікувати за контрольованими ними ознаками, які виявляються фенотипічно. Плазміди, існування яких у клітинах бактерій фенотипічно не виявляється (а для їхньої ідентифікації необхідне застосування біохімічних методів), називаються критичними. Ці плазміди ще мало вивчені.

Перш ніж плазміди стали використовувати як незамінні об'єкти молекулярної біології і генетичної інженерії, були вивчені їхня загальна і спеціальна функції. У всіх видів плазмід виявлені такі загальні функції, як здатність реплікуватися (rep), несумісності (inc), перенесення (tra — від англ. transfer — перенесення).

Плазміди — це молекули ДНК, тому за рахунок реплікації регулярно збільшується кількість плазмідних копій і вони рівномірно розподіляються між нащадками бактеріальної клітини, що ділиться. Найкраще вивчено механізм реплікації дрібної плазміди ColE1, що представлена у клітині, як правило, великим числом копій *(Зенгбуш П., 1982)*. У процесах ініціації й елонгації беруть участь продукти хромосомних генів, а для реплі-

кації ColE1 необхідні ДНК-полімераза III і ДНК-полімераза I. Останній фермент у реплікації хромосомної ДНК кишкової палички участі не бере, а використовується там у репараційних цілях. Висловлюється думка про те, що тільки початок реплікації плазміди ColE1 детермінується її генним апаратом, інші функції, що забезпечують реплікацію плазміди, реалізуються за участю хромосомного апарату бактеріальної клітини. У деяких плазмід, що у клітині знаходяться в невеликій кількості (1–2 чи трохи більше копій на хромосому), існує власний, незалежний від хромосоми апарат, що забезпечує реплікацію. До таких плазмід насамперед належать фактори F, R1, pSCIO1 та інші.

Про реальне існування процесу реплікації плазмід свідчать непрямі дані, до яких насамперед варто віднести той факт, що кількість плазмід з розрахунку на хромосому бактеріальної клітини-хазяїна завжди є величиною постійною. З іншого боку, якщо припустити, що процес реплікації невластивий плазмідам, то при будь-якій первісній кількості плазмід у бактеріальній клітині, що ділиться, завжди має настати момент, коли ця бактеріальна клітина звільниться від плазмідних структур. Насправді такий феномен зникнення плазмід із плазмідвмісних клітин поки що ніким не був установлений. Є інші приклади, що підтверджують факт розмноження плазмід.

Молекулярний механізм розмноження плазмід дотепер цілком не вивчений. Наявні гіпотези, що допускають існування позитивного і негативного контролю розмноження плазмід, не в змозі пояснити існуючі факти. Так, наприклад, гіпотеза позитивного контролю базується на тому, що розмноження плазмід F і F′ знаходиться під контролем власної генетичної системи, представленої тільки двома генами, один з яких здійснює контроль синтезу білкового продукту, що виступає як ініціатор процесу реплікації, а другий ген є оператором реплікації (реплікатором). Схема генетичного контролю розмноження плазмід F чи F′ передбачає, що розмноження настає в той момент, коли немає обмежень для функціонування ініціатора (білкової субстанції) і реплікатора. Разом з тим установлено, що в процесі ініціації синтезу ДНК плазміди ColE1 реплікація не припиняється, незважаючи на присутність такого інгібітора білкового синтезу, як хлорамфенікол.

Точку зору про наявність у плазмід власної системи реплікації поділяють багато фахівців, однак функціональна активність цієї системи знаходиться залежно від рівня життєдіяльності бактеріальної клітини. Так, перебування бактеріальної культури в несприятливих для її розмноження умовах супроводжується збільшенням кількості плазмід у бактеріальній клітині. Крім того, на залежність розмноження плазмід від метаболічної активності бактерії вказує факт можливої участі РНК як запалу при реплікації плазмідної ДНК.

Пізнання механізму розмноження плазмід не є приватним питанням. Його значення в тому, що на прикладі реплікації плазмідної ДНК вивчаються фундаментальні механізми реплікації генетичного матеріалу взагалі, що має практичне застосування при розробці методів подолання лікарської стійкості бактерій, а також обмеження поширення бактерій, що є носіями R-плазмід.

Функція несумісності (inc) плазмід — це біологічне явище, що виявляється при забарвленні, і означає, що дві однакові плазміди не можуть стабільно існувати в одній клітині; потрапивши при схрещуванні з клітини-донора в клітину-реципієнт плазміда витісняє подібну плазміду («резидента»), або сама витісняється нею. Молекулярний механізм несумісності поки що нез'ясований.

Поряд з несумісністю при вивченні взаємодії бактерій було встановлене близьке до цього явище, що одержало назву поверхневого виключення. Схрещування клітин-донорів і клітин-реципієнтів, що є носіями подібних плазмід F, R чи Col, незмінно супроводжується несприйняттям реципієнтною клітиною плазмідного матеріалу з клітини-донора. Хоча є досить переконливі дані, що вказують на існування плазмідного генного контролю поверхневого виключення, молекулярний механізм цього явища дотепер однозначно не встановлений. Що стосується несумісності плазмід, то ні гіпотеза конкуренції плазмід за мембранний сайт (ділянка) реплікації, ні гіпотеза негативного контролю розмноження не можуть цілком пояснити молекулярний механізм цього явища. Однак немає також підстав заперечувати взаємозв'язок механізму несумісності і механізму розмноження, що контролює кількість плазмід в одній бакте-

ріальній клітині. Відкрите явище несумісності плазмід покладено в основу їхньої класифікації. Висловлене припущення про філогенетичне споріднення плазмід, що належать до однієї групи, було підтверджено наступними дослідженнями. Установлено, що плазміди, які належать до однієї групи несумісності, характеризуються спільністю молекулярної будови їхньої ДНК; приналежність плазмід до однієї групи корелює з лікарською стійкістю бактерій. Класифікація плазмід за принципом несумісності дає можливість вивчити шляхи їхнього розповсюдження від одних бактерій до інших, а також шляхи поширення бактерій, що містять плазміди, у яких вони відіграють роль маркерів. Остання обставина дозволяє проводити плазмідний моніторинг. Усе це підвищує ефективність вивчення екології, епідеміології та епізоотології плазмід і бактерій, що утримують плазміди.

Функція перенесення (tra) є властивістю плазмід. Однак це властиве тільки великим плазмідам, з яких найбільш вивчена F E.coli. Молекулярна маса цієї плазміди досягає 65 млн, а кількість пар азотистих основ — 24 тис. Фактор перенесення (оперон перенесення, фактор F, плазміда F) містить 21 цистрон. Процес перенесення, що складається з декількох етапів, починається з того, що у певному місці плазміди, яке називається стартовою точкою перенесення (oriT), відбувається розрив одного з ланцюгів ДНК. Потім цей ланцюг переноситься у клітину-акцептор. На одноланцюгових структурах ДНК, що залишилися в донорській клітині, а також на перенесених у клітину-акцептор, реплікуються комплементарні ланцюги.

Фактор F, як і інші плазміди, може включатися в бактеріальну хромосому за типом незаконної рекомбінації у визначених місцях. Незаконна рекомбінація — це процес, в основі якого лежить обмін негомологічними ділянками ДНК. Перебування фактора F в інтегрованому з хромосомою стані (стан Hfr), є однією з альтернативних форм існування плазміди, а хромосоми E.coli, у які включений фактор F, набувають здатності до перенесення в клітини придатного реципієнтного штаму, і цей процес при інтеграції плазміди F із хромосомою E.coli здійснюється з високою частотою. При впливі на бактеріальну клітину УФ-випроміненням частота включення плазміди F у хромосому цієї клітини підвищується.

З відомих спеціальних функцій, що кодуються окремими плазмідами, варто назвати плідність (здатність плазмід переносити генетичний матеріал шляхом кон'югації), стійкість до одного чи кількох антибіотиків (фактори R_1 плазміди R), важких металів (Cd^{2+}, Hg^{2+}), ультрафіолетового випромінювання, здатність до утворення бактеріоцинів (речовин, при дії яких на клітини настає їх загибель) і антибіотиків (метиленоміцину, актинородіну та ін.), токсинів і поверхневих антигенів (ентеротоксинів гемолізину, антигену К88 та ін.), індукцію пухлин у рослин (плазміда Ті з Agrobacterium tumefaciens викликає утворення корончатого гала), метаболізм незвичайних джерел вуглецю (багато штамів Pseudomonas putida містять плазміди, що кодують ферменти для утилізації вуглеводнів), участь у споруляції стрептоміцетів.

Носіями такої спеціальної функції, як стійкість до антибіотиків і деяких інших груп лікувальних препаратів, є фактори R чи плазміди R (від англ. resistance — стійкість). Механізм стійкості обумовлюється тим, що плазмідні гени кодують синтез спеціальних ферментів; останні інактивують антибіотики шляхом їхнього розщеплення або шляхом модифікації ацетилюванням, аденілюванням, фосфорилюванням. Крім того, деякі антибіотики (тетрациклін) і сульфаніламіди не спричиняють властивого їм антибактеріального ефекту через детерміновані зміни в бактеріальній мембрані.

Гени r, що зумовлюють лікарську стійкість, можуть бути в плазмідних факторах R об'єднані. Тоді формується ознака множинної лікувальної стійкості. У результаті інтенсивної хіміотерапії проти бактеріальної дизентерії один зі штамів збудника цього захворювання Shigella dysenteriae стійкий одночасно до всіх чотирьох використаних у лікувальних цілях лікарських препаратів — хлорамфеніколу, стрептоміцину, тетрацикліну і сульфаніламідів. Явище множинної стійкості до ліків сьогодні широко розповсюджене в патогенних і непатогенних бактерій (E.coli, Salmonella). Японські дослідники установили, що 65 % штамів Shigella і 50 % штамів усіх інших кишкових бактерій, отриманих від хворих чи тих, що перехворіли на дизентерію, виявилися стійкими до застосованих в лікувальних цілях антибіотиків (стрептоміцину, хлорамфеніколу і тетрацикліну), а також

до сульфаламідів. У плазмідах, поряд з декількома генами r, що детермінують множинну лікарську стійкість, міститься також фактор перенесення цієї стійкості RTF. Гени фактора RTF мають багато схожого з генами загального фактора перенесення F E.coli і забезпечують кон'югацію і реплікацію. Плазміди R часто є носіями ділянки RTF. У такому випадку вони при спільному культивуванні можуть передаватися іншим видам бактерій, що свідчить про трансмісивне походження сутності ознаки множинної лікарської стійкості. Найчастіше ділянка RTF, що забезпечує кон'югацію бактерій і реплікацію ДНК, а також детермінанти r знаходяться в одній молекулі ДНК. Натомість відомо чимало випадків (наприклад, у бактерій Salmonella і Proteus), коли ці функціональні утворення знаходяться в різних молекулах. У природних умовах бактеріальні популяції, що є носіями плазмід, у яких фактори RTF і детермінанти r зосереджені в одній молекулі ДНК плазміди, просторово роз'єднані від тих бактеріальних штамів, у яких RTF і r знаходяться в різних плазмідах. Якщо плазміди є носіями тільки одного гена r і в них відсутній набір генів, що забезпечують функцію RTF, вони характеризуються невеликим розміром, забезпечують стійкість тільки до якоїсь однієї лікарської речовини і наявний ген лікарської стійкості не може бути переданий кон'югативним шляхом. Так, плазміда RpSClOl завдовжки 8,2 kb (маленька плазміда) має стійкість тільки до однієї лікарської речовини (антибіотика тетрацикліну), але ця ознака стійкості не може бути переданою за допомогою кон'югації (відсутність ділянки RTF). У природних умовах ген r, що детермінує ознаку стійкості до однієї лікарської речовини, скажімо, антибіотика, має здатність до взаємодії з плазмідами, що кодують стійкість до іншого антибіотика чи сульфаніламідного препарату. Об'єднання гена (чи генів) стійкості r до лікарських речовин (зазвичай до хімічних сполук) із плазмідами, що є носіями генів ділянки RTF, в остаточному підсумку приводить до виникнення плазміди, у якій комбінація RTF–r сприяє її швидкому поширенню в бактеріальній популяції. Хоча існують відповідні механізми контролю (зокрема, репресія функціональної активності RTF–r) за рахунок мутантних форм, де цей контроль ослаблений або відсутній, перенесен-

ня генів r у природних популяціях досить широко розповсюджений. Наприклад, у США (штат Атланта) був зареєстрований стійкий до дії антибіотика пеніциліну штам Neisseria gonorrhoeae, що є збудником гонореї. Для лікування захворювання, викликаного пеніциліностійким штамом, дозу антибіотика довелося збільшити в 24 рази (з 200 тис. до 4,8 млн одиниць). Різке зниження активності пеніциліну зумовлюється появою гена r, що детермінував синтез пеніцилінази. Фермент розщеплював пеніцилін і тим самим інактивував його.

Факт мікробної стійкості до дії пеніциліну був встановлений у Haemophilus influenzae — збудника менінгіту. Відомі й інші приклади міграції генів лікарської резистентності. Так, було встановлено, що ген, який обумовлює стійкість бактерій до тетрацикліну, може переходити з плазміди R у фаг, що розмножується в клітинах Salmonella, а потім у хромосому Salmonella, із хромосоми — у фаг λ і далі в trp-оперон E. coli, а потім знову у фаг λ. Простежений також шлях міграції гена стійкості до хлорамфеніколу.

Встановлене японськими дослідниками під керівництвом Митсухаши С. явище хромосомної міграції генів стійкості до деяких хімічних речовин було підтверджено в лабораторіях інших країн світу. Здатні до міграції генетичні елементи прокаріот, що кодують стійкість до певних хімічних сполук, були названі транспозонами, а для їхнього позначення стали використовувати символ Tn. З відомих нині транспозонів найбільш вивчені виділені з різних плазмід Tn1, Tn2, Tn3, що зумовлюють стійкість до ампіциліну; Tn4 зумовлює стійкість відразу до декількох хімічних сполук — стрептоміцину, ампіциліну і сульфаніламідів, Tn5 і Tn6 — до антибіотика канаміцину, Tn7 — до триметопріму і стрептоміцину, Tn9 — до хлорамфеніколу, Tn10 — тетрацикліну. До складу транспозонів входить близько 2600–5200 пар нуклеотидів.

При з'ясуванні причин високої здатності транспозонів до міграції на їхніх кінцях були виявлені повторювані нуклеотидні послідовності. Крім того, ще раніше було відомо, що деякі плазміди R містять неодноразово повторювані нуклеотидні послідовності (інвертовані повтори), що містять 800–1400 пар нуклеотидів. Характерною рисою повторюваних послідовностей є

їхня генетична інертність, тому що вони не кодують жодних властивостей. На сьогодні найбільш вивченими є п'ять відмінних один від одного послідовностей (IS1, IS2, IS3, IS4 і IS5), що називаються вставними, або інтронами (від англ. intervening sequence, послідовності, які переривають). Ці елементи виявлені в E.coli, Salmonella typhimurium, Citrobacter freundii, у деяких плазмідах (F, R) і помірних фагах (λ). Так, хромосома E. coli містить вісім копій IS1 і п'ять копій IS2 — елементів, що відрізняються від вірусів і плазмід тим, що автономно реплікуватися не можуть. Вони є найменшими рухливими генетичними елементами, які мають довжину близько 1 kb. Крім того, IS-послідовності, як уже було сказано, не несуть жодних генів. Однак назвати їх інертним генетичним матеріалом неможливо, тому що вони, представляючи новий вид послідовності, впливають на експресію сусідніх генів, можуть виконувати функцію нових промоторів, блокують транскрипцію дистальних генів транскрипційної одиниці, можуть індукувати делеції й інверсії, що призводять до хромосомних перебудов, мають здатність вбудовуватися і вилучатися з бактеріального геному в різних місцях незалежно від гена recA.

Варто звернути увагу на ту обставину, що IS-послідовності не мають постійного місця: їх знаходять у різних ділянках молекул ДНК. Включені в ці полінуклеотидні послідовності транспозони переміщаються разом з останніми, а в основі механізму включення транспозонів лежить принцип незаконної рекомбінації, тому що специфічність інтеграції насамперед визначається не спарюванням основ, а ДНК-білковими взаємодіями. Як уже було сказано, IS-елементи мають здатність вбудовуватися в різні місця геному, однак у деякі з них включення відбувається частіше, ніж в інші.

Висловлюється думка, що висока точність, з якою здійснюється вбудовування і виключення нуклеотидних фрагментів, свідчить про участь у цих реакціях білків, які специфічно взаємодіють з кінцевими ділянками IS-елементів.

Визначення послідовності нуклеотидів кінцевих ділянок транспозонів показало їхню повторюваність. Так, кінці транспозону, що зумовлюють стійкість до ампіциліну (Tn3), є зверне-

ними повторами, що включають 38 нуклеотидних пар. Однак між кінцевими нуклеотидами транспозону Tn3 і пов'язаними з ним ділянками реципієнтної ДНК гомології не було встановлено. Таким чином, можна сказати, що транспозон — це ділянка ДНК, що складається з одного чи декількох генів стійкості, до якого по обидва боки прилягають елементи IS. Вивчення транспозонів, механізму і шляхів їхньої міграції, а також установлення транспозонів еукаріот необхідне для вирішення як теоретичних, так і практичних питань.

Така спеціальна функція плазмід, як біосинтез бактеріоцинів, виявлена в багатьох видів бактерій. За своєю хімічною природою бактеріоцини є білковими речовинами, молекулярна маса яких коливається в межах 40–100 тис. На сьогодні найбільш вивчені бактеріоциногенні властивості плазмід у клітинах E. coli. Бактеріоцини, кодовані генами цих плазмід, називаються коліцинами, а плазміди, що кодують їх, позначаються як ColE1, ColE2 і т.д. Дія коліцинів характеризується різними механізмами. Так, біологічна дія ColE1 реалізується за допомогою інгібування процесів окисного фосфорилювання. Крім того, ця плазміда використовується в генетичній інженерії як вектор. Бактеріоциногенний ефект ColE2 досягається за рахунок розщеплення ДНК, а ColE3 спричиняє деградуючу дію на 3′-кінець 16S-рРНК, у зв'язку з чим порушується біосинтез білка, тому що рРНК втрачає здатність до специфічної взаємодії з іРНК; в основі механізму дії ColK знаходиться порушення функції мембран бактерій. Об'єктами, на які ефективно діють коліцини, є бактерії цього ж виду чи близькоспоріднених видів, наприклад Proteus і Shigella.

Токсиноутворююча функція бактерій, що зумовлює їхню патогенність, реалізується за рахунок кодованого плазмідами біосинтезу ентеротоксинів, гемолізинів і антигенів. Плазміди E.coli, що кодують синтез ентеротоксинів, являють собою фактор перенесення (RTF), інтегрований різними генами, що несуть інформацію для синтезу двох білкових факторів, один з яких (ST) є термостабільною, а інший (LT) — термолабільною речовиною. Вплив на організм термолабільних ентеротоксинів спричинює важчі наслідки, ніж ST-ентеротоксини. Токсини E.coli,

що викликають гемолітичний ефект, як і ентеротоксини, кодуються плазмідними генами і знаходяться в плазмідах, що мають здатність до перенесення. Ідентифіковані γ-, β- і γ-гемолізини. Для одержання гемолізину, що має патогенну дію, необхідна участь декількох цистронів, два з яких забезпечують біосинтез функціонально активного гемолізину, третій — проходження синтезованого гемолізину через бактеріальну мембрану і вихід його в зовнішнє середовище. Є дані, що для прояву патогенних властивостей синтезованого гемолізину необхідна участь двох інших плазмід, що у диких штамах E.coli знаходяться в одній бактеріальній клітині разом з гемолізиновим детермінантом. Цей та інший приклади свідчать, що кодованих плазмідами токсинів буває недостатньо для досягнення бактеріальною клітиною патогенної дії. Однак участь як плазмід, так і хромосом у процесі перетворення непатогенних бактерій у патогенні поки що не встановлена. Практично нічого невідомо і про механізм дії поверхневих антигенів (К88 і К99) та їхніх молекулярних властивостей, хоча плазміди, що кодують ці антигени, певною мірою вивчені.

Плазміди можуть прямо чи побічно впливати на біосинтез антибіотиків, що в основному синтезуються стрептоміцетами. Нещодавно було встановлено, що плазміди беруть участь у біосинтезі метиленоміцину, хлорамфеніколу, тетрацикліну, макроліту. Часто про антибіотикоутворювальну функцію роблять висновок з її порушення в зв'язку з елімінацією плазмід із клітин за допомогою бромистого етидію, акридину оранжевого й інших речовин, хоча механізм цієї реакції цілком не вивчений.

Дуже важливою з практичної точки зору обставиною є здатність деяких бактерій (багато штамів Pseudomonas putida) утилізувати різні класи вуглеводнів, а також те, що ця властивість детермінується плазмідами, які мають здатність до перенесення. Нині при схрещуванні отримані штами Pseudomonas putida, у яких локалізована плазміда, що кодує синтез ферментів для розщеплення ксилолу, толуолу (XYL), і плазміда NAH, що кодує синтез ферменту для розщеплення нафталіну. Важливим успіхом з теоретичної і практичної точок зору є введення в бактеріальну клітину, що містить XYL- і NAH-плазміди, створеної

гібридної плазміди, яка включила в себе частинки несумісних плазмід OCT і CAM. В одній бактеріальній клітині плазміди OCT і CAM через принцип несумісності одночасно бути присутніми не можуть, тому наведені дані є прикладом подолання несумісності.

Бактерія, у якій одночасно знаходяться у функціонально активному стані XYL- і NAH-плазміди, а також гібридна плазміда, що включила частини OCT- і CAM-плазмід завдяки своїй здатності розщеплювати більшу кількість класів вуглеводнів, ніж штами, що містять у клітині одну плазміду, характеризується високою енергією росту при використанні сирої нафти як поживного середовища. Цю «супербацилу» передбачається застосувати для ліквідації витоків нафти, а також для очищення трюмів танкерів.

5.1.3. Конструювання рекомбінантної ДНК

Розробка технології конструювання рекомбінантних ДНК є одним з найважливіших досягнень молекулярної біології. Молекули ДНК, у тому числі і гігантські молекули ДНК еукаріот, що містять цікаві для дослідника гени, за допомогою рестрикційних ендонуклеаз (рестриктаз) розщеплюють на окремі фрагменти. Заслуговує на увагу та обставина, що за допомогою одного і того самого ферменту рестрикції здійснюють розщеплення як молекули ДНК, з якої планується одержання необхідного гена, так і ДНК вектора (плазміди чи помірного фага). У цьому випадку рестрикційна ендонуклеаза, наприклад EcoRI, що є бактеріальним ферментом, розщеплює короткі палиндромні (ті, що мають вісь симетрії другого порядку) послідовності в специфічних місцях усередині цих послідовностей навскіс в обох ланцюгах хромосомної ДНК і ДНК вектора з утворенням комплементарних одноланцюгових виступів, що мають назву липких кінців. Дуже важливо, що за допомогою ферментів удається хромосомну ДНК, з якої утвориться безліч фрагментів, і ДНК плазміди перевести в лінійну форму, а потім одноланцюгові комплементарні кінці фрагмента великої молекули ДНК і плазміди піддати відпалу, що веде до з'єднання

липких кінців у результаті спарювання азотистих основ, а наявний у структурі відпаленої ДНК розрив усунути за допомогою легкодоступного бактеріального ферменту ДНК-лігази (рис. 5.1).

Відомі й інші методи, що застосовуються у генетичній інженерії (конекторний, лінкерний), за допомогою яких досягається з'єднання неспоріднених молекул ДНК. З'єднання двох неспоріднених молекул ДНК конекторним методом досягається за рахунок ферментативного приєднання за допомогою кінцевої трансферази (дезоксинуклеотидилтрансферази) полі(dA)-фрагментів до обох 3′-кінців однієї з двох неспоріднених молекул

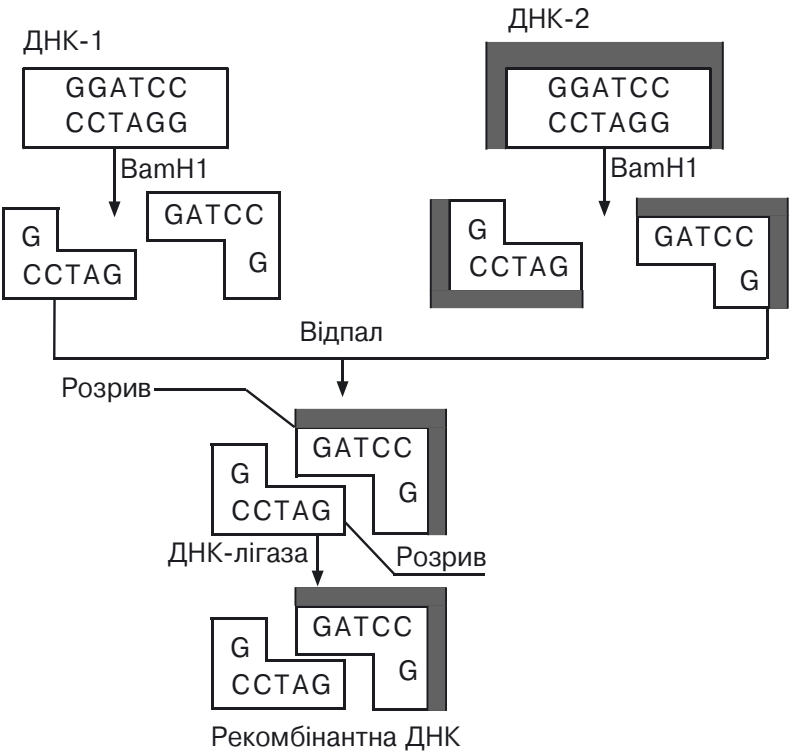


Рис. 5.1. ***Схема конструювання рекомбінантної ДНК*** *(за Хопвудом Д., 1984)*

ДНК; до обох 3′-кінців другої неспорідненої молекули ДНК приєднують фрагменти полі(dT). Для з'єднання 3′-кінців дволанцюгової структури ДНК можна використовувати гомополімерні нуклеотидні послідовності, що складаються з гуанінового і цитидилового нуклеотидів. Особливістю термінальної дезоксинуклеотидилтрансферази є незалежність її дії від присутності полінуклеотидної матриці, у зв'язку з чим подовження 3′-кінців молекул ДНК, що з'єднуються, можливе за рахунок гомополімерних нуклеотидних послідовностей довжиною близько 100 залишків. У зв'язку з тим, що приєднані до 3′-кінців однотипні полінуклеотидні послідовності можуть мати різну довжину, дефекти, що виникли в зв'язку з цим у двоспіральній структурі ДНК, добудовуються за рахунок ДНК-полімерази I.

З'єднання фрагментів ДНК і вектора, утворених у результаті дії відповідних ферментів рестрикції, здійснюють за допомогою методу, що включає в себе елементи методів конекторного та липких кінців. Для цього попередньо хімічним шляхом синтезують олігонуклеотидний фрагмент, що складається з 6–10 пар нуклеотидних залишків. Цей фрагмент виконує з'єднуючу функцію, і тому називається лінкером. За його допомогою з'єднуються кінці клонованого фрагмента ДНК і вектора, у який цей фрагмент уводиться для утворення рекомбінантних молекул ДНК. Попередньою умовою при створенні лінкера є можливість наступного його розщеплення відповідною рестрикційною ендонуклеазою. Потім до 3′-кінців плазмідного чи іншого походження вектора і фрагментів ДНК приєднують з утворенням ковалентних зв'язків заздалегідь синтезований лінкер (сполучний ланцюг), а 5′-кінці лінкера клонованої ділянки ДНК і ДНК вектора фосфорилюють за участю полінуклеотидкінази і за допомогою лігази (фага T4), що утворює ковалентний зв'язок між тупими кінцями ДНК. Тупі кінці, утворені приєднанням лінкера до клонованого фрагмента ДНК чи вектора після ферментативної обробки відповідною рестриктазою, наприклад EcoRI, перетворюють на липкі кінці (рис. 5.2), в основі з'єднання яких лежить механізм, описаний вище.

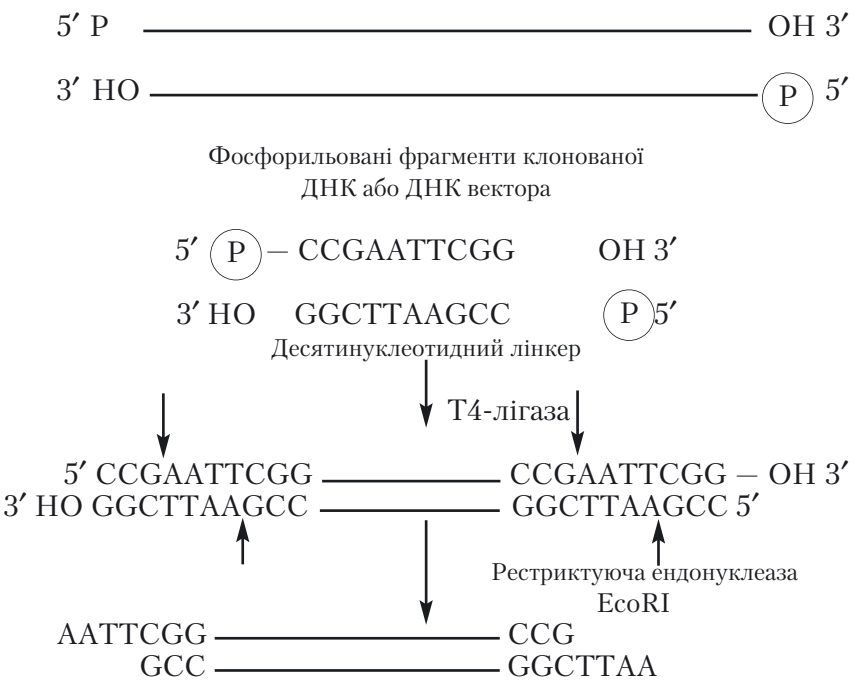


Рис. 5.2. ***Схема з'єднання фрагментів ДНК комбінованим (лінкерним) методом. Стрілками позначені місця дії рестриктази, що призводить до утворення липких кінців*** *(за Страйєром Л., 1985)*

На стадії виділення клонованих генів сумарну ДНК клітини-донора (наприклад, ссавця) за допомогою ферментів рестриктаз, що виконують роль своєрідного захисника, який охороняє клітину від вторгнення чужорідної ДНК, розщеплюють на фрагменти розміром від 1 до 30 тис. нуклеотидів. Складний геном удається розділити на кілька сотень тисяч полінуклеотидних фрагментів, кожний з яких можна вмонтувати в молекулу ДНК вектора. Важливо, щоб полінуклеотидний фрагмент ДНК клітини-реципієнта, що вбудовується, не перевищував полінуклеотидної ємності вектора, що використовується.

З фрагментів, що утворяться при розщепленні ендонуклеазами сумарної геномної ДНК і ДНК вектора (плазміди чи бактеріофага) за допомогою методу липких кінців, конекторного чи комбінованого (лінкерного) методів у присутності ДНК-лігази одержують молекулу рекомбінантної (гібридної) ДНК. У присутності всіх необхідних компонентів процес утворення рекомбінантної ДНК завершується протягом декількох хвилин.

Наступна стадія на шляху клонування рекомбінантної ДНК — введення цих гібридних молекул, що складаються з убудованих у ДНК вектора клонованих фрагментів ДНК, у тому числі еукаріотичних організмів, у бактеріальну клітину-хазяїна. Процес проникнення так званих голих молекул ДНК у бактеріальну клітину і здатність їх надавати цим клітинам нових спадкових ознак описані американськими дослідниками з лабораторії Ейвери О.Т. (1944). Явище поглинання ДНК із середовища бактеріальними та еукаріотичними клітинами одержало назву трансформації. Ефективність трансформації дуже низька: тільки одна з мільйона молекул ДНК проникає у клітину. Створюючи особливі умови, кількість трансформованих клітин можна значно збільшити.

Важливою умовою одержання рекомбінантних молекул ДНК є вибір таких плазмід, у яких була б тільки одна ділянка специфічної взаємодії з певною рестрикційною ендонуклеазою. За дотримання цієї умови кільцева плазмідна ДНК при ферментативному розщепленні перетворюється тільки на одну лінійну молекулу. Якщо в плазміді є декілька палідромних послідовностей, з якими специфічно взаємодіє фермент рестрикції, то в результаті його гідролітичної дії плазмідна ДНК розпадається на кілька фрагментів. Для одержання рекомбінантних молекул ДНК необхідно створити дрібні плазміди з високою швидкістю їхнього розмноження.

Нині при створенні нових векторів уже на стадії планування ставиться завдання одержання таких рекомбінантних молекул, які, маючи інші необхідні властивості, порівняно легко могли б проникати в клітину-хазяїна. Такі вимоги задовольняє вектор, сконструйований на основі мутантної форми фага λ, що одержав назву λ g t-λ. Під впливом рестриктази EcoRI цей мутант розщеплюється у двох місцях (кількість місць розщеплення

під впливом рестриктази в дикого типу досягає п'яти). Важливим моментом, що дозволяє використовувати цей фаговий мутант як вектор, є й те, що значні ділянки його ДНК можна видалити, не змінивши при цьому інфекційних властивостей бактеріофага. На частку ДНК, що залишилася після розщеплення EcoRI, припадає 72 % довжини вірусного геному. Дефект, що утворився після елімінації ділянки вірусної ДНК, можна заповнити фрагментом ДНК розміром 10 kb, який призначений для клонування. У такому випадку гібридна молекула ДНК, створена на базі фага λ і має 93 % первісної довжини (до обробки рестриктазою), може бути інкапсидована (упакована) у голівці вірусу. Однією з основних переваг створених на основі фага λ векторів є їх здатність проникати в бактерії з ефективністю, що значно перевершує таку ж у гібридних молекул, сконструйованих на плазмідній основі.

5.1.4. Клонування молекул рекомбінантної ДНК

Уведена тим чи іншим шляхом у бактеріальну клітину рекомбінантна молекула ДНК багаторазово там реплікується. Кожна гібридна молекула ДНК у результаті реплікації створює потомство ідентичних їй дочірніх молекул. Багаторазово розмножене потомство однієї бактеріальної клітини, що характеризується ідентичністю всіх складових його молекул, називають клоном. Фрагмент ДНК, попередньо отриманий у результаті розщеплення рестрикційною ендонуклеазою геномної ДНК (наприклад, еукаріотичного організму), у межах кожної клональної популяції присутній у чистому вигляді, єдиною домішкою якого є ДНК-вектор, що міститься в гібридній молекулі. Тому в більш вузькому значенні клоном називають убудований фрагмент чужорідної ДНК, попередньо виділений з його первісного геномного оточення і в результаті вибіркового розмноження присутній у великій кількості копій в однорідній популяції гібридних молекул. Як було сказано вище, у плазмідні чи вірусні вектори можуть долучатися різні фрагменти ДНК, що несуть у своєму складі різні гени, у зв'язку з чим утворюються сотні тисяч гібридних молекул, що розрізняються, і які при розмноженні утворюють клональні популяції. Родоначальницею кожної популяції є одна гібридна молекула ДНК.

При використанні як вектора бактеріофага гібридні ДНК, що утворилися і які складаються з фрагмента геномної ДНК еукаріотичного походження і ДНК вірусу, вводять у клітини E.coli. Рекомбінантні фаги багаторазово розмножуються у клітинах E.coli; у результаті їх лізування одержують великий набір окремих клональних популяцій — бібліотеку клонів.

Наступний етап — ідентифікація клонів. Завдання полягає в тому, щоб у бібліотеці клонів знайти одну чи кілька популяцій, що несуть рекомбінантну молекулу ДНК і містять потрібний ген. Добір клонів можна проводити за ознаками, характерними для самого клонованого гена чи для вектора, у який убудований потрібний ген. Ідентифікація є порівняно простою маніпуляцією, якщо раніше був клонований родинний потрібному ген. Клонований раніше фрагмент ДНК позначають радіоактивним ізотопом і встановлюють необхідний клон гібридизацією. При цьому враховується та обставина, що радіоактивна ДНК у зв'язку з комплементарністю нуклеотидних послідовностей буде зв'язуватися переважно з клонованим фрагментом ДНК, який розшукується. Що стосується ідентифікації клонованих фрагментів еукаріотичної ДНК, то і тут основою відбору є гібридизація.

Розроблено прийоми, за допомогою яких можна виділити іРНК (на її матриці здійснюється синтез відповідного білка) і її ДНК-копію. У тих клітинах, які спеціалізовані для синтезу певного білка у великих кількостях, іРНК також виявляється в концентраціях, що дозволяють порівняно легко виділити її, а також ДНК-копію відповідної іРНК у кількостях, необхідних для тестування гена, що розшукується. Цей метод виявляється результативним і в тих випадках, коли іРНК знаходиться в клітині, де її кількість складає десяті частки відсотка стосовно інших матричних РНК. Цей метод може бути використаний і тоді, коли через малу кількість існуючих прийомів іРНК не може бути ізольованою. Запропонований вихід з цього становища полягає у виділенні невеликої кількості чистого білка, біосинтез якого здійснюється на матриці іРНК, яка цікавить дослідника. Потім визначається амінокислотна послідовність цього білка і на підставі знання генетичного коду здійснюється визначення нуклеотидної послідовності відповідної іРНК і ДНК, що кодує аналізований білок.

На наступному етапі з окремих нуклеотидів хімічним шляхом синтезують невеликі олігонуклеотидні фрагменти ДНК з необхідною послідовністю азотистих основ. Ці фрагменти ДНК надалі використовуються як тести для ідентифікації і виділення клонів, що розшукуються.

З метою ідентифікації і відбору клонів використовується імунологічний метод. У цьому випадку виділяється чистий білок, кодований геном, що знаходиться у складі рекомбінантної ДНК у фаговому векторі. При введенні в бактеріальну клітину гібридного фагового вектора одночасно з його розмноженням здійснюється біосинтез невеликих кількостей цього білка. Подальше завдання полягає в тому, щоб проти потрібного білка одержати антитіла і використовувати приготований на їхній основі препарат для ідентифікації і відбору клону, що містить ген, який розшукується.

Ідентифікацію і відбір потрібного клону здійснюють за специфічною ознакою, носієм якої є плазмідна частина рекомбінантної молекули ДНК. Так, створена останнім часом плазміда pBR322 є носієм генів, що забезпечують стійкість утримуючих ці плазміди бактерій до тетрацикліну й ампіциліну (рис. 5.3). Крім того, кожна з таких рестрикційних ендонуклеаз, як EcoRI, HindIII, Sa1I, BamHI, розщеплює названу плазміду в одному чітко визначеному місці. Плазміда pBR322, оброблена рестриктазами HindIII, SalI, BamHI після введення у місця рестрикції фрагментів гетерогенної ДНК, утрачає раніше властиву їй здатність забезпечувати стійкість до тетрацикліну бактерій, що містять цю плазміду. Таке явище називається інактиваційною вставкою, або інсерційною інактивацією; стійкість цих клітин до ампіциліну зберігається. Використовуючи ознаки стійкості до ампіциліну й чутливості до тетрацикліну, роблять ідентифікацію і відбір клонів. Чутливість до тетрацикліну й ампіциліну зберігають ті бактеріальні клітини, у які плазміда pBR322, що несе гени стійкості до названих антибіотиків, не змогла вбудуватися. Клітини, у які проникла плазміда pBR322, але не мала вставки фрагмента чужорідної ДНК, стійкі і до тетрацикліну, і до ампіциліну. Стійкість до обох антибіотиків зберігають також клітини, що містять плазміду з вставкою фрагмента ДНК у ділянці рестрикції, утвореній після обробки плазміди рестрикційною ендонуклеазою EcoRI.

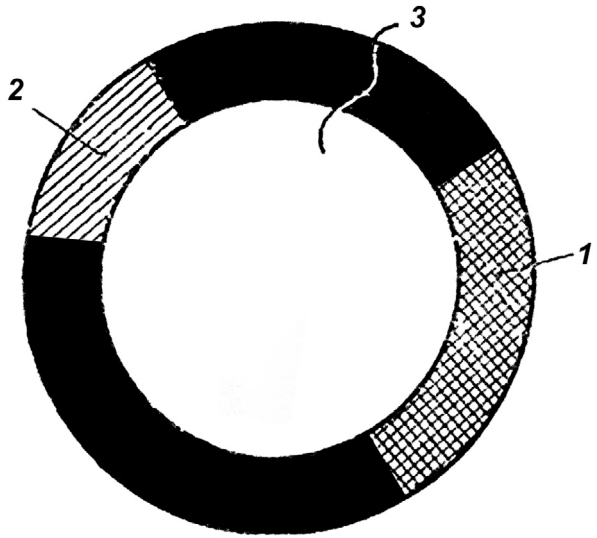


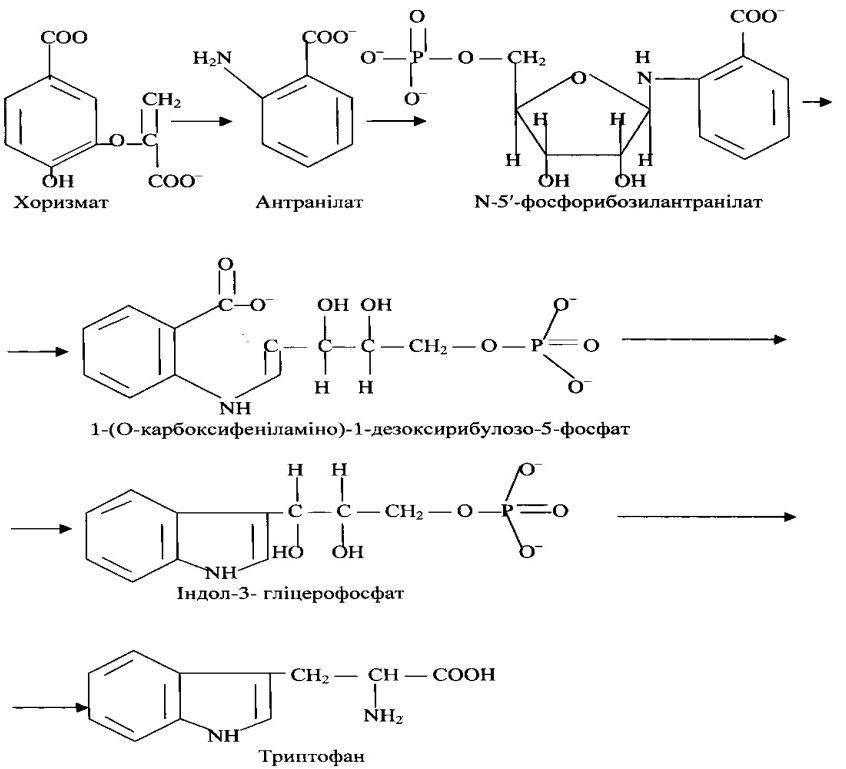
Рис. 5.3. ***Схематична карта плазміди pBK322*** *(за Страйєром Л., 1985):*
1 — ген стійкості до тетрацикліну; 2 — ген стійкості до ампіциліну;
3 — місце дії рестриктази EcoKI.

Проведені обчислення показують, що тільки один з 180 тис. клонів може містити унікальний еукаріотичний ген. Присутність цього гена в одній бляшці фага λ можна установити радіоавтографічним методом за допомогою радіоактивної молекули РНК чи ДНК. Продуктивність радіоавтографічного методу досить велика: протягом дня можна перевірити близько 1 млн клонів. Потрібно ще раз наголосити, що ідентифікація і добір шуканих клонів методом радіоавтогрїафії можливі за наявності раніше клонованих генів, які є родинними до генів, що розшукуються, чи транскрибованих з цього гена РНК *(Страйєр Л., 1985)*. Для тих випадків, коли описаний підхід виявляється неприйнятним, використовуються інші прийоми, засновані на створенні специфічного тесту, що дозволяє ідентифікувати і відібрати клон, котрий є носієм необхідного гена.

Отримані в результаті розщеплення рестриктуючими ендонуклеазами сумарної ДНК еукаріотичних і прокаріотичних організмів фрагменти, що містять гени, які кодують той чи інший

білок, можуть бути використані для вбудовування їх у вектори і створення рекомбінантних, чи гібридних ДНК. Бактеріальні гени, які беруть участь в утворенні рекомбінантних молекул, вбудовані у вектори в складі фрагментів ДНК, можна змусити експресуватися. Так, у фрагменті ДНК, отриманому при дії рестриктази на геномний матеріал E.coli, виявився триптофановий оперон. Його клонування у складі рекомбінантної молекули ДНК, яка складається з фрагмента ДНК із триптофановим опероном і плазмідного вектора ColEI, приводить до експресії.

У триптофановому опероні встановлена наявність п'яти генів, що кодують біосинтез п'яти ферментів, які беруть участь в утворенні з хоризмата через такі проміжні з'єднання, як антранілат, N-5′-фосфорибозилантранілат, 1-(О-карбоксифеніламіно)-1-дезоксирибулозо-5-фосфат, індол-3-гліцерофосфат критичної незамінної амінокислоти триптофану:



Концентрація ферментів, кодованих генами триптофанового оперона, що входить до складу плазмідного вектора ColEI, приблизно в 20 разів перевищує їхній уміст, синтезований у звичайних клітинах E.coli. Це пов'язано з тим, що кількість гібридних молекул плазміди ColEI у клітині E.coli може досягати кількох десятків копій. Зазвичай в бактеріальній клітині близько 25 копій плазміди ColEI, а при дії на бактерію антибіотиком хлорамфеніколом кількість плазмід ColEI збільшується, досягаючи 1000 копій. Механізм дії хлорамфеніколу зводиться до блокування процесів біосинтезу білка і реплікації хромосоми бактеріальної клітини; реплікація ДНК плазміди ColEI у присутності антибіотика не порушується.

Загальною властивістю коліциногенних плазмід, у тому числі і ColEI, є відсутність чіткого контролю їхньої реплікації. Є приклади, які свідчать про можливість експресії в бактеріальній клітині генів, взятих із дріжджів. Так, мутант E.coli, що потребує для свого росту збагаченого гістидином живильного середовища, ставав незалежним від екзогенних надходжень цієї амінокислоти при трансформації ауксотрофної клітини рекомбінантною ДНК, що складається з фрагмента дріжджової ДНК і фага λ. Підтвердженням того факту, що ген, який кодує фермент імідазолілгліцеролфосфатдегідрогеназу, вставлений у фаг λ у складі фрагмента дріжджовий ДНК, експресувався, є перетворення мутанта E.coli у незалежну від зовнішніх надходжень гістидину клітину. Що стосується генів ссавців, є дані, за якими бактерії не здатні експресувати еукаріотичні гени, що містять інтрони. Як вже зазначалося, на відміну від прокаріот еукаріотичні гени не є безперервними структурами.

У зв'язку з цим молекула, що утворилася в результаті транскрипції РНК (первинний транскрипт), перш ніж опинитися в цитоплазмі, проходить стадію дозрівання (процесинг), під час якого синтезована молекула РНК ферментативним шляхом розщеплюється на окремі фрагменти. Деякі з отриманих фрагментів з'єднуються між собою (сплайсуються), а велика частина нуклеотидних послідовностей під час процесингу елімінується з первинного транскрипта. В результаті з первинного транскрипту виходить іРНК. Однак у бактеріальній клітині,

очевидно, відсутні можливості для забезпечення процесингу первинного транскрипта. Тому, якщо навіть припустити, що еукаріотичний ген експресується у бактеріальній клітині, то отриманий у результаті трансляції недозрілої іРНК білок не буде ідентичний тому, що міг утворитися в результаті експресії цього ж гена в еукаріотичній клітині.

Вихід з положення, що створилося, може бути досягнуто таким чином, якщо при конструюванні рекомбінантних молекул у плазмідний чи вірусний вектор вбудовувати фрагмент еукаріотичній ДНК, комплементарний зрілій іРНК. Практичне рішення цього питання стало можливим після того, як була встановлена зворотна транскрипція іРНК за допомогою ферменту ревертази (зворотної транскриптази). Зворотна транскриптаза кодується геном РНК-вмісних вірусів, що ініціюють пухлинний ріст.

Для вирішення питань молекулярної біології і генетичної інженерії зворотну транскриптазу в основному одержують з вірусу мієлобластозу птахів. Важливою властивістю зворотної транскриптази є її здатність синтезувати на матриці іРНК комплементарний ланцюг ДНК і створювати на цьому ланцюзі ДНК шпилькоподібну структуру, що іншим ферментом — ДНК-полімеразою — використовується як відпал при синтезі іншого ланцюга ДНК. Варто звернути увагу і на той факт, що зворотна транскриптаза кодується не тільки геномом РНК, який містить віруси, що ініціюють пухлинний ріст, але виявляється і в нормальних клітинах миші і людини, де вона виконує, швидше за все, певну нормальну функцію.

Штучно синтезована на матриці, яка пройшла стадію процесингу, іРНК — копія дволанцюгової комплементарної ДНК (кДНК) містить безперервну генетичну інформацію, тобто є безінтронним штучним геном. Кодована ділянка гена яєчного альбуміну (овальбуміну) складається з восьми окремих ділянок, розділених інтронами, які розташовані у різних місцях геному. Овальбумінова іРНК, нуклеотидна послідовність якої розшифрована, містить всю інформацію про овальбумін, який складається з 387 амінокислотних залишків. Зворотною транскрипцією овальбумінової іРНК отримана кДНК, у результаті експресії якої у складі рекомбінантної ДНК у клітинах E.coli утворюєть-

ся близько 1,5 % овальбуміну; значна частина його виділяється з клітини.

Прикладом одержання необхідного для клонування безінтронного гена може слугувати процес створення кДНК на матриці іРНК препроінсуліну — попередника функціонально активного гормона інсуліну. Було відомо, що в клітинах інсулінома (пухлини підшлункової залози) синтезується велика кількість інсуліну, і що клітини цієї пухлини містять порівняно високу концентрацію іРНК препроінсуліну, у який під час процесингу вилучені інтрони. Експресія рекомбінантної ДНК, створеної вбудовуванням в плазмідний вектор кДНК, що кодує безінтронну іРНК препроінсуліну в клітинах E.coli, дозволила дати відповідь на два питання, що цікавили дослідників. По-перше, була доведена можливість експресії генів ссавців у бактеріальних клітинах. По-друге, біотехнологічний спосіб одержання інсуліну для задоволення потреб практичної медицини виявився більш рентабельним порівняно з раніше розробленим методом хімічного синтезу.

Якщо відома амінокислотна послідовність білка (виробництво його передбачається налагодити на біотехнологічній основі), одночасно з генетичним проводиться хіміко-ферментативний синтез гена за методикою, в основу якої покладені розробки лауреата Нобелівської премії Корани Г. (1969). Для цього олігонуклеотидні послідовності синтезуються хімічним шляхом, а потім за допомогою ферменту лігази з'єднуються між собою, у результаті чого виходить нуклеотидна послідовність ДНК, що кодує біосинтез білка проінсуліну.

Процес синтезу генів, що кодують білки невеликих розмірів, хіміко-ферментативним шляхом можна значно прискорити, використовуючи для цієї мети «генні машини» (рис. 5.4), у яких синтез специфічних послідовностей ДНК автоматизований.

Послідовність основ, що відповідає послідовності амінокислот білка, біотехнологічний синтез якого необхідно здійснити, вводиться на клавішний пульт керування. Через клапани, що відкриваються за допомогою мікропроцесора, у синтезуючу колонку за допомогою помпи подаються необхідні для процесу синтезу компоненти. Дрібні кремнієві намистинки, якими наповнена колонка, використовують як тверду основу, на якій

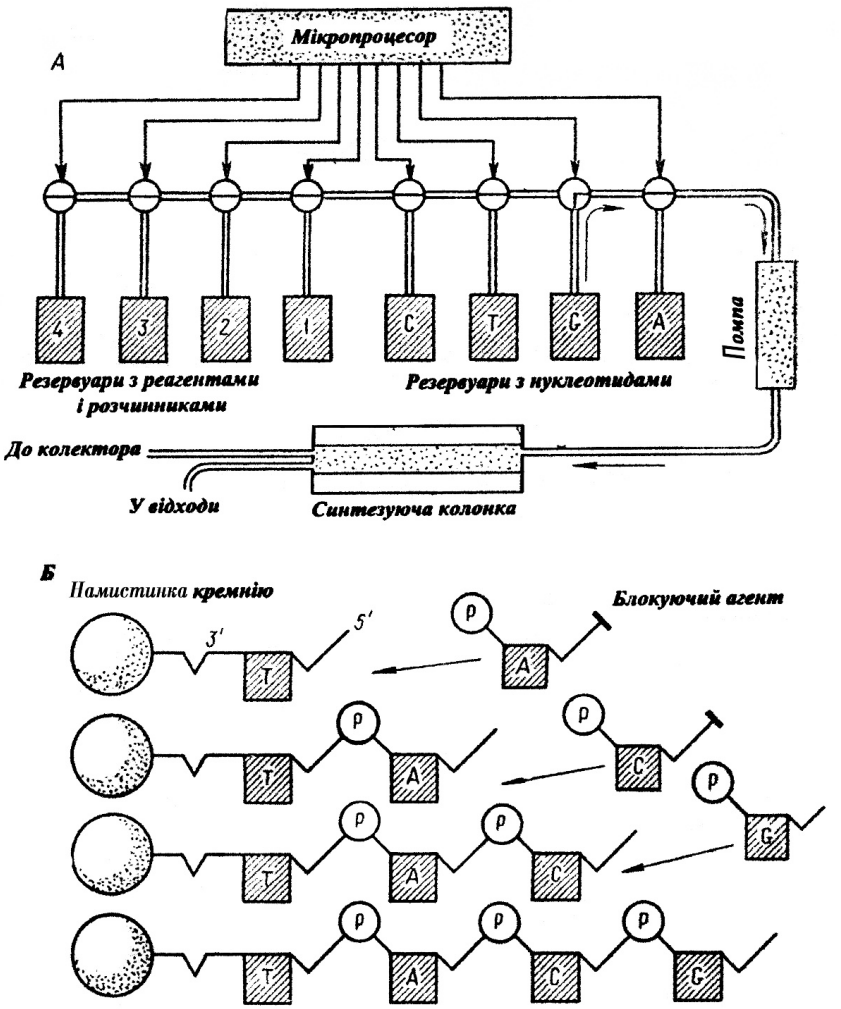


Рис. 5.4. ***Схема «генної машини»***
(за Хопвудом Д., 1984)

здійснюється створення полінуклеотидної послідовності (Б). Перед заповненням синтезуючої колонки намистинками до них попередньо приєднують нуклеотиди (Т), 5′-кінець яких залишається вільним. Введена в колонку за участю мікропроцесора наступна порція нуклеотиду (А), у якого 5′-кінець захищений від небажаних взаємодій блокуючим агентом, своїм 3′-положенням реагує з 5′-кінцем нуклеотиду, прикріпленого до намистинки. Перш ніж вступити в реакцію з наступним нуклеотидом (С), 5′-кінець щойно приєднаного нуклеотида А звільняється від блокуючого агента, що створює необхідні умови для приєднання нового нуклеотида G. За допомогою «генної машини» синтезуються ланцюги довжиною до 40 нуклеотидів зі швидкістю один нуклеотид за 30 хв. Готові послідовності одноланцюгової ДНК відщіплюють від намистинки і вимивають у колектор *(Хопвуд А., 1984)*. Для експресії синтезованого хіміко-ферментативним шляхом гена його разом з ділянками, що забезпечують активність цього гена, переносять у плазмідний вектор. Потім створену рекомбінантну молекулу ДНК трансформують у бактеріальні клітини й одержують штам, що продукує проінсулін, з якого виробляють інсулін. Таким способом був отриманий комерційний препарат інсуліну в США і в Інституті біоорганічної хімії АН СРСР під керівництвом академіка Овчинникова Ю.А.

Клонування синтетичної ДНК зазвичай здійснювали шляхом вбудовування у векторну ДНК дволанцюгових фрагментів, у яких обидва ланцюги були синтезовані хімічним або хіміко-ферментативним шляхом, або один з ланцюгів був отриманий ферментативним способом.

В Інституті цитології і генетики СВ АН СРСР була доведена принципова можливість клонування одноланцюгової синтетичної ДНК без додаткової збірки другого комплементарного ланцюга. Для клонування автори використовували одноланцюговий полінуклеотид, що складається з 93 нуклеотидних ланок і включає в себе лідерну послідовність гена людського фібробластного інтерферону. Спочатку хімічним способом синтезували три полінуклеотидних фрагменти, які складаються відповідно з 15, 38 і 43 нуклеотидних ланок. Потім ці фрагменти були з'єднані між собою. Сутність методу полягає в тому, що полінуклеотидний ланцюг збирається шляхом лігазної зшивки синте-

тичних фрагментів на коротких комплементарних цим фрагментам олігонуклеотидних «підкладках», чи «штифтах», що не є суцільним комплементарним ланцюгом.

Вбудовування 93-ланкового полінуклеотиду в плазміду pBR327, яку попередньо гідролізували рестриктазами EcoRI і HindIII, проводили в присутності олігонуклеотидів, що складаються з 20 і 16 нуклеотидних ланок і комплементарних відповідно 5′- і 3′-кінцям цього 93-ланкового полінуклеотиду. Олігонуклеотид, що складається з 16 ланок, використовувався як «штифт» при лігазній зшивці 93-ланцюгового полінуклеотиду з плазмідним вектором.

Цей метод при повному хімічному синтезі однієї з ланцюгів клонованої ДНК усував необхідність у синтезі другого комплементарного ланцюга. Отже, заощаджуються праця, час і реактиви, необхідні для забезпечення синтезу та лігазної зшивки другого ланцюга.

5.1.5. Експресія еукаріотичних генів у клітинах прокаріот

Наступна проблема, яка виникає у дослідників при вирішенні фундаментальних питань генетичної інженерії, — домогтися експресії еукаріотичного гена в чужорідному оточенні прокаріотичної клітини організму, найчастіше E.coli. Для цього одержаний і вже клонований ген, що підлягає експресії, ферментативним впливом елімінують з вектора, у складі якого він був клонований, і піддають певній модифікації. Такі складні додаткові маніпуляції необхідні в зв'язку з тим, що сигнали для транскрипції і трансляції в прокаріотичних і еукаріотичних організмів розрізняються. Крім того, ні кДНК, ні синтезований хімічним шляхом ген не містять у своєму складі промотору й інших сигналів, потрібних для експресії генів у бактеріях.

Так, до складу генів ссавців входять такі нуклеотидні послідовності, що виконують регуляторну функцію тільки в «рідних стінах», тобто у складі еукаріотичної клітини. Вихід з цього складного становища полягає в тому, що штучний еукаріотичний ген вбудовують у структурний ген вектора прокаріотичної клітини в місці, де прокаріотичні сигнали регуляції сприятимуть експресії еукаріотичного гена. Якщо еукаріотичний ген містить власні регуляторні нуклеотидні послідовності, їх замі-

няють на регуляторні послідовності із бактеріальних клітин. Потім рекомбінантну ДНК з модифікованим еукаріотичним геном трансформують у придатні чужорідні прокаріотичні клітини, найчастіше E.coli.

При експресії чужорідних генів синтезовані ними білкові продукти часто сприймаються клітинним оточенням як невласні речовини і тому розщеплюються ферментами клітини-хазяїна. Для подолання цієї перешкоди клітину-хазяїна перебудовують за допомогою добору мутантних форм, з яких еліміновані відповідні протеази. У зв'язку з цим нові для клітини речовини сприймаються її внутрішньоклітинним умістом як власні продукти.

Наступне завдання полягає в тім, щоб інтенсифікувати процес експресії клонованого гена. При цьому слід зазначити, що еволюція мікроорганізмів проходила в напрямку удосконалення механізмів, що забезпечують їхнє виживання і відтворення. За природного добору мікроорганізми досить добре пристосувалися до середовища існування і до конкуренції з іншими видами. Що стосується добору мікробних клітин за їх здатністю до виробництва потрібних для людини (та ще й у величезних кількостях) речовин, то в природних умовах еволюція мікроорганізмів у такому напрямку, зрозуміло, не відбувалася. Тому перед генетичною інженерією поряд з іншими порушено й успішно вирішується питання конструювання таких штамів мікроорганізмів, які мають здатність виробляти хоча й звичайний для них продукт, але в зовсім незвичних кількостях. Крім того, як уже було відзначено, конструювання рекомбінантних молекул ДНК призвело до синтезу таких речовин, що не були раніше метаболітами цієї клітини (рис. 5.5).

Використання методів і прийомів молекулярної біології та генетичної інженерії, за допомогою яких доведена принципова можливість біосинтезу мікробними чи дріжджовими клітинами дуже потрібних речовин з погляду забезпечення потреб людини не можна вважати біотехнологією. Наріжним каменем біотехнології є виробництво біологічно активних речовин для задоволення потреб охорони здоров'я, а також галузей агропрому в таких обсягах і за такою собівартістю, яка дозволила б виготовленій біотехнологічній продукції бути конкурентоспроможною. Так, на початкових етапах розробки біотехнології

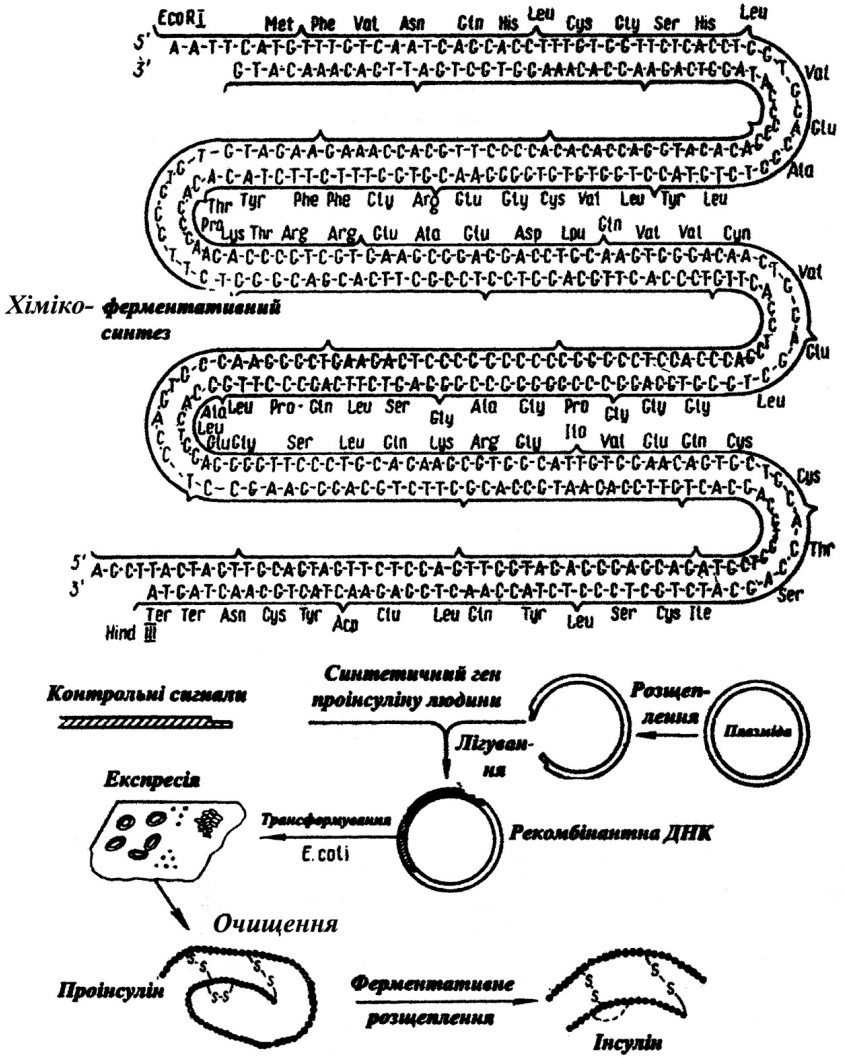


Рис. 5.5. ***Схема мікробного синтезу інсуліну людини*** *(за Овчінніковим Ю.А., 1986)*

мікробного виробництва інсуліну бактеріальні клони, трансформовані інсуліновою кДНК, синтезували попередник інсуліну в незначній кількості — близько 100 копій білка на одну мікробну клітину. Однак уже тоді вважали, що комерційний стимул до виробництва інсуліну людини, а також гормону росту й інтерферону в стані здолати труднощі, що виникають на шляху організації виробництва цієї й іншої біотехнологічної продукції в необхідному обсязі.

Експресія структурних генів, як зазначено раніше, що включає етап транскрипції (синтез іРНК, комплементарній відповідній матриці ДНК) і трансляції (побудова білкової молекули на іРНК-матриці в рибосомах), контролюється послідовностями основ, приєднаних до ділянки структурного гена. Це коротка промоторна ділянка, що знаходиться від місця ініціації на відстані приблизно 10 і 35 пар основ, має підвищену спорідненість з РНК-полімеразою і сприяє переміщенню ферменту уздовж ДНК-матриці, ініціюючи транскрипцію ДНК у місці, що прилягає до кодуючої послідовності структурного гена. На кінці структурного гена знаходиться ділянка термінації, у якій РНК-полімераза припиняє процес транскрипції.

У деяких генах біля промотору розташовуються додаткові нуклеотидні послідовності, хімічно споріднені з білком, взаємодія яких зі згаданими ділянками ДНК зумовлює їхні регуляторні функції. Так, між промотором і структурним геном знаходиться операторна ділянка. З нуклеотидами, що формують операторну ділянку, за наявності в клітинному середовищі певних метаболітів, взаємодіє білкова речовина, яка кодується нуклеотидною послідовністю ДНК. Ця білкова речовина називається респресором, а ділянка ДНК, що кодує цей білок, — геном-регулятором.

Регуляція експресії на стадії трансляції здійснюється за допомогою нуклеотидних послідовностей, що входять до складу іРНК. Так, у іРНК є спеціальна ділянка, яка представлена відповідною нуклеотидною послідовністю і до якої приєднується рибосома таким чином, що процес трансляції завжди починається з першого кодону (AUG-кодон, чи стартова ділянка), а закінчується стоп-кодоном (UAA-нуклеотидна послідовність), що зумовлює відокремлення синтезованого поліпептидного ланцюга.

Підвищення ефективності експресії генів і збільшення кількості продуктів, синтез яких контролюється цими генами, досягається за допомогою методів генетичного програмування. Навіть незначні зміни послідовності нуклеотидів у промоторі здатні збільшити хімічну спорідненість РНК-полімерази до цієї ділянки ДНК і підвищити швидкість транскрипції. Істотне збільшення швидкості транскрипції може бути досягнуто і за рахунок змін послідовності нуклеотидів в ділянці оператора й у гені-регуляторі, внаслідок чого білок-репресор не зможе вступити у взаємодію з операторною ділянкою ДНК і загальмувати синтез іРНК. Варто також враховувати залежність активності синтезованого ферменту від амінокислотної послідовності його поліпептидного ланцюга.

У зв'язку з цим фермент, що характеризується низькою хімічною спорідненістю до свого субстрату, набуває здатності вступати у взаємодію майже з кожною молекулою перетворюваної ним речовини. Можлива також втрата хімічної спорідненості до одних і придбання спорідненості до інших субстратів, що мають іншу будову. У цьому випадку причиною зміни послідовності амінокислот у білку-ферменті є відповідні зміни послідовності нуклеотидів в кодуючій ділянці структурного гена, внаслідок заміни, втрати чи вставки пари азотистих основ чи невеликих ділянок ДНК. Передбачається, що подібні зміни є наслідком помилок, які виникають при реплікації і передаються спадково з покоління в покоління.

Частота таких помилок (спонтанних мутацій) украй низька. Імовірність одноразової зміни однієї пари основ може відбутися за 10 мільйонів актів реплікації. Фізичні фактори (наприклад, ультрафіолетове випромінювання, іонізуюча радіація й ін.) та деякі хімічні речовини можуть підвищити частоту мутації не менш ніж у 1000 разів. Однак мутагенні фактори впливають на гени і викликають мутації за принципом випадковості. Технологія рекомбінантних ДНК підвищує точність традиційних підходів; вона дозволяє замінити непередбачуваність звичайного мутагенезу мутацією певних ділянок у визначених генах.

Перебудовуються гени за рахунок зміни нуклеотидних послідовностей ДНК за допомогою локалізованого мутагенезу; один з рестрикційних фрагментів клонованого гена замінюєть-

ся фрагментом із внесеними в нього змінами. Крім цього, розроблена методика заміни нуклеотидної послідовності, що міститься у гені, на нову чи просто додавання нових ділянок ДНК, які за своїм походженням є синтезованими поза організмом фрагментами ДНК.

Розроблено прийоми маніпулювання не тільки оліго- чи полінуклеотидними послідовностями, але й окремими нуклеотидами, що приводить до мінімальних змін гена (точкові мутації). Змінені тим чи іншим шляхом гени вводяться потім у природне для них біологічне середовище.

У зв'язку з модифікацією генів змінюються кількісні і якісні показники експресії. Наприклад, отримані штами Brevibacterium flavum і Sorynebacterium glutamicum перетворюють на лізин понад 33 % цукру, у результаті чого концентрація цієї критичної амінокислоти в живильному середовищі досягає 7,5 %; промислові штами Penicillium chrysogenum і Streptomyces aureofaciens синтезують понад 20 г пеніциліну і тетрацикліну з розрахунку на 1 л живильного середовища (продуктивність диких штамів знаходиться на рівні декількох міліграмів); більш ніж у 500 разів вдалося збільшити за допомогою рекомбінантних молекул ефективність функціонування E.coli у процесі біосинтезу ДНК-лігази.

Модифікація керуючих біологічною системою генів супроводжується зміною взаємозв'язків, що раніше існували у цій системі. Так, білок, що транспортується у визначений компартмент клітини, після відповідної модифікації гена, що кодує біосинтез цього білка, може змінити цей відсік на інший; модифікація нуклеотидної послідовності гена може призвести до того, що сигнали, які регулюють його експресію до перебудови, замінюються на стимули, що мають іншу хімічну будову.

Мікроорганізми, що містять рекомбінантні молекули ДНК із модифікованими тим чи іншим шляхом генами, уже використовуються чи будуть використовуватися у недалекому майбутньому для великомасштабного виробництва цінних речовин. Це інтерферон (універсальний противірусний засіб і, можливо, засіб для боротьби зі злоякісним ростом); ренін (використовується у виробництві сиру з молока); фактор некрозу пухлин (у терапевтичних цілях застосовується при ракових захворюваннях);

целюлаза (фермент призначається для гідролізу рослинної целюлози й одержання в-глюкози); пептидні антигени вірусів, що є складовими компонентами в конструюванні нових безпечних вакцин; інсулін (при захворюванні на цукровий діабет); урокіназа і плазміноген (використовуються для розчинення тромбів); соматотропін (застосовується з лікувальною метою при карликовості, опіках, кісткових переломах); соматостатин (гальмує секрецію соматотропіну, інсуліну і глюкагону); ДНК-лігаза (широко використовується в генетичній інженерії).

Розроблені молекулярними біологами методи і прийоми конструювання рекомбінантних молекул ДНК, клонування і модифікації генів, з одного боку, є підґрунтям, на якому створюється будинок біотехнології; з іншого — за допомогою цих методів і прийомів вирішуються фундаментальні питання біології, що надалі будуть використані в прикладних цілях. Так, за допомогою методу клонування вивчаються такі фундаментальні питання біології, як функціонування гена і регуляція цієї функції, проводиться визначення послідовності нуклеотидів; завдяки клонуванню генів можна одержати в достатніх кількостях і в чистому вигляді основні макромолекули біологічних систем, що дозволяє заощаджувати матеріальні ресурси, а також сили і час дослідника.

Метод клонування генів дозволяє одержати в необмеженій кількості ДНК для електронно-мікроскопічних досліджень, вивчення специфічних ділянок ДНК, які обумовлюють рухливість генів, реплікацію і транскрипцію ДНК, порівняно швидко провести картування складних хромосом і поділ їх на окремі фрагменти, що піддаються змінам.

Створено широкі можливості для вивчення структури РНК, процесів її дозрівання (вирізання інтронів з первинного транскрипта і наступне ферментативне зшивання кінців за допомогою лігази). Доцільно ще раз наголосити, що в прокаріотичних клітинах процесинг (дозрівання) не розповсюджений; у клітинах еукаріот усі види РНК містять інтрони, які під час дозрівання рибонуклеїнових кислот вирізаються, а утворені при цьому кінці зрощуються (сплайсинг).

Розкриття біохімічних механізмів процесингу лежить в основі розуміння функціонування генів. За допомогою клонуван-

ня стали можливими широкомасштабні дослідження з конкретизації функцій різноманітних білків. Клонування дозволяє модифікувати гени і кодовані ними білки, що призводить до зміни функцій останніх, а отже, і зв'язків між компонентами біологічної системи.

Метод клонування генів вносить істотний вклад в історію еволюційного розвитку. Шляхом клонування генів і наступної розшифровки їх нуклеотидних послідовностей удається відтворити зміни, що відбулися в клітинах організмів, які нині живуть. Аналіз нуклеотидних послідовностей клонованих фрагментів ДНК за допомогою розроблених досить складних комп'ютерних програм дозволяє з великою точністю установити ступінь еволюційного споріднення.

Така властивість нуклеотидних послідовностей, як консервативність (сталість у часі), з успіхом використовується молекулярними біологами для вирішення прикладних задач. Так, нуклеотидні послідовності, характерні для вірусів (онкогенів), які викликають ракову хворобу, виявлені в ДНК дріжджів. Це відкриття свідчить про роль цих генів у забезпеченні життєдіяльності одноклітинних організмів, яку вони відігравали задовго до появи на Землі багатоклітинних форм. З іншого боку, можливість тонкого експериментування з дріжджовими клітинами (поки недосяжна для багатоклітинних організмів) з наступною екстраполяцією отриманих даних на клітини ссавців є значним внеском у розвиток знань про молекулярні механізми раку.

Клонування варіантів генів, що зумовлюють схильність їхніх носіїв до серповидно-клітинної анемії, атеросклерозу, раку, гемофілії і багатьох інших захворювань обміну, відкриває можливість точної діагностики генетичної схильності до цих патологічних процесів і вишукування способів відновлення дефектних генів у їхніх носіїв і нащадків. Уведення недефектних варіантів клонованих генів у клітини, наприклад кісткового мозку чи шкіри, дозволяє послабити прояв генетичних захворювань чи усунути їх зовсім. Розробка способу введення недефектних клонованих генів у статеві клітини дозволить уникнути можливості передачі генетичних порушень нащадкам. Вже отримані еукаріотичні гени, біологічна активність яких реалізується не

тільки при введенні їх у бактерії, але й в еукаріотичні клітини. Клонований ген β-глобіну кролика за допомогою вірусу SV40, використаного як вектор, був перенесений у клітини нирок мавпи, де в результаті його експресії вдалося одержати значну кількість β-глобіну кролика. Цей приклад підтверджує можливість усунення генетичних дефектів, а також показує, наскільки такий підхід перспективний для розшифровки регуляторних механізмів експресії генів еукаріотичних організмів.

5.1.6. Перспективи і проблеми біотехнології клонування генів

Такі методи генетичної інженерії, як конструювання рекомбінантних молекул ДНК і клонування генів, стали звичайними прийомами дослідження у молекулярній біології. За їхньою допомогою вдалося вирішити ряд фундаментальних проблем біології, а також виконати багато розробок, що знайшли широке застосування в біотехнології. Слід зазначити, що потенційні можливості методів конструювання рекомбінантних ДНК і клонування генів для вирішення як теоретичних, так і практичних питань ще не вичерпані. Однак з'явилися серйозні побоювання непередбачуваності поводження рекомбінантних молекул ДНК, трансформованих у кишкові палички. У зв'язку з цим спеціально створена комісія Національної академії наук США опублікувала Звернення, підписане видатними вченими, які висловлювали побоювання щодо росту кількості ракових захворювань, особливо в тих випадках, коли в генетичних експериментах як вектор використовувався онкогенний вірус мавп SV40. Ці побоювання, як і побоювання стосовно масового поширення маркірованих трансформованих штамів кишкової палички, не підтвердилися, але були запропоновані заходи безпеки, аналогічні тим, як і при роботі зі збудниками інфекційних захворювань.

У лабораторіях, де дозволені дослідження з застосуванням методів генетичної інженерії, заходи безпеки залежно від рівня їхньої надійності розподілені на чотири категорії, а самі експерименти щодо небезпеки розділені на три ступені. Чим більше небезпека при конструюванні рекомбінантних ДНК і клонуванні генів, тим надійнішими і жорсткішими мають бути заходи, що

забезпечують безпеку цих робіт. Досліди щодо введення в бактерії рекомбінантних ДНК, одержаних із фрагментів геномної ДНК теплокровних тварин і ДНК відповідних векторів, повинні проводитися в спеціальних ізольованих приміщеннях (боксах) з негативним атмосферним тиском у них, у стерильному одязі. Працювати рекомендується з ослабленими штамами бактерій і вірусів (наприклад, з мутантами фага λ і кишкової палички, які не розмножуються при температурі тіла теплокровних тварин і людини, а також з такими штамами E.coli, що втратили здатність до синтезу диамінополімелінової кислоти, яка входить до складу стінки бактеріальної клітини. Запобіжні заходи значно посилюються, коли бактеріальну клітину трансформують рекомбінантними ДНК, що містять гени, експресія яких супроводжується процесом токсиноутворення. Хоча є докази нездатності лабораторних штамів E.coli витримувати конкуренцію з бактеріями цього виду, що знаходяться у природному середовищі (кишечник людини і тварин), рекомендовано створювати і використовувати в роботі тільки такі клітини-хазяї, імовірність виникнення яких за межами лабораторії складає 10^{-8}. Проводяться роботи зі створення модифікованих векторів, реплікація яких є термолабільним процесом (температура тіла теплокровних тварин і людини є лімітуючим чинником реплікації), а також векторів, у яких система ферментів, що забезпечують рестрикцію і модифікацію, була б представлена відповідно термостабільною рестриктазою і термолабільною метилазою. У такому випадку вектор, потрапляючи в організм теплокровної тварини або людини, має зруйнуватися.

Рівень розвитку молекулярної біології вже сьогодні дозволяє проводити дослідження з ідентифікації генів, що впливають на статуру, розвиток інтелекту і здібностей. Небезпека в тім, що гуманні спроби виправлення очевидних генетичних дефектів можуть перерости в амбіційні плани поліпшення генетичного матеріалу людини.

Друге коло проблем пов'язане зі з'ясуванням причин можливих змін сформованих взаємин в екологічних системах з появою організмів — носіїв функціонально активних змінених генів. Наводяться переконливі аргументи, які свідчать про те, що імовірність появи екологічних порушень незначна, тому що

організми, у яких відбулися генетичні зміни, мають меншу життєздатність порівняно зі спорідненими організмами, у яких генотип не мав змін через утручання генетичних інженерів. Хоча авторитетні дослідники подейкують про безпеку генетичних маніпуляцій для екосистем, можливість порушення не виключена. Біологи, подібно до фізиків 40 років тому, переступили межу, за якою їхня діяльність залишалася поза категоріями добра і зла.

Контрольні питання

1. Які практичні проблеми сільськогосподарського виробництва можна вирішити і вже вирішуються за допомогою методів генетичної інженерії?
2. Що було підґрунтям становлення технології одержання рекомбінантних ДНК і клонування генів?
3. Що таке рекомбінантна ДНК?
4. Яка роль рестрикційних ендонуклеаз у технології одержання рекомбінантних ДНК?
5. Як слід розуміти поняття «експресія гена»?
6. Які особливості експресії генів ссавців?
7. Механізм експресії гена.
8. Регулювання експресії гена.
9. Особливості будови ДНК-векторів.
10. Які вектори переважно використовуються для перенесення генетичної інформації?
11. Що таке інтрони?
12. Що являють собою транспозони?
13. У чому полягає роль транспозонів?
14. Механізм переміщення транспозонів у геномі.
15. У якій послідовності здійснюється конструювання рекомбінантної ДНК?
16. Якими методами досягається з'єднання молекул ДНК?
17. Як здійснюється з'єднання фрагментів ДНК і ДНК-вектора?
18. Які є ферменти рестрикції?
19. Які послідовності нуклеотидів гідролізують рестриктази? Навести приклади.

20. Назвіть етапи клонування молекул рекомбінантної ДНК.
21. Що таке клон?
22. Як проводиться ідентифікація клонів?
23. За якою ознакою проводиться ідентифікація клонів?
24. Що є основою для відбору клонів?
25. Як проводиться відбір клонів?
26. Які біохімічні реакції відбуваються в процесі дозрівання інформаційної РНК?
27. Що означає зворотна транскриптаза та які властивості цієї сполуки?
28. Яка роль ферменту зворотної транскриптази у генній інженерії?
29. Чи є в генах-копіях інтрони?
30. Що являють собою «генні машини»?
31. З якою метою використовуються «генні машини»?
32. Механізм функціонування «генної машини».
33. В чому полягає особливість експресії еукаріотичного гена у чужорідному оточенні прокаріотичної клітини?
34. Які етапи включає експресія структурних генів?
35. Які функції промотору?
36. Що таке репресор та ген-регулятор?
37. Якими методами можна досягти підвищення ефективності експресії генів?
38. Як досягається збільшення кількості продуктів, синтез яких контролюється певними генами?
39. Де використовуються мікроорганізми, що містять рекомбінантні молекули ДНК?
40. Яке значення має біотехнологія конструювання рекомбінантних молекул ДНК та клонування генів для фундаментальних досліджень?
41. Значення біотехнології конструювання рекомбінантних молекул ДНК і клонування генів для вирішення народногосподарських питань.
42. Проблеми, які виникають при використання методів генної інженерії?
43. Які є об'єктивні підходи для оцінки екологічної чистоти і безпечності продукції, одержаної методами генної інженерії?

Розділ 6.

ДНК-ТЕХНОЛОГІЇ

ДНК-технології — це один з розділів молекулярної генетики, методи якого базуються на здатності специфічних ферментів-рестриктаз розщеплювати молекули ДНК на окремі фрагменти, які використовуються для упроваджування у геноми плазмід бактерій, фагів з метою одержання гібридних форм, які складаються з власної ДНК і вбудованих фрагментів чужорідної ДНК. Основні методи ДНК-технологій: клонування ДНК, ідентифікація генів, секвенування та синтез олігонуклеотидів, спрямований мутагенез ДНК, експресія синтезованих фрагментів ДНК, технологія одержання рекомбінантної ДНК та введення її у клітини. ДНК-технології дозволяють розробляти науково обгрунтовані програми селекції, виявляти та оцінювати поліморфізм молекул ДНК, досліджувати структуру геному, генофондів, забезпечити створення банків генів. ДНК-технології використовуються для: контролю за якістю сільськогосподарської сировини і продуктів харчування, діагностики інфекційних хвороб, виявлення генетичних (спадкових) захворювань на ранніх стадіях розвитку, дослідження геному на виявлення продуктивних якостей і використання у селекції, створення генетичних паспортів видів сільськогосподарських тварин, порід, таксономічних груп тощо. Сучасні ДНК-технології застосовують для керування потоком генетичної інформації, збереження біорізноманіття, створення нових форм тварин для одержання «біореакторів» (продуцентів, необхідних для людини білків), спрямованого отримання бажаних генотипів (використання стовбурових ембріональних клітинних ліній, трансплантації ядер бластомерів та соматичних клітин у яйцеклітини) та ін. Розвитку ДНК-технологій сприяла їх здатність вирішувати різні проблеми біології, медицини, сільського господарства, екології тощо.

У сучасний період бурхливий розвиток ДНК-технологій відбувається завдяки розробці нових молекулярно-генетичних

методів досліджень. Методи аналізу ДНК засновані на рестрикції, гібридизації та ампліфікації. Рестрикція (restriction — розщеплення) — це процес розщеплення чужорідної молекули ДНК під дією специфічних бактеріальних ферментів-рестриктаз у певних специфічних ділянках, що мають назву сайти (site — ділянка) рестрикції, довжиною від 4–7 до 8–12 пар нуклеотидів. За допомогою рестриктаз макромолекули ДНК розщеплюються на фрагменти від декількох сотень до декількох тисяч пар нуклеотидів. Гібридизація (hybridization) — це здатність комплементарних ланцюгів нуклеїнових кислот утворювати комплекси. Принцип комплементарності використовують для ідентифікації окремих фрагментів ДНК і цілих організмів. Ампліфікація (amplification) — це процес утворення додаткових копій ділянок хромосомної ДНК, які містять певні гени.

Молекулярна біологія базується на принципі генетичного детермінізму. Дослідження на молекулярному рівні структурної організації як генів, так і в цілому геному дозволяє вивчати механізми функціонування генів. Використання молекулярно-генетичних методів дозволило дослідити в першу чергу геном прокаріот. Для молекулярно-генетичного аналізу складного геному еукаріот були необхідні інформативні маркери. Спочатку використовувалися тест-системи для виявлення продуктів генів (білковий поліморфізм), потім на рівні генетичного матеріалу клітин (поліморфізм ДНК). Більш інформативним виявилося використання як маркерів поліморфних послідовностей нуклеотидів ДНК за поліморфізмом довжини рестриктних фрагментів (ПДРФ). Проблема пошуку маркерів на рівні молекул ДНК була практично вирішена, коли відкрили метод ампліфікації фрагментів ДНК за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР).

Полімеразна ланцюгова реакція

Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), яку називають «золотою кулею» діагностики, — один із сучасних високочутливих методів молекулярної біології, який базується на принципі виявлення і багаторазового копіювання (ампліфікації) індивідуальних фрагментів ДНК. Принцип методу ПЛР (Polymerase

chain reaction (PCR)) розроблений Кері Мюллісом зі співробітниками (фірма «Cetus», США) у 1983 р., який за ці роботи у 1993 році одержав Нобелівську премію. Зараз ПЛР широко використовується як для наукових досліджень, так і для діагностики в закладах охорони здоров'я, структурах держсанепіднагляду (генотипування, діагностика генетичних та інфекційних захворювань), ветеринарно-санітарної експертизи (визначення видової належності м'ясних інгредієнтів у складі кормів) та ін.

В основі методу ПЛР лежить природний процес — комплементарна добудова ДНК матриці, яке здійснюється за допомогою ферменту ДНК-полімерази. Ця реакція має назву реплікації ДНК. Природна реплікація ДНК має декілька стадій:

1. Денатурація ДНК (розплетення подвійної спіралі, розходження ниток ДНК).
2. Утворення коротких дволанцюгових ділянок ДНК (затравок, необхідних для ініціації синтезу ДНК).
3. Синтез нового ланцюга ДНК (комплементарна добудова обох ниток).

Цей процес можна використовувати для одержання копій коротких ділянок ДНК, специфічних, наприклад, для конкретних мікроорганізмів, тобто здійснювати цілеспрямований пошук таких специфічних ділянок, що і є метою генодіагностики для виявлення у даному випадку збудників інфекційних захворювань.

Полімеразна ланцюгова реакція, або специфічна ампліфікація ДНК, дає змогу вибірково синтезувати in vitro невеликі ділянки ДНК, які мають розмір від декількох десятків до сотень пар олігонуклеотидів (від грец. Oligos — малий). Тобто ампліфікація — це процес утворення додаткових копій певної нуклеотидної послідовності ділянок хромосомної ДНК. Як матриця можуть використовуватися різні зразки ДНК, що містять послідовність, яку треба ампліфікувати (тиражувати). Таким чином, ПЛР — це багаторазове збільшення кількості копій (ампліфікація) специфічної ділянки ДНК, яке каталізується ферментом — ДНК-полімеразою.

Для проведення ампліфікації необхідні наступні компоненти:

ДНК-матриця (ДНК або її частина, яка містить досліджуваний специфічний фрагмент);

Праймери (від англ. Primer — початковий, основний) — синтетичні олігонуклеотиди (20–30 нуклеотидних пар), які комплементарні послідовностям ДНК у межах специфічного фрагмента. Вибір специфічного фрагмента та підбір праймерів відіграє важливу роль у специфічності проведення ампліфікації, що позначається на якості аналізу.

Суміш дезоксинуклеотидтрифосфатів (ДНТФ) (суміш чотирьох ДНТФ, які є матеріалом для синтезу нових комплементарних ланцюгів ДНК).

ДНК-полімераза. При проведенні ПЛР-аналізу використовують різні ферменти:

Taq-полімераза — термостабільна ДНК-полімераза, яка каталізує подовження ланцюгів праймерів шляхом послідовного приєднання нуклеотидних основ до зростаючого ланцюга ДНК, що синтезується.

Taq-полімераза виділена з термофільної бактерії Thermus aquaticus, яка живе в гарячих джерелах. Фермент стабільний при високих температурах і зберігає високу активність у процесі ампліфікації.

Tth-полімераза, яка виділена з термофільної бактерії Thermus thermophilis. Температурний і pH оптимуми відповідно дорівнюють 75 °С і 9,0. Фермент має ревертазну активність і використовується з РНК-матрицею у реакції синтезу комплементарної молекули ДНК. Для одержання специфічних ділянок геному РНК-вмісних вірусів спочатку отримують ДНК-копію з РНК-матриці шляхом використання реакції зворотної транскрипції (RT), яка каталізується ферментом — ревертазою (зворотною транскриптазою).

Pwo-полімераза, яку отримують з термофільної бактерії Pyrococcus woesei. Фермент більш термостабільний, ніж Taq- і Tth-полімерази.

Буферний розчин (реакційне середовище, яке містить іони Mg^{2+}, необхідні для підтримки активності ферменту).

Необхідною умовою при ампліфікації є наявність «праймерів» — синтетичних невеличких фрагментів ДНК, які складають-

ся з 20–30 пар нуклеотидних основ. Праймери комплементарні ділянкам (сайтам) відпалу на ідентифікованій матричній ДНК.

ПЛР-аналіз відбувається циклами, кожний з яких складається з трьох послідовних стадій, які відбуваються при різних температурах:

1. Денатурація або процес плавлення молекул ДНК (t^o=93–95 ^{o}C). При цьому дволанцюгова форма перетворюється на одноланцюгову, яка стає доступною для праймерів.
2. Відпал — приєднання праймерів, один з яких комплементарний початку одного ланцюга ДНК, а другий — кінцю іншого.
3. Подовження (елонгація) ланцюга ДНК за рахунок приєднання дезоксинуклеотидтрифосфатів за принципом комплементарності. Відбувається за участю ДНК-полімерази термофільної бактерії Thermus aquaticus (Taq-полімерази) при температурі 60–70 ^{o}C. Утворюються дволанцюгові молекули ДНК — точні копії необхідного фрагмента.

Цей триступеневий цикл, у процесі якого утворюються синтезовані фрагменти ДНК-амплікони, повторюється 30–40 разів. З кожним циклом кількість сегментів ДНК, обмежених з обох кінців, що використовуються праймерами, збільшується експоненціально ($C=2^n$, де n — кількість циклів). Вихід інших продуктів збільшується лінійно.

Полімеразна ланцюгова реакція проводиться в термоциклері (ампліфікаторі) — термостаті, в якому автоматично змінюється температурний режим. Наступний етап ПЛР — детекція або виявлення ампліфікованої ДНК. Ампліфіковані специфічні фрагменти ДНК виявляють методом горизонтального електрофорезу в агарозному гелі з барвником (бромистий етидій). Барвник утворює з фрагментами ДНК стійку сполуку, яка проявляється у вигляді смуг, що світяться при опроміненні гелю УФ-випромінюванням при довжині хвилі 290–330 нм. Продукт електрофорезу розглядають в УФ-світлі за допомогою спеціального приладу — трансілюмінатора і фотографують.

ПЛР може бути доповнена рестрикційним аналізом ампліфікованої ДНК, що потрібно для визначення поліморфізму ДНК.

Для лабораторії ПЛР необхідні три ізольовані кімнати з наявністю води і вентиляції. Для попередження контамінації або

потрапляння будь-яким шляхом із зовнішнього середовища в реакційну суміш продуктів ампліфікації, що викликає хибнопозитивні результати, основними видами робіт є підготовка досліджуваних зразків, ампліфікація та детекція продуктів ПЛР, які потрібно ізолювати один від одного і проводити в різних приміщеннях. Робота організовується в одному напрямі: від ПЛР-приміщення до кімнати, де відбувається детекція продуктів полімеразної реакції.

При проведенні ПЛР необхідно одночасно проводити постановки контрольних проб — позитивної і негативної. В пробірку з позитивним контролем вносять препарат, в якому міститься визначена послідовність ДНК. У пробірці з негативним контролем замість досліджуваного зразка ДНК вносять аналогічний об'єм води. Використовують також так званий «внутрішній контроль», при якому в реакційну суміш додають зразок ДНК, який має специфічні сайти приєднання праймерів, але відрізняється за довжиною від очікуваного цільового фрагмента. Виявлення специфічних продуктів ампліфікації внутрішнього контролю — сигнал успішного проходження ПЛР. Якщо продукти ампліфікації внутрішнього контролю не виявляються — реакція за будь-яких причин не відбулася.

Сьогодні велика увага приділяється розробці ПЛР-тест-систем (діагностикумів), які необхідні для виявлення ДНК збудника різних інфекційних хвороб.

Одним з надто складних завдань ветеринарних лабораторій є визначення видової належності м'ясних інгредієнтів у складі комбікормів. В останні роки ця проблема набула великого значення у зв'язку з відкриттям пріонних захворювань сільськогосподарських тварин, які належать до групи губчастоподібних енцефалопатій (ГЕ). З 1996 р. у всіх країнах Євросоюзу введена заборона на згодовування жуйним тваринам м'ясокісткового борошна, яке виготовлене з органів ссавців. Це пояснює важливість визначення видової належності м'ясних інгредієнтів у складі комбікормів.

Значно складніше провести цю ідентифікацію у кормах, які піддавалися термічній обробці (м'ясокістковому та рибному борошні, сухих та консервованих кормах для домашніх тварин). При термічній обробці відбувається денатурація білків і втрата

видової специфічності, у зв'язку з чим імунодифузія в гелі, ізоелектричне фокусування, імуноферментний аналіз, які використовуються для ідентифікації сирого м'яса, в такому випадку непридатні. Є підстави сподіватися, що використання ПЛР-тест-систем, які мають високу чутливість і специфічність, дасть можливість вирішити цю проблему. Прикладом такої тест-системи є розроблена методика для визначення видової належності м'ясних інгредієнтів у складі сумішей.

При розробці тест-системи для визначення видової належності м'ясних інгредієнтів у складі продуктів харчування та кормів використовували наступну схему. Шляхом аналізу нуклеотидних послідовностей були вибрані специфічні олігонуклеотидні праймери, які специфічні до ДНК мітохондріального геному жуйних. Для диференціювання виду жуйних праймери відібрані з урахуванням мультиплексної ПЛР, у якій утворюється два специфічних ПЛР-продукти різної довжини: перший для ДНК великої рогатої худоби — (680 п.н.), а другий — для ДНК дрібної рогатої худоби (350 п.н.). Після цього у препаратах ДНК, які виділені з крові ВРХ, овець, свиней, птиці та м'яса риби, визначається чутливість та специфічність вибраних праймерів. Проведені дослідження дозволили встановити, що коли ІФА дозволяє виявляти домішку м'ясокісткового борошна в рибному борошні тільки в концентрації не менше 50 %, то при проведенні ПЛР-аналізу чутливість зростає і дає можливість визначати вже 1 % домішку. Тобто при виявленні домішок тканин жуйних тварин у складі кормів чутливість ПЛР тест-системи була у 50 разів вищою, ніж при проведенні імуноферментного аналізу.

Використання тест-систем дозволяє запобігти фальсифікації рибного борошна тканинами ссавців, проводити диференціацію видової належності протеїнів у складі кормів для тварин і м'ясопродуктах. Це також має важливе епідеміологічне значення.

Зараз ПЛР — один з основних молекулярно-генетичних методів, які застосовуються в різних галузях:

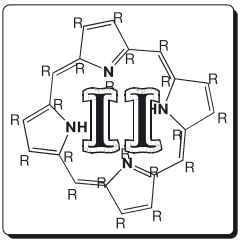
- ✓ тваринництві — це дослідження геному сільськогосподарських тварин на наявність продуктивних якостей для вирішення проблем селекції; діагностика спадкових хвороб тварин; створення генетичних паспортів порід, видів; діагностика

інфекційних захворювань та проведення епізоотологічного моніторингу;

- ✓ у ветеринарній медицині — це діагностика таких хвороб, як сальмонельоз, бруцельоз, лістеріоз, туберкульоз, чума ВРХ, класична чума свиней, хвороба Ауески, лейкоз, стафілококоз, мікоплазмоз, хвороба Марека, хвороба Гамборо, хвороба Ньюкасла, чума м'ясоїдних, вірусний ентерит, реовірусна інфекція, генетичні захворювання та ін;
- ✓ у харчовій промисловості — для визначення наявності різних патогенів у продуктах харчування.

Контрольні питання

1. Назвіть основні етапи ДНК-технологій.
2. Де застосовують сучасні ДНК-технології?
3. Які існують методи аналізу ДНК?
4. Дати визначення процесам рестрикції, гібридизації та ампліфікації.
5. На якому принципі базується полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР)?
6. Який процес покладено в основу методу ПЛР?
7. Назвіть стадії реплікації ДНК.
8. Які компоненти необхідні для проведення ампліфікації?
9. З яких циклів складається ПЛР-аналіз?
10. За допомогою якого методу відбувається детекція або виявлення ампліфікованої ДНК?
11. Вимоги до лабораторій ПЛР.
12. Яка мета проведення постановки контрольних проб при проведенні ПЛР?
13. Як за допомогою методу ПЛР визначають видову належність м'ясних інгредієнтів у складі комбікормів?
14. Використання ПЛР у тваринництві.
15. Використання ПЛР у харчовій промисловості.
16. Використання ПЛР у ветеринарній медицині.



Частина

Спеціальні біотехнології

Розділ 7.

БІОТЕХНОЛОГІЯ ВИРОБНИЦТВА І ЗАСТОСУВАННЯ ІММОБІЛІЗОВАНИХ ПРЕПАРАТІВ

7.1. ІНЖЕНЕРНА ЕНЗИМОЛОГІЯ. ЗАВДАННЯ ІНЖЕНЕРНОЇ ЕНЗИМОЛОГІЇ

Інженерна ензимологія поряд з генетичною і клітинною інженерією складає фундамент нової біотехнології.

Інженерна ензимологія — це галузь біотехнології, яка базується на використанні каталітичних функцій ферментів (або ферментних систем) у ізольованому стані або в складі певних клітин для одержання відповідних цільових продуктів.

Слово «інженерна» свідчить про створення конструкції (від франц. engin — машина), в даному випадку — конструювання біокаталізаторів з заданими властивостями з подальшим використанням у біотехнологічному процесі.

Це новий науково-технічний напрям, який базується на хімічній ензимології, біохімії, хімічній технології та інженерно-економічних дисциплінах. Основне завдання інженерної ензи-

мології — розробка біотехнологічних процесів, у яких використовується каталітична дія ферментів, виділених зі складу біологічних систем або ферментів, які знаходяться в клітинах, штучно позбавлених здатності до росту. Існує й і інше визначення завдання інженерної ензимології: це конструювання біоорганічних каталізаторів з передбаченими властивостями на основі ферментів або поліферментних комплексів, виділених з біологічних систем, які розвиваються. З огляду на практичні потреби одержання певних продуктів передбачені властивості — це визначений термін служби каталізатора за певних умов (температури, pH, іонної сили розчину), його селективність (специфічність) дії, продуктивність (активність), імуногенність, токсичність і т.д.

Однак завдання інженерної ензимології набагато ширші, ніж створення каталізаторів нового типу. Найголовніша мета цієї дисципліни — розробити наукові основи використання ферментних каталізаторів для створення нових біотехнологічних процесів у промисловості, нових методів у терапії і діагностиці, аналізі, органічному синтезі й інших галузях практичної діяльності.

Завдяки високій активності і специфічності деякі ферменти і ферментні системи знайшли застосування як біокаталізатори в різних галузях практичної діяльності: в харчовій, фармацевтичній, текстильній, шкіряній та інших галузях промисловості, в гуманній і ветеринарній медицині, в сільському господарстві, органічному синтезі, хімічному аналізі тощо. У промисловості, наприклад, використовуються в основному препарати для гідролізу природних полімерів білків, крохмалю, пектинів (табл. 7.1).

Але більш широке технологічне використання розчинних або нативних ферментів затримувалось через низку причин, які залежать від природи самих ферментів. Перш за все ферменти можуть функціонувати лише при незначних коливаннях pH середовища, температури, іонної сили розчину і відсутності інгібіторів; вони нестійкі при зберіганні і впливові різних факторів, особливо теплових; багаторазове використання ферментів утруднене через складність їх відокремлення від продуктів реакції, в результаті чого вони використовуються, як правило, один раз; трудомісткість очищення ферментів і одержання їх у достатньо активному стані і, як наслідок, висока вартість нативних

ферментів. Подолати ці труднощі вдалося шляхом іммобілізації ферментів, тобто переведення їх із розчинної в нерозчинну форму.

Таблиця 7.1. ***Ферменти, які використовуються у промисловості*** *(І.В. Березін і ін., 1987)*

Ферменти	*Сфера застосування*
Глюкозидази:	
α-амілаза	Гідроліз крохмалю, обробка текстильних виробів
глюкоамілаза	Одержання глюкози, оцукрення ліків і пива
інвертаза	Виробництво кондитерських виробів
пектиназа	Освітлення вин і фруктових соків
целюлаза	Обробка соломи
Протеази:	
протеази мікробного походження	Домішки до детергентів, випікання хліба, освітлення вин і пива, розм'якшення м'яса, вичинка шкіри
бромелаїн	Виробництво поживних сумішей на основі гідролізатів білків, розм'якшення м'яса
папаїн	Освітлення пива, розм'якшення м'яса
трипсин	Вичинка шкіри
ренін	Вироблення сирів
ліпази	Модифікація смаку молочних продуктів
Оксидоредуктази:	
глюкозооксидаза	Видалення кисню із харчових продуктів
каталаза	Видалення перикису водню після стерилізації молочних продуктів
Ізомерази:	
глюкозоізомераза	Виробництво глюкозо-фруктозних сиропів

В основу сучасної інженерної ензимології покладено використання іммобілізованих ферментів і ферментних систем.

7.2. ІММОБІЛІЗАЦІЯ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН ТА КЛІТИН

Біологічно активні речовини як високо-, так і низькомолекулярні (ферменти, білки, поліпептиди, глікопротеїни, нуклеїнові кислоти, антигени, антитіла, антибіотики, гормони, вітаміни, лікарські речовини тощо) можуть бути іммобілізовані, тобто переведені у нерозчинний стан зі збереженням (частковим або повним) їх активності.

Іммобілізація це обмеження рухливості молекул та їх конформаційних перебудов. Іммобілізація у широкому розумінні слова — це будь-яке обмеження вільності руху об'єкта в просторі.

Найбільшу групу іммобілізованих біологічно активних речовин складають ферменти. Основні принципи і способи іммобілізіції вперше були розроблені для ферментів і іммобілізовані ферменти вперше почали широко застосовувати в різних галузях народного господарства.

Так, дослідження Дж. Нельсона і Е. Гриффина ще в 1916 р. показали, що інвертаза, адсорбована на вугіллі (тобто іммобілізована), зберігає каталітичну активність. У 20–30 рр. минулого століття роботи у цьому напрямку були продовжені, і в 1939 р. Дж. Пфанмюллер і Г. Шлейх одержали перший патент на використання адсорбованих на дерев'яній тирсі протеолітичних ферментів для обробки шкур. У 1953 р. Н. Грубхофером і Д. Шлейтом вперше був застосований метод ковалентної іммобілізації.

Методичні підходи іммобілізації ферментів розповсюджуються і на інші біологічно активні речовини, тому іммобілізація ферментів і іммобілізовані ферменти є модельними об'єктами.

7.3. ІММОБІЛІЗАЦІЯ ФЕРМЕНТІВ. МЕТА ІММОБІЛІЗАЦІЇ

Під іммобілізацією ферменту розуміють включення його в будь-яку ізольовану фазу, яка відділена від фази вільного розчину, але здатна обмінюватися молекулами субстрату або ефектора, що знаходяться у фазі вільного розчину. Іншими словами — іммобілізація — це включення ферменту в таке середовище, в якому доступною для нього є лише обмежена частина загального об'єму.

Іммобілізований фермент (лат. Immobilis — нерухомий) — це фермент, приєднаний тим чи іншим способом до інертної, нерозчинної підкладки або носія (матриці) з частковим або повним збереженням його каталітичної активності.

Іммобілізованим вважають також фермент, вміщений у сіткоподібну матрицю, крізь яку вільно проникають низькомоле-

кулярні субстрати і продукти ферментної реакції, але не можуть пройти макромолекули білка-ферменту.

При іммобілізації обмежується рухливість молекул і відбувається закріплення структури таким чином, що активний центр ферменту зберігає свою каталітичну активність протягом тривалого часу.

Метою іммобілізації є можливість використання ферментних препаратів як промислових каталізаторів у біотехнологічних процесах одержання біотехнологічної продукції, для аналітичної роботи і в лікувальних цілях.

В результаті поєднання ферменту з носієм були створені гетерогенні біокаталізатори, для яких нещодавно, на першій конференції з інженерної ензимології в Хеннікері (США) в 1971 р. був узаконений термін «іммобілізовані ферменти». В літературі ще можна натрапити й на інші терміни, наприклад: «нерозчинні ферменти», «матрицьовані ферменти» тощо, зміст яких однозначний — це препарати ферментів, зв'язаних з нерозчинними носіями.

Однак поняття іммобілізація потрібно розглядати ширше, як будь-яке обмеження вільності руху білкових молекул (або їх фрагментів) у просторі. Цього можна досягнути, окрім зв'язування з нерозчинним носієм, шляхом внутрішньомолекулярної чи міжмолекулярної «зшивки» білкових молекул низькомолекулярними біфункціональними реагентами, або приєднанням ферменту до розчинного полімеру. Такі препарати називають ферментами, модифікованими «зшиваючими» або, відповідно, полімерними реагентами.

Іммобілізовані ферментні препарати мають низку суттєвих переваг при використанні їх з прикладною метою порівняно з нативними попередниками.

По-перше, при іммобілізації ферменти з розряду гомогенних каталізаторів (які знаходяться у тій самій фазі, що й субстрати реакції) переходять у розряд гетерогенних (які утворюють особливу фазу, відділену від реагентів). Фермент і реагенти завдяки цьому можуть бути розділені. Це дає можливість: а) зупинити в потрібний момент реакцію; б) регенерувати фермент після закінчення реакції і використати каталізатор повторно; в) одержати продукт, незабруднений ферментом, що дуже важливо в харчовому і фармацевтичному виробництві.

По-друге, використання гетерогенних каталізаторів дозволить проводити ферментативний процес безперервно, наприклад, у проточних колонках, і регулювати швидкість реакції, що каталізується, а також вихід продукту шляхом зміни швидкості потоку.

По-третє, іммобілізація або модифікація ферменту сприяє цілеспрямованій зміні властивостей каталізатора, в тому числі і його специфічності, залежності каталітичної активності від pH, іонної сили розчину, температури й інших параметрів середовища, а також підвищує стійкість (або стабільність) до різних денатуруючих факторів у 100–1000 разів.

По-четверте, іммобілізація ферментів дає можливість регулювати їх каталітичну активність шляхом зміни властивостей носія.

Завдяки одержанню нового класу біоорганічних каталізаторів — іммобілізованих ферментів — стало можливим налагодження промислового крупнотоннажного виробництва біотехнологічної продукції, яке піддається автоматизації.

Метод іммобілізації також дає можливість одержувати препарати пролонгованої і направленої дії для застосування з лікувальною метою у гуманній і ветеринарній медицині та у тваринництві для поліпшення травлення і засвоєння поживних речовин кормів у організмі тварин та збільшення їх продуктивності.

7.4. НОСІЇ ДЛЯ ІММОБІЛІЗАЦІЇ ФЕРМЕНТІВ

Для одержання іммобілізованих ферментів використовується величезна кількість носіїв (матриць, підкладок) як органічної, так і неорганічної природи.

Усі носії можна розділити на дві основні групи: органічні і неорганічні, які, у свою чергу, можуть бути як природними, так і синтетичними (рис. 7.1).

7.4.1. Органічні полімерні носії

Існуючі органічні полімерні носії можна розділити на два класи: природні і синтетичні. У свою чергу, клас природних полімерів можна розділити на групи відповідно до їх біохімічної

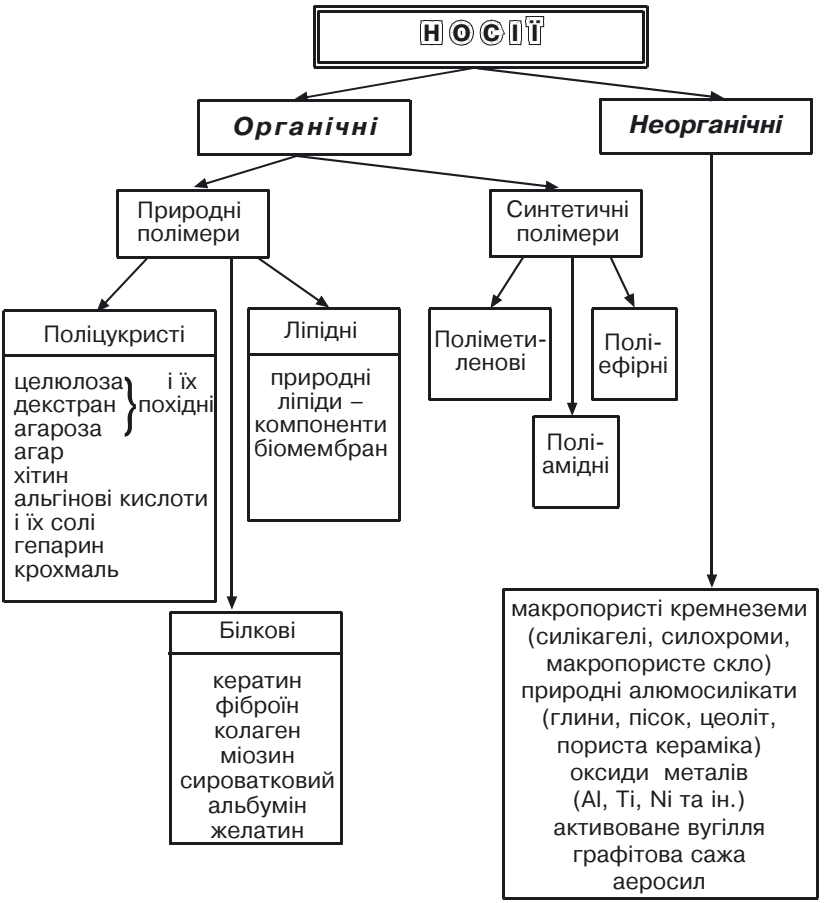


Рис. 7.1. ***Класифікація носіїв, які використовуються для іммобілізації БАР***
(О.В. Скородумова, Н.Г. Рибальський, 1990)

класифікації: поліцукристі, білкові і ліпідні носії. Синтетичні полімери також розділяються на групи відповідно до хімічної будови основного ланцюга макромолекул: поліметиленові, поліамідні і поліефірні носії.

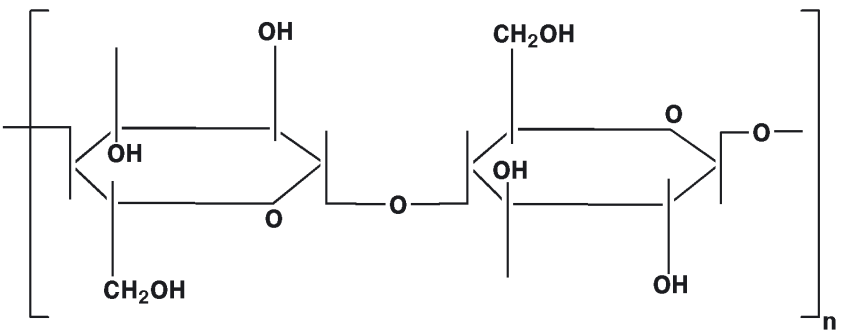
Із цієї групи носіїв широкого застосування для іммобілізації ферментів набули природні поліцукристі носії і синтетичні носії поліметиленового типу.

Природні носії. Велике значення природних полімерів як носіїв для іммобілізації пояснюється їх доступністю і наявністю на їх поверхні реакційноздатних функціональних груп (у вихідному або модифікованому препараті), які легко вступають у різні хімічні реакції, а також високою гідрофільністю. До недоліків природних носіїв належать нестійкість до дії мікроорганізмів і висока вартість деяких з них.

Поліцукристі носії — це целюлоза, декстран, агароза і їх похідні, агар, хітин, альгінові кислоти і їх солі, гепарин, крохмаль.

Серед них широко використовуються похідні целюлози, декстрана, агарози, модифіковані різними хімічними зшивками. Різні типи таких препаратів виробляються зарубіжними фірмами для іммобілізації або афінної хроматографії.

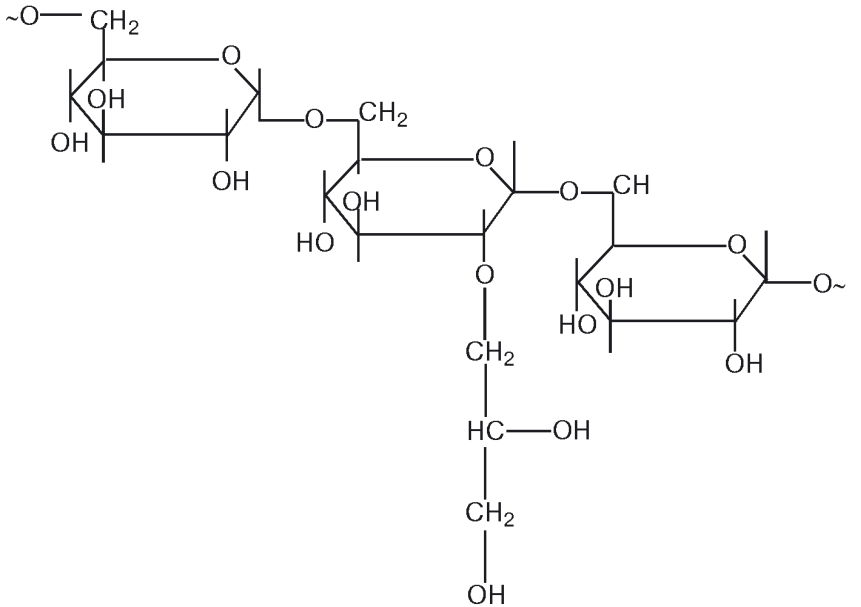
Целюлоза — це полі-1,4-β–D-глюкопіранозил-D-глюкопіраноза:



Целюлоза відзначається високою гідрофільністю, а наявність на її поверхні великої кількості гідроксильних груп дає можливість її легко модифікувати шляхом введення різних замінників. Препарати целюлози для надання їм хімічної стійкості «зшивають» епіхлоргідрином. Для збільшення механічної міцності целюлозу гранулюють шляхом часткового гідролізу, в результаті чого руйнуються її аморфні ділянки. На їх місце для збереження пористості вводять хімічні зшивки. Гранульована целюлоза завдяки простоті одержання, порівняно низькій вартості належить до зручних носіїв для іммобілізації ферментів і

афінної хроматографії. Вітчизняні і зарубіжні фірми випускають різні промислові марки целюлози (табл. 7.2) для іммобілізації ферментів і афінної хроматографії. Недоліком целюлози як носія є нестійкість до впливу сильних кислот, лугів та окислювачів.

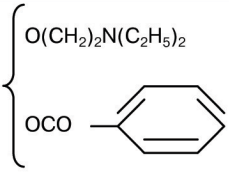
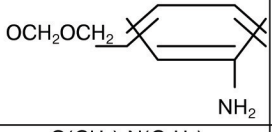
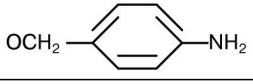
Декстран — полі 1,6-α–D-глюкопіранозил-D-глюкопіраноза — розгалужений поліцукор з бактеріальних джерел, який містить залишки глюкози, що зв'язані в основному 1,6-глюкозидними зв'язками (а також 1,2-, 1,3- і 1,4-зв'язками):



Гелі на основі декстрану, зшиті епіхлоргідрином, випускаються фірмою Pharmacia (Швеція) за комерційною назвою «сефадекс» і Reanal (Угорщина) «молселект». При висушуванні сефадекси стискаються, а у водних розчинах сильно набухають. Середній розмір пор у сітці гелю регулюється зміною частки зшивки. Гелі на основі декстрану мають високу хімічну стійкість і гідрофільність. Зарубіжними фірмами випускаються також похідні декстрану, які містять різні функціональні групи (табл. 7.3).

Таблиця 7.2.

Целюлоза і деякі її похідні *(І.В. Березін та ін., 1987)*

Замінник по ОН-групі	*Назва препарату*	*Фірма*
—	Целюлоза	“Whatman” (Англія)
$O(CH_2)_2NH_2$	Аміноетилцелюлоза	— //—
OPO_3H	Фосфорилцелюлоза (Р-10)	— //—
— — $O(CH_2)_2N(C_2H_5)_2$	Целюлоза — //— Діетиламіноетилцелюлоза	“Sigma” (США) “Bio-Rad-Labs” (США)
OCH_2COOH	Карбоксиметилцелюлоза	— //—
$O(CH_2)_2NH_2$	Аміноетилцелюлоза	— //—
	n-амінобензоілцелюлоза	— //—
— //—	— //—	“Serva” (Німеччина) “Reanal” (Венгрія)
$OCOCH_2Br$	Бромацетилцелюлоза	— //—
	Бензоілдиетиламіноетил-целюлоза	— //—
$OCH_2CONHNH_2$	Гідразидкарбоксиметилцел юлоза	“Miies Labs” (Англія)
$OCOCH_2Br$	Бромацетилцелюлоза	— //—
	м-Амінобензилоксиметил-целюлоза	— //—
$O(CH_2)_2N(C_2H_5)_2$	ДЕАЕ-целюлоза	НВО Біохімреактив
OCH_2COOH	КМ-целюлоза	— //—
	n-Амінобензилцелюлоза	НПО Біохімреактив
$O(CH_2)_2SO_3H$	Сульфоетилцелюлоза	— //—
$O(CH_2)_2N(C_2H_5)_3$	Триетиламонійетил-целюлоза	— //—

Таблиця 7.3.

Комерційні препарати похідних декстрану

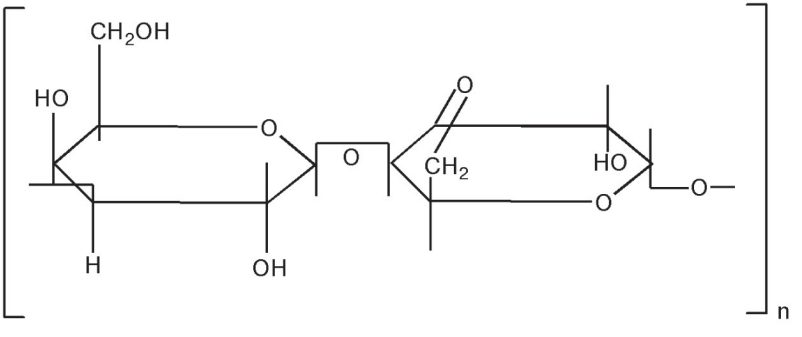
(І.В. Березін та ін., 1987)

Функціональна група	*Назва і марка*	*Фірма*
OCH_2COOH	Карбоксиметилсефадекс (CM)	Pharmacia (Швеція)
$O(CH_2)_3SO_3H$	Сульфопропилсефадекс (SP)	— //—
$O(CH_2)_2N(C_2H_5)_2$	Діетиламіноетилсефадекс (ДЕАЕ)	— //—
$OCH_2CH_2N(C_2H_5)_2CH_2–$ $–CH(OH)CH_3$	Діетил-(2-оксипропил) аміноетилсефадекс (QAE)	— //—
OCH_2COOH	Молселект (CM)	Reanal (Венгрія)
$O(CH_2)_2SO_3H$	Молселект (SE)	— //—
$O(CH_2)_2N(C_2H_5)_2$	Молселект (ДЕАЕ)	— //—

До групи декстранів можна віднести також ***крохмаль*** — суміш поліцукрів, основним компонентом якого є амілоза. Шляхом хімічної модифікації крохмалю зшиваючими агентами, такими як формальдегід, гліоксаль, глутаровий альдегід, одержаний новий носій ***губчастий крохмаль*** з підвищеною стійкістю до ферментів, які гідролізують поліцукри.

На основі декстранів одержують водорозчинні препарати з різними функціональними групами, які використовуються в медицині як носії лікарських речовин. Вибір носіїв на основі декстрану для медичних цілей обумовлено тим, що вони легко піддаються деградації.

Агароза — полі-β–галактопірозил-3,6-ангідро-α–L-галактопіраноза:



Агароза широко використовується для іммобілізації, але вартість її зависока, через що розробляються методи її модифікації з метою одержання форм, які легко регенеруються. При охолодженні гарячого 2–6%-го водного розчину агарози до температури нижче 45 °С утворюються міцні крупнопористі гелі, які є свого роду складною сумішшю із заряджених і нейтральних поліцукрів. У процесі утворення гелю індивідуальні поліцукридні ланцюги утворюють подвійні спіралі, які потім агрегують з утворенням «вузлів». При температурі близько 100 °С гель агарози розплавлюється, тому на відміну від сефадексів його не можна автоклавувати. Висушування агарози призводить до незворотньої деструкції гелю, тому його необхідно зберігати у вигляді водної суспензії.

Гелі на основі агарози виробляються різними зарубіжними фірмами і випускаються під комерційними назвами «сефароза», «біогель А», «ультрагель А», «сефароза CL» (табл. 7.4).

Агар виділяють з клітинних мембран деяких червоних морських водоростей. Точний склад його невідомий. Однак установлено, що він містить два поліцукри: агарозу і агаропектин. Гелі агару утворюються аналогічно до агарозних при охолодженні водного розчину до температури 38 °С. Після висушування гель агару перетворюється на прозору плівку, що дає можливість використовувати для вивчення іммобілізованого в гелі ферменту оптичні методи дослідження.

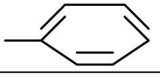
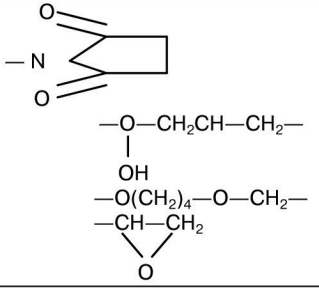
До переваг агару варто віднести низьку вартість і нетоксичність. Відмінною особливістю цього носія є здатність формувати механічно міцні гелі навіть при малих концентраціях у розчині.

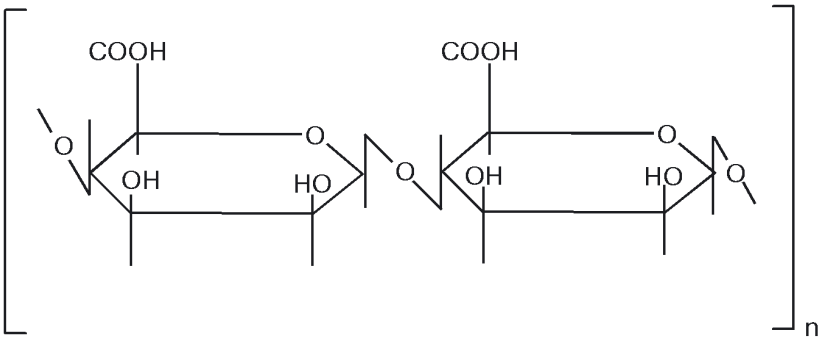
Суттєвого покращення властивостей агару можна досягнути зшиванням епіхлоргідрином, діепоксидними сполуками тощо. Зшитий агар стійкий до нагрівання навіть у лужному середовищі, має високу механічну міцність, а наявність на поверхні великої кількості гідроксильних груп дає змогу для проведення модифікації. Це дало підставу вважати його майже ідеальним носієм.

Альгінові кислоти і їх солі — це поліцукри бурих морських водоростей, які складаються з поєднаних β-1,4-зв'язками залишків D-маннуронової кислоти:

Таблиця 7.4.

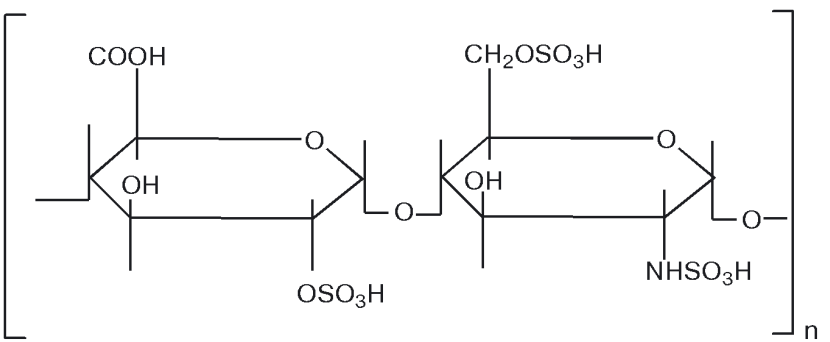
Агароза і деякі її похідні *(І.В. Березін та ін., 1987)*

Функціональна група (замінник по ОН-групі)	*Назва і марка*	*Концентрація агарози, %*	*Фірма*
—	Сефароза 6В	6	Pharmacia (Швеція)
—	Сефароза 4В	4	— //—
—	Сефароза 2В	2	— //—
$—O(CH_2)_2NH(C_2H_5)_2Cl^-$	ДЕАЕ-сефароза CL-6B	6	— //—
$—OCH_2COOH$	КМ-сефароза CL-6B	6	— //—
—OCN	Бромціансефароза 4В	4	— //—
$—OCH_2—CH(OH)—CH_2—O—$	Октилсефароза CL-4B	4	— //—
$—(CH_2)_7—CH_3$ $—OCH_2—CHOH—CH_2—O—$ 	Фенилсефароза CL-4B	4	— //—
	Біогель А–0,5	10	Bio-Rad Labs (США)
	Біогель А–1,5	8	— //—
	Біогель А–5	6	— //—
	Біогель А–15	4	— //—
	Біогель А–50	2	— //—
	Біогель А–150	1	— //—
$—O(CH_2)_2N(C_2H_5)_2$	ДЕАЕ-біогель А Активована	— 4	— //— Pharmacia (Швеція)
$—NH—(CH_2)_5—COO—$	СН-сефароза 4В		— //—
	Епоксиактивована сефароза 6В	6	Pharmacia (Швеція) — //—



Характерною властивістю цих носіїв є різка залежність їх розчинності від температури і pH розчину. Так, альгінові кислоти добре розчинні в гарячій воді і мало — у холодній. Альгінати кальцію мають здатність утворювати гелі, які використовуються для іммобілізації ферментів, клітин, органел шляхом включення.

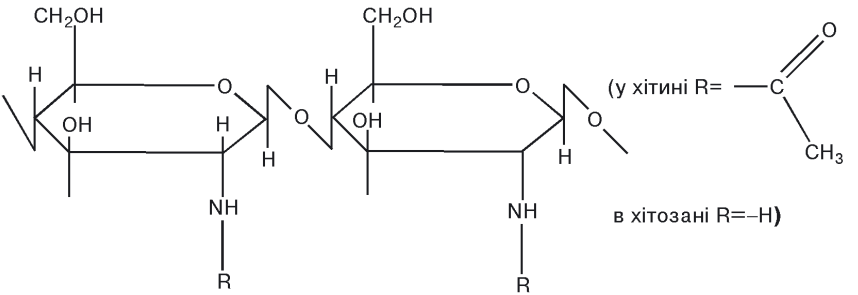
Гепарин — це кислий поліцукор, який містить ланки сульфатованої D-глюкуронової кислоти (або L-ідуронової) і сульфатованого глюкозаміну (або N-ацетил-глюкозаміну):



Він успішно використовується для одержання водорозчинних препаратів іммобілізованих ферментів, які використовуються у медицині для введення in vivo.

Загальними недоліками поліцукристих носіїв є їх нестійкість до дії мікроорганізмів і неспецифічна сорбція білків.

Хітин — природний амінополіцукор. Його можна розглядати як целюлозу, в якій CH_2OH-група замінена ацетамідним залишком:



Він є основним компонентом зовнішнього скелету ракоподібних, комах, а також клітинних оболонок деяких грибів. Ця сполука є відходом промислової переробки креветок і крабів, тому доступна у великих кількостях при відносно невеликій вартості.

Хітин має пористу структуру, не розчиняється у воді, розбавлених кислотах і лугах, а також у органічних розчинниках. Для переведення у реакційноздатну форму він може модифікуватись глутаровим альдегідом, а також солями важких металів (наприклад Ti).

Обробка хітину концентрованими розчинами лугів (деацилювання) приводить до утворення ***хітозану***. Хітозан, який має вільні аміногрупи, може використовуватися для ковалентної іммобілізації ферментів за допомогою таких біфункціональних реагентів, як діальдегіди, діізоціанати. На відміну від хітину хітозан розчиняється у мінеральних і органічних кислотах, тому для іммобілізації часто використовується у вигляді розчинів (pH 3–7).

При використанні хітозану як носія одержані препарати іммобілізованих ферментів мають високу каталітичну активність і стійкість до дії мікроорганізмів, а також спостерігається суттєве підвищення їх термостабільності.

Значний інтерес останнім часом викликають мікробні хітозанази, які ще недостатньо вивчені. Для виділення хітозаназ із

продуцента Bacillus sp. 739 і їх афінного очищення ефективним сорбентом виявився колоїдний розчин хітозану *(Г.Е. Актуганов і ін., 2003)*. Для адсорбції доцільна концентрація хітозану 0,12–0,15 %, що сприяє значній економії носія і зберігає можливість його подальшої регенерації.

У природі хітозан розповсюджений не так широко, як хітин, і виявлений поки що лише у деяких видів нижчих грибів *(К.Г. Скрябіна та ін., 2000)*. Тому у промислових масштабах його одержують в основному з хітину панцирів крабів або креветок шляхом лужного дезацетилювання.

Білкові носії. До них належать кератин, фіброїн, фібрин, колаген, міозин, сироватковий альбумін, казеїн та інші.

Використання білків як носіїв для іммобілізації ферментів має велике практичне значення, наприклад, у медицині. Такі носії дозволяють наблизитись до умов функціонування ферментів in vivo, вирішити проблему біодеградації і використати більшість із них у вигляді мембран і плівок. Іммобілізацію на білкових носіях можна проводити як у присутності зшиваючих агентів, так і без них.

Загальним недоліком для білкових носіїв, які використовуються в медицині, є їх імуногенність при введенні в організм (винятком є колаген і фібрин).

Найчастіше як носії використовуються кератин, фіброїн, колаген, міозин і сироватковий альбумін.

Колаген — фібрилярний білок групи склеропротеїдів. Він є основним компонентом хрящів і сухожилля, має високу стійкість до розриву. На своїй поверхні колаген має велику кількість реакційноздатних груп, його можна легко модифікувати, надаючи матриці широкий набір бажаних властивостей. Так, блокуванням аміно- або карбоксильних груп можна змінити поверхневий заряд носія і, відповідно, гідрофільно-гідрофобний баланс; за допомогою зшиваючих агентів можна одержати стиснену мікроструктуру.

Колаген має високу гідрофільність. Він здатний сорбувати від 1 до 5 г води на 1 г білка, залишаючись при цьому в нерозчинному вигляді і зберігаючи волокнисту структуру.

Продуктом переробки колагену є ***желатин*** — розчинна суміш поліпептидів. Одержують його тривалою обробкою колагену окропом, у ході чого гідролізуються деякі ковалентні зв'язки колагену. В результаті волокнистий нерозчинний колаген перетворюється на розчинну суміш поліпептидів, яка називається желатиною і має гелеву структуру.

Цінність цього носія полягає в його нетоксичності, легкій біодеградації, що дозволяє використовувати желатин у фармацевтичній і харчовій промисловості.

Кератин — фібрилярний білок групи склеропротеїдів, з якого майже повністю складається шерсть, волосся, рогові покриви, пір'я і т.д. Його, як правило, одержують при переробці пір'я (побічний продукт птахопереробних підприємств). Кератин доступний у великих кількостях і дешевий.

Синтетичні полімерні носії. Величезна різноманітність доступних синтетичних полімерів забезпечила їх широке використання як носіїв для іммобілізації ферментів. Вводячи в полімерні молекули різні функціональні групи, можна у широких межах змінювати фізичні і хімічні властивості носія.

Синтетичні полімери універсальні і можуть використовуватись як для ковалентної і сорбційної іммобілізації ферментів, так і для включення в структуру носія (в гелі, мікрокапсули, трубки).

Найбільш широко використовуються полімери на основі стиролу, похідних акрілової кислоти, полівінілового спирту, поліамідів, поліуретанів і ін. Структура і фізико-хімічні властивості синтетичних полімерних носіїв абсолютно різні і варіюють у широких межах. Серед них є носії у вигляді сферичних частинок, гранул, порошків, мембран, трубок, пористі носії з макросітчастою, ізопористою і гетеропористою структурами, які використовуються як для сорбційної іммобілізації, так і для одержання гелей, мікрокапсул, або з високореакційними функціональними групами — для ковалентної іммобілізації.

Полімери на основі стиролу. Вони є основою для багатьох промислових марок іонообмінних матеріалів — Дауекс і Амберліт. Для сорбційної іммобілізації використовуються як мікропористі, так і макропористі носії, а також носії, які мають макросітчасту ізопористу і гетеропористу структури. Макросіт-

часті полістироли подібні до скла, вони мають стабільну структуру пор, не набухають у воді і мають високу механічну міцність. Немодифіковані полістірольні носії гідрофобні.

Введення реакційноздатних груп до складу синтетичних полімерів на основі стиролу дає можливість отримати нові види носіїв, придатних для хімічної іммобілізації.

Полімери на основі похідних акрілової кислоти. Одним із численних похідних акрілової кислоти, які широко використовуються для одержання полімерних гідрофільних носіїв, є акріламід. Його використовують для одержання гелю — поліакріламідний гель (ПААГ). Він випускається низкою фірм. Так, фірма Bio–Rad Labs (США) виробляє ПААГ і його похідні під назвою «***біогелі***» типу P, Koch–Light (Велика Британія) — «***ензакріли***», Reanal (Угорщина) — «***акрілекси***».

Фірми LKB (Швеція) та IBF (Франція) випускають також носії змішаного типу на основі ПААГ і агарози під назвою ***ультрагелі*** типу AcA. Це жорстка матриця, яка створюється агарозою з контролюючою пористістю, що забезпечується ПААГ. Носії випускаються у вигляді водної суспензії сферичних гранул і використовуються для синтезу афінних сорбентів і нековалентної іммобілізації ферментів.

Для ковалентної іммобілізації ферментів поліакріламідний носій активують одним із способів: або в готовий полімер долучають функціональні групи методом хімічної модифікації, або полімеризують відповідне функціональне похідне мономера.

Із інших похідних акрілової кислоти, які використовуються для одержання полімерних носіїв, є ***хлорангідрид метакрілової кислоти***.

Більшість полімерів на основі акрілової кислоти не стійкі до впливу багатьох хімічних реагентів, а також набухають у воді і органічних розчинниках. Тому у випадках, коли необхідна жорстка структура носія, використовують змішаного типу носії — ***ультрагель типу AcA*** на основі синтетичного і природного полімерів. До синтетичних полімерів із жорсткою структурою належать сополімери похідних акрілової кислоти, які випускаються під назвою «***сферон***» фірмами Lachema (Чехія) і Realco Chem. Co (США). Це макропористі полімерні гелі. Вони

механічно міцні, хімічно і біологічно стійкі. Наявність гідроксильних груп на поверхні надає матриці схожість з сефарозою. Це дозволяє використовувати розроблені для сефарози методи активації носія.

Поліамідні носії. Це група різних гетероланцюгових полімерів з амідною групою, яка повторюється –C(O)–NH–. Один із способів їх одержання грунтується на гомополіконденсації амінокарбонових кислот — ***найлон-6, капрон***. Окрім найлона-6, для іммобілізації використовуються ***поліізонітрилнайлон***, ***поліаміноарилнайлон*** та ін. Амідні групи надають полімерам гідрофільності.

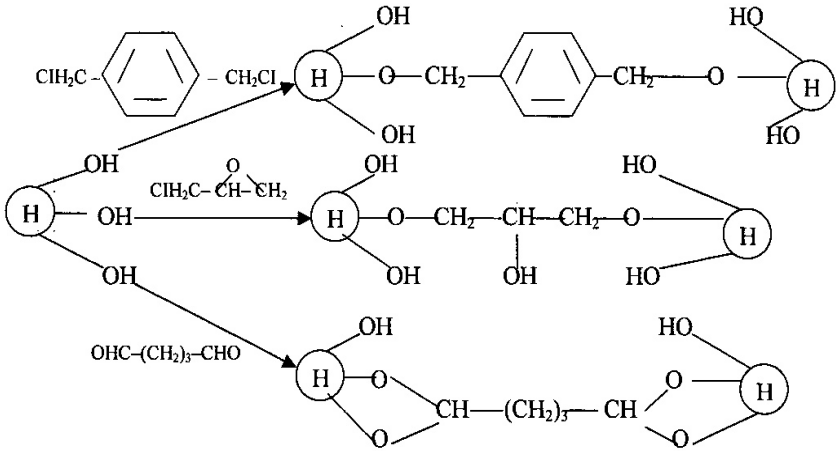
Для використання як носіїв поліаміди активують, частково гідролізуючи їх, з подальшою обробкою, наприклад, глутаровим альдегідом.

Головною перевагою носіїв цього типу є те, що вони можуть бути створені в різній фізичній формі: у вигляді гранул, порошків, волокон, мембран, трубок тощо.

До групи поліамідних носіїв належать також полімери на основі ***N–вінілпіролідону.***

Широке використання цих носіїв, перш за все для медичних потреб, обумовлено їх біологічною інертністю і стійкістю до впливу середовища. При використанні полівінілпіролідону і сополімерів на його основі одержані препарати іммобілізованих ферментів, які здатні повільно деградувати в організмі, причому швидкість розпаду залежить від природи другого мономера і концентрації зшиваючого агента у суміші.

Носії на основі полівінілового спирту. Ці носії, запропоновані Г. Манеке і Г. Фогтом (1980), мають високу реакційну здатність. Відповідна обробка дозволяє вводити в них різні функціональні групи: дісульфідні, альдегідні та ін. Для одержання гідрофільних гелів носії можуть бути зшиті глутаровим альдегідом у кислому середовищі, а в лужному — епіхлоргідрином або n-ксилилендіхлоридом:



До переваг носіїв на основі полівінілового спирту слід віднести, окрім високого вмісту реакційноздатних груп, велику місткість.

Поліуретани. Гідрофільні поліуретанові полімери містять угруповання —NH—C(=O)—O—. Вони є зручними матеріалами для включення ферментів у гель.

Процес іммобілізації у даному випадку полягає у простому змішуванні компонентів. Поліуретани мають більшу стійкістю стосовно води, ніж поліаміди.

Органічні низькомолекулярні носії. Природні носії — ліпіди. Використання природних ліпідів як носіїв для іммобілізації вимагає спеціальної техніки і дуже трудомістке. Ця іммобілізація наближена до умов функціонування ферментативних систем у живій клітині, тому що використовуються, як правило, ліпіди — компоненти біомембран: гліцероліпіди, сфінголіпіди, холестерин, кардіоліпін.

У зв'язку з тим, що ці носії дорого коштують, а для проведення іммобілізації необхідне дороге і складне обладнання, вони використовуються переважно для одержання лікарських препаратів.

Як правило, ліпідні носії використовуються у вигляді моношарів на різних поверхнях або біошарів сферичної форми — ліпосом.

Моношари ліпідів на поверхні води. Ліпіди здатні утворювати мономолекулярні плівки на межі розділення фаз (вода : повітря або вода : неполярний розчинник). Ліпідні молекули в моношарі розміщені таким чином, що їх полярні головні групи занурені у водну фазу, а вуглеводневі частини направлені у повітря або занурені в органічний розчинник. Така плівка здатна сорбувати білкові молекули.

Одержання моношарів на поверхні води вимагає спеціальної техніки і є досить трудомісткою процедурою, що обмежує їх використання.

Моношари ліпіду на твердій поверхні. Ці системи як носії були запропоновані О.М. Полтораком і Є.С. Чухрай (1966). Суть методу полягає у нанесенні ліпідного моношару на тверду підкладку (силікагель, сажа, аеросил) з подальшою адсорбцією білка із водного розчину. Як ліпідну матрицю використовують зазвичай лецитин, фосфатидилетаноламін і холестерин. Розроблений також метод одержання штучних змішаних лецитин-холестеринових шарів.

Можливість змінювати структуру і орієнтацію молекул у ліпідних шарах досягається підбором полярності носія і природи розчинника ліпіду, який використовується.

Ліпосоми. Вперше ліпосоми були описані А. Бенгемом в 1964 р. Для їх виготовлення часто використовуються фосфатидилхоліни (лецитіни), фосфатидилетаноламін, фосфатидилсерин, кардіоліпін, сфінгомієлін, причому вони утворюються як із чистих ліпідів, так і сумішей.

Існує три різних види ліпосом: мультиламелярні, моноламелярні і макровезикулярні. ***Мультиламелярні*** ліпосоми — це замкнуті структури, які складаються із декількох концентричних ліпідних біслоїв, відокремлених один від одного водним середовищем. Сумарний діаметр мультіламелярних ліпосом коливається від 1–2 до 50 мкм.

Ультразвукова обробка мультиламелярних ліпосом приводить до трансформації їх у прості або ***моноламелярні*** з меншими розмірами частинок. Діаметр моноламелярних ліпосом становить від 20,0 до 50 нм.

Третій тип ліпосом — ***макровезикулярні***, які утворюються, наприклад, шляхом злиття малих ліпосом, що індукуються

іонами Ca^{2+}, а також присутністю фосфоліпідів з негативно зарядженими головними групами. Такі ліпосоми складаються з одного бішару і можуть мати діаметр від 60,0 нм до 100 мкм.

Розмір і форма ліпосом залежить від способу їх виготовлення, а також від таких факторів, як кислотність середовища, присутність неорганічних солей і природи ліпіду, який використовується.

Широке використання ліпосом як носіїв для іммобілізації ферментів і лікарських препаратів обумовлено простотою одержання і легкістю регенерації іммобілізованого препарату, а також можливістю застосування in vivo.

Синтетичні аналоги ліпідів (поверхнево-активні речовини). Поверхнево-активні речовини (ПАР) складаються з молекул дифільної природи, які містять у своєму складі як полярну головну групу, так і неполярну вуглеводневу частину. Природні ліпіди, в принципі, теж відносяться до ПАР. Синтетичні ПАР — це сполуки, чимало з яких є продуктами крупнотоннажного виробництва.

Залежно від того, які групи присутні у головній частині молекули, усі ПАР можна розділити на чотири основних типу: аніонні, катіонні, неіонні і цвітеріонні. Наприклад, біо-2-етилгексиловий ефір натрієвої солі сульфоянтарної кислоти — аніонна ПАР; цетилтриметиламонійбромід — катіонна ПАР; полі (9–10) оксиетилена октилфеніловий ефір (трітон Х–100) — неіонна ПАР; алкілдіметилкарбоксибетаін — цвітеріонна ПАР. Фірмою Servera випускається понад 30 найменувань тільки неіонних ПАР різної будови.

Як носії для іммобілізації ферментів використовуються такі форми ПАР: обернені (спрямовані) міцели ПАР в органічних розчинниках; синтетичні миючі засоби (СМЗ) з біодобавками — ферментами; носії з полімеризованих ПАР.

7.4.2. Носії неорганічної природи

Для іммобілізації ферментів використовуються різні неорганічні носії: макропористі кремнеземи — силікагель, силохром, макропористе скло; метали і їх оксиди: титан, залізо, алюміній; природні алюмосилікати — різні глини, цеоліти; пориста кераміка, активоване вугілля, сажа.

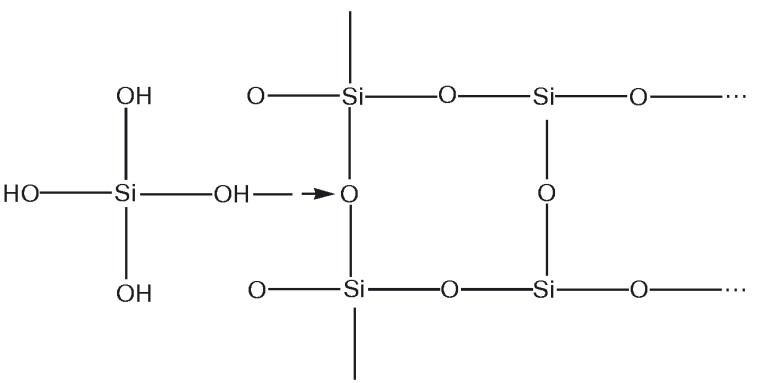
Асортимент мінеральних носіїв, які випускаються у різних країнах, постійно збільшується, а стандартизація структурних характеристик носіїв, які виробляються (питома поверхня, розміри і об'єм пор, розміри зерен), роблять їх особливо зручними для використання.

Основними якостями, які обумовлюють широке застосування неорганічних матеріалів як носіїв, є їх здатність до швидкої регенерації і можливість надання їм будь-якої конфігурації. Це перевага мінеральних носіїв. Носії використовуються як у вигляді порошків, гранул, мембран, трубок, кульок, так і моноліту. Вони можуть бути як пористими, так і непористими.

Неорганічні носії можуть використовуватись як для адсорбційної, так і ковалентної іммобілізації після хімічної модифікації поверхні носія шляхом введення реакційноздатних груп, які можуть вступати у взаємодію з функціональними групами ферменту. Найчастіше як модифікуючі агенти використовуються кремнієорганічні речовини, зокрема γ-амінопропілтриетоксісилан, галогенсілани, складні ефіри сілілкарбонових кислот.

Макропористі кремнеземи. До носіїв цього типу належать силікагелі, силохроми і макропористе скло. До позитивних якостей кремнеземних носіїв слід віднести механічну міцність, хімічну інертність до багатьох розчинників, наявність жорсткого каркасу із заданими розмірами пор, стійкість до дії мікроорганізмів.

Силікагель — аморфна речовина із загальною хімічною формулою $xSiO_{2*}yH_2O$. Одержують його в процесі «старіння» (поліконденсації) ортокремнієвої кислоти ($SiO_2 \cdot 2H_2O$):



Поверхня частинок силікагелю й інших кремнеземів покрита гідрофільними гідроксильними групами, які мають слабковиражені кислотні властивості.

Недоліком кремнеземних носіїв є їх використання в обмеженому діапазоні pH, підвищена розчинність і деяка неспецифічна сорбція на їх поверхні. Подолати ці недоліки, окрім першого, можна шляхом модифікації поверхні кремнеземів.

Модифікація проводиться одним із двох методів. Для зниження розчинності і підвищення стабільності носіїв їх покривають різними матеріалами, наприклад, плівкою оксиду металу (алюмінію, цирконію, титану), полімерів (поліетиленаміну), або обробляють солями перехідних металів.

Можна проводити хімічну модифікацію кремнеземів шляхом введення різних реакційноздатних груп (–CN; $–NO_2$; $–NH_2$ та ін.) або гідрофобізувати поверхню, наприклад хлорангідридами заміщених бензойних кислот або стеароїлхлоридом.

Серед методів хімічної модифікації кремнеземів найбільш розповсюдженими є обробка носія кремнієорганічними речовинами, галогеналкілсиланами, складними ефірами силілкарбонових кислот.

Таким чином, використання різних модифікуючих агентів дає можливість змінювати властивості поверхні кремнеземних носіїв. Однак вартість цих носіїв надто висока, а модифікація ще більше підвищує їх вартість, що є суттєвим обмеженням для впровадження кремнеземів у промисловість.

Окрім крупнодисперсних кремнеземів, як носії використовуються і ***пірогенні кремнеземи.*** Вони повністю нерозчинні, мають високу хімічну, біологічну і термічну стійкість, жорсткість каркасу при різних значеннях pH розчину. Їх поверхня покрита гідроксильними групами, завдяки яким відбувається адсорбція з утворенням водневих зв'язків.

На відміну від крупнодисперсних кремнеземів (силікагелів, силохромів, макропористого скла), які використовуються для іммобілізації біологічно активних речовин з великою молекулярною масою (наприклад, ферментів), пірогенні кремнеземи застосовуються як носії переважно для іммобілізації низькомолекулярних сполук — ліків, гербіцидів.

Аеросил — це тарова марка пірогенного кремнезему, основною речовиною якого є SiO_2. Це продукт високотемпературного парафазного гідролізу $SiCl_4$ у струмі кисню з подальшою конденсацією у парах води (І.В. Жарникова, 2004). За фізичними властивостями сорбент є непористим кремнеземом, який має форму частинок, близьких до сферичних. Поверхня аеросилу покрита гідроксильними групами, завдяки яким відбувається адсорбція з утворенням водневих зв'язків. Завдяки своїм фізико-хімічним властивостям (висока чистота, велика питома поверхня, малі розміри частинок), а також у зв'язку з екологічною і фізіологічною нешкідливістю та сумісністю зі шкірою він широко застосовується у фармакології і косметології. Входить до складу наповнювачів пестицидів і добрив, для одержання таблетованих форм лікарських препаратів.

Більш придатними для промислового використання можуть бути ***природні алюмосилікати — глини, цеоліти,*** а також ***пориста*** кераміка, до складу якої, окрім алюмосилікатів, входять оксиди титану, цирконію або інші домішки. Поверхня цих носіїв аналогічно кремнеземним може бути модифікована різними органічними речовинами, наприклад силанами (γ-амінопропілтриетоксісиланом).

Важливою характеристикою силікатних і алюмосилікатних носіїв є висока щільність поверхневих груп, на яких зв'язування білкових молекул ферменту може здійснюватись як за рахунок електростатичних взаємодій, так і водневих зв'язків. Це дуже суттєво для ефективної іммобілізації ферментів.

Широкого розповсюдження як носії набули також ***активоване вугілля*** і ***графітована сажа.*** Активоване вугілля може бути використане як носій для адсорбційної і ковалентної іммобілізації (після попередньої активації оксидних груп).

До переваг сажі можна віднести високу однорідність і електричну провідність її поверхні. Остання властивість важлива при створенні біоелектрокаталітичних систем на основі іммобілізованих ферментів. Суттєвим недоліком цього носія є низька механічна міцність, що обмежує його використання. Відкладанням вуглецю на гранульованій сажі був створений новий носій — ***карбохром***, у якого висока механічна міцність поєднується з перевагами графітованої сажі.

Перспективними є носії на основі ***металів і їх оксидів.*** Ці носії мають високу механічну міцність, відносно дешеві, стабільні, мають хороші гідродинамічні властивості. На практиці частіше використовуються носії на основі ***оксиду алюмінію*** і ***титану***. У промисловому масштабі їх одержують зазвичай у вигляді макропористих порошків, однорідних за формою і розміром. Використання матриць цього типу дозволяє проводити іммобілізацію як адсорбційну, так і ковалентну після попередньої модифікації γ-амінопропілтриетоксісиланом.

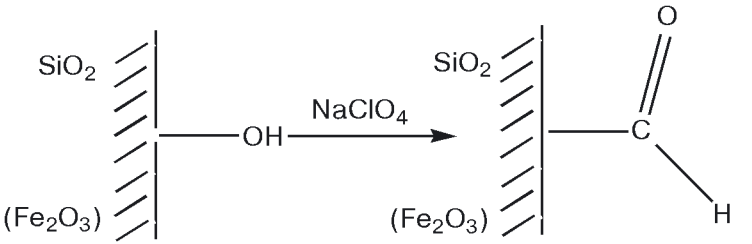
Металеві поверхні, які використовуються як носії **(Al, Ni, Ti)**, зазвичай модифікують шляхом створення оксидної плівки на поверхні матриці, або покривають їх шаром полімеру (похідні полістиролу, целюлози та ін.). Це дозволяє значно підвищити місткість носія.

В останні роки розвиваються методи іммобілізації, які грунтуються на використанні носіїв на основі ***феромагнітних матеріалів***. Одержані біокаталізатори й іммобілізовані біологічно активні речовини мають магнітні властивості, що дає змогу маніпулювати ними за допомогою магнітного поля. Іммобілізовані на магнітних носіях лікарські речовини використовуються у системах «направленого транспорту» ліків у органи-мішені, тобто хворі органи. Магнітні носії, з'єднані з біореагентами, є новими засобами виділення і очищення білків і клітин.

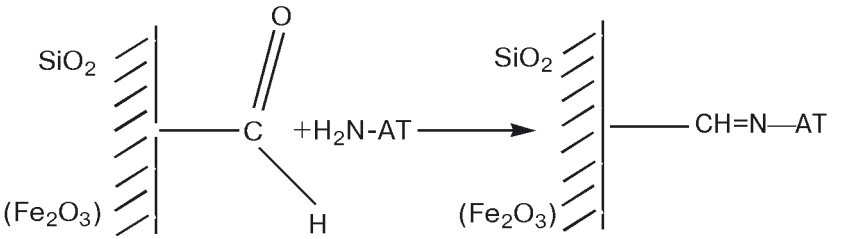
За своєю природою магнітні носії можуть складатись із феромагнітного матеріалу або ж бути гелевою субстанцією з включеними в пори частинками магнетика.

Технологія одержання іммобілізованих біологічно активних речовин з магнітними властивостями розвинена у багатьох країнах світу. Препарати біологічно активних речовин з магнітними властивостями, на думку багатьох дослідників, з часом витіснять іммобілізовані біокаталізатори і лікарські засоби.

На основі високодисперсного кремнезему (аеросилу) шляхом додавання до нього магнітного порошку (Fe_2O_3) одержали біокаталізатор, який в подальшому модифікували декстраном (поліглюкіном) і активували внесенням на поверхню активних груп, що використовуються для ковалентної іммобілізації за схемою *(І.В. Жарникова, 2004)*:



Далі на біокаталізаторі проводили іммобілізацію антитіл з утворенням імуномагносорбента (МІС) з подальшим використанням цього комплексу в імуноферментному аналізі:



Іммобілізовані антитіла зберігають свою стабільну активність і через 9 років зберігання при температурі 4–5 °С, тоді коли зазвичай — тільки 2–3 тижні.

Використання магнітного компонента у складі сорбенту, який використовується як носій у твердофазовому імуноаналізі мікроорганізмів, значно спрощує маніпуляції з дрібнодисперсним матеріалом та підвищує швидкість методу діагностики.

7.4.3. Місткість носія

Місткість носія — це кількість ферменту, яка за допомогою фізичних чи хімічних методів іммобілізації може зв'язуватись з одиницею маси носія за контрольованих умов процесу іммобілізації (температура, pH, іонна сила розчину тощо).

Вона залежить від властивостей носія (питомої поверхні, пористості) і від того, з якими функціональними групами носія реагує фермент під час його іммобілізації. Так, при взаємодії

білка-ферменту з найлоновим носієм через аміногрупи місткість носія досягає 150 мг білка-ферменту на 1 г носія, а при зв'язуванні через COOH-групи — тільки 44-78 мг.

7.4.4 Модифікація носія (лат. modificatio — зміна).

Для подолання деяких негативних властивостей або надання їм нових властивостей носії модифікують, тобто направлено змінюють їх властивості. Модифікація носіїв передбачає обробку їх речовинами, які посилюють здатність зв'язувати фермент.

Відомо багато способів модифікації матриць і активування їх функціональних груп. Наприклад, такий недолік кремнеземних носіїв як висока розчинність вдається усунути шляхом модифікування властивостей їх поверхні — покриття плівкою алюмінію, гафнію, титану тощо. При цьому в десятки разів зменшується їх розчинність, а також усувається неспецифічна сорбція. Одним з істотних недоліків губчастого крохмалю є недостатня стійкість його проти дії гідролаз. Оброблена формальдегідом або глутаровим альдегідом молекула крохмалю модифікується за рахунок зшивок і стає стійкою проти гідролаз.

Модифікування поверхні носіїв дає змогу регулювати процес зв'язування їх із функціональними групами ферменту, а одержані іммобілізовані препарати характеризуються більшою стабільністю.

Найрозповсюдженішим модифікатором є глутаровий альдегід, який утворює амідний зв'язок між аміногрупою носія і карбоксильною групою ферменту. Він ще називається поперечно-зшиваючий агент (реагент).

Для одержання іммобілізованих ферментів із заздалегідь відомими властивостями найчастіше здійснюють активування поверхні модифікованого носія.

Активація носія — це обробка його поверхні фізичними або хімічними методами і речовинами з метою підвищення його місткості. При цьому на поверхні носія утворюються електрофільні групи (мінус-групи, наприклад, COO^-), які мають високу реакційну здатність до нуклеофільних груп білка (наприклад, аміно- і сульфогідрильних груп — NH_3^+ і SH^+).

7.4.5. Вимоги до носіїв

Виходячи з того, що властивості одержаних іммобілізованих ферментів залежать від властивостей носіїв, до них висуваються особливі вимоги (Дж. Порат, 1974):

1) висока хімічна і біологічна стійкість;
2) висока механічна міцність;
3) достатня проникність, велика питома поверхня, висока місткість, пористість;
4) можливість одержання у вигляді зручних у технологічному сенсі форм (гранул, мембран, трубок, листків тощо);
5) легке переведення у реакційноздатну форму (активація);
6) висока гідрофільність, яка забезпечує можливість проведення реакції зв'язування ферменту з носієм у водному середовищі;
7) невисока вартість.

До полімерних носіїв висувається низка додаткових вимог, обумовлених методом іммобілізації, властивостями ферменту, що іммобілізується, і способом подальшого використання препарату:

1) при ковалентній іммобілізації носій повинен зв'язуватись тільки з тими функціональними групами на білку, що не відповідаютьі за каталіз, тобто розміщені на поверхні і не входять до активного центру;

2) вони не повинні впливати як інгібітори на фермент.

7.5. МЕТОДИ ІММОБІЛІЗАЦІЇ ФЕРМЕНТІВ

Існуючі способи іммобілізації ферментів діляться на 2 групи: фізичні і хімічні методи.

7.5.1. Фізичні методи іммобілізації.

Іммобілізація досягається без утворення ковалентного зв'язку між ферментом і матрицею. З них, у свою чергу, можна виділити 2 підгрупи методів: 1) адсорбція на нерозчинних носіях; 2) методи включення у структуру носія — включення у гель; мікрокапсулювання (використання напівпроникних мембран); включення в порожнисті нитки; в ліпосоми; включення у

двохфазове середовище, де фермент розчинний і може знаходитись тільки в одній із фаз (рис. 7.2).

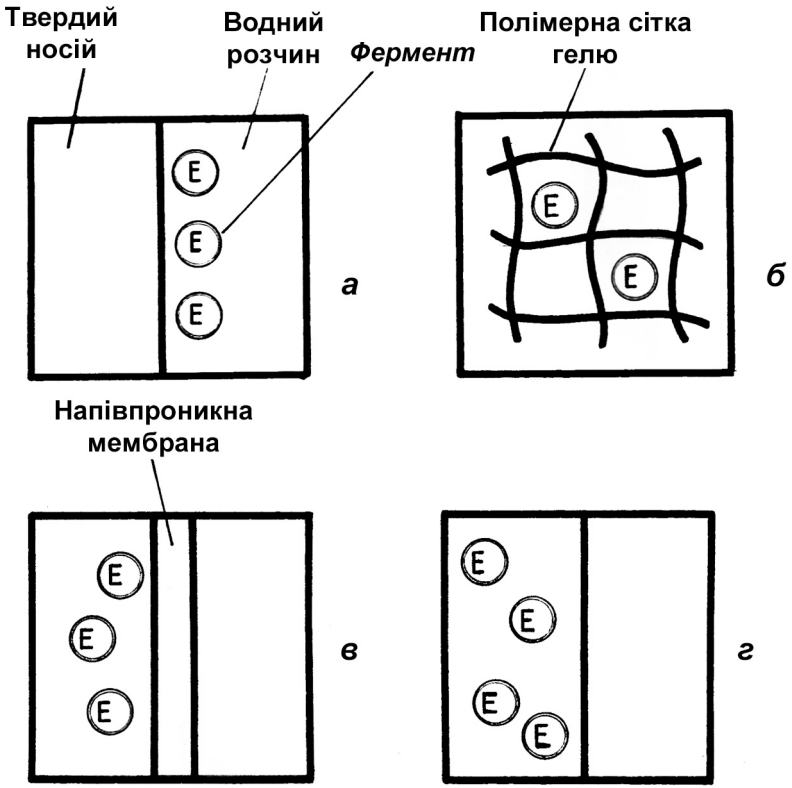


Рис. 7.2. ***Способи фізичної іммобілізації ферментів*** *(за Березіним І.В. та ін., 1987):*
а — адсорбція на нерозчинних носіях; б — включення в пори гелю;
в — відділення ферменту за допомогою напівпроникної мембрани;
г — використання двохфазного реакційного середовища

7.5.1.1. Іммобілізація ферментів шляхом адсорбції на нерозчинних носіях

Адсорбційна іммобілізація є найдавнішим з усіх існуючих методів. Так, ще в 1916 р. Дж. Нельсон і Е. Гріффін провели успішну іммобілізацію інвертази шляхом адсорбції на активованому вугіллі і гелі гідроксиду алюмінію.

Іммобілізація ферментів адсорбцією на нерозчинних носіях передбачає контакт водного розчину ферменту з носіями органічної і неорганічної природи. Утримання адсорбованої молекули ферменту на поверхні носія забезпечується за рахунок неспецифічних ван-дер-ваальсових взаємодій, електростатичних взаємодій, водневих зв'язків і гідрофобних взаємодій між носієм і поверхневими групами білка-ферменту. Тип зв'язку залежить від природи носія і функціональних груп на поверхні молекули ферменту.

Методика адсорбційної іммобілізації. На практиці для одержання іммобілізованих адсорбцією ферментів використовуються такі методичні підходи.

Статичний метод (рис. 7.3, а) найбільш простий і полягає в тому, що носій додають у водний розчин ферменту і одержану суміш залишають на певний час без перемішування. Іммобілізація досягається за рахунок довільної дифузії ферменту до поверхні носія з подальшою адсорбцією. Недоліком методу є те, що для одержання препарату з високим вмістом адсорбованого ферменту потрібен тривалий час.

Спосіб з перемішуванням, або динамічний метод. При ньому носій суспендується в розчині ферменту і одержана суміш безперервно перемішується за допомогою магнітного чи механічного змішувача, або на лабораторній гойдалці (рис. 7.3, б). Цей спосіб більш ефективний за попередній.

Відокремлення іммобілізованого ферменту проводиться шляхом фільтрування або центрифугування. Після відмивання неадсорбованого ферменту препарат готовий до використання.

Метод електроосадження. У цьому випадку в розчин ферменту занурюють два електроди з нанесеним на поверхню одного з них шару носія. При вмиканні електричного струму молекули ферменту завдяки наявним на їх поверхні зарядже-

ним групам починають переміщуватися в розчині й осаджуються на поверхні носія (рис. 7.3, в).

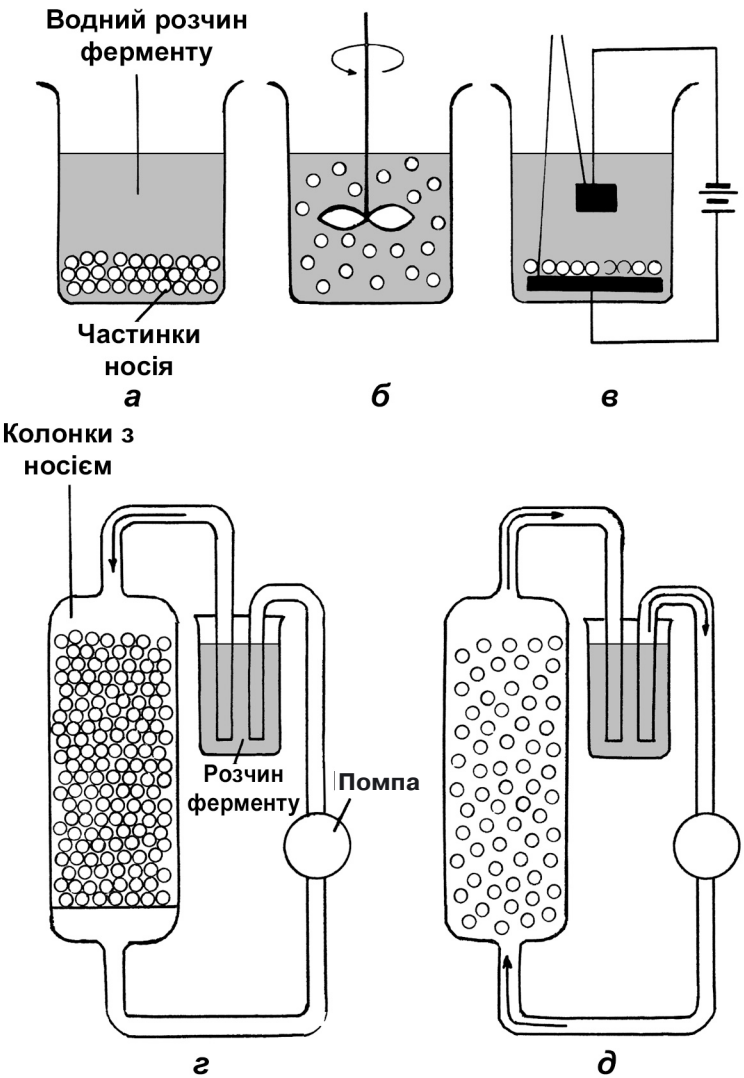


Рис. 7.3. ***Способи адсорбційної іммобілізації ферментів*** *(за Березіним І.В. та ін., 1987)*

Метод нанесення в колонці. Найбільш зручний для технологічного використання іммобілізованого ферменту. Через колонку, заповнену носієм, за допомогою помпи прокачують розчин ферменту, причому швидкість потоку має бути такою, щоб частинки були у завислому стані, утворюючи «кип'ячий шар». Промивку теж проводять у колонці (рис. 7.3, г, д).

Процес адсорбції і міцність зв'язування ферменту з носієм значною мірою залежить від умов проведення іммобілізації. Основними факторами, які впливають на адсорбцію ферменту, є питома поверхня і пористість носія, значення pH та іонної сили розчину ферменту, його концентрація і температура проведення процесу адсорбції.

Питома поверхня і пористість носія. Сорбційна ємність носія пропорційна його питомій поверхні у випадку, коли носій непористий або коли діаметр пор буде приблизно удвічі більший за розмір молекули білка. Коли ж пори будуть малими, то не зможуть вмістити молекулу ферменту і сорбційна ємність носія буде незначною. При цьому вважається, що молекулярні розміри субстрату набагато менші, ніж ферменту, і молекула субстрату здатна проникнути у пору, де знаходиться сорбований фермент. У разі, коли субстратом є речовина з дуже великою молекулярною масою, вибір діаметра пор носія уже диктується розмірами молекули субстрату. До того ж, високомолекулярний субстрат сам може слугувати носієм для іммобілізації ферменту. Наприклад, для адсорбційної іммобілізації ферментів целюлазного комплексу з успіхом був використаний як носій його субстрат — целюлоза.

Значення pH. Реакція середовища дуже впливає на ефективність сорбції ферменту на поверхні носія, особливо якщо сорбція відбувається головним чином за рахунок електростатичних взаємодій. Це пов'язано з тим, що при зміні pH змінюється стан іонізації іоногенних груп носія і білка, які відповідальні за адсорбцію. При використанні носіїв, які не є іонообмінниками, максимальна адсорбція досягається в ізоелектричній точці білка.

Іонна сила. Значення цієї величини впливає на міцність зв'язування ферменту з носієм. При високій концентрації солей присутні в розчині іони витісняють з поверхні носія зв'язані за

рахунок електростатичних взаємодій молекули білка-ферменту. Тобто підвищення іонної сили розчину, як правило, викликає десорбцію ферменту.

Концентрація ферменту. При збільшенні концентрації ферменту в розчині кількість сорбованого на носії ферменту збільшується і відповідно зростає питома каталітична активність іммобілізованого препарату. Але ця закономірність існує до певної межі. При подальшому підвищенні концентрації ферменту не збільшується сорбція ферменту на носії, тобто відбувається «насичення» носія.

Температура. Підвищення температури по-різному впливає на процес адсорбції. З одного боку, сильне нагрівання призводить до денатурації білка і втрати каталітичної активності. З іншого — зростання температури зазвичай забезпечує прискорення процесу. Отже, є оптимальна температура для проведення адсорбційної іммобілізації, величини якої залежать від природи ферменту і носія.

Таким чином, ефективність адсорбційної іммобілізації ферментів визначається тонким балансом цілої низки факторів. Порушення цього балансу внаслідок змін будь-якого із зовнішніх факторів може призвести до різкого ослаблення взаємодії ферменту з носієм і, як наслідок, до його десорбції.

Ефективність сорбції може бути підвищена використанням попередньо модифікованих носіїв і ферментів.

Іммобілізація на попередньо модифікованих носіях. Попередня модифікація носія у багатьох випадках дозволяє суттєво підвищити міцність зв'язування ферменту на матриці.

Модифікуючими агентами для носіїв виступають гідрофобні речовини, розчини іонів металокомплексоутворювачів, а також речовини з великою кількістю груп, здатних до електростатичної взаємодії з білковою глобулою.

1. Обробка носіїв **іонами металів (Ti, Sn, Zn, V, Fe)** підвищує міцність зв'язування ферменту з носієм за рахунок утворення комплексу білка з іонами металів. Іон металу відіграє роль містка, який з'єднує молекулу ферменту з носієм (рис. 7.4, а). Цей метод ефективний при іммобілізації різних ферментів на таких носіях, як, наприклад, целюлоза, найлон, скло, фільтрувальний папір тощо.

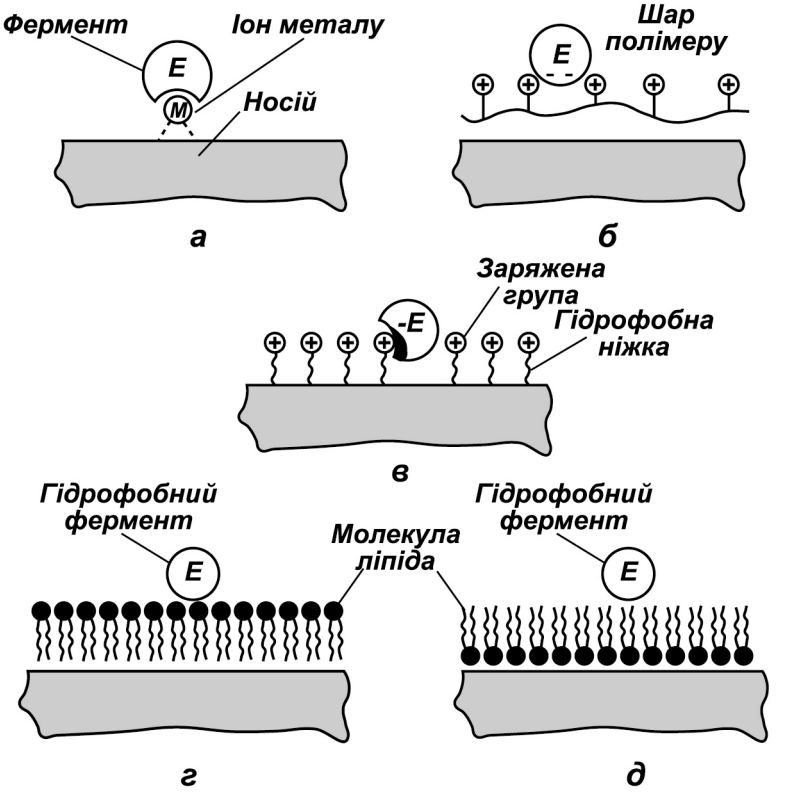


Рис. 7.4. ***Адсорбційна іммобілізація ферментів на попередньо модифікованих носіях***
(за Березіним І.В. та ін., 1987)

2. Модифікація **гідрофобними сполуками** теж сприяє підвищенню ефективності сорбції, що забезпечується гідрофобними взаємодіями між модифікатором і неполярними ділянками на поверхні білкової глобули (рис. 7.4, в). Із носіїв найчастіше використовуються різні агарози, які ковалентно модифіковані гідрофобними групами (алкільними, фенільними та ін.); поліцукристі носії, модифіковані таніном та інші. На кінці такої гідрофобної «ніжки» може бути присутня й заряджена група, завдяки чому забезпечується взаємодія з ферментом одночасно за рахунок електростатичних і гідрофобних сил.

3. Обробка носія речовинами, молекули яких **містять велику кількість функціональних груп**, здатних взаємодіяти з групами на поверхні білкової глобули за рахунок електростатичних сил і водневих зв'язків (рис. 7.4, б). Наприклад, полімеризація на поверхні носія силохрому акрілової кислоти, вінілацетата та ін. з подальшою хімічною модифікацією полімера приводить до утворення носія з високою поверхневою концентрацією функціональних груп (гідроксильних, аміноалкильних, аміноарильних і гідразідних), здатних до електростатичної взаємодії з білковою глобулою.

Як модифікатор часто використовується також альбумін, який наноситься на носій шляхом адсорбції, а потім піддається денатурації нагріванням. Шар денатурованого альбуміну утворює на поверхні носія «м'яку» підкладку з великою кількістю функціональних груп, які здатні міцно зв'язувати молекули ферменту, водночас забезпечуючи для них сприятливе мікрооточення. В результаті у багатьох випадках при обробці альбуміном вдається досягти підвищення ефективності сорбції і покращення каталітичних характеристик іммобілізованого ферменту.

Модифікація носія, окрім підвищення ефективності сорбції, часто забезпечує також покращення каталітичних властивостей іммобілізованого ферменту за рахунок створення для його молекул сприятливого мікрооточення. Крім того, інколи без попередньої модифікації носія взагалі не вдається зберегти каталітичну активність ферменту при адсорбційній іммобілізації. Наприклад, якщо фермент з низькою стабільністю у кислому середовищі pH, то при його адсорбції на силікагелі може відбутися втрата каталітичної активності через те, що поверхня цього носія має кислий характер (pH ~ 4). Для уникнення інактивації ферменту необхідно носій витримати деякий час у буферному розчині зі значенням pH, яке відповідало б оптимальному pH для ферменту.

Аналогічна проблема часто виникає при адсорбційній іммобілізації ферментів, яким для нормального функціонування необхідна наявність в активному центрі іона металу.

При іммобілізації металозалежних ферментів може відбутись вихід іона металу з активного центру ферменту і його

зв'язування на поверхні носія, що супроводжується частковою або повною втратою його каталітичної активності. Це небажане явище можна усунути шляхом обробки носія розчином, який містить іони відповідного металу, а отже, насичити центри сорбції іонів металів на носії.

Модифікація ферментів аналогічно передбачає введення іоногенних груп (полікислоти, карбоксиметилцелюлоза, залишки янтарної кислоти та ін.) або обробку гідрофобними речовинами. У деяких випадках для підвищення зв'язку адсорбованого ферменту з носієм та запобігання його змивання з носія (десорбції) використовується обробка його біфункціональним зшиваючим реагентом. У цьому випадку поверхня носія виявляється покритою плівкою зі зшитих між собою молекул ферменту. Як зшиваючий агент найчастіше використовується глутаровий альдегід.

Переваги і недоліки методу. Іммобілізація ферментів шляхом адсорбції широко розповсюджена. Метод простий, доступний, дешевий, а носії, які використовуються для проведення адсорбції, порівняно недорогі. Іммобілізовані шляхом адсорбції ферменти в більшості випадків мають високу каталітичну активність і переваги в технологічному плані.

Одним із суттєвих недоліків методу є десорбція ферменту, тобто сповзання його з носія, що призводить до втрати дорогого біокаталізатора та забруднення кінцевого продукту, який одержують. Частіше це трапляється в момент додавання субстрату до іммобілізованого ферменту. До інших недоліків можна віднести низький вихід зв'язаного ферменту з розрахунку на одиницю маси носія, а також часткову або повну його інактивацію.

Крім того, недоліком адсорбційного методу іммобілізації є неможливість дати загальні рекомендації, які дозволили б заздалегідь зробити правильний вибір носія і оптимальних умов проведення процесу іммобілізації конкретного ферменту. Це завдання доводиться щоразу вирішувати заново, використовуючи метод проб і помилок.

7.5.1.2. Методи механічного включення молекул ферменту в структуру носія

Іммобілізація ферментів шляхом включення в гелі. Суть цього методу іммобілізації полягає в тому, що фермент включається у тривимірну сітку із тісно переплетених полімерних ланцюгів, які утворюють гель (рис. 7.2, б). Утримання молекул ферменту відбувається за рахунок того, що середня відстань між сусідніми ланцюгами в гелі менша за молекули включеного ферменту, тому він не може полишити полімерну матрицю і вийти в розчин. Певну роль в утриманні ферменту в сітці гелю відіграють іонні і водневі зв'язки, які виникають між ферментом і носієм. Простір між полімерними ланцюгами в гелі заповнений водою, на частку якої зазвичай припадає значна частина загального об'єму гелю.

Гелі можуть бути як органічної, так і неорганічної природи. Неорганічні — це силікагель, гель фосфату кальцію. З органічних використовуються гелі природних поліцукрів (крохмалю, агар-агару, агарози карагінана тощо), природних білків — колагену, а також синтетичних полімерів.

Ефективність включення ферменту в гелі досягається при оптимальному поєднанні розмірів пор гелю і молекули ферменту та оптимізації мікрооточення ферменту.

Для підвищення механічної міцності носіїв і більш міцного утримування включеного в них ферменту використовується обробка матриць біфункціональними зшиваючими реагентами, які здатні взаємодіяти з функціональними групами ферменту.

Перевагою методу є його простота, можливість одержання іммобілізованих препаратів у будь-якій формі (сферичні частинки, плівки та ін.), універсальність, тобто можливість використання для іммобілізації будь-яких біологічно активних речовин, поліферментних систем і навіть клітин. Одержані препарати стабільні, оскільки захищені гелем від несприятливих зовнішніх впливів, у тому числі і від бактеріального забруднення, оскільки крупні бактеріальні клітини не можуть проникнути у дрібнопористу матрицю.

Недоліком одержаних таким методом препаратів є певні дифузні труднощі при взаємодії ферменту з субстратом. А коли

субстратом є високомолекулярна сполука, то цей спосіб іммобілізації взагалі не може бути використаний.

Іммобілізація ферментів з використанням напівпроникних оболонок (мембран). Загальний принцип, який лежить в основі цього способу, полягає в тому, що водний розчин ферменту відділяється від водного розчину субстрату напівпроникною мембраною, яка є непроникною для ферменту й інших високомолекулярних сполук, але дає можливість вільно дифундувати через неї низькомолекулярним речовинам — субстратам і продуктам реакції (рис. 7.5). Фермент бере участь у каталітичній реакції, перебуваючи у нативному стані в розчині і, утримуючись мембраною, легко може бути відокремлений від продуктів реакції.

Існуючі модифікації цього методу відрізняються лише способами одержання напівпроникної мембрани: методи міжфазової поліконденсації, міжфазової коацервації і метод подвійної емульгації.

Мікрокапсулювання. Цей спосіб іммобілізації ферментів розроблений Т. Чангом (1964). Суть його полягає в тому, що водний розчин ферменту включають всередину мікрокапсул — замкнених сферичних пухирців з тонкою полімерною стінкою — мембраною (рис. 7.5, а). Залежно від способу одержання розміри мікрокапсул складають десятки або сотні мікрометрів, а товщина мембрани — соті-десяті долі мікрометра при діаметрі пор близько декількох нанометрів.

Метод мікрокапсулювання особливо зручний для іммобілізації поліферментних систем і може бути придатним для іммобілізації інших БАР, клітинних органел та інших субодиниць клітини, гомогенатів тканин тощо.

Включення ферменту у волокна. Це аналогічний мікрокапсулюванню метод, який відрізняється від мікрокапсулювання головним чином формою одержаних препаратів. У першому випадку утворюються сферичні мікрокапсули, а в другому — нитки.

Основа методу полягає у розчиненні волокноутворюючого полімеру (похідні целюлози, полівінілхлорид, полі-L-метилглутамат) в органічному розчиннику, емульгації одержаного розчину з розчином або суспензією ферменту і протисненні емульсії через фільєри в рідину, яка викликає коагуляцію (наприклад, толуол).

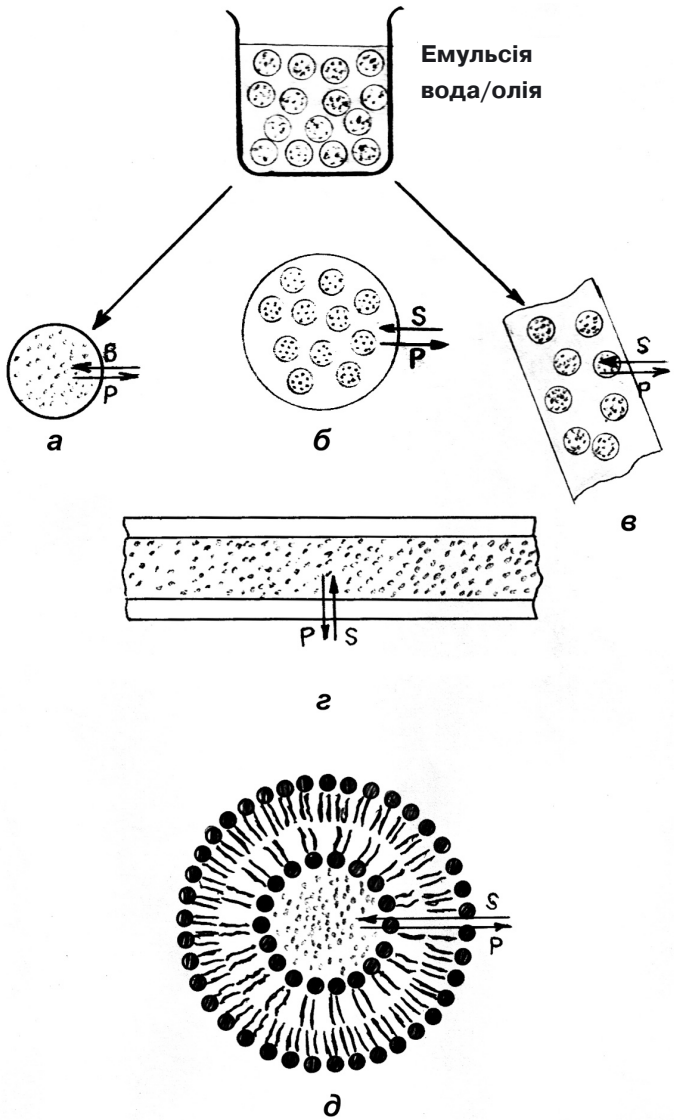


Рис. 7.5. ***Іммобілізація ферментів з використанням напівпроникних оболонок (мембран)***
(за Березіним І.В. та ін., 1987):
а — мікрокапсулювання; б, в — включення у волокна; г — включення у порожнисті нитки з напівпроникними стінками; д — включення в ліпосоми; крапками позначені молекули ферменту; символами S і P субстрат та продукт ферментативної реакції відповідно

Одержані волокна — це пористі полімерні гелі, які містять гомогенну дисперсію невеликих крапель водного розчину ферменту розміром близько 1 мкм (рис. 7.5, в). Змінюючи умови процесу коагуляції, можна змінювати розмір пор у волокнах та кількість включеного ферменту. Однак не всі ферменти можуть бути інкапсульовані у волокнах. Перешкодою є жорсткі умови обробки (контакт з органічними розчинниками).

Для іммобілізації можуть використовуватись і одержані промисловістю готові полімерні порожнисті волокна, які застосовуються для очищення білків методом діалізу (рис. 7.5, г). Їх виготовляють з природних і синтетичних полімерів (целюлоза, полівінілхлорид, поліакриламід).

Для проведення ферментативної реакції волокна, заповнені розчином ферменту, занурюють у розчин субстрату, який дифундує через мембрану всередину волокна.

Недоліком методу є можливість використання тільки низькомолекулярних субстратів. Волокна, як і мікрокапсули, придатні для іммобілізації поліферментних систем, клітин, клітинних фрагментів.

Перевагою методу є його простота. Ферментомісткі волокна мають високу механічну міцність.

Включення ферменту в ліпосоми. Цей метод може використовуватись для іммобілізації практично всіх біологічно активних речовин, а одержані препарати широко застосовуються в медицині, а також для проведення фундаментальних досліджень, оскільки такі системи близькі до природних мембран і їх вивчення може дати цінну інформацію про ферментативні процеси в клітині.

Ліпосоми — це концентричні бішарові замкнуті ліпідні мембрани. Існують декілька способів їх одержання (рис. 7.5, д). У простішому випадку розчин ліпіду (зазвичай лецитину) розчиняють в органічному розчиннику, який упарюють у вакуумі, а на стінках посудини залишається тонка плівка ліпіду. Вона диспергується у водному середовищі, в якому міститься фермент (БАР), з утворенням сферичних капсул — ліпосом. Спосіб інкапсулювання (іммобілізації) ферментів (або інших БАР) в ліпосомах зводиться таким чином до диспергування ліпідної плівки у присутності розчину ферменту.

У другому варіанті методу розчин ліпіду в органічному розчиннику нашаровують на поверхню водного розчину ферменту, після чого органічний розчинник видаляють шляхом випарювання в струмі інертного газу, а ліпідну плівку, що утворилась, диспергують у водному розчині.

Розмір ліпосом залежно від методу їх одержання і фосфоліпідного складу може становить від 250 °А до 1мк і більше. Ліпосоми можуть бути полі- і моноламелярними, тобто складатись з декількох або одного ліпідного шару. Центральне водне ядро поліламелярних ліпосом має діаметр 0,15 мк, а відстань між сусідніми бішарами дорівнює ~ 75 мк.

Спосіб інкапсулювання ферментів (або інших БАР) в ліпосомах зводиться таким чином до диспергування ліпідної плівки у присутності розчину ферменту.

Характер взаємодії включеного білка-ферменту з ліпідними шарами різноманітний. Частина молекул взаємодіє із внутрішніми ліпідними шарами, частково проникаючи в них, а інші молекули ферменту можуть адсорбуватись на зовнішній поверхні ліпосоми.

Відмінність у властивостях структурних частин ліпосом розширюють можливості іммобілізації. Так, речовини, розчинні у воді, можуть включатись у внутрішню фазу ліпосом і/або водний простір між концентричними бішарами, а жиророзчинні можуть включатись у саму мембрану ліпосом. Включення в ліпосоми захищає інкапсульовану речовину від інактивуючого впливу оточуючого середовища.

Сучасні методи одержання ліпосом дають можливість включати в них майже 50 % ферменту, який знаходиться в розчині, причому практично без втрати каталітичної активності.

Іммобілізація ферментів з використанням систем двофазового типу. Відмінною рисою цього способу іммобілізації є те, що обмеження вільного переміщення ферменту в об'ємі системи досягається не за рахунок його взаємодії із жорстким носієм (сорбентом, гелем або мембраною), а внаслідок його здатності розчинятись тільки в одній із фаз двофазової системи, наприклад типу «вода — органічний розчинник, що не змішується з водою» (рис. 7.2, г). В таких системах фермент присутній тільки в одній фазі, а продукт ферментативної реакції зосереджується у

другій. Метод простий, однак використання його обмежується низькою швидкістю процесу, можливістю інактивації ферменту на межі розділення фаз, а також переходом ферменту в протилежну фазу, що призводить до забруднення продукту і втрати дорогого каталізатора. Перевагою систем такого типу є можливість перетворення макромолекулярних субстратів.

Отже, перевагою методів механічного включення є те, що іммобілізована біологічно активна речовина захищена від несприятливих зовнішніх впливів шаром носія, що дає можливість одержати стабільні іммобілізовані препарати.

Недоліком є неспецифічні взаємодії між включеним ферментом і носієм, а також можливі міжмолекулярні взаємодії білків, що спричинює їх автоліз.

7.5.2. Хімічні методи іммобілізації

Хімічні методи іммобілізації ґрунтуються на ковалентному зв'язку молекул ферменту з носієм як органічної, так і мінеральної природи. Основною позитивною якістю препаратів іммобілізованих ферментів, одержаних хімічними методами, є наявність міцних хімічних зв'язків між ферментом і носієм. Це важлива експлуатаційна характеристика іммобілізованого біокаталізатора, оскільки в процесі його використання не «змивається» фермент з носія (десорбція), чим забезпечується чистота продуктів реакції, що надто важливо при одержанні продукції медичного і харчового призначення, а також для забезпечення сталих, відтворюваних результатів у аналітичних системах. Крім того, хімічна іммобілізація ферментів дозволяє суттєво покращити важливі для практики якості — субстратну специфічність, каталітичну активність і стабільність. Саме хімічними методами шляхом багатоточкового ковалентного закріплення білкової структури вдається досягти найбільшої стабілізації ферменту.

7.5.2.1. Основні принципи конструювання препаратів ковалентно іммобілізованих ферментів. При проведенні іммобілізації хімічним методом використовується величезна різноманітність хімічних реакцій, вихідних компонентів та умов перебігу реакцій.

Практично всі функціональні групи білків (α і ε-аміногрупи, α, β і γ-карбоксильні групи, сульфогідрильні групи цистеїну, ароматичні кільця тирозину і триптофану, імідазольна група гістидіну, гідроксильна група амінокислот) можуть бути використані для зшивання ферменту з носієм. Зокрема, широко використовують реакції, які ведуть до утворення пептидних зв'язків між аміногрупами ферменту і карбоксильними групами носія або, навпаки, між карбоксильними групами каталізатора і аміногрупами носія.

В основі методик, що використовуються для хімічної іммобілізації, лежать реакції утворення:

а) амідного зв'язку [–C(O)–NH];

б) карбамідних зв'язків (похідних сечовини: –(NH,O)–C(O,S)–NH–);

в) вторинних амінів [–NH–];

г) азосполучення (утворення азосполук зі зв'язком –N=N–);

д) тіолдисульфідного обміну та інші.

Але незалежно від кількості і хімічної природи компонентів, які використовуються в процесі іммобілізації, кількості і труднощів окремих стадій цього процесу, створюється одна із трьох моделей, до складу яких входить не більше трьох елементів: фермент (Ф), носій (Н) і зшиваючий бі- або поліфункціональний реагент (С, З), який називається «зшивка», «вставка», «спейсер», «ніжка» і займає проміжне положення між молекулами, що зшиваються.

Таким чином, ковалентна іммобілізація ферментів передбачає створення конструкцій, сполучених хімічними зв'язками трьох елементів: НЗФ (максимум) або двох НФ і ЗФ (мінімум). У свою чергу принципи конструювання відповідних моделей можна назвати термінами: «пришивкою» (для НФ), «зшивкою» (для НЗФ) і «вшивкою» для (ЗФ).

Утворення хімічних зв'язків між елементами можливе тільки за наявності специфічних реакційноздатних груп у всіх реагентів, що вступають у взаємодію: ферменту, носія і зшиваючого агента.

За наявності на поверхні носія функціональних груп, здатних вступати у хімічні реакції з функціональними групами ферменту з утворенням ковалентних зв'язків, методика хімічної іммобілізації аналогічна адсорбційній. В розчин ферменту вводиться носій і на ньому проходить адсорбція ферменту, але вона незворотна, бо фермент пришивається до носія однією або декількома ковалентними зв'язками — Н–Ф (рис. 7.6, а).

У разі, коли тісний контакт з носієм може виявитись небажаним, наприклад, через несприятливі зміни мікросередовища ферменту, стеричних і дифузних обмежень, необхідно віддалити фермент від носія на деяку відстань. Ковалентна іммобілізація у цьому випадку відбувається шляхом зшивки ферменту з носієм за допомогою зшиваючого реагента різної довжини — Н–З–Ф (рис. 7.6, б).

За різноманітністю методичних прийомів цей спосіб незрівнянно багатший і гнучкіший за попередній за рахунок зшиваючого агента. По-перше, підбираючи довжину зшиваючого агента (або підбираючи оптимальну суміш зшиваючих агентів різної довжини), можна змінювати каталітичні характеристики іммобілізованого ферменту.

По-друге, можна спеціально конструювати зшивку так, щоб вона містила зв'язок, лабільний за певних умов або такий, що специфічно розщеплюється певними реагентами (зокрема, ферментативно). Це дає ключ до контрольованого відокремлення іммобілізованого ферменту від носія, наприклад, при вирішенні проблем направленого транспорту ферментів у живому організмі.

Ковалентна іммобілізація можлива і в системах, які початково не містять носія, а тільки фермент і зшиваючий реагент (З–Ф). Носій (як тверде тіло) формується безпосередньо у процесі іммобілізації, або ж сам фермент слугує одночасно і носієм. Таким чином, відбувається ковалентне вшивання молекули ферменту в різні типи сіток (рис. 7.6, в). Ідея конструювання ферментних сіток (ретикуляція ферментів) випливає із поліфункціональної природи самої молекули ферменту, який має на поверхні, окрім активного центру, велику кількість реакційноздатних груп. При введенні в розчин ферменту біфункціонального зшиваючого реагента окремі молекули ферменту зшиваються одна з одною і утворюють сітку, в якій вузлами слугують самі молекули ферменту. Залежно від природи і кількості зши-

ваючого агента можна одержати як водорозчинні, так і водонерозчинні препарати.

Інший спосіб ретикуляції заснований на використанні ферментів, попередньо ковалентно модифікованих зшиваючим реагентом, який має подвійний зв'язок (наприклад, акрилоілхлоридом). У цьому випадку при співполімеризації білкового макромономера з низькомолекулярними мономерами (наприклад, з акриламідом), утворюються сітчасті полімерні гелі, зшиті

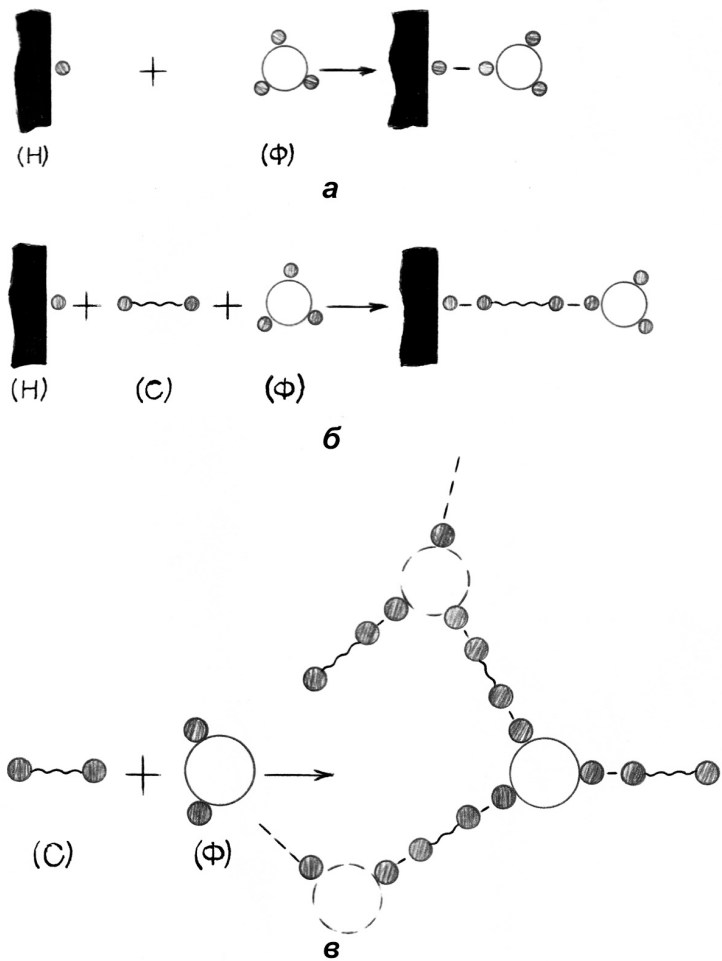


Рис. 7.6. ***Блок-схеми ковалентної іммобілізації ферментів*** *(за Березіним І.В. та ін., 1987)*

білком або додатковим зшиваючим мономером (наприклад, N, N-метилен-біс-акриламідом). У наведеній системі вихідний стан — рідкий розчин, а кінцевий (після полімеризації) — тверде тіло (гель), причому, звичайно, воно набуває форми тієї посудини (реактора), в якій проводиться полімеризація.

Зшивкою білка в об'ємі розчинника (сополімеризація) одержують тривимірний гель (рис. 7.7, а) у вигляді крупного однорідного блока, який можна механічно подрібнювати і використовувати у вигляді частинок у суспензіях.

Тривимірний гель можна готувати і безпосередньо у вигляді дрібних частинок сферичної форми шляхом емульсійної полімеризації. Емульсії одержують диспергуванням водного розчину, який містить мономери в органічному розчиннику, що не змішується з водою. Варіантом таких систем є мікроемульсії або гідратовані обернені (спрямовані) міцели поверхнево-активних речовин (ПАР) в органічних розчинниках. В міцелярних системах розміри «крапельок», які містять модифікований фермент і мономери, можна варіювати і навіть одержувати їх близькими до власних розмірів молекул ферменту. При їх використанні можна обшивати окремі молекули ферменту полімерною оболонкою заданої товщини, тобто одягти фермент у «сорочку, яка зшита за міркою» (рис. 7.7, б). Це нова якість іммобілізації — **молекулярний** рівень.

Процес ретикуляції може відбуватись не тільки в розчині ферменту, але й при використанні його іммобілізованних препаратів. Так, додаткова обробка адсорбційно іммобілізованого ферменту на інертному носії зшиваючим агентом приведе до — підвищення міцності (задублення) препарата. Носій тут не бере участі в хімічній реакції, а слугує лише матрицею для організації шару (моношару) адсорбованого ферменту і обумовлює двовимірну направленість ретикуляції. До того ж, носій може бути взагалі видалений (наприклад, нітроцелюлозу розчиняють у метанолі) і таким чином одержують зшиту ферментну плівку (рис. 7.7, в).

Препарати молекулярно іммобілізованих ферментів можуть бути одержані, якщо обидві групи біфункціонального зшиваючого реагента взаємодіють з однією і тією спмою молекулою білка — ферменту. Тут можна говорити про накладання «хімічних дужок», які внутрішньомолекулярно закріплюють структуру ферменту (рис. 7.7, г).

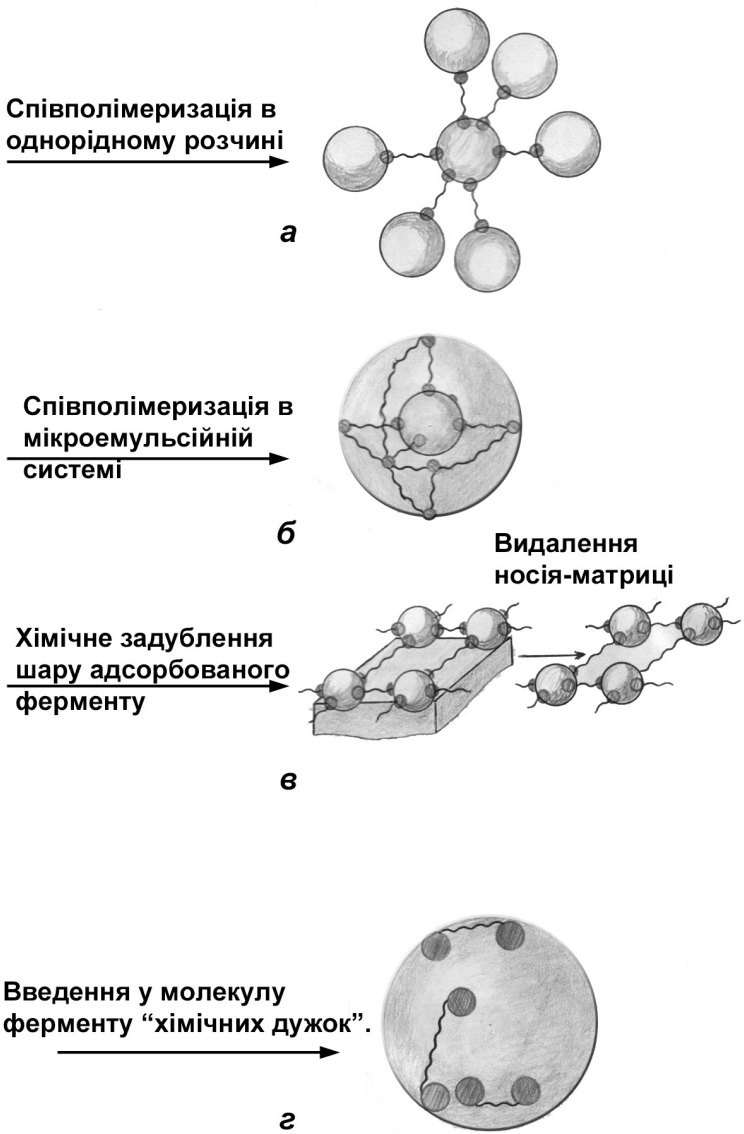


Рис. 7.7. ***Типи ретикуляції ферментів*** *(за Березіним І.В. та ін., 1987):*
а — міжмолекулярна трьохмірна сітка; б — сітчаста оболонка навколо молекули ферменту (молекулярно-іммобілізований фермент);
в — міжмолекулярна двомірна сітка; г — внутрішньомолекулярна сітка із поліпептидних ланцюгів білка та «хімічних дужок».

7.5.2.2. Характеристика реагентів

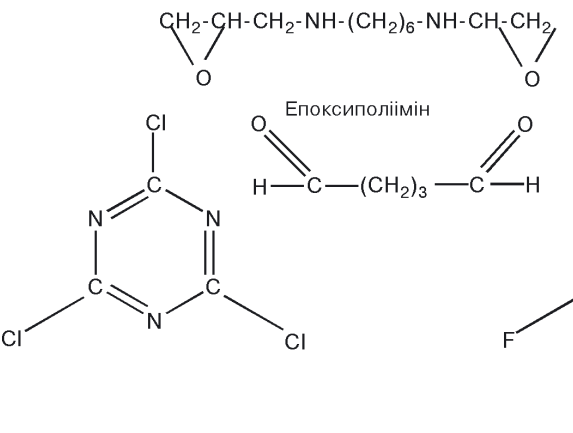
Носій. Для хімічної іммобілізації можуть використовуватись носії як органічної, так і неорганічної природи, природні або синтетичні. У кожному конкретному випадку використовується носій, який має реакційноздатні групи або в нього ці групи введені шляхом активації чи обробки модифікуючими агентами.

Активацію носіїв проводять з метою введення на поверхню електрофільних груп, які реакційноздатні стосовно до нуклеофільних груп білка (аміно- і SH-груп). Для цього, наприклад, вводять діазогрупи, альдегідні, імідоефірні, азидні групи.

Як активатори носіїв використовуються діальдегіди, бромціан, ароматичні хінони, карбодиіміди, хлортриазини, епоксиди, реактив Вудворда тощо.

Зшиваючі реагенти. Можуть бути як простими біфункціональними (тобто з двома однаковими або різними за хімічною природою реакційноздатними групами) і складними, поліфункціональними, в тому числі і побудованих із різних за хімічною природою ланок з неоднаковими за міцністю зв'язками між ними.

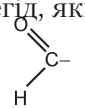
Найбільш широко як багатофункціональні зшиваючі реагенти використовуються: глутаровий альдегід, 2,4-динітро-3,5-дифторбензол, низькомолекулярні карбодиіміди, ціанурхлорид, епоксиполііміни.



Хлористий ціанур Глутаровий альдегід 2,4-динітро-3,5-дифторбензол

Епоксиполіміни здійснюють поперечне зшивання біокаталізаторів за рахунок епокси- та іміногруп.

Хлористий ціанур містить три активних атоми хлору. Він взаємодіє з целюлозою (носій) і ферментом, а третій реакційноздатний зв'язок може бути використаний для взаємодії з іншим компонентом.

Глутаровий альдегід, який є біфункціональним реагентом, своїми альдегідними  групами при нейтральній реакції середовища утворює ковалентний зв'язок з вільними аміногрупами носія і ферменту. Недоліком його є те, що він може взаємодіяти з функціональними групами, які входять до складу активного центру, в результаті чого фермент інактивується. Щоб запобігти цьому, активний центр захищають глутатіоном, цистеїном або іншим низькомолекулярним тіолом тощо.

Зшиваючі реагенти використовуються для віддалення молекули іммобілізованого ферменту від носія на певну відстань. Це обумовлено тим, що у деяких випадках тісний контакт ферменту з носієм є небажаним, наприклад, через несприятливі зміни мікрооточення ферменту, стеричних і дифузійних обмежень. З цією метою використовуються зшиваючі реагенти різної довжини.

Мікрооточення іммобілізованого ферменту — це молекули та іони, що знаходяться дуже близько біля нього і впливають на його активність. Іммобілізація супроводжується зміною багатьох параметрів ферментативної реакції (оптимумів температури і pH, константи Михаєліса, максимальної швидкості реакції та ін.).

Носій впливає на мікрооточення іммобілізованого ферменту. Він може сприяти концентруванню на своїй поверхні або відштовхувати від неї молекули субстрату, продукту реакції, інгібітора, іонів водню та інших молекул і іонів, змінюючи при цьому їхній вміст у безпосередній близькості від ферменту.

Участь носія у створенні мікрооточення іммобілізованого ферменту відрізняється від розчинника. У зв'язку з цим вводиться поняття вільний розчин і мікрооточення ферменту. Якщо фермент, іммобілізованний на поліаніоновому носії і діє

на субстрат, який має позитивний заряд, то у зв'язку з електростатичною взаємодією концентрація субстрату у фазі вільного розчину і в мікрооточенні буде різною. Жоден з іонів, що є у розчині (субстрат, H^+), не розподіляється рівномірно в системі.

Носій впливає також на мікрооточення ферменту в результаті обмежень, створюваних носієм для вільної дифузії молекул (субстрату, продукту, кофактора тощо) як у напрямі до ферменту, так і від нього. Дифузійні обмеження спричинюються внутрішньою або зовнішньою перешкодою.

Зовнішня дифузійна перешкода пов'язана з наявністю навколо носія шару, що не перемішується (шару Нернста), товщина якого залежить від швидкості, з якою розчинник перемішується навколо носія. Зі збільшенням швидкості зменшується величина протидії, створюваної зовнішньою дифузійною перешкодою. Речовини розчинника дифундують у шар Нернста завдяки пасивній молекулярній дифузії і конвекції.

Внутрішні дифузійні перешкоди виникають через обмеження, створювані самим носієм. Визначальною щодо швидкості дифузії є одна з дифузійних перешкод — внутрішня або зовнішня.

Підбираючи довжину зшиваючого агента (або оптимальну суміш зшиваючих агентів різної довжини), можна, по-перше, змінювати каталітичні характеристики іммобілізованого ферменту. По-друге, можна спеціально конструювати зшивку так, щоб вона містила зв'язок, лабільний в певних умовах, або такий, що специфічно розщеплюється певними реагентами (ферментами). Це дає ключ до контрольованого відділення іммобілізованого ферменту від носія, наприклад, при вирішенні проблем направленого транспорту ферментів у живому організмі.

Фермент. Враховуючи, що основою будь-якого ферменту є білок, однією з головних умов успішного проведення іммобілізації хімічним методом є врахування специфічних особливостей будови білкової молекули. Білкові частини ферментів — це компактна конструкція з однієї або декількох поліпептидних ланцюгів, які ковалентно зв'язані (зшиті) між собою дисульфідними містками. Вони побудовані з ~ 20 амінокислот, з'єднаних між собою пептидним зв'язком. Кількість амінокислотних залишків у поліпептидних ланцюгах білків складає від декількох

десятків до тисяч. Однак якісний склад білків (вміст тих чи інших амінокислотних залишків) виявляється дуже схожим. Майже половину усіх амінокислотних залишків білка складають амінокислоти з неполярними або слабополярними бічними групами. В результаті цього за рахунок гідрофобних взаємодій поліпептидні ланцюги скручуються у глобулярні структури таким чином, що ядро складають неполярні фрагменти поліпептидних ланцюгів, а зовнішній шар утворюють ланки з полярними та іоногенними групами, такими як —SH, —OH, —COOH, $—NH_2$.

Звичайно, деяка кількість гідрофобних угруповань також може опинитись на поверхні. З них на глобулі формуються контактні ділянки для зв'язування субстратів і (або) для міжсубодиничних взаємодій.

Таким чином, білкові глобули несуть на своїй зовнішній поверхні реакційноздатні функціональні групи — мішені. Реакційна здатність білка — ферменту визначається набором і кількістю розміщених ззовні білкової молекули функціональних груп: тіольних (цистеїну), гідроксильних (серину, треоніну, тирозину), карбоксильних (глутамінової і аспарагінової кислот), гуанідинових (аргініну), імідазольних (гістидину) та аміногруп (лізину).

Найбільш реакційноздатними є SH-групи цистеїну. Вони здатні брати участь у різноманітних хімічних реакціях: окислення, ацилювання, алкілування і т.д. Однак SH-групи не зовсім підходять на роль груп-мішеней для ковалентної іммобілізації через низку причин. По-перше, вміст цистеїну в білках невеликий. По-друге — дуже часто в білках немає вільних SH-груп, тому що вони беруть участь в утворенні дисульфідних містків, які стабілізують структуру ферментів. По-третє: у разі, коли такі групи у білка є, вони, як правило, входять до складу активного центру ферменту і необхідні для каталітичної активності. Тоді при іммобілізації їх спеціально захищають обробкою ферменту різними речовинами. Але попри на це, SH-групи є дуже привабливими як групи-мішені. Тому розроблені методи введення в молекулу ферменту екзогенних SH-груп, наприклад, модифікацією аміногруп білка потрібними реагентами, зокрема, ацилюванням тіолактоном гомоцистеїна.

Для різних хімічних модифікацій і для ковалентної іммобілізації найчастіше використовуються аміногрупи білка. Це обумовлено низкою причин: їх у білку забагато; вони високореакційноздатні і поступаються лише SH-групам за кількістю та різноманітністю реакцій, у яких вони можуть брати участь; здебільшого аміногрупи відіграють другорядну роль у підтримці структури і функції ферментів.

Крім того, така важлива властивість аміногруп, як здатність бути донором протонів, забезпечує у фізіологічних умовах наявність на поверхні білка позитивних зарядів, які взаємодіють з негативно зарядженими карбоксильними групами білка з утворенням сольових містків. Для ковалентної іммобілізації через аміногрупи розроблена велика кількість носіїв і зшиваючих реагентів.

Таким чином, найбільш зручною групою-мішенню для хімічної іммобілізації є аміногрупа. Однак, крім аміногруп, у реакціях модифікації та іммобілізації можуть брати участь й інші групи білка: тіольні, імідазольні, гуанідинові, гідроксильні, а також небілкові компоненти ферменту, або ж реакційна система, зокрема, вода.

Головним завданням іммобілізації ферментів хімічним методом є максимальне збереження каталітичної функції ферменту шляхом використання функціональних груп, які не входять до активного центру ферменту і несуттєві для виявлення каталітичної активності, а також створення умов іммобілізації, які не викликають денатурації білкової молекули. Отже, при хімічній іммобілізації бажано захищати активний центр ферменту. Для цього можна використати різні захисні реагенти, субстрати, зворотні інгібітори тощо.

Загальною перевагою іммобілізованих хімічним методом препаратів є чітко визначені і контрольовані властивості, що дуже важливо при використанні їх у медицині і в аналітичній роботі.

Недоліком хімічних методів іммобілізації і одержаних таким методом препаратів є їх висока вартість, складність одержання і в зв'язку з цим недоцільність їх використання у великомасштабних промислових процесах. З цією метою більш придатними препаратами є ти, що одержані фізичними методами іммобілізації і особливо шляхом адсорбції.

Таким чином, при іммобілізації ферменти із розряду гомогенних каталізаторів (які знаходяться у тій же фазі, що й субстрати реакції) переходять у розряд гетерогенних (які утворюють особливу фазу, що відділена від реагентів).

7.6. ФІЗИКО-ХІМІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ІММОБІЛІЗОВАНОГО ФЕРМЕНТУ

Фізико-хімічною характеристикою іммобілізованого ферменту є його стабільність. Стабільність ферменту — це здатність зберігати каталітичну активність в даних умовах. Визначається стабільність структурою самого ферменту, а також характером його взаємодії з оточуючими частинками в розчині, на поверхні, всередині носія або в об'ємі полімерного гелю.

Кількісною характеристикою стабільності ферменту є константа швидкості мономолекулярної інактивації ферменту (Кін). На практиці користуються або константою швидкості інактивації ферменту на певній глибині стадії його інактивації (50 або 75 %), або враховують час, протягом якого активність ферменту зменшується удвічі (тобто період напівжиття або напівінактивації ферменту).

Про стабільність ферменту роблять висновки також за його залишковою активністю після інкубації протягом певного часу, за певної температури або в присутності денатуруючого фактора. Коли йдеться про стабілізацію ферменту, мають на увазі зменшення константи швидкості інактивації ферменту.

Оцінку ефекту стабілізації або дестабілізації проводять шляхом порівняння Кін ферменту вихідного (нативного) з іммобілізованою формою при певній температурі.

7.7. КЛАСИФІКАЦІЯ ІММОБІЛІЗОВАНИХ ФЕРМЕНТІВ

Згідно з рекомендаціями Міжнародної комісії з ферментної технології в 1972 р. для іммобілізованих ферментів складена така класифікаційна схема (рис. 7.8). Відповідно до такої схеми усі іммобілізовані ферменти поділяються на дві групи: вмонтовані і

зв'язані. Вмонтовані, у свою чергу, поділяються на дві підгрупи: укладені в матриці і мікроінкапсульовані.

Ферменти залежно від методу зв'язування поділяються на адсорбовані та ковалентно зв'язані. Ковалентно зв'язані, у свою черг, бувають зшитими (коли використовується зшивач, модель Ф–З–Н або З–Ф) і ковалентно приєднані до носія (модель Ф–Н).

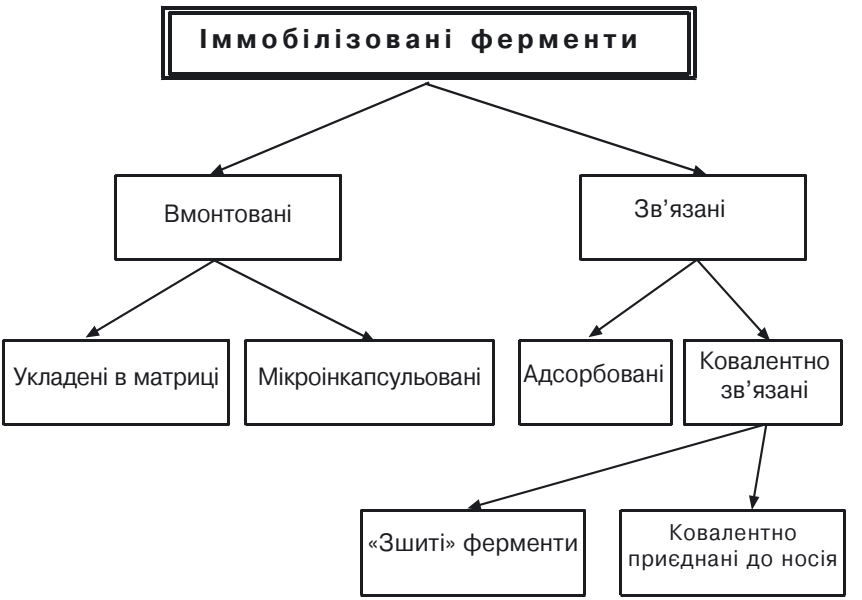


Рис. 7.8. ***Класифікація іммобілізованих ферментів*** *(О.В. Скородумова, Н.Г. Рибальський, 1990)*

7.8. ІММОБІЛІЗАЦІЯ КЛІТИН (АДГЕЗІЯ)

Крім біологічно активних речовин (в т.ч. ферментів), можна іммобілізувати цілі мікробні клітини. Це явище називається адгезією.

Слід зазначити, що пріоритет в області іммобілізації клітин належить не вченим, а природі. У природі більшість мікроорганізмів знаходиться (на тій чи іншій стадії розвитку) в закріпленому стані на поверхні тіла тварин, рослин, у воді, в гірських породах і особливо в ґрунті. Без адгезії мікрорганізми не могли б існувати у природі. Вона є важливою екологічною рисою існування мікроорганізмів. Так, у ґрунті адгезія дозволяє мікроорганізмам утримуватись у ґрунтовому профілі і не вимиватись в нижні горизонти. Крім того, адгезовані клітини знаходяться на межі розділу твердого тіла і рідини, де зосереджені основні поживні речовини. Розкладання рослинних решток, деяких мінералів теж відбувається лише при адгезії мікроорганізмів.

Явище адгезії на різних носіях почали використовувати дуже давно. Ще більше 150 років тому в Німеччині використовували закріплені на буковій стружці бактерії для виробництва оцту. В 1857 р. Луї Пастер наголошував, що додавання адсорбентів стимулює спиртове бродіння.

Однією з перших робіт, яка започаткувала використання в області інженерної ензимології поряд з ферментами безпосередньо клітин, є робота шведських дослідників К. Мосбаха і П. Ларссона, опублікована в 1970 р. У Радянському Союзі вперше були опубліковані роботи в цьому напрямку в 1974 р.

Перший промисловий процес з використанням іммобілізованих клітин здійснено в 1973 році. Відома японська фірма «Танабе Сейяко» за допомогою іммобілізованих в поліакріламідному гелі клітин Escherichia coli здійснила процес одержання аспарагінової кислоти з фумарової кислоти. Тепер існує більше десятка біотехнологічних процесів, у яких використовуються іммобілізовані клітини (синтез амінокислот, органічних кислот, антибіотиків).

Ферментативна активність іммобілізованих клітин використовується також при очищенні стічних вод, особливо від токсичних сполук, наприклад фенолу, бензолу, гексаметилендіаміну.

Можлива також деградація і неприродних речовин, таких як циклічний дімер амінокапронової кислоти, який міститься у стічних водах з найлонового виробництва. Створені пілотні установки, в яких використовується суміш адсорбованих мікроорганізмів, що здійснюють денітрифікацію стічних вод, а також вилучення з них важких металів. Показана можливість використання цілих клітин Algaligenes eutrophus, іммобілізованих в альгінатний або карагінановий гель, для очищення стічних вод від тритію. 10 г клітин (сира біомаса) еквівалентні 1 г платинового каталізатора.

Іммобілізовані клітини використовуються для обробки не тільки стічних вод, але й органічних відходів. Реактор з адсорбованими клітинами в анаеробних умовах діяв два роки. Одержаний біогаз містив 90 % метану і менше 5 % CO_2.

Для іммобілізації можуть використовуватись клітини у різному стані: живі і пошкоджені різною мірою. Одностадійні реакції можуть здійснювати і живі, і пошкоджені клітини. Поліферментні реакції проводять з використанням живих клітин, які тривалий час можуть регенерувати АТФ та інші кофактори (НАД, НАДФ).

Іммобілізовані клітини мають певні переваги над іммобілізованими ферментами: при використанні іммобілізованих клітин нема необхідності виділення і очищення необхідних ферментів, що має високу вартість; ферменти в клітині функціонують в нативному оточенні і їх денатурація в процесі роботи зводиться до мінімуму; клітини здійснюють одно- і складні багатостадійні процеси синтезу практично в один етап; у деяких випадках мають вищу ферментативну активність і стабільність окремих ферментів; значно ширший діапазон використання і більше можливості масштабування біотехнологічних процесів.

Основними недоліками адгезії є: обмеження дифузії як субстрату до клітини, так і продукта реакції у зворотному напрямку через стінку клітини, плазматичну або внутрішньоклітинну мембрану; необхідність підтримання цілісності клітини і утримання клітин у тій фазі росту, у якій синтезуються потрібні ферменти; через присутність у клітині великої кількості ферментів (що в деяких випадках є перевагою) можливі небажані побічні реакції.

Однак, незважаючи на недоліки, даний напрямок біотехнології дуже перспективний (судячи з кількості публікацій та оцінок спеціалістів) і поступово витіснятиме процеси з використанням як іммобілізованих ферментів, так і вільних клітин. Найбільш перспективним напрямком реалізації біотехнологічного потенціалу іммобілізованих клітин є клітинна і генетична інженерія, гібридомна технологія, субклітинна інженерія, ґрунтова біотехнологія тощо.

Варто зазначити, що іммобілізувати можна не тільки цілі клітини мікроорганізмів, але й клітини рослинних і тваринних тканин, використовуючи їх так, як і активні біокаталізатори для синтезу фізіологічно активних речовин. Перспективною є також іммобілізація клітинних органел як активних поліферментних систем.

7.8.1. Основні методи іммобілізації клітин

Методи іммобілізації клітин мікроорганізмів умовно можна розділити на три типи: фізичні, механічні і хімічні (рис. 7.9), але частота використання їх різна.

Фізичні методи. До них належать адсорбція і агрегація.

Адсорбція є одним із найбільш традиційних способів іммобілізації клітин. Як адсорбенти (носії) можуть використовуватись різні органічні і неорганічні носії — різні природні мінерали (пісок, глини, дерев'яна стружка тощо) і синтетичні матеріали (кераміка, капрон, поліуретан та ін.). Останнім часом особливої уваги заслуговують крупнопористі носії. Однак цей спосіб, маючи низку суттєвих переваг (низька вартість, простота іммобілізації, відсутність дифузних затруднень і екологічність), містить чимало недоліків, які обмежують сферу застосування крупнопористих носіїв. Головна із них — це незначна адгезія мікроорганізмів.

Агрегація. Цей метод полягає у зв'язуванні клітин між собою з утворенням агрегатів. Він рідко використовується в біотехнологічних процесах.

Механічні методи. Методи включення клітин у різні гелі одержали найбільше розповсюдження. Для цього найчастіше використовується поліакриламідний гель, карагенан, альгінатні

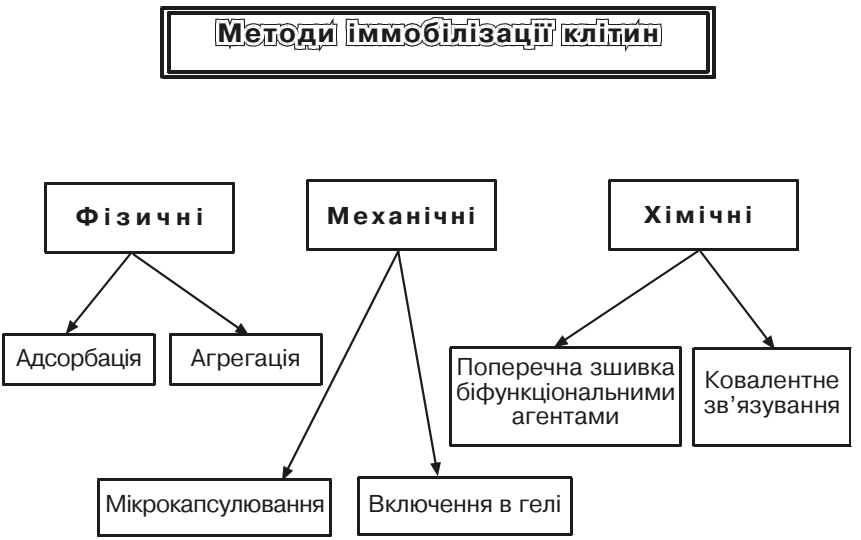


Рис. 7.9. ***Основні методи іммобілізації клітин*** *(Н.Г. Рибальський, І.Г. Чапліна, 1990)*

гелі, а також фотопоперечнозшиті й уретанові полімери. Клітини, включені в поліакриламідний, Са-альгінатний і карагінановий гелі, можуть зберігати життєздатність і за присутності поживного середовища розмножуватись у приповерхневих шарах гелю.

Залежно від властивостей носія і характеру процесу використовують носії у вигляді гранул, волокон або мембран.

Мікрокапсулювання є одним з традиційних методів іммобілізації і останнім часом набуває широкого розповсюдження для іммобілізації клітин.

Хімічний метод. Він грунтується на утворенні ковалентних зв'язків з активованим носієм, на поперечній зшивці клітин за рахунок активних груп амінокислот та інших сполук у стінці клітин з біфункціональними реагентами, наприклад глутаровим альдегідом.

Хімічні методи іммобілізації клітин не знайшли такого широкого розповсюдження, як для іммобілізації ферментів та інших біологічно активних речовин. Це пов'язано, в першу чергу,

з токсичною дією на клітини різних біфункціональних реагентів, хоча останнім часом з'явились різні методи, які зменшують токсичну дію реагентів, що дає можливість підвищити життєдіяльність клітин.

В останні роки запропонований абсолютно новий спосіб проведення ферментативних реакцій як для вільних, так і для іммобілізованих клітин — двофазові водно-органічні системи. Клітини при цьому локалізовані у водній фазі і меншою мірою зазнають впливу органічного розчинника, який не змішується з водою.

Японські дослідники розробили спосіб іммобілізації клітин у фоточутливі полімери. Іммобілізовані таким чином клітини є особливо прийнятними для використання двофазових систем і перетворення стероїдних сполук. Однак цей метод не підходить для живих клітин, але дає гарні результати при проведенні одностадійних реакцій.

Контрольні питання

1. Інженерна ензимологія і її основне завдання. Що лежить в основі сучасної інженерної ензимології?
2. Що таке іммобілізація та іммобілізовані ферменти?
3. З якою метою проводиться іммобілізація ферментів?
4. Які носії використовуються для іммобілізації і як вони класифікуються?
5. Що таке органічні полімерні носії і їх характеристика?
6. Чим відрізняються носії неорганічної природи і яким чином їх можна використати для хімічної іммобілізації?
7. Що таке місткість або ємність носія і від чого вона залежить?
8. Що таке модифікація і активація носія?
9. Яким вимогам мають відповідати носії? Які додаткові вимоги висуваються до полімерних носіїв?
10. Якими методами можна провести іммобілізацію ферментів?

11. Що таке адсорбційна іммобілізація і які носії можуть при цьому використовуватися? За рахунок чого відбувається утримання адсорбованої молекули ферменту на поверхні носія? Фактори, які впливають на адсорбцію?
12. Якої природи мають бути гелі для іммобілізації ферментів?
13. Що таке ліпосоми? За рахунок чого проходить іммобілізація ферментів при включенні їх у ліпосоми?
14. Які особливості має метод іммобілізації ферментів мікрокапсулюванням?
15. Як відбувається іммобілізація ферментів при використанні систем двохфазового типу?
16. На чому базуються хімічні методи іммобілізації?
17. Які основні принципи конструювання ковалентно-іммобілізованих ферментів?
18. Які носії використовуються для хімічної іммобілізації?
19. Що таке зшиваючий реагент і з якою метою він використовується при іммобілізації ферментів?
20. Чим визначається реакційна здатність білка-ферменту? Які функціональні групи білка є найбільш реакційноздатними?
21. Які реакційноздатні групи використовуються як групи-мішені для ковалентної іммобілізації?
22. Яке головне завдання при іммобілізації ферментів хімічним методом?
23. Які недоліки і переваги хімічного методу іммобілізації?
24. Що є фізико-хімічною характеристикою іммобілізованого ферменту?
25. Що покладено в основу класифікації іммобілізованих ферментів, коли і ким вона була запропонована?
26. Що таке іммобілізація клітин і значення цього явища?
27. Якими методами проводиться іммобілізація клітин?
28. Які переваги і недоліки має іммобілізація клітин порівняно з іммобілізацією ферментів?

Розділ 8.

ВИКОРИСТАННЯ ІММОБІЛІЗОВАНИХ ПРЕПАРАТІВ З ЛІКУВАЛЬНОЮ МЕТОЮ

Застосування ферментів та інших біологічно активних речовин (БАР) білкової природи в терапії має давні традиції. Сучасна медицина широко використовує високоочищені препарати БАР білкової природи як перспективні засоби медикаментозного лікування завдяки їхній високій активності і специфічності. Сьогодні визначилися такі основні напрями ензимотерапії:

1) усунення дефіциту ферментів з метою компенсації вродженої або набутої функціональної недостатності;

2) видалення нежиттєздатних, денатурованих структур, клітинних і тканинних уламків;

3) лізис тромбів;

4) комплексна терапія злоякісних новоутворень;

5) детоксикація організму.

Як лікувальні препарати ферменти застосовуються з метою поповнення відсутніх в організмі каталізаторів, що виникає внаслідок генетичних чи інших патологічних порушень, а також для специфічного руйнування шкідливих продуктів обміну, що накопичуються в організмі хворого.

На сьогодні дуже важливою проблемою є лікування уроджених ензимопатій. Нині досліджено майже 150 уроджених «лізосомних» хвороб накопичення, за яких через генетично обумовлену відсутність того чи іншого ферменту в клітині відбувається летальне нагромадження субстрату. Сюди ж варто віднести і захворювання, що виникають через відсутність ферменту, який каталізує певну стадію обміну. Наприклад, фенілкетонурія (хвороба, яка призводить до затримки розумового розвитку) викликається нестачею ферменту, що перетворює фенілаланін у тирозин. Відсутність глюкозо-6-фосфатдегідрогенази в еритроцитах призводить до виникнення невиліковного захворювання — фавізму. Захворювання печінки і нирок супро-

воджується нагромадженням в організмі токсичних продуктів життєдіяльності.

Теоретично з лікувальною метою у таких випадках потрібно ввести хворому відсутній фермент із чужорідного джерела. Але спроби лікувати внутрішньовенним введенням відповідних нативних ферментів, виділених з біологічних рідин і тканин, не дали бажаних результатів, особливо при лікуванні лізосомних хвороб.

Причиною неефективності терапії нативними ферментами є швидке виведення чужорідного білка-ферменту з кровотоку і захоплення його печінкою ще до його дії, а також зумовлення ними як чужорідними білками різних побічних реакцій (антигенність, алергенність, токсичність тощо), що може стати причиною летального наслідку.

В живому організмі ферменти і фізіологічно важливі білки майже завжди містяться всередині клітини. При цьому фермент знаходиться в оточенні, яке здатне підтримувати його нативну структуру, і часто локалізований у безпосередній близькості до інших ферментів, які переробляють продукт реакції першого. Ферментативні системи взаємодіють із субстратами через мембрану клітини за допомогою різних транспортних механізмів.

При безпосередньому введенні ферменту в організм, він може потрапити в умови, які сприяють його денатурації, і активність ферменту буде стрімко знижуватись одразу ж після ін'єкції. Небезпечними для ферментів є протеїнази організму, які розщеплюють введений білок на неактивні пептиди, а також інгібітори, які зв'язуються з ферментом через активний центр. В результаті вони будуть утилізовані лейкоцитами і фагоцитами. Крім того, введений у нативному стані фермент, як речовина високої молекулярної маси, дифундуватиме дуже повільно у потрібне місце (хворий орган), а введений безпосередньо у хвору ділянку буде швидко вимиватися кровотоком або іншими рідинами. Крім того, широке щоденне застосування ферментів обмежене й економічними факторами — їх високою вартістю, а цьому можна запобігти за рахунок іммобілізації ферменту, що сприяє його стабілізації і захищає певною мірою від реакції імунної системи, а також збільшує час його дії у кровотоці.

8.1. ІММОБІЛІЗАЦІЯ ПРЕПАРАТІВ. НОСІЇ ДЛЯ ІММОБІЛІЗАЦІЇ

Модифікація лікарської речовини дозволяє пролонгувати її дію в організмі, знизити токсичність препарату, що використовується, та уникнути його протеолізу.

Поряд з проблемою імуногенності одним з головних завдань при виготовленні лікарських препаратів на основі ферментів (білкових речовин) є виведення препарату з організму повністю. Наразі шляхи виведення ферменту в цілому з'ясовані і основною проблемою є виведення з організму носія.

Тому носії, які використовуються для іммобілізації білкових лікарських препаратів, мають відповідати певним вимогам, які залежать від способу їх застосування. Вони не повинні негативно впливати на організм і мають сприяти проникненню препарату до бажаної цілі (до хворого органу). І носії, і зшивка повинні бути нетоксичними, без антигенних властивостей. При безпосередньому введенні носій повинен з часом руйнуватися в тканинах і виводитися з організму або метаболізуватися. У зв'язку з цим молекулярна маса носія не має перевищувати 60000, щоб він міг виводитися нирками. Речовини з високою молекулярною масою забиватимуть ниркові канальці. Винятком можуть бути полімери, що деградуються, які руйнуються в організмі до нормальних метаболітів. До таких полімерів, наприклад, належить D, L-полімолочна кислота, декстрани.

Якщо ж іммобілізований фермент буде використовуватись у позаорганізмовому шунті, то кращий носій — вініловий полімер. Стабілізація терапевтичних ферментів у деяких випадках може здійснюватися без використання полімерних носіїв за рахунок хімічної модифікації білкової глобули низькомолекулярними реагентами, або введенням у глобулу внутрішньомолекулярних зшивок з біфункціональних реагентів, що ускладнює денатураційне розгортання молекули білка. Цей підхід важливий тоді, коли для здійснення функції ферменту має відбутися його взаємодія з рецептором клітинної мембрани (наприклад, паратромбін–тромбоцит), або проникнути всередину клітини.

У деяких випадках використовується міжмолекулярне зшивання ферментів біфункціональними реагентами типу глутаро-

вого альдегіду, що можна також розглядати як іммобілізацію однієї молекули ферменту на іншій. Така модифікація ферменту приводить до підвищення його стабільності й ефективності. Наприклад, таким чином удалося стабілізувати α-галактозидазу, яка використовується для лікування хвороби Фабрі.

Зв'язування ферментів з іншими білками також дає виражений ефект — кон'югати урикази або гемоглобіну з альбуміном здатні в декілька разів довше циркулювати в активному стані у кровотоці, ніж відповідні нативні білки *(Ларіонова Н.І., Торчилін В.П., 1982)*.

Найкращими носіями є поліцукри, зокрема декстрани, завдяки високій біосумісності. Для іммобілізації терапевтичних ферментів можуть використовуватись і деякі нетоксичні та неімуногенні синтетичні полімери, наприклад, реакційноздатні похідні поліетиленгліколю, полівінілпіролідону, полівінілового спирту та ін.

Певну перспективу відкриває використання як носіїв природних сполук, які самі по собі мають корисну фізіологічну активність або здатні посилювати дію зв'язаного з ним ферменту. Так, для іммобілізації тромболітичних ферментів може використовуватись антикоагулянт гепарин.

Можливість регуляції імунної відповіді організму на введення терапевтичного ферменту є дуже важливим моментом. Багато перспективних ферментних препаратів не можуть використовуватися через те, що викликають, як чужорідні білки, негативні реакції організму. В той же час іммобілізація таких ферментів на природних або синтетичних полімерах, наприклад, на поліцукрах або поліетиленгліколі, різко знижує імунологічні й алергічні реакції, мабуть, за рахунок стеричних перешкод взаємодії антиген–антитіло, які створюються матрицею.

8.2. МЕТОДИ ІММОБІЛІЗАЦІЇ І ЗАСТОСУВАННЯ ПРЕПАРАТІВ

Іммобілізація терапевтичних ферментів та інших білкових препаратів може проводитися різноманітними методами ковалентної і нековалентної фіксації ферментів на нерозчинних і

розчинних носіях різної природи. Вибір методу залежить від призначення препарату та способу його введення.

Існують два принципово різних підходи до одержання і застосування іммобілізованих терапевтичних ферментів: 1) введення в організм; 2) використання у реакторах за допомогою позаорганізмового шунта (штучної нирки) чи імплантації реактора з іммобілізованим ферментом як протеза кровоносної судини.

Перший підхід обумовлюється різновидами, що залежать від патологічних уражень організму. При різних системних ураженнях, коли необхідна присутність терапевтичного ферменту в різних органах і тканинах, доцільно використовувати тим чи іншим методом іммобілізований водорозчинний препарат, який має підвищену стабільність та уповільнене виведення з організму. До нього належать різні ферментовмісні «штучні клітини» типу мікрокапсул, ліпосом, «тіней» еритроцитів.

З іншого боку, для терапії локальних уражень, коли присутність ферменту потрібна лише у місці ураження, доцільно створювати біосумісні ферментовмісні полімерні частини (які біодеградуються чи просто тимчасово імплантуються), що можуть бути локалізовані в певному місці і залишатися там деякий час, виділяючи безперервно в оточуюче середовище терапевтичний фермент.

Препарати іммобілізованих ферментів для локального застосування можуть бути одержані як на основі нерозчинних полімерів, так і носіїв, які біодеградуються. У першому випадку носій після закінчення дії ферменту механічно видаляється з вогнища ураження, а в другому — самостійно руйнується у тканинах.

З використанням мікрогранул зшитого декстрану-сефадексу були одержані препарати тромболітичних ферментів з заданою швидкістю біодеградації — фібролізин, стрептокіназа і урокіназа. Вони можуть створювати локальне депо при терапії тромбозів.

Другий підхід в одержанні і застосуванні іммобілізованих ферментів — це використання їх у різних екстракорпоральних апаратах для перфузійного очищення різних біологічних рідин.

Екстракорпоральна перфузія з використанням ферментів широко застосовується для виведення токсинів з організму. Носіями є сферичні частинки з полімерів, скла, кераміки, силікатів. Вимоги до цих носіїв такі: вони мають бути з мінімальною неспецифічною сорбцією, не повинні викликати деформацію формених елементів крові і не мають бути дорогими, тому що колонки для гемодіалізу і детоксикації одноразового використання.

Окремим випадком цього підходу є створення ферментних реакторів, які використовуються як тромбобезпечні протези кровоносних судин. Сюди належить також перев'язувальний матеріал, який містить зазвичай протеолітичні ферменти, що використовуються для очищення гнійних ран.

При лікуванні системних уражень розчинні препарати іммобілізованих ферментів можуть використовуватися для традиційного **внутрішньовенного введення**. Але краще їх вводити **у черевну порожнину**, де каталітична активність зберігається протягом 8 місяців. Так, модифіковані декстраном карбоксипептидаза G і аргіназа при внутрішньочеревному введенні мишам з прищепленою мастоцитомою мають здатність створювати більш високу і тривало діючу концентрацію активності у кровотоці, ніж нативні ферменти. Іммобілізація на розчинних полімерних носіях дає можливість одержати більш стабільні, активні і безпечні терапевтичні препарати. Таким методом можна з успіхом іммобілізувати інші препарати білкової природи — різні фізіологічно активні поліпептиди типу панкреатичного інгібітора трипсину і, що надто важливо, гормону інсуліну.

Перспективним методом іммобілізації і застосування модифікованих форм ферментів для лікування є створення різного типу **«штучних клітин».**

Лікарські препарати, в яких співвідношення білок : полімер за масою дуже високе і досягає сотень тисяч і вище, можуть бути виготовлені за допомогою методу так званої «штучної клітини», а також ліпосом. Ці препарати є свого роду мікросферами з більш-менш твердою і проникною оболонкою. Їхнє призначення різне.

Першим типом «штучних клітин» є **мікрокапсули,** які були одержані Чангом Т.М. в 1965 році. Мікрокапсульовані препара-

ти ферментів – це крихітні реактори діаметром від 10^3 до 510^4 нм, тонка полімерна оболонка яких (200–400 нм) проникна для низькомолекулярних сполук, тобто для низькомолекулярних субстратів і продуктів їх перетворення. Фермент, який знаходиться всередині оболонки, надійно утримується, не контактує з біологічними рідинами і тканинами організму, не руйнується протеїназами, не інгібується та не викликає імунної реакції. В мікрокапсулу можуть бути включені відносно високі концентрації ферменту, досягти яких у кровотоці при використанні нативного ферменту неможливо, а також різні ферменти одночасно.

Основною перевагою мікрокапсул є можливість імплантувати їх у потрібне місце, наприклад у безпосередній близькості до пухлини. Фермент, включений у капсулу, може бути попередньо стабілізованим, або поряд з ним можуть бути включені сполуки, також високомолекулярні, які сприяють його стабілізації.

Капсули можуть містити мікроскопічні ділянки тканин. Наприклад, є експериментальні дані зі створення депо інсуліну в організмі шляхом імплантації мікрокапсул, що містять острівки Лангерганса, які синтезують у підшлунковій залозі інсулін *(Березін І.В. та ін., 1987)*.

Всередину мікрокапсул можуть бути включені поліферментні системи і їх кофактори, модифіковані з метою збільшення молекулярної маси та утримання всередині мікросфери.

Полімерна стінка мікрокапсул зазвичай виготовляється із міцних синтетичних полімерів (поліамідів, поліуретанів та ін.), або з природних (полімолочної кислоти). Полімолочна кислота біодеградується з достатньою швидкістю і тому зникає проблема утилізації матеріалу оболонок мікрокапсул в організмі, а такі ферментні препарати є дуже перспективними. Однак застосування мікрокапсул із синтетичних полімерів дуже ефективне при позаорганізмовому їх використанні: у вигляді колонок для діалізу в апараті «штучна нирка». Це дає можливість зменшити об'єм препарату і відповідно кількість необхідних дорогих розчинів. Наприклад, для мікрокапсульованої «штучної нирки» потрібна колонка об'ємом усього 30 мл, яка працює майже у 100 разів швидше за звичайний апарат.

Уреазу з носієм (іонообмінною смолою чи активованим вугіллям) поміщують в одну мікрокапсулу. Аміак, який утворюється в процесі розкладу сечовини, адсорбується всередині мікрокапсули:

$$\text{Сечовина} \xrightarrow[\text{в мікрокапсулу}]{\text{дифузія}} \text{сечовина} \xrightarrow{\text{уреаза}} HCO_3^- + NH_4^+ \xrightarrow{\text{адсорбція на смолі чи на активованому вугіллі}}$$

Вірогідно, ферментні реактори на мікрокапсулах будуть використовуватися для деградації недіалізованих матеріалів.

У деяких випадках для виготовлення мікрокапсул використовуються високомолекулярні сполуки, розчинні за одних умов і зберігають високу міцність оболонок — за інших. Таким чином поводить себе ацетилфталілцелюлоза, мікрокапсули з якої інтактні у шлунковому соці і розчиняються у кишечнику, звільнюючи вміст.

Всередину мікрокапсул можуть включатися магнітні частинки. У цьому випадку ззовні підводять магнітне поле і препарат утримують поблизу органу-мішені (хворого органу).

Перші успішні експерименти із застосування мікрокапсульованих ферментів на тваринах були проведені з використанням уреази для зниження сечовини в крові, каталази для лікування тварин з каталазною недостатністю і аспарагінази для пригнічення росту аспарагінозалежних пухлин *(Ларіонова Н.І., Торчілін В.П., 1982)*.

Наступним після мікрокапсулювання методом створення штучних клітин є включення ферментів у **ліпосоми** — штучні фосфоліпідні мікробульбашки, які ще називають контейнерами-переносниками.

Ліпосоми — це бішарові сферичні утворення діаметром від 20 до 10^3 нм, які одержують найчастіше при механічних впливах на дисперсії фосфоліпідів (Ларіонова Н.І., Торчілін В.П., 1982). Ліпосоми цілком біосумісні, не викликають імунологічних реакцій, а фосфоліпіди ліпосом при їхній деградації можуть бути використані для синтезу клітинних мембран. На відміну від мікрокапсул ліпосоми мають здатність доставляти включений у них препарат безпосередньо до клітин, з якими ліпосоми взаємодіють, та сприяти надходженню відсутнього ферменту в лізо-

соми. Однак уже через 15–30 хвилин після введення 50–80 % ліпосом поглинаються клітинами ретикулоендотеліальної системи, насамперед печінки і селезінки. Отже, є проблема специфічного поглинання ферменту, укладеного в ліпосомах, певними тканинами. Є ідеї, реалізація яких дозволить ліпосомам доставляти фермент за адресою, тобто до хворого органу. Для цього передбачається на поверхню ліпосом включати антитіла до антигенних структур, що знаходиться на поверхні тих клітин, для яких призначений фермент.

З великої кількості ферментів, уже включених у ліпосоми, викликає інтерес аспарагіназа, що використовується для лікування деяких форм лейкозу. Установлено, що деякі лейкозні клітини не можуть синтезувати амідаспарагін, а отже, не можуть рости без використання екзогенного аспарагіну. Введення в кров'яне русло іммобілізованої за допомогою включення в ліпосоми чи капсули з полімолочної кислоти аспарагінази призводить до зниження концентрації цього аміду в крові до мінімального рівня. Загибель лейкозних клітин настає від аспарагінового голодування.

Враховуючи те, що клітини ретикулоендотеліальної системи, зокрема печінки, являють собою природну мішень для ліпосом, то включені у ліпосоми ферменти можуть виявитися дуже ефективними для лікування різних ферментних нестач печінки.

Як контейнери для включення ферментів можуть використовуватися і оболонки клітин крові, зокрема мембрани або **«тіні» еритроцитів**. Одержують їх шляхом часткового гемолізу еритроцитів з подальшим заповненням ферментом та повним відновленням цілісності мембрани. Таким методом одержали «тіні» еритроцитів, які заповнені β-глюкозідазою, β-галактозідазою, β-глюкуронідазою, аспарагіназою.

Крім еритроцитів, використовуються і оболонки інших клітин. Так, одержані лікарські препарати, які включені в **оболонки макрофагів** *(Березін І.В. та ін., 1987)*. Макрофаги мають тенденцію накопичуватись у вогнищах запалення, а значить і можуть транспортувати туди як низько-, так і високомолекулярний лікарський препарат. Позитивним щодо «тіней» клітин як носіїв є їх повна сумісність з організмом людини чи тварини, оскільки цей носій готують на основі клітин, виділених із організму пацієнта.

Певний інтерес становлять **міцели** — утворення, які менші за діаметром від ліпосом. Вони дуже перспективні як носії ферментів для виготовлення складних мазевих композицій, в яких ферменти нестійкі.

8.3. ТЕРАПІЯ ІММОБІЛІЗОВАНИМИ ФЕРМЕНТАМИ

Завдяки перевагам, яких набувають іммобілізовані ферменти порівняно з нативними (стабільність, неімуногенність, не піддаються протеолізу, дії мікроорганізмів, можуть мати властивість концентруватись у бажаному органі), вони є дуже перспективними для застосування у клінічній практиці. Найбільших успіхів досягнуто у двох напрямах: лікуванні гострої серцевої недостатності і терапії процесів, викликаних ранами.

Найбільш широко використовуються в клінічній практиці протеолітичні ферменти. Одержані іммобілізовані протеази — субтилізин, трипсин, α-хімотрипсин, терилітин і ін.

У колишньому Радянському Союзі вперше в світі у лікувальну практику була впроваджена іммобілізована на поліцукристому носії стрептокіназа, яка з успіхом і зараз використовується для лікування різних тромболітичних захворювань. Препарат «Стрептодекіназа» не має антигенних властивостей, нетоксичний і стабільний.

Відомо, що протеїнази, розщеплюючи денатуровані білки, сприяють очищенню ран і, відповідно, їх загоюванню. Як носії для іммобілізації протеолітичних ферментів з цією метою найчастіше використовуються волокнисті матеріали на основі целюлози, полівінілового спирту, солей альгінової кислоти, поліамідні і колагенові волокна. Готують також препарати, іммобілізовані на гранульованих носіях — целюлозних кульках, гранулах декстрину тощо. Готують нитки, в які при формуванні включають фермент і використовують їх як зшивний матеріал.

Порівняльний аналіз дії нативних та іммобілізованих протеїназ (в основному α-хімотрипсину, трипсину, терилітину, субтилізину, колагенази) показав, що уже на 2–4-й день рана очищається від некротичних мас і вдвічі швидше настає грануляція. Іммобілізовані протеолітичні ферменти з великим успі-

хом використовуються у лікуванні гнійних захворювань легень і плеври. Природний полімер колаген ефективний як носій при використанні протеїназ для введення у черевну порожнину, лікування емпіем, абсцесів.

Для створення протезів судин зі зниженою або виключеною можливістю тромбоутворення використовуються біосумісні полімерні трубки, на внутрішній поверхні яких іммобілізують протеїнази.

Іммобілізовані протеолітичні ферменти ефективно використовуються для лікування гнійних захворювань та опіків у людей та тварин *(Анюліс Е. і ін., 1989, Щетінін В.В., 1991)*.

Такі протеолітичні ферменти як професим і процель, іммобілізовані на гемоцелюлозі методом ковалентного зв'язування, застосовують при лікуванні гнійних ендометритів, гнійних маститів та гнійних ран кінцівок тварин *(Анюліс Е. і ін., 1989)*. Перевага цих ферментів ще й у тому, що вони не всмоктуються в кров і не впливають на якість продукції.

Дуже важливими при лікуванні різних патологій є білки-інгібітори ферментів, і, зокрема, основний полівалентний інгібітор протеїназ. Його іммобілізували на поліцукрі КМ-декстрані (карбоксиметилдекстран), який, у свою чергу, модифікували залишками галактози. Білкові інгібітори протеїназ застосовуються при лікуванні сепсису, бактеріального (ендотоксичного) шоку, алергічних захворювань, артрозоартритів та ін. При інфаркті міокарда інгібітори протеїназ мають антиішемічну дію, зменшуючи некротичну зону і покращуючи колатеральний кровообіг.

На основі іммобілізованих білкових інгібіторів протеїназ синтезовані біоспецифічні сорбенти, які використовуються для лікування таких патологій як сепсис, гнійний перитоніт, опікова хвороба, нирково-печінкова недостатність *(Валуєва Т.А. і ін., 1988)*.

Одержаний іммобілізований на органічному носії поліетиленоксиді протеолітичний фермент протосубтилін, який застосовується у виробництві біопрепаратів, гуманній і ветеринарній медицині *(Салганик Р.І. і ін., 1988)*. Препарат має підвищену активність і термостабільність і, крім того, активний в більш широкому діапазоні pH.

Одержаний також комплексний вітамінний препарат, іммобілізований на колагені і призначений для профілактики порушень обміну речовин. Іммобілізація вітамінних комплексів (аскорбінової кислоти, тіаміну, броміду пірідоксину) на колагеновому носії проводилася методом включення вітамінів у гель. Дослідами на лабораторних тваринах встановлено, що використання іммобілізованого комплексу вітамінів більшою мірою впливає позитивно при порушенні обміну речовин, ніж застосування водного розчину цих же вітамінів окремо.

Контрольні питання

1. У яких випадках використовуються ферментні препарати з лікувальною метою?
2. З якою метою проводиться іммобілізація ферментних препаратів, призначених для ензимотерапії?
3. Які носії використовуються для іммобілізації терапевтичних ферментів?
4. Які вимоги до носіїв, що використовуються для іммобілізації лікувальних ферментів і від чого вони залежать?
5. Які методи іммобілізації застосовуються для одержання терапевтичних препаратів?
6. Які існують методи використання іммобілізованих терапевтичних ферментів?
7. У чому полягає перспективність методу іммобілізації шляхом створення «штучних клітин»?
8. Які особливості іммобілізації та застосування у терапії мікрокапсул?
9. Що таке ліпосоми та їх характеристика? Які переваги і недоліки має цей метод іммобілізації?
10. Які особливості має метод включення терапевтичних ферментів у «тіні» еритроцитів та в оболонки макрофагів, їх застосування?
11. Які іммобілізовані ферменти застосовуються у гуманній і ветеринарній медицині?

Розділ 9.

ВИКОРИСТАННЯ ІММОБІЛІЗОВАНИХ ФЕРМЕНТІВ У АНАЛІТИЧНІЙ РОБОТІ

Унікальна специфічність дії і висока каталітична активність, а також дедалі більша доступність індивідуальних ферментів стали причиною їх широкого використання для аналітичних цілей, в медицині (гуманній і ветеринарній), харчовій, мікробіологічній і медичній промисловості, для контролю оточуючого середовища і наукових досліджень.

Поряд із вдосконаленням різних фізико-хімічних інструментальних методів (хроматографічних, радіохімічних, люмінесцентних та ін.) методи аналізу з використанням як реагентів ферментів застосовуються для виявлення і кількісного визначення різних речовин: металів, органічних і неорганічних сполук, метаболітів, ферментів, мутагенів, онкогенів тощо.

Особливістю сучасних підходів до створення біохімічних методів аналізу на основі ферментів є високі вимоги до їх чутливості, точності, специфічності, відтворюваності, можливості автоматизації, вартості. Крім того, аналіз має бути експресним, розрахованим на використання мікрокількості зразка і можливість проведення дослідження у багатокомпонентних середовищах, наприклад, таких як сироватка крові, стічні води тощо.

Ще однією характерною рисою сучасного аналізу є його різномасштабність залежно від умов використання: поодиноких у промисловості (1–100 аналізів на день) і масових (10^3–10^4) при епідеміологічних обстеженнях, причому аналізи повинні проводитися як у стаціонарних, так і в пересувних лабораторіях.

Наведені вище вимоги зумовили створення численних видів ферментних аналізаторів.

Однак попри на переваги ферментативних методів аналізу, їх використання донедавна обмежувалося сферою клінічної біохімії. Це пояснюється такими причинами:

1) ферменти – це, у більшості випадків, дуже дорогі препарати, які виділяються із дефіцитної рослинної або тваринної сировини;
2) багато ферментів є нестабільними і швидко втрачають свою каталітичну активність, зберігаються, як правило, при низькій температурі;
3) розчинні ферменти дуже чутливі до дії різних домішок, які можуть міститися в об'єктах, що аналізуються;
4) розчинні ферменти можуть бути використані лише одноразово, що також підвищує вартість аналізу.

Для широкого впровадження ферментних методів аналізу в медицину (гуманну і ветеринарну), екологію і технологічне виробництво необхідно було вирішити декілька практично важливих завдань: знайти дешевші і доступні джерела ферментів, підвищити стабільність біокаталізаторів, зробити можливим багаторазове використання ферментів. Це досягається методами біотехнології, технічної мікробіології, генної інженерії та інженерної ензимології. Ферменти рослинного і тваринного походження поступово замінюються на мікробні ферменти. Біотехнологи навчились одержувати «на замовлення» такі штами-мутанти, які синтезують необхідний фермент у десятки і сотні разів більших кількостях, ніж вихідні штами.

Принциповим кроком у розвитку ферментативного аналізу було впровадження в аналітичну практику іммобілізованих ферментів, які мають переваги над розчинними формами:

1) багаторазове використання в реакторах періодичної і безперервної дії;
2) висока стабільність при зберіганні і в умовах проходження процесу;
3) знижена чутливість до дії активаторів та інгібіторів, що підвищує специфічність аналізу;
4) простота використання у вигляді готових реагентів;
5) можливість проведення послідовних вимірів з одним і тим самим зразком;
6) зниження вартості аналізу за рахунок вартості самих ферментів, допоміжних реагентів, особливо кофакторів;

7) можливість використання іммобілізованих ферментів у різноманітному обладнанні;
8) скорочення часу аналізів;
9) збільшення pH і температурного оптимуму дії ферментів.

Для іммобілізації ферментів використовують різноманітні типи носіїв, залежно від конструктивних особливостей обладнання. Наприклад, для ферментних електродів використовуються синтетичні полімери, які утворюють плівку з включеними в їхні пори ферментами. Для автоаналізаторів фотометричного типу перспективними виявилися найлонові трубки, на поверхню яких пришиті ферменти. Такі трубки дозволяють проводити з одним зразком до 10000 аналізів *(Єгоров А.М., 1984)*. Для колончастих реакторів ефективні макропористі носії на основі модифікованих кремнеземів.

Перші роботи з аналітичного використання іммобілізованих ферментів належать до середини 60-х років минулого століття. У 1965 р. Дж. Гілболт включив холінестеразу в крохмальний гель, який нанесли на поліуретанову пластинку і використали для виявлення фосфороорганічних пестицидів у повітрі *(Березін І.В. та ін., 1987)*. Іммобілізована холінестераза використовується сьогодні в автоматичних датчиках у промисловому виробництві інсектофунгіцидів для постійного контролю повітряного середовища цехів.

У 1966 р. Г. Хікс і С. Апдайк вперше використали аналітичні колончасті реактори з ферментами, включеними в поліакріламідний гель. За допомогою глюкозооксидази визначали глюкозу, а лактатдегідрогенази – молочну кислоту. Субстрати пропускали через невеликі колонки об'ємом 1–5 мл. Продукт, який утворюється (H_2O_2 або НАД · H_2), досліджували колориметрично. З однією колонкою, тобто з однією порцією іммобілізованого ферменту вдавалося провести десятки і навіть сотні аналізів. Відтоді і розпочалась ера іммобілізованих ферментів у хімічному аналізі. Подальший розвиток робіт у цій сфері відбувався за наступними напрямами.

9.1. АНАЛІТИЧНІ ПРОТОЧНІ РЕАКТОРИ З ІММОБІЛІЗОВАНИМИ ФЕРМЕНТАМИ

Використання іммобілізованих ферментів відкрило можливість створення проточних аналізаторів, необхідних для контролю технологічних процесів.

Були запропоновані різноманітні реактори з іммобілізованими ферментами – у вигляді колонок, трубок, порожнистих ниток. Для заповнення колонок використовували ферменти, ковалентно зв'язані з носіями – амінованим склом, акриловими полімерами, агарозою або сефарозою, найлоновим порошком, силікагелем, силохромом тощо.

Головною вимогою до носіїв є: здатність зв'язувати найбільшу кількість ферменту (висока місткість), забезпечувати швидке проходження аналізованої суміші через реактор і відсутність сильної неспецифічної сорбції її компонентів на носії, тому що це може призвести до зниження активності ферменту і до збільшення тиску в колонці.

Одним з найкращих носіїв для колончастих реакторів є сефароза, активована бромціаном. На ній успішно іммобілізували не тільки окремі ферменти, але й поліферментні системи. Першою на такому реакторі визначали незамінну амінокислоту – триптофан.

Р. Сандерем (1977) як ферментні реактори використовував найлонові трубки. Внутрішня поверхня була частково гідролізована кислотою, а потім на найлоні був ковалентно іммобілізований фермент. Ці трубки приєднували до автоматичних проточних аналізаторів фірми «Технікон». За допомогою таких реакторів визначали різні метаболіти і ліки в сироватці крові: сечовину, сечову кислоту, амінокислоти, глюкозу, лактозу, мальтозу, пеніцилін та ін.

Оригінальний варіант ферментного реактора запропонували італійські хіміки *(Марконі В. і ін., 1975)*. Вони розробили метод включення ферменту всередину порожнистих ниток триацетатцелюлози в момент її формування, тобто в момент витягування нитки з розчину. Фермент опинявся включеним у внутрішню порожнину, куди могли проникати тільки низькомолекулярні субстрати. Ці нитки накручували у вигляді кату-

шок, поміщали у скляну оболонку і через такий ферментний реактор пропускали аналізовану суміш. За допомогою такого методу сьогодні визначається пеніцилін, сечовина, глюкоза й інші речовини.

9.2. ФЕРМЕНТНІ МІКРОКАЛОРИМЕТРИЧНІ ДАТЧИКИ

Для харчової і мікробіологічної промисловості на основі іммобілізованих ферментів розроблені датчики на вуглеводи, які дозволяють проводити їх безперервне визначення.

У 1975 р. К. Мосбах зі співробітниками (Швеція) вперше запропонували використовувати в колонних ферментних реакторах мікрокалориметричний датчик для аналізу метаболітів. Датчик (рис. 9.1) складається із двох ідентичних колонок, заповнених іммобілізованим на склі або сефарозі ферментом. В нижній частині кожної колонки є термістор. Якщо через колонки прокачується буферний розчин, то ніякої реакції не відбувається і різниця температур між двома термісторами дорівнює нулю. Коли в колонку вводиться буферний розчин з аналізованим субстратом, то в результаті ферментативного перетворення останнього виділяється тепло. Температура в цій колонці підвищується. Різниця температур між двома термісторами пропорційна кількості перетвореного субстрату.

Перевагою методу є те, що його можна використовувати для будь-якої ферментної системи, непрозорих середовищ, для реакцій, де не утворюються забарвлені продукти. Чутливість методу дає можливість виявляти мікромолярні кількості різноманітних речовин.

9.3. ФЕРМЕНТНІ ЕЛЕКТРОДИ

Це тип ферментних реакторів, у яких фермент і електрод утворюють єдину конструкцію, яка не потребує для їхнього функціонування додаткових реагентів, окрім буферного розчину. Такі електроди одержали назву «безреагентних» датчиків, а методи аналізу, що ґрунтуються на їх використанні називаються «безреагентними». Електроди разом з іммобілізованими ферментами,

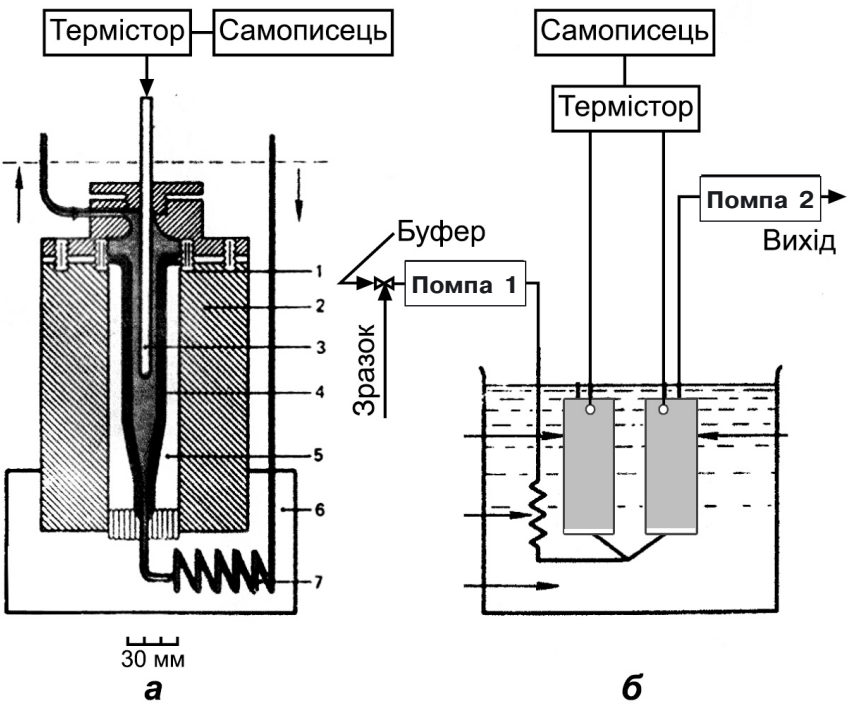


Рис. 9.1. ***Мікрокалориметричний датчик для аналізу метаболітів за допомогою іммобілізованих ферментів*** *(за Березіним І.В. та ін., 1987):*

а — пристрій вимірювального блока: 1 — кріплення верхньої і нижньої частини колонки; 2 — металевий блок; 3 — термістор; 4 — мікроколонка, яка заповнена іммобілізованим ферментом; 5 — внутрішня частина блока; 6 — водяна баня; 7 — теплообмінник;

б — загальна схема установки: стрілками показано напрям потоку розчину, який аналізується; 1 — колонка з ферментом; 2 —теплообмінник; 3 — колонка порівняння; 4 — водяна баня.

утворюючи єдину конструкцію, являють собою ферментний електрод (рис. 9.2).

Єдина конструкція створюється шляхом розміщення розчинного або іммобілізованого на розчинному носії ферменту в приелектродному шарі, який відділений від решти простору

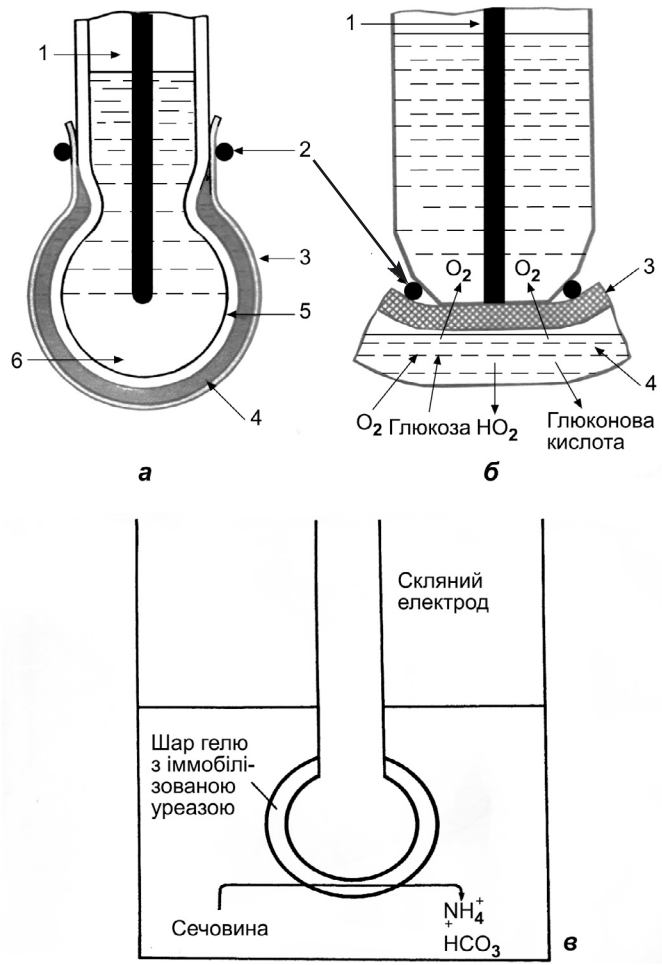


Рис. 9.2. ***Ферментні електроди*** *(за Березіним та ін., 1987):*

а — ферментний електрод на основі скляного електрода для вимірювання pH:
1 — металевий електрод; 2 — гумове кільце; 3 — діалізна плівка або інша напівпроникна мембрана; 4 — розчин ферменту або шар полімерного гелю, що містить фермент; 5 — скляна мембрана, яка проникна для іонів водню; 6 — приелектродний буферний розчин;

б — схема електрода для визначення глюкози:
1 — катод; 2 — електрод порівняння, який знаходиться у внутрішньому буферному розчині; 3 — напівпроникна полімерна мембрана; 4 — шар іммобілізованої глюкозооксидази;

в — електрод для визначення сечовини; в цьому електроді уреаза іммобілізована в гелі, який нанесений на поверхню скляного електрода.

діалізною мембраною. Однак частіше ферменти включають у полімерні або гелеві плівки альбуміну, желатину, колагену, агар-агару, гідроксиду алюмінію або ковалентно приєднують до напівпроникних целюлозних, полікарбонатних мембран чи до поверхні скляних дисків. Потім така плівка (або диск) прикріплюється до поверхні електрода.

У ферментних електродах, як і в інших ферментних аналітичних системах, можуть використовуватися не тільки одноферментні, але й поліферментні системи і навіть клітини мікроорганізмів. В останньому випадку одержують так звані «бактеріальні» електроди. Так, іммобілізовані нітрифікуючі бактерії окислюють аміак з утворенням нітриту киснем, зниження якого вимірюється електродом Кларка. Аналогічні методи були розроблені для визначення метану і інших газів, а також для етанолу, оцтової кислоти, мутагенів. Мікробні електроди прості, селективні, стабільні і можуть використовуватися для контролю забруднення довкілля.

Г. Рехніц у 1977 р. покрив NH_3-чутливий електрод пастою клітин Streptococcus faecalis і за його допомогою визначав аргінін за реакцією дезамінування. Час роботи такого електрода складав 20 діб, а час відповіді – 20 хв. Якщо на електрод наносити попередньо зруйновані клітини, то час відповіді скорочується до 10 хв, а тривалість роботи електрода збільшується до 40 діб.

Потенціометричні ферментні електроди використовуються для визначення амінокислот, сечовини, нітрат- і нітритіонів, пеніциліну. З ферментів у них використовуються оксидази або декарбоксилази амінокислот, уреаза, нітрит- і нітратредуктаза та ін.

Важливим напрямом сучасного ферментативного аналізу є використання мультиферментних систем, у яких один з ферментів забезпечує специфічність реакції, а інший – переведення продуктів цієї реакції у речовину, яка легко детектується (виявляється) фізико-хімічними методами. Наприклад, деякі ферментативні реакції, пов'язані з утворенням перекису водню, можуть використовуватися для фотометричного аналізу разом з пероксидазою. Для визначення різних вуглеводів як універсальний детектор використовується глюкозооксидаза. Наприклад, визначення лактози здійснюються таким чином:

$$\text{лактоза} \xrightarrow{\beta\text{-галактозидаза}} \text{глюкоза} + \text{галактоза},$$

$$\text{глюкоза} \xrightarrow[+\ O_2]{\text{глюкозооксидаза}} \text{глюконова кислота} + H_2O_2.$$

На основі електрода на глюкозооксидазу можуть бути створені електроди на різні вуглеводи (лактоза, цукроза, поліцукри).

9.4. БІОЛЮМІНЕСЦЕНТНИЙ МІКРОАНАЛІЗ

Одним з перспективних методів аналізу є біолюмінесцентний метод на основі світлячкової і бактеріальної люциферази.

Під час аналізу реєструється світло, яке випромінюється збудженими продуктами реакції, інтенсивність якого за оптимальних умов проведення процесу пропорційна концентрації таких важливих метаболітів або коферментів, як АТФ, НАД · H_2, H_2O_2, гемін, ФМН тощо. Висока специфічність цих реакцій стосовно субстратів, високий квантовий вихід (від 0,01 до 1,0) дозволяє аналізувати багато речовин з межею виявлення до 1 фмоль при використанні поліферментних спряжених (поєднаних) реакцій.

У 1976 р. вперше були одержані препарати іммобілізованої люциферази бактерій. У 1977 р. люциферазу світлячків іммобілізували на скляних кульках і на BrCN-сефарозі. Зі скляних кульок були виготовлені стрижні, за допомогою яких визначали 10^{-6} моль/л і більш високі концентрації НАД · H_2 та АТФ. Згодом як носії використовували діалізні плівки, ацетатцелюлозні мембрани, целюлозу і ін. Іммобілізовані люциферази мають в 10–100 разів вищу стабільність, їх можна використовувати багаторазово для визначення АТФ, НАД · H_2.

На рис. 9.3 показаний аналізатор з колонним проточним реактором, у якому знаходиться ковалентно іммобілізована люцифераза на BrCN-сефарозі для визначення концентрації АТФ. Аналогічний реактор з іммобілізованою біферментною системою бактерій дозволяє визначати мікрокількості НАД · H_2.

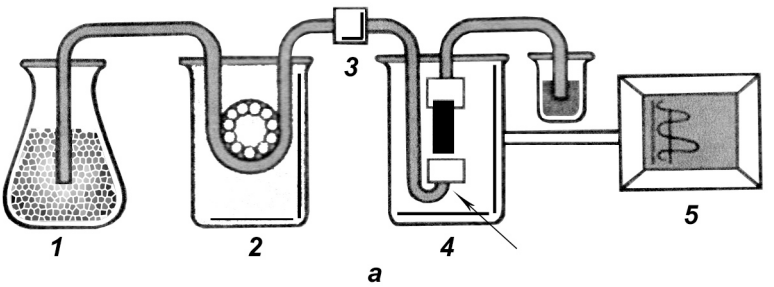


Рис. 9.3. ***Біолюмінісцентний мікроаналіз з колонним реактором*** *(за Березіним І.В. та ін., 1987):*

а — схема установки; 1 — розчин субстрату; 2 — перистальтична помпа; 3 —пристрій для введення зразка, що аналізується; 4 — колонка з іммобілізованою люциферазою в кюветному відділі люмінометра; 5 — реєструючий пристрій (самописець або дисплей).

Біолюмінесцентним методом сьогодні визначаються багато діагностично важливих біохімічних тестів, у яких визначуваною речовиною є АТФ або НАД · H_2. Наприклад, підвищення в сироватці крові активності креатинкінази спостерігається при таких важких захворюваннях, як інфаркт міокарда, інсульт або мускульна дистрофія. Біолюмінесцентний метод дозволяє встановити активність цього ферменту від 0,1 до 1000 МО (в нормі сироватка містить менше 10 МО креатинкінази). Ферментативний метод аналізу креатинкінази заснований на таких реакціях:

$$\text{АДФ + креатинфосфат} \xrightarrow{\text{креатинкіназа}} \text{АТФ + креатин.}$$

Наприкінці кінці XX століття з'явилося чималоо робіт з використання в мікроаналізі соіммобілізованих поліферментних біолюмінесцентних систем. Наприклад, за допомогою триферментної соіммобілізованої системи: аденілаткіназа + піруваткіназа + люцифераза світлячків визначають різні аденінові нуклеотиди: АМФ, АДФ і АТФ таким чином:

$$\text{АМФ + ЦТФ} \xrightleftharpoons{\text{аденілаткіназа}} \text{АДФ + ЦДФ}$$

$$\text{АДФ + фосфоенолпіруват} \xrightleftharpoons{\text{піруваткіназа}} \text{АТФ + піруват.}$$

Потім АТФ вимірюють люциферазою світлячків. При аналізі АДФ, окрім люциферину, беруть субстрат піруваткінази – фосфоенолпіруват, а для визначення АМФ у реакційну суміш вводять цитидинтрифосфат (ЦТФ). Отже, один біокаталізатор, що містить три співіммобілізованих ферменти, використовується для визначення трьох нуклеотидів.

Триферментна система: бактеріальна люцифераза + оксидоредуктаза + форміатдегідрогеназа, що співіммобілізовані на BrCN-сефарозі, використовуються для визначення НАД в інтервалі концентрації 10^{-12}–10^{-6} моль/л і форміату з межею виявлення 10^{-12} моль/л. У цьому випадку НАД перетворюється за реакцією:

$$\text{НАД} + \text{HCOOH} \xrightarrow{\text{форміатдегідрогеназа}} \text{НАД} \cdot \text{H}_2 + \text{CO}_2 \text{ в НАД} \cdot \text{H}_2,$$

який вимірюється біолюмінесцентно.

Великою перевагою співіммобілізованих поліферментних систем є те, що активність співіммобілізованих ферментів зростає у десятки, а іноді в сотні разів порівняно з їх розчинними формами. Певно, при співіммобілізації досягається значно вища локальна концентрація ферментів і продуктів проміжних реакцій на поверхні носія, полегшується дифузія продуктів однієї ферментативної реакції до активного центру іншого ферменту.

Сьогодні 4-, 7- і навіть 13-ферментні співіммобілізовані системи використовуються для біолюмінесцентного мікроаналізу різних метаболітів: стероїдів, тригліцеридів, жовчних кислот тощо.

9.5. БІОСЕНСОРИ З ІММОБІЛІЗОВАНИМИ ФЕРМЕНТАМИ

Біосенсори з іммобілізованими ферментами найбільш придатні для вирішення біоаналітичних завдань в медицині (гуманній і ветеринарній), харчовій, мікробіологічній, хімічній промисловості, біотехнології і екології для контролю оточуючого середовища, а також в наукових дослідженнях.

Десятки біохімічних тестів виконуються при постановці діагнозу і для контролю за ходом лікування. Чимало з них ґрунтуються на використанні ферментів, в тому числі іммобілізованих.

Наприклад, ферментний електрод на глюкозу, вмонтований в автоматичну систему, допомагає не тільки контролювати рівень глюкози в крові хворим на діабет, але й корегувати цей рівень, подаючи сигнали на дозатор інсуліну в організм.

У харчовій промисловості ферментні датчики дають можливість визначити якість вихідної сировини і, що дуже важливо, визначати залишкові кількості пестицидів та інших шкідливих речовин. Аналізатори з іммобілізованою холінестеразою, контролюючи склад повітря в хімічних цехах, допомагають забезпечити належні умови праці людей на особливо шкідливих підприємствах.

Контроль за стерильністю зразків є важливим завданням біохімічної, фармакологічної промисловості і медичної мікробіології. Його можна забезпечити аналізатором на основі іммобілізованої люциферази, за допомогою якої можна виявити біолюмінесцентним методом 500–1000 клітин в 1 мл.

9.6. ІМУНОФЕРМЕНТНИЙ АНАЛІЗ (ІФА) І ЙОГО ВИКОРИСТАННЯ

Серед вимог до сучасних методів біохімічного аналізу найважливішим є специфічність, тобто здатність детектувати (виявляти) дану речовину у складних багатокомпонентних середовищах, таких як сироватка крові, сік рослин або ферментаційне середовище. Найбільшу специфічність мають імунохімічні методи, що грунтуються на реакції антитіл з антигеном, які утворюють одне з одним стійкі комплекси.

Сутність будь-якого імунохімічного аналізу зводиться до того, щоб після завершення реакції антиген-антитіло визначити концентрацію надлишкового компонента (антигена або антитіла), який не вступив у реакцію. Оскільки ці концентрації невисокі (10^{-12} – 10^{-8} моль/л), для їх виявлення зазвичай використовують легко детектовану мітку (радіоактивний йод, трітій). Нові можливості були відкриті при використанні ферментів для підвищення чутливості імунохімічних методів аналізу. Виявилося, що без втрати чутливості методу радіоактивна мітка може бути замінена приєднанням ферменту, який після реакції виявляється за його каталітичною активністю.

Поєднання ферментативних та імунохімічних методів аналізу зумовило створення імуноферментних методів аналізу, в яких антитіло виступає як специфічний детектор речовини, що визначається, а фермент – як маркер імунохімічної реакції, за допомогою якого **візуалізується** утворення комплексу. В ІФА використовуються різноманітні методи ферментативного аналізу, що визначає її високу специфічність і чутливість.

Принципи імунохімічного аналізу

ІФА – процес утворення кон'югату відомого антитіла і ферменту та наступного приєднання отриманої комплексної сполуки до антигена.

Для проведення ІФА потрібна іммобілізація антитіла або антигена на твердому носії (підкладці) шляхом гідрофобної, електростатичної взаємодії або в результаті ковалентного зв'язування антитіла чи антигена з носієм.

Антитіло, утворюючи комплекс з антигеном, може забезпечити унікальне за специфічністю виявлення речовини в будь-яких складних багатокомпонентних системах. Спочатку основою імуноферментного аналізу була властивість антитіл (Ab) «склеювати» антигени (Ag). Цей процес подається наступною системою рівняння:

$$Ag + Ab \rightleftharpoons AgAb, \qquad (1)$$

$$AgAb + (Ag)_n + (Ab)_m \rightleftharpoons (AgAb)_i. \qquad (2)$$

Оскільки молекули антитіл є двовалентними, вони здатні зв'язуватися з двома молекулами антигену в комплекс, який, у свою чергу, може зв'язувати інше антитіло і т.д. Утворення таких агрегатів можна виявити за збільшенням помутніння розчину, або за випадінням в осад. Цей підхід використовується, наприклад, для визначення груп крові при «склеюванні» еритроцитів антитілами тієї чи іншої специфічності. Така реакція одержала назву гемаглютинації і досі широко використовується. Взаємодія білкових антигенів з антитілами викликає їх осаджування, тобто преципітацію. Цей метод також широко застосовується при визначенні білків плазми крові в концентрації 10^{-6} г/мл. Але ці методи не можуть забезпечити кількісне визначення речовин. Вони належать до якісних або напівкількісних.

Принципово новий крок був зроблений при використанні в імунохімічних реакціях компонентів, помічених маркером, який детектується одним із відомих фізико-хімічних методів з високою чутливістю.

Визначення концентрації антигену ґрунтується на принципі конкурентного зв'язування антитілами міченого і немміченого антигена. Суть цих методів подається таким рівнянням:

$$Ag + Ag^* + Ab \rightleftharpoons AbAg + AbAg^*, \quad (3)$$

де: Ag* і Ag – визначуваний антиген з міткою і без мітки;
Ab – антитіла;
AgAb і Ag*Ab – відповідні комплекси.

Для визначення концентрації комплексу Ag*Ab його потрібно віддокремити від вільного міченого антигена Ag*, або змінити властивості маркера в комплексі з антигеном. Обидва принципи знайшли практичне застосування в методах імунохімічного аналізу.

Маркери в імунохімічному аналізі

Як мітки використовуються різні речовини: радіоактивні ізотопи ^{125}I або ^{3}H, ферменти або їх субстрати, флуоресцюючі барвники. Від чутливості маркера залежить чутливість методу аналізу. Вибір маркера і способу його «прив'язування» до антигену є одним із важливих етапів у проведенні аналізу.

Радіоактивні мітки. Вперше вони були запропоновані американськими дослідниками *(Берсон С.А., Ялоу Р.С., 1959)* і спочатку мали широке застосування. Однак сьогодні перевага надається маркерам-ферментам. Це зумовлено труднощами, пов'язаними з використанням ізотопних маркерів. Це складність і висока вартість обладнання, необхідність централізованої системи розподілу імунохімічних наборів, мічених радіоактивними ізотопами та небезпека ізотопів для навколишнього середовища. Тому були запропоновані маркери-ферменти.

Ферментні мітки. З відомих нині понад 2000 різних ферментів, тільки деякі використовуються в імуноферментному аналізі. Це пояснюється високими вимогами, які висуваються до властивостей ферментів-маркерів. Фермент має бути високоактивним, а продукти його реакції виявлятися з високою чутливістю; стабільним, щоб активність його зберігалася протягом року; вміст ферменту-маркера у досліджуваному зразку має бути мінімальним. Через це для різних об'єктів використовуються різні ферменти. У багатьох випадках, коли необхідний якісний резуль-

тат, оцінка імунохімічної реакції може бути проведена візуально.

Субстратні мітки. Крім ферментів, як маркери можуть використовуватися субстрати. Зокрема, часто використовуються як мітки АТФ і НАД, що можуть бути «пришиті» до молекули антигену через аденіновий залишок таким чином, що зберігається їх здатність взаємодіяти з ферментом. Аналогічно були використані субстрати пероксидази (люмінол, ізолюмінол).

Одержання кон'югатів з ферментами

Для введення ферментної мітки розроблено багато різних хімічних, біохімічних та імунологічних способів. Першим реагентом, який використовувався для синтезу імуноферментних кон'югатів, був глутаровий альдегід, що реагує з аміногрупами лізину білкових молекул. За його допомогою були одержані кон'югати антитіл і антигенів з пероксидазою, лужною фосфатазою, глюкооксидазою, глюкоамілазою. Склад одержаних кон'югатів можна варіювати, змінюючи концентрацію альдегіду і білкових компонентів.

З водонерозчинних карбодиімідів найбільш успішно для синтезу кон'югатів використовуються 1-етил-3-(3-діметиламінопропіл) карбодиімід і 1-циклогексил-3-(2-морфоліноетил) карбодиімідметил-n-толуолсульфонат, які утворюють пептидний зв'язок між вільними карбоксильними і NH_2-групами білкових компонентів.

Широкого розповсюдження набув метод синтезу імунопероксидазних кон'югатів, в основі якого лежить окислення перйодатом натрію вуглеводної частини молекули пероксидази з утворенням альдегідних груп.

Розроблені методи одержання імуноферментних кон'югатів з β-галактозідазою, що містить до 20 SH-груп. Вони базуються на тому, що зв'язування через них антигенів не відображається на каталітичних функціях ферменту.

Враховуючи те, що ферменти з великою молекулярною масою можуть інгібувати реакцію антиген-антитіло за рахунок стеричного екранування антигенних детермінант, у деяких випадках доцільно використовувати як мітки не цілу молекулу ферменту, а пептид, який має специфічну активність. Такий синтез здійснювався при одержанні кон'югата Fab-фрагмента з гемоктапептидом, що має пероксидазну активність.

Ковалентні методи одержання імуноферментних кон'югатів широко розповсюджені, однак у деяких випадках дія зшиваючого реагента негативно впливає на ферментативну та імунологічну активність компонентів гібридної макромолекули.

У зв'язку з цим певний інтерес викликають імунологічні методи введення ферментної мітки – це метод «гібридних антитіл». Гібридомна технологія відкриває принципово новий шлях одержання гібридних антитіл. Він полягає в тому, що зливаються моноклональні клітини, специфічні проти даного антигену і ферменту-маркера, в результаті чого утворюються гібридоми другого покоління, які синтезують антитіла з двома специфічностями.

Розділення вільних і зв'язаних маркерів

Одним із важливих моментів у проведенні імуноферментного аналізу є розділення вільних і зв'язаних з антитілами мічених компонентів. Найбільш розповсюдженим є метод, заснований на іммобілізації антитіл на твердій підкладці (стінки полістирольних пробірок або кульок, целюлозні диски, гранули макропористих носіїв для хроматографії). Особливо перспективними є полістиролові пробірки або планшети, що містять 96 лунок. Суть методів розділення полягає в тому, що одні з компонентів, наприклад, антитіла, можуть бути сорбційно іммобілізовані на поверхні вимірювальної кювети. Після проведення інкубації зі зразком антиген сорбується на поверхні, а всі інші компоненти залишаються в розчині і можуть легко відділятися, наприклад, за допомогою пористих частин під дією магнітного поля. Основні проблеми, які виникають при реалізації твердофазових методів розділення, є стандартизація поверхні і зменшення неспецифічного зв'язування мічених компонентів з носієм.

Інший шлях розділення мічених і немічених компонентів грунтується на принципі модуляції активності ферментів антитілами. При взаємодії антитіл з гаптеном, «пришитим» поблизу активного центру ферменту, відбувається повне інгібування його активності. При додаванні до такої системи вільного гаптена відбувається дисоціація комплексу, в результаті чого активність ферменту відновлюється (рис. 9.4, рівняння 4, 5):

$$E - Г + Ab \underset{}{\overset{}{\rightleftharpoons}} E - Г - Ab \xrightarrow{S} P, \qquad (4)$$

$$E - Г - Ab + Г \rightleftharpoons E - Г + Г - Ab \xrightarrow{S} P, \qquad (5)$$

де: Е–Г – комплекс ферменту (Е) з гаптеном (Г);
Ab – антитіло;
S – субстрат;
Р – продукт ферментативної реакції.

Ці методи одержали назву гомогенного аналізу.

Методи імуноферментного аналізу (ІФА)

Методи ІФА поділяються на дві великі групи: твердофазові і гомогенні.

При **твердофазових** методах, які одержали назву ELISA (enzyme linced immunosorbent assy), використовується принцип іммобілізації одного із компонентів (антигену Ag або антитіла Ab) на твердому носії (підкладці) шляхом гідрофобної, електростатичної взаємодії. Як носій найчастіше використовують полімерний матеріал. Речовина, що визначається (антитіло чи антиген), відповідно конкурує з аналогічними речовинами, в які введений фермент-маркер, за зв'язування на сорбенті:

$$\| - Ab + Ag + AgE \rightarrow \| - Ab + AgE + Ag + AgE.$$

Після видалення речовин, які не прореагували, визначається концентрація ферменту, що зв'язався з носієм.

У системах твердофазового імуноферментного аналізу (ELISA) антигенів (рис. 9.5) можна виділити декілька основних методів (варіантів).

1. Прямий конкурентний метод – антитіла, іммобілізовані на твердій фазі (носії), а мічений і немічений антигени, додані одночасно, конкурують один з одним за зв'язування (рис. 9.5, а).
2. Метод послідовного насичення – спочатку з антитілами інкубують зразок, а потім після видалення компонентів, які не зв'язалися, додають мічений антиген. Використовується у випадку, коли досліджуваний зразок може впливати на маркер, або якщо константи зв'язування обох компонентів з антитілами різні (рис. 9.5, б).
3. Метод інгібування з використанням подвійних антитіл. Базується на конкуренції вільних антитіл з антигеном, який попередньо іммобілізований на носії, і антигеном, що визначається і знаходиться у розчині (рис. 9.5, в).

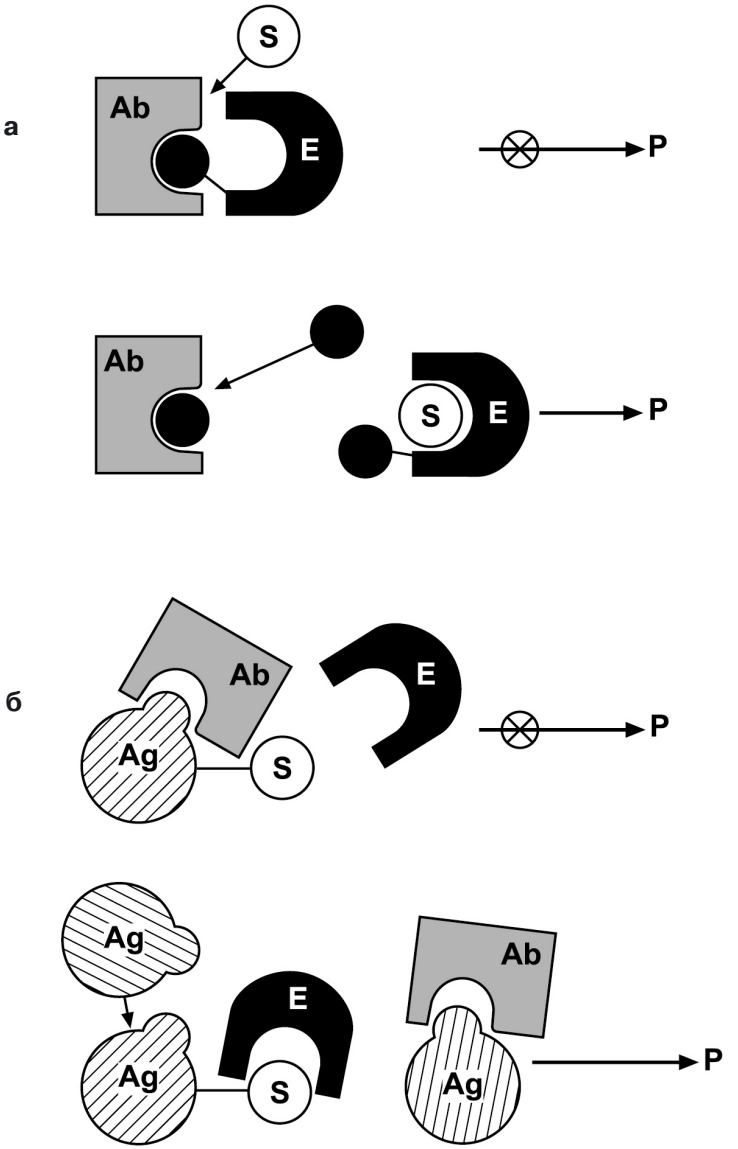


Рис. 9.4. ***Принципові схеми гомогенних методів імуноферментного аналізу*** *(за Березіним І.В. та ін., 1987):*
а–Г — вільний гаптен; Е–Г — мічений ферментом гаптен; Ab — антитіла; S і P — субстрат і продукт ферментної реакції; б — Ag–S — мічений субстратом антиген; Ag — вільний антиген; Е — фермент; Р — продукт ферментної реакції; символ х — інгібування ферментної реакції.

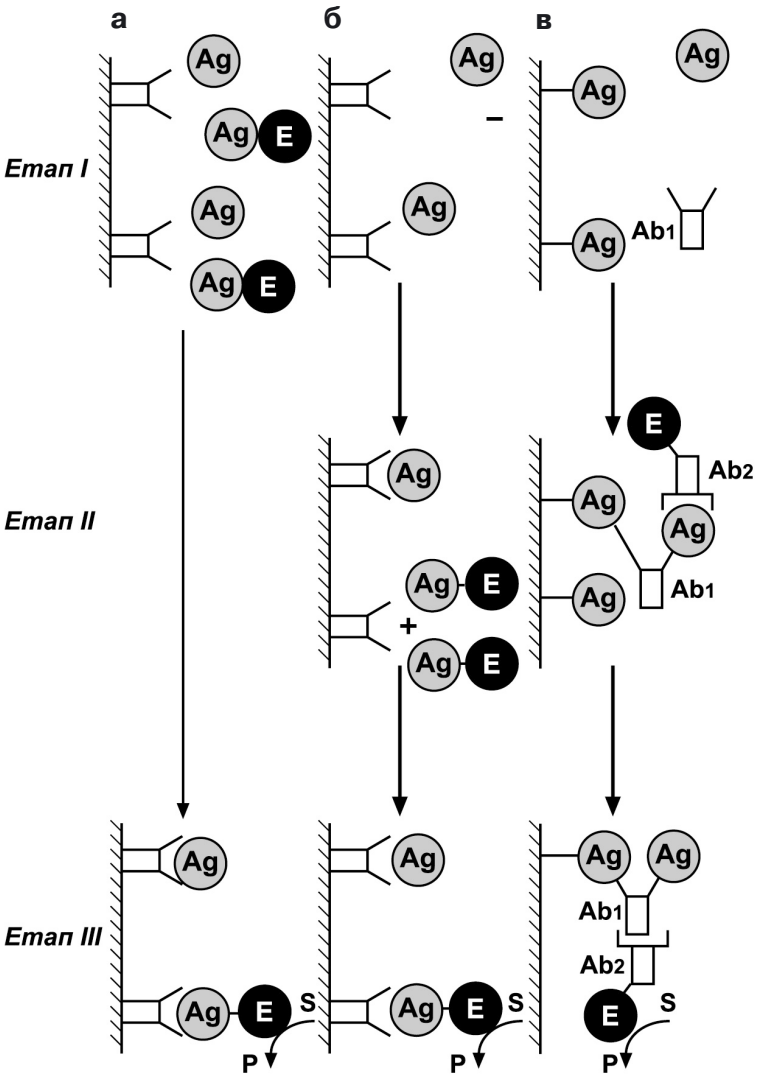


Рис. 9.5. ***Схеми конкурентних методів твердофазового аналізу*** *(за Березіним І.В. та ін., 1987):*
а — прямий конкурентний метод; б — метод послідовного насичення; в — метод інгібування з використанням подвійних антитіл; Ab і Ag — антитіла і антигени, які адсорбовані на носії; Ag–E і Ag — мічений ферментом і вільний антиген; Ab–E — другі антитіла, які мічені ферментом; S і P — субстрат і продукт ферментної реакції; стадії I і II — інкубація з наступним відмиванням компонентів, що не зв'язалися; стадія III — додавання субстрату і детекція ферментної активності.

Гомогенні методи аналізу EMIT (enzyme multiplay immunotechnic) були розроблені для визначення низькомолекулярних сполук – гаптенів, ліків, гормонів, фізіологічно активних речовин. Суть методів полягає в тому, що гаптен пришивається ковалентно поблизу активного центру ферменту таким чином, що після його взаємодії з антитілом молекула ферменту втрачає свою каталітичну активність.

Додавання до цієї системи вільного гаптену приводить до пропорційного збільшення активності ферменту внаслідок витіснення антитіл із комплексу. Принципові схеми гомогенних методів імуноферментного аналізу наведені на рис. 9.4.

Як ферменти в таких системах використовуються лізоцим, малатдегідрогеназа, глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа; як субстрати – кофактори. Певно, при утворенні комплексу фермент-гаптен з антитілом, останній так змінює конформацію білкової глобули, що кофактор не може продуктивно зв'язуватися з активним центром ферменту, в результаті чого його активність зникає.

Антигени, мічені субстратами і кофакторами, також знайшли застосування в гомогенних методах ІФА. Суть цих методів (рівняння 6, 7, 8) полягає в тому, що при взаємодії міченого антигену з антитілами субстрат стає недоступним для дії ферменту, внаслідок чого продукт ферментативної реакції не накопичується в системі (рис. 9.4, б):

$$Ag - S \xrightarrow{E} P, \qquad (6)$$

$$Ag - S + Ab \quad Ag - S - Ab \xrightarrow{E} P, \qquad (7)$$

$$Ag - S - Ab + Ag \rightarrow Ag - S + Ag - Ab \xrightarrow{E} P, \qquad (8)$$

де: Ag – S – комплекс антигену з субстратом.

Отже, утворення комплексу Ag–Ab може відбутися в розчині без спеціального розділення вільних і зв'язаних компонентів безпосередньо в пробірках.

Гомогенний аналіз на основі біолюмінесценції (ЛІКА). При ньому маркером є молекула АТФ, яка пришита до інсуліну. Додавання антитіл проти інсуліну призводить до екранування молекули АТФ і її недоступності для світлячкової люциферази.

Аналогічний підхід був використаний для застосування як

маркера НАД. У цьому випадку детектуючою системою слугувала алкогольдегідрогеназа печінки коня, за допомогою якої в системі внутрішньої регенерації можна визначити до 10^{-7} М інсуліну.

Особливістю гомогенних методів є простота й експресність – час аналізу займає декілька хвилин (до 15 хв), тому що в них відсутні дифузійні ускладнення імунохімічної реакції, характерні для твердофазових методів аналізу.

Метод широко застосовується при визначенні гормонів, барбітуратів, антиепілептичних засобів та ін.

Використання ІФА

Серед різних напрямів розробки ІФА неабиякий інтерес викликає створення методів, які дозволяють в одному зразку визначити декілька речовин. Наприклад, при діагностиці вірусного гепатиту важливим є одночасне визначення декількох антигенів, що дає можливість визначити стадію інфекційного процесу. Використання суміші антитіл, мічених різними ферментами, – один із шляхів, який дає можливість вирішити проблему.

Методи ІФА знайшли широке розповсюдження у медицині (гуманній і ветеринарній), контролі технологічних процесів і якості біотехнологічної, фармацевтичної, харчової продукції та наукових дослідженнях.

У медичній діагностиці методи ІФА використовуються для виявлення мікробних та вірусних збудників і антитіл проти них, а також збудників паразитарних інфекцій (гельмінти, малярійний плазмодій та ін.), що мають складний і мінливий антигенний склад.

Методи ІФА широко застосовуються і в діагностиці неінфекційних захворювань, таких як діабет, рак, серцево-судинні й ендокринні захворювання.

Методи гомогенного ІФА використовуються для контролю лікарської терапії, особливо препаратів, які впливають на серцево-судинну систему, антибіотиків, психотропних речовин. Ці методи дають можливість швидко виявляти отруєння, наявність наркотиків і допінгових препаратів у організмі.

У ветеринарній практиці метод ІФА найчастіше застосовують для виявлення антитіл вірусу ящуру, хвороби Ауескі, африканської чуми свиней, чуми великої рогатої худоби, ротавірусної та коронавірусної інфекцій, для оцінки ефективності вакцинації, а також при епізоотичному обстеженні тварин. Методи ІФА вважаються особливо ефективними при виявленні

невідомих, важко культивованих і таких збудників, що дуже складно виявляються в лабораторних умовах, а також для розпізнавання маловідомих хвороб.

Можливість візуального виявлення комплексу антитіло-фермент, чому сприяє утворення кольорового продукту ферментної реакції під час розщеплення певного субстрату, робить цей метод доступним для застосування у виробничих лабораторіях. Можливість експрес-діагностики окремих захворювань дає змогу проводити досліди на великому поголів'ї.

Налагоджено випуск антивидових мічених ферментами антитіл до глобулінів кролів, мишей, свиней, великої рогатої худоби, а також створені тест-системи для виявлення вірусних антигенів і вірус-специфічних антитіл, що створило сприятливі умови для впровадження методів ІФА у ветеринарну практику.

У зв'язку з інтенсивним розвитком промислової біотехнології методи ІФА дедалі ширше застосовуються для контролю технологічних процесів і якості біотехнологічної продукції. Так, у мікробіологічних виробництвах методи ІФА використовуються для швидкого виявлення високоефективних мікроорганізмів-продуцентів різних фізіологічно активних речовин (ферментів, антибіотиків та ін.), контролю наявності сторонніх мікроорганізмів і бактеріофагів у ферментерах, для визначення забруднення повітря промислових приміщень на наявність шкідливих речовин, які викликають професійні захворювання обслуговуючого персоналу.

Важливими є методи ІФА при виробництві лікарських препаратів, в тому числі із сировини тваринного походження і донорської крові. Домішки супутніх речовин або вірусних антигенів можуть бути дуже шкідливими для організму. Важливим є виявлення у донорській крові вірусу гепатиту В, білкових домішок у препаратах інсуліну тощо.

У наукових дослідженнях імуноферментний аналіз застосовується як у традиційних сферах біохімічних досліджень, так і в нових, пов'язаних з розробкою методів генетичної і клітинної інженерії. Наприклад, одержання гібридом цілком базується на використанні ІФА при клонуванні клітин. При генно-інженерних роботах ці методи дозволяють швидко відбирати клони-продуценти.

Методи ІФА ефективні при вирішенні фундаментальних проблем онкології, вірусології, біохімії, фізіології тощо.

Контрольні питання

1. Які передумови використання ферментів у аналітичній роботі?
2. Яка особливість сучасних підходів до створення біохімічних методів аналізу на основі ферментів?
3. Які переваги мають іммобілізовані ферменти над розчинними у ферментативних методах аналізу?
4. Які є носії для іммобілізації ферментів з їх наступним використанням в аналітичній роботі і від чого залежить вибір такого носія?
5. Які обставини стали передумовою використання іммобілізованих ферментів у хімічному аналізі?
6. Який вигляд мають аналітичні проточні реактори? Де вони застосовуються?
7. Які носії використовуються в аналітичних проточних реакторах і яким вимогам вони мають відповідати?
8. Що таке ферментні мікрокалориметричні датчики і для чого вони розроблені?
9. Що є перевагою ферментних мікрокалориметричних датчиків?
10. Що таке ферментні електроди і як вони створюються?
11. Де використовуються ферментні електроди?
12. На чому базується біолюмінесцентний метод мікроаналізу?
13. Які носії використовуються для іммобілізації ферментів і поліферментних систем?
14. В яких галузях застосовуються біосенсори з іммобілізованими ферментами?
15. На чому базуються методи імуноферментного аналізу (ІФА)?
16. Які маркери (мітки) використовуються в ІФА?
17. Які недоліки мають радіоактивні мітки?
18. Якими властивостями мають бути наділені ферментні маркери?
19. Які субстратні мітки найчастіше використовуються?
20. Які є способи введення ферментної мітки (або одержання кон'югатів з ферментами)?
21. Як проводиться розділення вільних і зв'язаних маркерів?
22. За яким принципом класифікуються методи ІФА?
23. Які особливості мають твердофазні методи?
24. Суть гомогенних методів ІФА і для визначення яких сполук вони використовуються?
25. Які особливості має гомогенний аналіз на основі біолюмінесценції (ЛІКА)?
26. Де використовуються методи ІФА?

Розділ 10.

ЗАСТОСУВАННЯ ІММОБІЛІЗОВАНИХ ФЕРМЕНТІВ У БІОТЕХНОЛОГІЇ

10.1. БІОТЕХНОЛОГІЯ ПЕРЕТВОРЕННЯ КРОХМАЛЮ НА ГЛЮКОЗУ

Глюкоза використовується як вихідна сировина для виробництва глюкозофруктозних сиропів, в органічному синтезі для одержання амінокислот і вітамінів, а також у медицині. Для одержання глюкози використовується дешева і доступна сировина – крохмаль.

Утворення глюкози з крохмалю – це двоступінчастий процес. На першому етапі під дією α-амілази з крохмалю утворюються декстрини невеликої молекулярної маси (олігоцукристі фрагменти) і певна кількість мальтози. На другому етапі під дією ферменту глюкоамілази від олігоцукристих фрагментів відщеплюються кінцеві залишки глюкози.

Для промислового виробництва α-амілазу одержують шляхом мікробного синтезу продуцентами Bacillis subtilis, грибами Aspergillus niger і A.oryzae. Для B.subtilis сполученням методів мутагенезу і селекції з методами генетичної інженерії було отримано штам, здатний до надсинтезу α-амілази, вихід якої у 200 разів перевершував вихідні форми. Доведено, що вихід цукристих речовин збільшується при підвищенні температури процесу гідролізу крохмалю. Японські дослідники отримали термостабільну α-амілазу шляхом введення в сінну паличку гена, який контролює синтез цього ферменту.

Перспективними продуцентами глюкоамілази є гриби з родин Rhizopus, Endomyces, Endomycopsis, а також бактерії із родин Aerobacter, Clostridium.

Технологічна схема одержання глюкози:

1. Желатинізація крохмалю при нагріванні (62–72 °С).
2. Декстринізація крохмалю за допомогою бактеріальної α-амілази (80–110°, pH 6,5–6,7).

3. Оцукрення декстринізованого крохмалю за участю грибної глюкоамілази (50–60°, pH 4–5). Одержання крохмальної патоки різного вуглеводного складу.

4. Очищення та одержання глюкозних сиропів. Кристалізація глюкози.

Лімітуючою ланкою у біотехнологічному процесі є третя стадія, проблема якої полягає в одержанні іммобілізованого препарату глюкоамілази, який би зберігав стабільність при параметрах технологічного процесу.

Процес одержання іммобілізованої α-амілази поки що не стоїть на порядку денному, тому що низька її вартість не викликає необхідності проведення регенерації ферменту.

У 1970–1980 рр. фірма «Корнінг Глас» продемонструвала першу пілотну установку з використанням глюкоамілази, іммобілізованої шляхом ковалентного приєднання до поверхні макропористого кремнезему. У реакційну колону висотою близько 2 м і діаметром 15 см подається 30% розчин частково гідролізованого крохмалю (декстрини), який протягом 9-хвилинного контакту з іммобілізованою глюкоамілазою перетворюється на глюкозний сироп. Для порівняння: час контакту розчинної глюкоамілази з декстринами для одержання глюкози – 724 хв. Протягом 80 днів роботи установки при 40 °С іммобілізована глюкоамілаза практично не інактивується. Однак до сьогодні промисловий процес одержання глюкози з використанням гетерогенного біокаталізатора не реалізований.

Основними перешкодами на шляху промислового освоєння процесу створення технології крупнотоннажного виробництва глюкозних сиропів за участю іммобілізованої глюкоамілази були такі обставини. По-перше, недостатньо висока стабільність одержаних препаратів іммобілізованої глюкоамілази при температурі пастеризації (60–65 °С); по-друге, зниження виходу глюкози на 7–10 % (90–93 %) при використанні іммобілізованого ферменту порівняно з нативним, який забезпечує конверсію крохмалю в глюкозу на рівні 98 %. Технологія може бути поставлена на комерційну основу за умови одержання стабільних препаратів з періодом інактивації тривалістю 3–4 тижні. Промислової установки з перетворення крохмалю у глюкозу з застосуванням іммобілізованої глюкоамілази поки що немає.

В результаті досліджень останнього десятиріччя з іммобілізації глюкоамілази на неорганічних матеріалах розроблені біокаталізатори з досить високою стабільністю іммобілізованої глюкоамілази (табл. 10.1). Глюкоамілаза, іммобілізована на попередньо оброблених частинках кістки свині, зберігала практично повністю первинну активність протягом 700 год роботи при температурі 37°. На носіях, поверхня яких покрита каталітичним волокнистим вуглецем (КВВ), іммобілізована глюкоамілаза мала найбільшу стабільність. Активність іммобілізованого ферменту зростала на порядок порівняно з його активності у розчині. Іммобілізована глюкоамілаза не втрачала каталітичної активності через 1–1,5 роки зберігання при кімнатній температурі. Використання макроструктурованих КВВ-містких носіїв дозволило виготовити ефективні гетерогенні біокаталізатори складної геометричної форми (сотові моноліти, пористі пеноматеріали), які мали високу стабільність і активність у процесі оцукрення крохмалю. При періодичному функціонуванні при 50 °С протягом 8–8,5 міс. ці біокаталізатори практично повністю зберігали ферментативну активність.

Традиційно в біотехнологічному процесі одержання глюкози з крохмалю використовуються проточні біореактори з розміщенням гетерогенного біокаталізатора у вигляді нерухомого шару. Останнім часом розроблений принципово новий тип біокаталітичного реактора – роторно-інерційний біореактор (РІБ) на рівні лабораторного зразка (Коваленко Г.А. та ін., 2004). Його основним функціональним елементом є контейнер з закріпленим гетерогенним біокаталізатором, який обертається навколо своєї осі (рис. 10.1). Частота обертів контейнера складає від 3 до 170 об./хв; загальний об'єм контейнера – 1,2 л; об'єм біокаталізатора становив 360 $м^3$. Температура в біореакторі підтримувалася на рівні 50–55 °С. Біокаталізатор отримували шляхом адсорбційної іммобілізації глюкоамілази на вуглецевовмісній пенокераміці.

Випробування показали, що біореактор нового типу (РІБ) в оптимальних умовах роботи (частота обертів контейнера не менше 80 об./хв, швидкість подачі субстрату не більше 0,2 л/год) в 1,5–2 рази ефективніший за продуктивністю, ніж традиційний реактор з нерухомим шаром. Активність біокаталізатора в 3–3,5 рази вища, ніж у традиційному реакторі.

Таблиця 10.1.

Глюкоамілаза, іммобілізована на різних носіях

(за Коваленко Г.А. та ін., 2002)

Носій / спосіб іммобілізації	*Стабільність*	*Тип реактора*	*Конверсія субстрату, % субстрат*
Роботи 70–80 рр. XX ст.			
Пористе скло / ковалентне зв'язування	Дезактивація через 300 год безперервної роботи при 37–60 °С	Проточний з нерухомим шаром гранул біокаталізатора	до 30 (крохмаль)
Алюмогель, оксид алюмінію / ковалентне зв'язування, поперечна зшивка ГА*	269–417 діб при 50 °С та 300 год при 60 °С	Проточний з шаром гранул біокаталізатора	92–93 (крохмаль)
Активоване вугілля / адсорбція, поперечна зшивка ГА*	36 год без втрати активності; 1 міс. при 30 °С зберігається 80% активності	Періодичний з перемішуванням	– (мальтоза)
Роботи останнього десятиріччя			
Магнітні частинки, покриті поліетиленіміном/ковалентне зв'язування	2 тижні, 50 °С, зберігається 96% активності	Проточний з шаром біокаталізатора	71
Кісткова тканина, оброблена крохмалем / поперечна зшивка ГА*	700 год безперервного гідролізу при 37 °С без втрати активності	Періодичний з перемішуванням	95 (крохмаль)
Полістеренові магнітні частинки / адсорбція	11 год роботи без втрати активності	Проточний з шаром біокаталізатора	– (мальтоза)
Активоване вугілля / адсорбція	2 тижні без втрати активності	Проточний колончастий з нерухомим шаром гранул біокаталізатора	10 (декстрини)
Кістковий порошок / адсорбція	Після 20 циклів роботи конверсія субстрату знизилася на 3%	–	98 після 11 циклів (крохмаль)
КВВ-вмістимі керамічні носії	40 год роботи без втрати активності	Проточний реактор на основі сотового моноліту	70 (крохмаль)

* ГА — глутаровий альдегід.

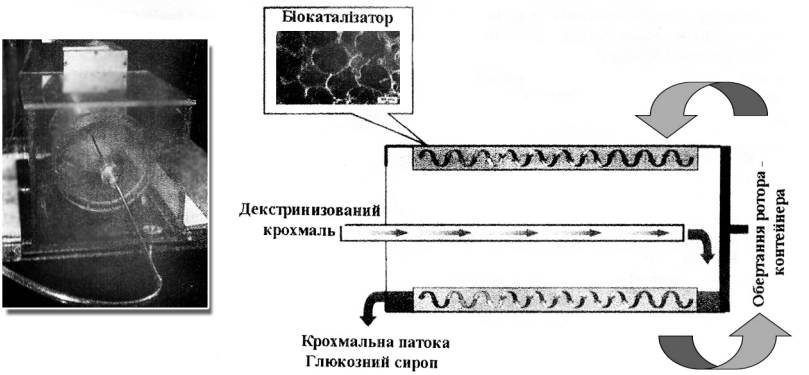


Рис. 10.1. ***Роторно-інерційний біореактор для гетерогенних біокаталітичних процесів***
(Коваленко Г.А. та ін., 2004)

Контрольні питання

1. Де використовується глюкоза як вихідна сировина?
2. Які особливості технологічного процесу отримання глюкози із крохмалю і що є лімітуючим у біотехнологічному процесі?
3. Які біокаталізатори використовуються при одержанні глюкози і способи їх отримання?
4. Які суттєві проблеми має біотехнологія перетворення крохмалю на глюкозу?

10.2. БІОТЕХНОЛОГІЯ ОДЕРЖАННЯ СИРОПІВ З ВИСОКИМ УМІСТОМ ФРУКТОЗИ

Фруктоза (фруктовий, плодовий чи медовий цукор) широко розповсюджена в природі, міститься у багатьох фруктах і плодах. Особливо багаті на неї яблука, а також бджолиний мед, який майже наполовину складається із фруктози. Порівняно зі звичайним цукром (до складу молекул якого фруктоза теж входить, але у вигляді хімічної сполуки з менш солодкою глюкозою) фруктоза має більш приємний смак, і згідно з професійною термінологією смак фруктози – «медовий», а звичайного цукру – нудно-солодкий.

Фруктоза в 1,65 раза солодша за сахарозу і більш ніж у 2,2 раза солодша глюкози, що відповідно зменшує її споживання, а це, в свою чергу, призводить до зниження калорійності продукту. Це дуже важливо з точки зору дієтології харчування. Крім того, фруктозу на відміну від глюкози чи цукру можуть споживати хворі на діабет. Фруктоза в суміші з глюкозою не кристалізується (не зацукрується), що важливо для виробництва морозива, кондитерських виробів тощо.

Сироп з високим умістом фруктози застосовується для виготовлення тонізуючих і ацидофільних напоїв, морозива, кондитерських виробів, консервованих фруктів та інших продуктів. Отже, підвищення солодкості сиропів за рахунок збільшення в них фруктози, потенційним джерелом якої може бути глюкоза, має практичне значення. У світі були розпочаті спроби пошуку ефективних методів одержання цього продукту.

Солодкі фруктозні сиропи можна отримувати **із цукрози** шляхом кислотного гідролізу (сірчаною, лимонною кислотами, рідше соляною при підвищеній температурі), або більш ефективним ферментативним способом – інверсією за допомогою ферменту інвертази (сахарази). Під дією інвертази із цукрози утворюється суміш D-глюкози і D-фруктози.

Здатність до біосинтезу інвертази мають багато мікроорганізмів, але найбільш вивченою групою серед них є дріжджі і зокрема Sacharomyces cerevisiae. Останнім часом одержані результати, які свідчать проте, що дріжджі K.marxianus синтезують інвертазу, активність якої у 2–3 рази вища, ніж S. cerevisiae *(Жеребцов Н.А. та ін., 2003)*.

У біотехнологічному процесі одержання інверту використовується інвертаза, іммобілізована на різноманітних носіях органічної і неорганічної природи.

Біокаталізатором у пілотній установці фірми Snam Progetti для безперервного процесу інверсії сахарози є дріжджова інвертаза, яка іммобілізована шляхом включення у порожнисті нитки триацетату целюлози. Біокаталізатор має високу стабільність. За 10 років роботи при температурі 25 °С він втратив лише 20 % своєї первинної активності.

Включення інвертази у поліакриламідний гель дає можливість отримати біокаталізатор, який має високу стабільність при температурі 30°– за 450 діб безперервної роботи активність інвертази зменшилася лише на 10 %.

Індійська національна корпорація NRDC розробила промисловий процес інверсії цукру, біокаталізатором якого є дріжджові клітини, іммобілізовані на неорганічному носії.

Коваленко Г.А. та ін. (2003) одержали високостабільний гетерогенний біокаталізатор для процесу інверсії цукру шляхом адсорбційної іммобілізації інвертази на керамічних носіях, покритих каталітичним волокнистим вуглецем (КВВ).

Інвертний цукор кристалізується порівняно з сахарозою повільніше, тому його використовують при виготовленні продуктів, в яких кристалізація цукру є небажаною, наприклад, при виробництві напіврідких начинок цукерок, а також лікерів, штучного меду, сиропів.

Більш перспективним є шлях одержання фруктози **із глюкози**, яка утворюється в результаті гідролізу крохмалю.

Відомо, що глюкозу можна перетворити на фруктозу ферментативним шляхом за участю ферменту глюкоізомерази як розчинної, так і іммобілізованої. У промисловості глюкоізомеразу використовують винятково в іммобілізованій формі. Комерційні препарати іммобілізованої глюкоізомерази отримують різноманітними способами іммобілізації: адсорбцією ферменту на різних носіях (іонообмінних смолах і пористих неорганічних носіях); висушуванням цілих клітин продуценту, коли внутрішньоклітинний фермент залишався зв'язаним з клітиною; ковалентним зв'язуванням глюкоізомерази на органічних і неорганічних носіях; включенням в гель і нитки; включенням в гель з подальшою

зшивкою. В табл.10.2 наведені способи іммобілізації найбільш розповсюджених промислових препаратів глюкоізомерази.

Таблиця 10.2.

Промислові препарати іммобілізованої глюкоізомерази

(за Нахапетян Л.А., Меняйловою І.І., 1988)

Фірма (країна)	*Назва препарату*	*Продуцент*	*Метод іммобілізації*
Novo Industri (Данія)	Sweet-zyme	Bacillis coagulans	Руйнування клітин, зшивка глутаровим альдегідом
Gist Brocades (Нідерланди)	Maxa-zyme	Actinoplanes missouriensis	Зшивка глутаровим альдегідом клітин, змішаних з желатином
Miles Kali-Chemie (США –Німеччина)	Optis-weet 22	Streptomyces rubiginosus	Ковалентне зв'язування з кремнеземним носієм розчинного ферменту
ICI (Велико-британія)	Immobilase	Arthrobacter species	Включення цілих клітин у сітку із полікатіонітів і аніонітів
Nagase (Японія)	Sweetase	Streptomyces phaeochromo-genes	Висушування цілих клітин
Roquette Freres (Франція)	Lysase	Streptomyces violaceoniger	Зшивка глутаровим альдегідом клітин, змішаних з желатином
Suomen Sokeri (Фінляндія)	Spezyme	Streptomyces rubiginosus	Зв'язування розчинного ферменту іонообмінною адсорбцією на композиційному носії із ДЕАЕ-целюлози, полістиролу і двоокису титану

Незважаючи на всі переваги фруктози над цукром, її виробництво у світі практично було відсутнє до середини 60-х років минулого століття.

У 1966 р. в Японії вперше застосували розчинний препарат глюкоізомерази для виробництва сиропу з високим умістом фруктози. Отриманий продукт містив 42 % фруктози, 50 – глюкози і 8 % інших цукрів.

У 1973 р. в США компанією «Клінтон Корн» вперше було розпочато промислове виробництво сиропів з високим умістом

фруктози, але використовували для цієї мети не розчинну глюкоізомеразу, як японці, а іммобілізований на целюлозному іонообміннику фермент у реакторі з плоским шаром.

Наукові основи процесу наступні. Фермент глюкоізомераза каталізує перетворення (ізомеризацію) глюкози до фруктози за одну стадію, і реакція відбувається до тоді, доки в реакційній системі кількість глюкози і фруктози не стане майже однаковою. Після цього реакція припиняється і одержану суміш можна використовувати у вигляді глюкозо-фруктозного сиропу або відділити фруктозу, а глюкозу, яка залишилася, знову піддати ізомеризації.

Біотехнологічний процес ізомеризації глюкози здійснюється в реакторах, що мають форму колон висотою до 5 м, які попередньо заповнюють іммобілізованим ферментом у вигляді гранул, порожнистих ниток, кусочків гелю тощо. В колону безперервним потоком зверху вниз подають розчин глюкози (попередньо отриманий при гідролізі кукурудзяного або картопляного крохмалю), а з колони витікає глюкозо-фруктозний сироп.

Про ефективність такої технології свідчать такі дані: на 1 кг іммобілізованого ферменту за 100 днів роботи одержують 4 т фруктози (у перерахунку на сухий продукт). Час напівінактивації ферменту (час, за який активність ферменту зменшується удвічі) становить від 20 до 50 днів. Каталізатор (іммобілізований фермент) підлягає заміні тільки один раз у 2–3 міс., завдяки чому процес є економічно вигідним. Вартість продукту з іммобілізованим ферментом складає лише 61 % від вартості продукту з розчинним ферментом.

Для підтримки високої продуктивності установки протягом більш тривалого часу рекомендується використовувати чисту вихідну сировину. А.А. Клесов наводить дані компанії «Денкі Кагаку», що при використанні кристалічної глюкози продуктивність реактора була 4000 кг сухої фруктози з розрахунку на 1 кг іммобілізованого ферменту. Напівінактивація каталізатора відбувалась протягом 50 днів. При більш низькій якості глюкози продуктивність реактора зменшувалася до 1500 кг продукту на 1 кг іммобілізованого ферменту, а час напівінактивації скорочувався до 20 днів.

Японська компанія «Кійова Хакко» для одержання сиропу з високим умістом фруктози використовує глюкоізомеразу, іммобілізовану адсорбцією на фенолформальдегідній смолі Дуоліт А7. Вихідною сировиною є 40 % розчин глюкози при температурі 60 °С (pH 8,2), який пропускають через колону з Дуолітом А7 (рис. 10.2), а готовий продукт для видалення солей

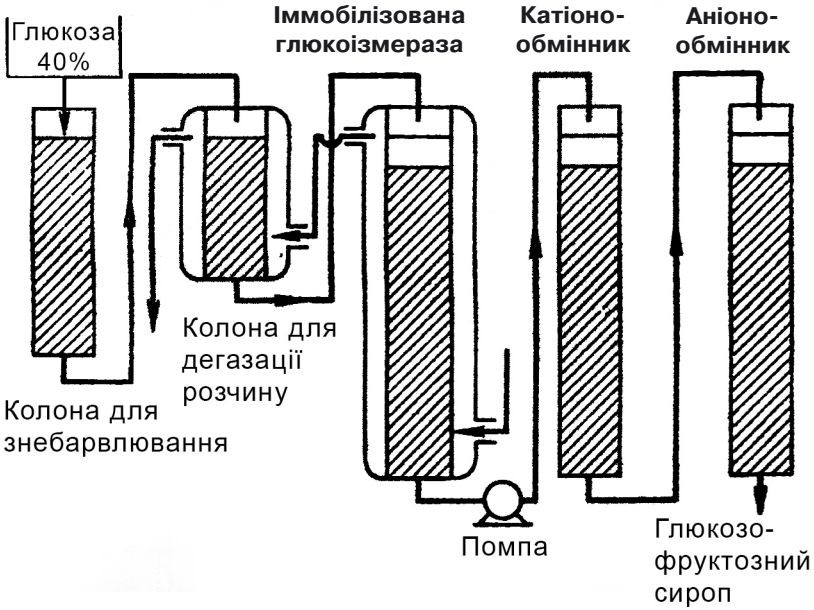


Рис. 10.2. ***Схема процесу ізомеризації глюкози у фруктозу за допомогою глюкоізомерази, яка іммобілізована на фенолформальдегідній смолі***
(за Клесовим А. А., 1982)

пропускають послідовно через катіонообмінник і аніонообмінник. При безперервній роботі реактора протягом 40 днів не було встановлено мікробного забруднення системи через високу температуру (60 °С). Напівінактивується іммобілізована глюкоізомераза протягом 6 днів. Вартість виробництва при застосуванні іммобілізованого ферменту становила 61,5 % вартості продукту, виготовленого із застосуванням розчинної глюкоізомерази.

Контрольні питання

1. Які переваги має фруктоза над глюкозою і де застосовуються сиропи з високим умістом фруктози?
2. Яким методом і за участю яких ферментів глюкозу можна перетворити на фруктозу?
3. Які способи використовуються для отримання препаратів іммобілізованої глюкоізомерази?
4. В яких установках здійснюється біотехнологічний процес ізомеризації глюкози і який принцип їх роботи?

10.3. БІОТЕХНОЛОГІЯ ВИРОБНИЦТВА ГЛЮКОЗИ Й ЕТАНОЛУ З ЦЕЛЮЛОЗИ

Розробка цієї технології в масштабах крупнотоннажного виробництва має виняткове народногосподарське значення. Інтенсивна дослідницька робота з вивчення ферментативного гідролізу целюлози проводиться в США, Японії, Швеції, Фінляндії, Італії; у менших обсягах – у Польщі, Чехії, Словаччині та Болгарії. Провідним напрямом є пошук економічно вигідних шляхів одержання, в першу чергу, етанолу як джерела енергії, а не харчової глюкози, що пов'язано зі сформованою енергетичною ситуацією. Розробка високорентабельної технології одержання етилового спирту з поновлюваних ресурсів (рослинної біомаси, відходів сільського і лісового господарств, а також промисловості) дозволить зменшити енергетичний голод.

При розробці технології виробництва харчової глюкози нездоланні поки що труднощі, пов'язані з вибором джерел, якістю целюлозовмісної сировини і ферментних препаратів, що входять у целюлозний комплекс. Їхнє співвідношення й активність повинні бути в такий спосіб збалансованими, щоб кінцевим продуктом гідролізу була харчова глюкоза, а не суміш глюкози з іншими ді- та олігоцукрами, непридатними для використання у харчовій промисловості. Гідролітична деградація целюлози здійснюється не менш ніж чотирма ферментами, що складають так званий целюлозний комплекс. Слід зазначити факт існування у природних умовах іммобілізації ферментів або автоіммобілізації. Міцно адсорбувавшись на субстраті, ферменти целюлозного комплексу здійснюють свою каталітичну функцію. Продуктами гідролітичної реакції є глюкоза (20–40 %), дисахарид целобіоза і певна кількість більш складних олігоцукрів. Склад кінцевих продуктів визначається видом целюлозовмісної сировини, складом і співвідношенням ферментів у целюлозному комплексі.

Цукри, що утворюються при гідролізі целюлози, можуть у реакційній суміші зброджуватись ферментами дріжджових клітин з утворенням етанолу. Через те, що целюлозні комплекси, які каталізують утворення з целюлози глюкози, ще не отримані, практичні зусилля спрямовані на створення технологій виробництва етанолу, який використовується як енергетичне джерело.

Усі виробники етанолу використовують целюлозний комплекс мікробного походження.

Одна з установок з переробки целюлозної сировини знаходиться в США і працює у пілотному режимі. Тут одержують целюлозний комплекс ферментів і потім використовують його для переробки паперової макулатури у вуглеводи, які за допомогою целюлозного комплексу мікробного походження зброджуються з утворенням етанолу. На другій пілотній установці (у її створенні на кооперативних засадах брали участь компанія «Голф Ойл», університети Пітсбурга і Канзаса (США) та японська компанія «Ниппон Майнинг») проходить відпрацювання біотехнологія виробництва етанолу з паперової макулатури і відходів сільськогосподарського виробництва.

Гідроліз целюлози у глюкозу можна провести за допомогою продуцента Trichoderma reesii, целюлаза якої руйнує кристалічну і нерозчинну целюлозу. У США *(С. Альбер, 1987)* одержали мутант T. reesii, який продукує у 2–4 рази більше целюлази, ніж штам дикого типу. Процес гідролізу целюлози дуже простий. Гриб вирощують у середовищі, яке містить відходи деревини і мінеральні солі. Потім культура фільтрується. До фільтрату з ферментом додається подрібнений папір. Усе поміщають в реакційний чан та інкубують за температури 50 °С й певного атмосферногоу тиску. Під час реакції гідролізу утворюється неочищений глюкозний сироп, а негідролізована целюлоза і фермент використовуються повторно. Вихід глюкози складає 50 % вихідної целюлози. На думку американських фахівців, процес перетворення відходів целюлози на спирт більш перспективний ніж одержання спирту із крохмалю кукурудзи.

Контрольні питання

1. Що є проблемним у біотехнологічному виробництві глюкози і етанолу з целюлози?
2. Які ферменти здійснюють біодеградацію целюлози?
3. Що є продуктом гідролізу целюлози?
4. Яким шляхом у світовій практиці здійснюється переробка целюлозовмісної сировини?

10.4. БІОТЕХНОЛОГІЯ ОДЕРЖАННЯ L-ЯБЛУЧНОЇ КИСЛОТИ

L-яблучна кислота має попит на світовому ринку як замінник лимонної кислоти в харчовій і фармацевтичній промисловості. Хімічним методом (гідролізом ангідриду яблучної кислоти) одержують тільки рацемічну суміш оптичних D, L-ізомерів яблучної кислоти, а мікробіологічний синтез L-яблучної кислоти є непридатним для промислового виробництва через його високу вартість.

Однак L-яблучну кислоту можна одержати шляхом ферментації з тієї самої фумарової кислоти, з якої одержують L-аспарагінову кислоту. За участю ферменту фумарази проходить гідратація фумарової кислоти (приєднання за подвійним зв'язком води) з утворенням L-яблучної кислоти. Як біокаталізатор використовують клітини, які містять фермент фумаразу.

Для одержання L-яблучної кислоти у великих кількостях японська фірма «Танабе Сейяку» використовує іммобілізовані мікробні клітини в поліакриламідному гелі. Однак вони, окрім основного процесу утворення L-яблучної кислоти, каталізують небажаний, побічний у данному випадку процес утворення янтарної кислоти. Для гальмування цієї реакції іммобілізовані мікробні клітини додатково обробляють. Іммобілізація підвищує стабільність клітинної фумарази. Час її напівінактивації при температурі 37 °С складає 55 днів, тоді коли цей показник для інтактних (необроблених) клітин сягає 6 днів.

Італійська компанія «Снам Проджетті» для виробництва L-яблучної кислоти використовує фермент фумаразу, яку іммобілізують шляхом включення у порожнисті нитки триацетату целюлози. Окрім цього, компанія використовує для іммобілізації цілих мікробних клітин замість поліакриламідного гелю інший гель на основі карагінану (поліцукру із морських водоростей). Це збільшило час напівінактивації ферменту до 160 днів.

Контрольні питання

1. Де застосовується L-яблучна кислота і за участю якого ферменту її отримують?
2. Які форми ферменту використовують у біотехнологічному процесі одержання L-яблучної кислоти?

10.5. ЗАСТОСУВАННЯ БІОТЕХНОЛОГІЙ З ІММОБІЛІЗОВАНИМИ ФЕРМЕНТАМИ У МОЛОЧНІЙ ПРОМИСЛОВОСТІ

Нині у молочній промисловості біотехнології з використанням іммобілізованих ферментів можуть бути застосовані для видалення лактози з молока і продуктів його переробки, у процесах виробництва сирів, а також для збільшення терміну збереження молока.

При переробці молока для одержання сирів утворюється дуже багато молочної сироватки, у якій міститься в невеликих кількостях білок, різні солі і лактоза (близько 5 %). Так, при виробництві 1 т сиру утворюється 9 т сироватки. В кожній тонні сироватки міститься близько 5 кг високоякісного білка, вітаміни групи В, комплекс вільних амінокислот, усі найважливіші мінеральні елементи, в тому числі кальцій і фосфор. Але найцінніщим компонентом сироватки є лактоза, якої в 1 т майже 50 кг.

Лактоза, діцукор або молочний цукор, є цінною сировиною для харчової і мікробіологічної промисловості. Вона має низьку розчинність і малу солодкість, і тому в харчовій промисловості не може використовуватися без попередньої обробки. При дії на неї ферменту лактази або β-галактозідази розщеплюється на два моноцукри – глюкозу і галактозу, які у 1,5 раза солодші за цукор. Вони використовуються у харчовій промисловості, наприклад, для виготовлення морозива з тривалим терміном зберігання (до 4 міс.) та замість меляси для одержання цукристих речовин.

Сироватка може використовуватись у мікробіологічній промисловості як субстрат для вирощування культури кормових дріжджів, які мають лактазну активність (Saccharomyces fragilis, Zygosaccharomyces lactic, Candidia pseudotropicalis і ін.).

Така переробка молочної сироватки зменшує забруднення навколишнього середовища, тому що в більшості випадків ці відходи переробки молока не утилізуються. Хімічний гідроліз лактози економічно невигідний через високу вартість очищення отримуваних з неї продуктів.

Вилучення лактози з молочної сироватки. Поки що немає промислових установок з переробки молочної сироватки, хоча доступна і дешева сировина та цінні продукти, що утворюються при гідролізі, викликають неабиякий інтерес. У деяких країнах працюють пілотні установки. Так, у США фірмою «Корнінг Глас» налагоджена переробка депротеінізованої і знесоленої сироватки. В установці, що працює при 50 °С, використовується лактоза, іммобілізована методом ковалентного зв'язування з пористим силікагелем за допомогою глутарового альдегіду. Час напівінактивації ферменту залежить насамперед від складу вихідної сировини і при переробці знесоленої депротеінізованої сироватки досягає 62 днів. Собівартість 1 т цукрів, отриманих при ферментативному гідролізі сироваткової лактози, на цій установці складає близько 175 доларів.

У 1978 р. в Англії розпочали переробку молочної сироватки з вилучення лактози на напівпромисловій установці (рис. 10.3). Наразі використовується лактоза, іммобілізована на пористому

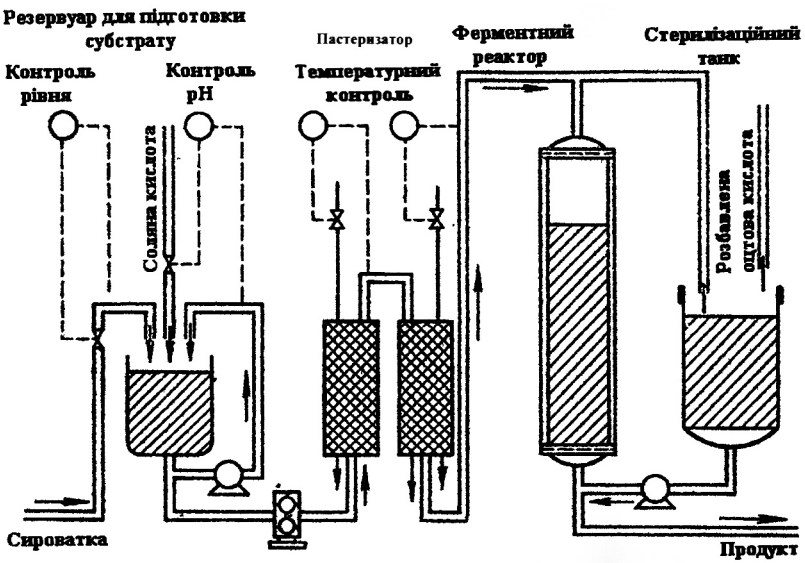


Рис. 10.3. ***Схема напівпромислової установки для гідролізу лактози у молочній сироватці***
(за Клесовим А.А., 1982)

силікагелі шляхом ковалентного зв'язування за допомогою глутарового альдегіду за методом фірми «Корнінг Глас». У реактор надходить попередньо пастеризована, депротеінізована і демінералізованана сироватка. Протягом 5 днів безупинної роботи на установці переробляється близько 30 т сироватки, з якої одержують 1,7 т цукрового сиропу або 1,2 т сухих цукрів. Ступінь конверсії лактози – 80 %. Аналогічна установка за участю тих же партнерів уведена в дію 1978 р. у Франції. Її продуктивність – 500 л/год сироватки. На промисловій установці з денною продуктивністю 200 т цукрового сиропу при 80 % конверсії лактози собівартість 1 кг отриманих цукрів складає 1,25–1,80 французького франка.

Для вилучення лактози з молочної сироватки біокаталізатор (іммобілізована лактаза) розміщується в реакторі горизонтально у вигляді нерухомого шару.

Вилучення лактози з молока. Необхідність вилучення лактози з незбираного молока викликана тим, що деякі люди, особливо в країнах Азії й Африки, не засвоюють лактозу через відсутність у їхньому організмі лактази. При вживанні в їжу молока в них з'являється діарея, метеоризм, біль у животі. Елімінувавши лактозу з молока, можна вирішити дуже важливе питання поліпшення харчування значної частини населення, насамперед дітей в економічно відсталих країнах.

Однак виникає багато проблем, пов'язаних з особливими фізико-хімічними властивостями цього продукту. У зв'язку з тим, що молоко – колоїдний розчин, при використанні реактора з нерухомим шаром існує потенційна небезпека забивання колонок. Крім цього, для збереження високої якості і запобігання мікробного забруднення технологією передбачена обробка молока при низьких робочих температурах. У цьому випадку зменшується активність іммобілізованого ферменту, тому що оптимум дії лактази становить 37 °С. Зменшення активності лактази спричиняє збільшення часу витримування молока в реакторі. Це, в свою чергу, може призвести до забруднення молока ферментом і носієм, очищення молока від яких дорого коштує.

Успішне подолання багатьох з названих проблем дозволило здійснити перший комерційний проект з одержання безлактоз-

ного молока. З 1975 р. в Італії працює промислова пілотна установка з використанням лактази (рис. 10.4).

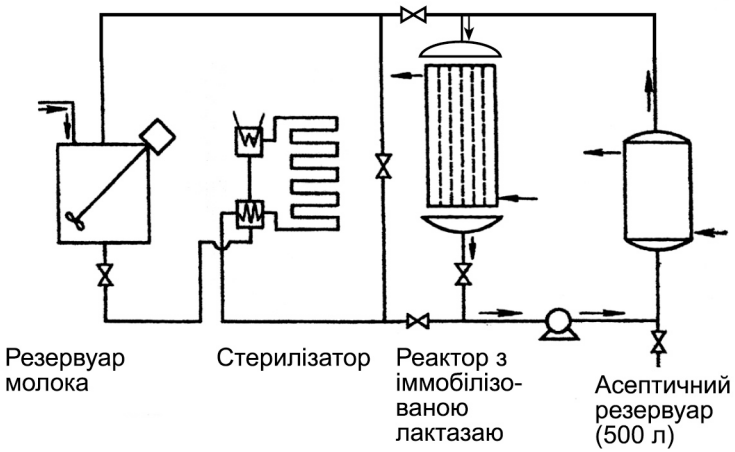


Рис. 10.4. ***Схема пілотної установки для одержання безлактозного дієтичного молока за допомогою іммобілізованої лактази***
(за Клесовим А.А., 1982)

Джерелом для комерційних препаратів розчинної лактази є гриби (з них лактаза більше підходить для переробки кислої сироватки) і дріжджі (лактаза більш придатна для обробки молока).

Для попередження закупорки реактора швидкість, з якою протікає молоко через колонку, значно збільшили. Іммобілізація дріжджової лактази проведена шляхом включення крапельок ферменту у порожнисті нитки триацетатцелюлози, що змотуються в мотки і дуже рихло розміщуються паралельно осі реактора та закріплюються в його верхній і нижній точках. Таке рішення одночасно забезпечує низький опір струму рідини і дуже велику площу поверхні ферменту. Стійкість триацетатцелюлози перешкоджає потраплянню носія у продукцію. Іммобілізований таким методом фермент має високу стабільність: 0,5 кг ферментомістких волокон триацетатцелюлози після переробки 500 тис. л молока при 4–7 °С втратили тільки 10 % своєї первинної ферментативної активності.

Для усунення мікробного забруднення колонки періодично промивають бактерицидними розчинами.

При високій вартості лактази (дріжджової β-галактозідази) економічного ефекту можна досягнути за рахунок високої експлуатаційної стабільності ферменту і високої конверсії лактози. Проблему вирішили, використавши реактор з нерухомим шаром і рециркуляцією (реактори з нерухомим шаром потребують менше ферменту при виході такої ж кількості продукту). Установка має 20-метровий реактор, у якому знаходиться 4 кг лактази, іммобілізованої шляхом включення у волокна триацетатцелюлози. Фермент досить стабільний. Протягом 50 днів роботи його активність зменшилася тільки на 20 %. Потужність установки – не менше 8000 л молока на день. Переробці піддається збиране молоко, що стерилізується протягом 3 с при температурі 142 °С, потім швидко охолоджується до 4–7 °С і кількаразово прокачується зі швидкістю 7 л/хв через реакційну колонку до досягнення необхідного ступеня конверсії (75 %). При 7 °С безлактозне молоко може зберігатися протягом 3–4 місяців.

Джерелом для комерційних препаратів розчинної лактази є гриби (з них лактаза більш підходить для переробки кислої сироватки) і дріжджі (лактаза більш придатна для обробки молока).

Виробництво сирів. Використання іммобілізованих ферментів може бути перспективним при переробці молока для виробництва сирів. При виробництві сирів використовується сичужний фермент реннін. В результаті його дії із незбираного молока виділяється білок казеїн, який після коагуляції стає основою усього процесу виробництва сичужних сирів. Процес згортання (зсідання) молока проходить у дві стадії. На першій, ензиматичній, відбувається зміна структури казеїну, який стає менш стійким і під дією іонів кальцію на другій неензиматичній стадії випадає в осад. Крім того, відомо, що сичужний фермент суттєво впливає на якість сиру і, як наслідок, на економіку виробництва.

Природний сичужний фермент (реннін) виготовляють із сичугів молодих телят, які одержували з раціоном тільки моло-

ко. Практично в усіх країнах з розвиненою молочною промисловістю не вистачає сичугів телят, а отже, сичужного ферменту. У колишньому Радянському Союзі щорічно для потреб сироваріння потрібно було 200–250 т сичужного ферменту, який можна виділити з 8–10 млн сичугів телят *(Артамонов В.І., 1989)*. Підраховано, що загальна потреба в ренніні у світі оцінюється сумою близько 100 млн дол.

Замість шлунків молодих телят у виробництві сирів почали використовувати сичуги більш дорослих телят, в яких міститься менше реніну, однак вони мають підвищену кількість пепсину та небажаних баластних речовин, що негативно впливає на якість сирів, які виготовляються. Все це зумовило інтенсивний пошук альтернативних джерел ренніну за допомогою мікроорганізмів.

Мікроорганізми продукують різноманітні ферменти. Ще з кінця XIX століття було відомо, що деякі мікроорганізми синтезують ферменти, які викликають згортання молока. До них належать Bac. subtilis, Bacterium prodigiosum, Aspergillus oryzae та ін. Мікробні ферменти для згортання молока у промислових масштабах виробляються в Японії, США, Данії та інших країнах. Продуцентами ферментів, які використовуються в Японії є Mucor parasitica, у США – гриб Endothia parasitica, а у Данії — плісень Mucor miehei. Фірмою Cooney et Emerson випускається фермент реннілаза, у Франції – формоза, а в колишньому Радянському Союзі вироблявся мезентерин ГР і мукор. Мікробні ферменти можна використовувати окремо, а також у суміші з природним ренніном, витрати якого зменшуються удвічі.

На жаль, мікробний реннін має деякі недоліки. Він зберігає активність протягом тривалого часу і має ширший спектр дії порівняно з ренніном тваринного походження. Завдяки цьому мікробний реннін сприяє видаленню природних ароматів сирів, негативно впливає на процеси консервації і старіння сирів та погіршує його смакові властивості. Тому останнім часом для одержання більш якісного ренніну використовуються методи генетичної інженерії.

Перспективним є застосування іммобілізованого ренніну чи інших альтернативних протеаз, можливість їх реактивації і

тривалого використання, а також автоматизація процесу, що забезпечить значний економічний ефект.

Перспективним є також використання іммобілізованих ферментів для стабілізації молока. При обробці трипсином молоко скисає повільніше і довше зберігає свої первинні смакові властивості. Обробка іммобілізованим трипсином збільшила термін зберігання молока на 2–3 тижні. Використання іммобілізованих ферментів ефективніше за традиційні способи обробки молока – стерилізацію або обробку струмом високої частоти.

Контрольні питання

1. З якою метою використовуються іммобілізовані ферменти в молочній промисловості?
2. Біотехнологія вилучення лактози з молочної сироватки.
3. На якому носії іммобілізується лактаза для вилучення лактози з молочної сироватки і як розміщується біокаталізатор у реакторі?
4. Як відбувається вилучення лактози з молока і які труднощі виникають при цьому?
5. На якому носії і яким методом проводиться іммобілізація лактази для обробки молока? Як розміщується біокаталізатор у реакторі установки?
6. Які перспективи використання іммобілізованих ферментів у технології одержання сиру?

10.6. БІОТЕХНОЛОГІЯ ВИРОБНИЦТВА D-ФЕНІЛГЛІЦИНУ

D-фенілгліцин – це амінокислота, яка необхідна для виготовлення напівсинтетичних антибіотиків – ампіциліну і цефалексину. Це антибіотики широкого спектру дії, які згубно діють як на грамнегативні, так і грампозитивні мікроорганізми та мають низьку токсичність.

Італійська компанія «Снам Проджетті» розробила технологію одержання оптично активних амінокислот із рацемічних сумішей з використанням як біокаталізатора іммобілізованого ферменту гідантоїнази шляхом включення у порожнисті нитки триацетату целюлози. Джерелом цього ферменту є печінка телят. В процесі іммобілізації активність гідантоїнази знижується на 20% і становить 80 % активності нативного ферменту.

D-фенілгліцин одержують шляхом хімічного синтезу. При взаємодії альдегідів з ціанистим калієм і карбонатом амонію утворюється рацемічна суміш, тобто суміш D, L-ізомерів – гідантоїнів амінокислот. Гідантоїназа взаємодіє тільки з D-гідантоїнами з подальшим перетворенням їх у карбамоїлпохідні D-амінокислот. L-гідантоїни амінокислот довільно перетворюються на рацемічну суміш, яка складається з D, L-гідантоїнів. D-ізомери за участю гідантоїнази знову елімінуються з рацемічної суміші, перетворюючись на карбамоїлпохідні D-амінокислот. Останні у присутності гідроксиду кальцію при температурі 100 °С гідролізуються до D-амінокислот, тобто таким шляхом одержується D-фенілгліцин. Є дані, що 3 кг фенілгідантоїну в реакторі періодичної дії при 30 °С і pH 8,5 протягом 5 год перетворюються на D-фенілгліцин.

Контрольні питання

1. До яких речовин належить D-фенілгліцин і де він застосовується?
2. Біотехнологія одержання D-фенілгліцину?
3. Що є біокаталізатором у біотехнологічному процесі отримання D-фенілгліцину і як його застосовують?

Розділ 11.

БІОТЕХНОЛОГІЯ ВИРОБНИЦТВА АНТИБІОТИКІВ

Відкриття основних груп антибіотиків і весь комплекс генетичних і біохімічних досліджень їхніх продуцентів у 40–50-ті роки минулого століття, які дозволили створити масштабне виробництво принципово нових лікарських препаратів, можна віднести до найважливіших досягнень біотехнології.

Демографічний вибух в одних країнах і різке збільшення тривалості життя в інших на той час були обумовлені значною мірою антибіотиками. Серед продукції фармацевтичної промисловості розвинених країн антибіотики посідають перше місце за всіма показниками.

Незважаючи на знання структури практично всіх відомих речовин з антибіотичною дією, їхній хімічний синтез громіздкий і неефективний. У промисловості одержують антибіотики медичного чи ветеринарного призначення, використовуючи здатність відповідних штамів-продуцентів генерувати даний антибіотик у певній фазі росту і заданому режимі культивування.

Антибіотики – це низькомолекулярні речовини, які розрізняються за хімічною структурою. Загальне в цих сполуках є те, що, залишаючись продуктами життєдіяльності мікроорганізмів, вони в дуже малих концентраціях порушують ріст мікроорганізмів. Більшість антибіотиків належать до вторинних метаболітів, так званих ідіолітів.

Мікроорганізми, які виробляють вторинні метаболіти, спочатку проходять стадію швидкого росту – трофофазу, під час якої синтез вторинних метаболітів незначний. У міру сповільнення або припинення росту через виснаження однієї або декількох необхідних поживних речовин у культуральному середовищі мікроорганізми переходять в ідіофазу. У цей період синтезуються ідіоліти (антибіотики). Більшість мікроорганізмів у процесі трофофази чутливі до власних антибіотиків, однак

у період ідіофази вони втрачають цю властивість. Щоб зберегти мікроорганізми, продукуючі антибіотики, від самознищення, потрібно швидко досягти ідіофази і потім культивувати мікроорганізми у цій фазі.

На сьогодні відомо близько 6000 антибіотиків та антибіотичних речовин природного походження, продуцентами яких в основному є шість родів нитчастих грибів, три роди актиноміцетів (майже 4000 різних антибіотиків) і два роди справжніх бактерій (майже 500 антибіотиків).

Із нитчастих грибів плісняві гриби родів Cephalosporium і Penicillium є продуцентами так званих β-лактамних антибіотиків – пеніцилінів і цефалоспоринів. Більша частина синтезованих актиноміцетами антибіотичних речовин, включаючи тетрацикліни, належить до роду Streptomyces (один тільки вид Streptomyces griseus синтезує понад п'ятдесят антибіотиків).

Крім пеніцилінів і цефалоспоринів, до β-лактамних антибіотиків належать цефаміцини, продуцентами яких є нитчасті бактерії актиноміцети, які належать до роду стрептоміцетів Streptomyces.

У 1945 р. Бротзу з Інституту гігієни в Кальарі (Сардінія) виділив із проби морської води плісень Cephalosporium acremonium, яка синтезує декілька антибіотиків, у тому числі цефалоспорин С, який особливо ефективний проти стійких до пеніциліну грампозитивних бактерій.

У період 40-х – 70-х років XX ст. кількість щорічно винайдених антибіотиків збільшувалася лінійно: щорічно відкривали приблизно 200 нових сполук. Наприкінці 70-х років XX ст. антибіотики виявляли зі швидкістю 300 сполук на рік, з них 150 продукувались актиноміцетами *(Альбер Сассон, 1987)*.

Серед відомих тепер 5000–6000 природних антибіотиків і антибіотичних речовин для реалізації споживачам виробляється лише 100, більшість яких (69) одержана зі стрептоміцетів. До найважливіших антибіотиків терапевтичного призначення, які використовувались донедавна і використовуються тепер належать наступні їх класи (табл. 11.1).

Перелік наведених класів антибіотиків поповнюється щороку. Причини такої уваги до пошуку нових антибіотиків пояснюються токсичністю існуючих антибіотиків, алергічними

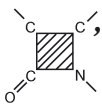
Таблиця 11.1.

Найважливіші антибіотики терапевтичного призначення *(за Єгоровим Н.С. , 1987)*

Клас	*Типові антибіотики*	*Продуценти*	*На кого діє*	*Механізм дії*	*Труднощі терапевтичного застосування*
β-лактамні	Пеніциліни, цефалоспорини	Гриби родів Penicillium, Cephalosporum	Грампозитивні й грамнегативні бактерії	Порушення синтезу клітинної стінки	Алергічні реакції
Аміноглікозидні	Стрептоміцин, гентоміцин, канаміцин, тобраміцин, амікацин	Актиноміцети роду Streptomyces, бактерії родів Micromonospora, Bacillus	В основному грамнегативні бактерії	Незворотнє пригнічення синтезу білка	Токсична дія на слуховий нерв і нирки
Тетрацикліни	Одноіменні антибіотики	Актиноміцети роду Streptomyces	Грампозитивні й грамнегативні бактерії, рікетсії, хламідії, найпростіші	Зворотнє подавлення синтезу білка	Розповсюдження стійких штамів
Макроліди	Антибактеріальні: еритроміцин Протигрибкові і антипротозойні: полієни	Актиноміцети роду Streptomyces Те ж саме	Грампозитивні бактерії Гриби, деякі найпростіші	Те ж саме Порушення плазматичної мембрани	Токсичність
Поліпептидні	Поліміксини, граміцидіни, бацитрацини	Різні мікроорганізми	В основному грамнегативні бактерії	Механізм дії різний	Висока токсичність

реакціями на їх введення, підвищенням стійкості до них патогенних мікроорганізмів, а також необхідністю пошуку засобів боротьби зі збудниками, проти яких недостатньо ефективні відомі тепер препарати.

У світі в 1978 р. було реалізовано антибіотиків на 4,2 млрд. доларів. Із цієї суми 1,5 млрд. доларів припадає на β-лактамні антибіотики (пеніциліни і цефалоспорини) та антибіотики, які синтезуються актиноміцетами (1 млрд. доларів). У 1980 р. світове виробництво антибіотиків складало приблизно 25000 т, з них 17000 т – пеніциліни, 5000 – тетрацикліни, 1200 – цефалоспорини і 800 т – еритроміцини.

Починаючи з середини 60-х років XX ст. у зв'язку зі зростаючою складністю виділення ефективних антибіотиків і розповсюдження стійкості до широко вживаних антибіотиків у значної кількості патогенних бактерій, дослідники перейшли від пошуку нових препаратів до модифікації структури уже отриманих. Вони прагнули підвищити ефективність антибіотиків, знайти захист їх від інактивації ферментами стійких бактерій і покращити фармакологічні властивості препаратів. Більшість досліджень було зосереджено на пеніцилінах і цефалоспоринах, структура яких включає ***чотиричленне β-лактамне кільце, що складається з трьох атомів вуглецю і одного атома азоту:***  ***, і яке є зручним для модифікації.***

11.1. ВИРОБНИЦТВО β-ЛАКТАМНИХ АНТИБІОТИКІВ

Одержання пеніцилінів. Вперше антибактеріальну дію пеніциліну і можливість його використання як лікувального препарату встановили у 1940 р. А. Флемінг, Х. Флорі і Е. Чейн зі співробітниками Оксфордського університету. Продуктивність лабораторного штаму плісені була на той час 2 мг препарату на 1 л культуральної рідини, що було недостатнім для налагодження промислового виробництва антибіотика. Продуктивність гриба вдалося збільшити шляхом багаторазового систематичного впливу на нього такими мутагенами, як рентгенівське й

ультрафіолетове опромінювання, азотистий іприт у сполученні зі спонтанними мутаціями й відбором найкращих продуцетнів. Завдяки цьому концентрація пеніциліну в культуральній рідині була доведена до 2 %, тобто збільшена в 10 тис. разів (20 г/л культуральної рідини).

Метод підвищення продуктивності штамів-продуцентів антибіотиків, який грунтується на безладних мутаціях, незважаючи на великі затрати праці й часу, використовується й нині. Це є наслідком того, що біосинтез антибіотика відбувається в результаті сумісної дії 10–30 різних ферментів, кодованих відповідною кількістю генів. Полігенний механізм, покладений в основу біосинтезу антибіотика, є причиною того, що зміни окремих генів не дають бажаних результатів. Крім того, для багатьох антибіотиків, мікробіологічне виробництво яких налагоджено, молекулярні механізми їх біосинтезу дотепер не з'ясовані.

Для масштабного виробництва пеніциліну G використовують високопродуктивний промисловий штам Penicillium chrysogenum, який був одержаний у результаті послідовних циклів мутагенезу і селекції. Вирощують його глибинним методом у ферментерах за допомогою фенілоцтової кислоти, яка є попередником бензильного бокового ланцюга молекули антибіотика. Інтенсивний синтез пеніциліну розпочинається за наявності великої кількості біомаси міцелію при повному використанні глюкози і молочної кислоти в середовищі, при pH, наближеному до нейтрального. Мікробіологічна стадія при виробництві пеніциліну триває близько 200 год. Після закінчення ферментації культуральну рідину фільтрують, а клітини плісені промивають. З фільтрату і промивок за допомогою бутанолу й іонів калію у спеціальних установках – кристалізаторах одержують кристалічну калієву сіль пеніциліну G (чистота – 99,5 %), яка є вихідним матеріалом для наступних хімічних модифікацій.

До цього часу пеніцилінові антибіотики становлять найважливішу групу хіміотерапевтичних засобів. Ядром пеніцилінів є 6-амінопеніциланова кислота, або 6-АПК, яку використовують для отримання напівсинтетичних пеніцилінів (рис. 11.1).

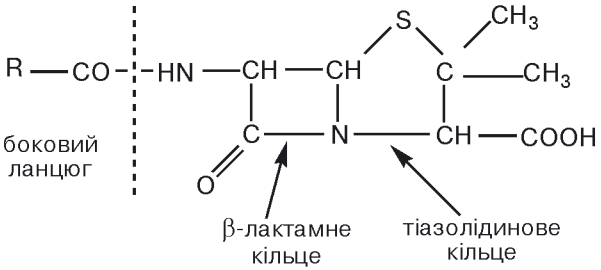


Рис.11.1. ***Будова молекули пеніциліну***

Отримання антибіотиків цефалоспоринового ряду. Цефалоспорини – друга велика група екстрацелюлярних β-лактамних антибіотиків, у яких шестичленне дигідротіазинове кільце з'єднане з β-лактамним кільцем. Завдяки цьому ядром цефалоспоринів є 7α-аміноцефалоспоринова кислота або 7-АЦК (***цефемове ядро***), вперше виділене у процесі очищення цефалоспорину С.

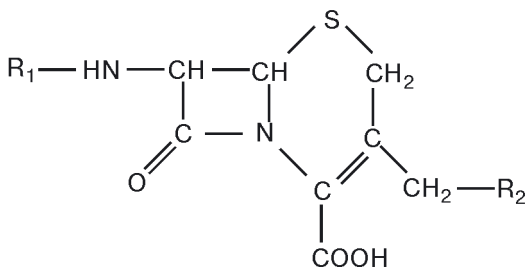


Рис. 11.2. ***7-аміноцефалоспоринова кислота*** *(7-АЦК)*

При виробництві цефалоспорину С поєднують мікробіологічний метод з подальшою хімічною модифікацією. Як продуцент антибіотика використовується Cephalosporium acremonium. У цього антибіотика поєднується антибактеріальна активність як проти грампозитивних, так і грамнегативних мікроорганізмів. Проте для досягнення лікувального ефекту потрібні високі концентрації цефалоспорину С. Він є матеріалом для подальших хімічних модифікацій.

11.2. МОДИФІКАЦІЯ β-ЛАКТАМНИХ АНТИБІОТИКІВ

За декілька десятиліть використання антибіотиків з лікувальною метою нагромадилась велика кількість патогенних мікроорганізмів, які набули спадкової стійкості до препаратів, що раніше викликали їх загибель. Вихід зі складного становища був знайдений завдяки хімічній і ферментативній трансформації природних антибіотиків.

В результаті одержали так звані напівсинтетичні антибіотики, в структуру яких внесені деякі зміни, які не займають основного угруповання атомів, відповідальних за антибіотичний ефект. Таким чином модифікували природні пеніциліни і цефалоспорини за допомогою іммобілізованого ферменту пеніцилінамідази.

Одержання нових, більш ефективних аналогів пеніциліну пов'язане зі зміною його бічного ланцюга при збереженні цілісності решти частини, так званого «ядра» антибіотика – 6-амінопеніцилановой кислоти.

Це відкрило доступ до широкомасштабного виробництва напівсинтетичних пеніцилінів, стійких в кислому середовищі, які володіють високою активністю по відношенню до великої кількості мікробів, низькою токсичністю, а також стійкістю до ферменту β-лактамази, яка гідролізує лактамне кільце, що призводить до повної втрати антибіотичної активності. Остання властивість дуже важлива, тому що багато мікроорганізмів, які містять β-лактамазу, стійкі до дії бензилпеніциліну і деяких інших пеніцилінів.

11.2.1. Одержання 6-амінопеніцилановой кислоти (6-АПК).

Це ключовий продукт синтезу нових пеніцилінів. Похідними 6-АПК є напівсинтетичні пеніциліни. Одержують їх шляхом гідролізу бензилпеніциліну (пеніциліну G). Оброблений ферментом пеніцилінамідазою, продуцентом якого є спеціальний бактеріальний штам E. coli, пеніцилін G в результаті вибіркового видалення з молекули бензильної групи при 37 °С у водному середовищі перетворюється на 6-амінопеніцилановую кислоту.

Другим компонентом, який утворюється в процесі гідролізу, є фенілоцтова кислота:

$$\text{Бензилпеніцилін} + H_2O \xrightarrow{\text{пеніцилінамідаза}} \text{6-АПК} + \text{фенілоцтова кислота}.$$

На ранніх етапах (1976 р.) 6-АПК одержували шляхом обробки бензилпеніциліну бактеріальною масою E.coli, тобто інтактними клітинами, які містять фермент пеніцилінамідазу, що без побічних реакцій розщеплював саме той амідний зв'язок, необхідний для утворення 6-АПК.

В результаті використання іммобілізованих бактеріальних клітин (E.coli), які містять пеніцилінамідазу, а потім і самої іммобілізованої пеніцилінамідази, значно підвищилася продуктивність і економічність промислового процесу одержання 6-АПК. У 1975 р. процес одержання 6-АПК з використанням іммобілізованої пеніцилінамідази впроваджено у тодішньому Радянському Союзі, і це було першим процесом інженерної ензимології.

В кожній країні іммобілізацію проводять різними шляхами. Італійська компанія використовує іммобілізовану пеніцилінамідазу шляхом включення ферменту в порожнисті нитки триацетату целюлози, що забезпечує загальний вихід 6–АПК на рівні 85 % з чистотою 96 %. За технологією японської компанії «Танабе Сейяку» використовуються іммобілізовані в поліакриламідному гелі цілі бактеріальні клітини (з часом напівінактивації 42 доби при 30 °С або 17 діб при 40 °С). Загальний вихід 6-АПК – приблизно 80 %.

У колишньому СРСР весь об'єм 6-АПК вироблявся за допомогою пеніцилінамідази, іммобілізованої включенням у поліакриламідний гель, модифікований глутаровим альдегідом.

Отримана 6-АПК має слабку антибактеріальну активність і не використовується самостійно як лікувальний засіб. Однак ядро 6-АПК є зручною основою для модифікацій, в результаті яких при приєднанні бічних груп антибактеріальна активність препарату значно підвищується. Наприклад, при заміні бічних груп дістають ***метицилін***, стійкий проти інактиваційної дії бактеріальних ферментів, а також ***ампіцилін***, який діє на грампозитивні бактерії.

На сьогодні в різних країнах виробляють біосинтетичні (за допомогою Penicillium notatum або P. chrysogenum) антибіотики і на їх основі – напівсинтетичні антибіотики β-лактами (табл. 11.2).

Таблиця 11.2.

Природні і напівсинтетичні пеніциліни

(Єлінов Н.П., 1995)

Назва	Радикал, R	Ефективність per os	Стійкість до β-лактамаз		Гідролізується після всмоктування
			Staph. aureus	грам-негат. бактерій	
1	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*
Бензилпеніцилін	Бензил	–	–	–	–
Феноксиметил-пеніцилін	Феноксибензил	+	–	–	–
Метицилін	2,6-Диметокси-феніл	–	+	+	–
Оксацилін	5-Метил-3-феніл-4-ізоксазоліл	+	+	+	–
Клоксацилін	3-о-Хлорфеніл-5-метил-4- ізооксазоліл	+	+	+	–
Флуклоксацилін	2-Хлор-6-фтор-феніл-5-метил-4- ізоксазоліл	+	+	+	–
Ампіцилін	α -D-(-)-амінобензил	+	–	–	–
Амоксицилін	р-Окси-α-D-(-)-амінобензил	+	–	–	–
Карбеніцилін	Натрієва сіль α-D-(-)-карбокси-бензил	–	–	+	–
Тикарцилін	Натрієва сіль карбокси (тієн-3-іл) ацетил	–	–	+	–
Карфецилін*	Феніл (феноксикарбоніл)-ацетил	+	–	+	+
Каріндацилін*	Інден-5-іл-оксикарбоніл-феніл-ацетил	+	–	+	+

Продовження табл. 11.2.

Назва	Радикал, R	Ефективність per os	Стійкість до β-лактамаз		Гідролізується після всмоктування
			Staph. aureus	грам-негат. бактерій	
1	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*
Півампіцилін*	Амінофеніл-ацетил	+	–	–	+
Талампіцилін*	Див. ампіцилін^{oo}	+	–	–	+
Бакампіцилін*	Див. ампіцилін$^{+}$	+	–	–	+
Піперацилін**	2,3-Диоксопіпе-разін-1-іл-карбоніламіно (феніл) ацетил	–	–	–	–
Азлоцилін**	4-Оксопіразо-лідин-1-іл-карбоніламіно-(феніл) ацетил	–	–	–	–
Мезлоцилін**	3-Метилсульфоніл-2- оксоімідазолідин-1-іл-карбоніламіно-(феніл) ацетил	–	–	–	–
Мецилінам**	Пергідроазепін-1-іл-метилен	–	о	?	
Півмецилінам**	Див. мецилінам^{o}	+	о	?	+

Примітка: *ефіри карбеніциліну;

* ефіри ампіциліну;

** заміщені ампіциліни;

** 6-β—амідинозаміщені пеніциліни;

в позиції 3-тіазолідинового циклу (у формі складного ефіру): ^{o}-півалоілоксиметил, ^{oo}3-оксо- 1, 3-дигідроізобензофуран-1-іл, $^{+}$2-етоксикарбонілоксиетил або 4-етоксикарбонілоксибутил; (+) – відповідь позитивна; (–) – відповідь негативна; (о) – не діє на грампозитивні бактерії; (?) – інформація відсутня.

З пеніциліну G можна одержати 6-АПК і хімічним шляхом, вдаючись до багатостадійних хімічних перетворень при досить жорстких умовах (низька температура, наявність певних розчинників і видалення із середовища, де відбувається реакція, навіть слідів вологи). Через складність хімічного методу перевагу надають ферментативному, який, крім того, має менше етапів.

11.2.2. Одержання 7-α–аміноцефалоспоринової кислоти – 7-АЦК.

Пеніцилінамідазі властива унікальна субстратна специфічність, яка дозволяє здійснювати гідроліз не тільки пеніциліну, але й цефалоспорину, причому відщеплюється тільки бічна група (R_1 або R_2), β-лактамний цикл лишається незмінним (рис. 11.2).

Із виробленого мікробіологічним шляхом цефалоспорину С під дією пеніцилінамідази проводиться елімінація бічного амідного ланцюга і отримується 7-АЦК, яка є ключовою сполукою для синтезу нових цефалоспоринів. Приєднуючи до неї різні бічні ланцюги, отримують активні антибактеріальні напівсинтетичні препарати цефалоспоринового ряду. Відомо майже 20 цефалоспоринів, створених методом напівсинтезу з АЦК: цефалоспоридін (цепорин), цефуроксим, цефокситин, цефалотин, цефацетрил, цефалексин, цефазолін, цефаридин, цефотаксим тощо.

11.3. СТВОРЕННЯ НОВОЇ БІОТЕХНОЛОГІЇ ВИРОБНИЦТВА І ЗАСТОСУВАННЯ АНТИБІОТИКІВ

Нова біотехнологія ґрунтується на досягненнях молекулярної біології, молекулярної генетики і генетичної інженерії. Сьогодні розробляються перспективні напрями, що грунтуються на знаннях шляхів біосинтезу антибіотиків або їхніх окремих ключових структур. Для створення нової біотехнології масштабного виробництва антибіотиків передбачається використання різних прийомів або напрямів.

1. Генноінженерний напрям передбачає конструювання продуцентів з використанням плазмід E.coli як вектора для створення рекомбінантних ДНК. Вони містять гени, які контролюють біосинтез ферментів, які каталізують лімітуючі етапи біосинтезу антибіотика.
2. Виділення лімітуючих реакцій і за допомогою генетичної інженерії конструювання генів «вузьких місць» та одержання відповідного штаму-продуцента, який виробляє достатню кількість первинного метаболіту, що раніше лімітував швидкість біосинтезу антибіотика. Реалізація цього прийому дала змогу підвищити продуктивність продуцента цефалоспорину.
3. Введення в геном мікроорганізму інформації про фермент, який необхідний для модифікації продукованого антибіотика, наприклад, його метилювання за допомогою метилаз.
4. Використання сильних індукторів біосинтезу нуклеїнових кислот і білків-ферментів для збільшення концентрації первинних метаболітів, з яких за наявності відповідних ферментів утворюються антибіотики.
5. Збільшення продуктивності продуцентів шляхом використання специфічних ферментів, які визначають перехід мікробної культури із стадії трофофази до ідіофази, а також пригнічують процеси ретроінгібування.
6. Мутаційний біосинтез (мутасинтез). За допомогою мутацій мікроорганізмів одержують штами-мутанти, у яких блоковано утворення окремих фрагментів молекули антибіотика. При мутасинтезі відповідні мутантні штами використовують для завершення синтезу антибіотичної молекули. В результаті отримують модифіковані або так звані гібридні антибіотики.
7. Нова технологія, за якої використовуються штами-суперпродуценти антибіотиків, у яких передбачено вдосконалення захисту продуцента від синтезованого ним антибіотика.
8. Використання при виробництві антибіотиків іммобілізованих ферментів, що каталізують як реакції гідролізу, так і синтезу на деяких стадіях виробництва нових пеніцилінів і цефалоспоринів. Перспективним є використання іммобілізованих на полімерному носії цілих клітин-продуцентів, що дає змогу здійснити повний синтез антибіотичних препаратів.

9. Багатообіцяючим підходом є інкапсулювання антибіотиків і, зокрема, їх включення в ліпосоми, що дає можливість забезпечити цільову доставку препарату в органи-мішені (хворі органи) і знижує їх побічну дію.
10. Замість антибіотика в організм може вводитися його продуцент, який є антагоністом збудника захворювання. Цей підхід бере початок з робіт І.І. Мечникова про пригнічення гнильної мікрофлори в товстому кишечнику людини за допомогою молочнокислих бактерій.

Так, виникненню карієсу зубів сприяє дикий патогенний штам бактерії Streptococus mutans, який знаходиться в ротовій порожнині. Він виділяє кислоти, які руйнують зубну емаль і дентин. Одержаний мутантний штам цього виду бактерії, який при введенні в ротову порожнину не утворює корозивних кислот, витісняє дикий патогенний штам і виділяє летальний для нього білковий продукт (Єгоров Н.С. і ін., 1987).

Контрольні питання

1. Що таке антибіотики, коли і ким вони були відкриті?
2. Які антибіотики й антибіотичні речовини сьогодні відомі і скільки їх виробляється для реалізації?
3. Які мікроорганізми є продуцентами антибіотиків?
4. Які антибіотики належать до β-лактамних?
5. Біотехнологія одержання пеніцилінів.
6. Який промисловий штам використовується для крупнотоннажного виробництва пеніциліну G і його продуктивність?
7. Біотехнологія отримання антибіотиків цефалоспоринового ряду?
8. Який продуцент використовують для виробництва цефалоспоринових антибіотиків?
9. З якою метою проводиться модифікація β-лактамних антибіотиків?
10. Яким шляхом одержують 6-АПК?

11. Чи використовується 6-АПК як самостійний лікувальний препарат?
12. Якими методами і на яких носіях проводиться іммобілізація пеніцилінамідази у різних країнах?
13. Які антибіотики можна отримати в результаті модифікації ядра 6-АПК?
14. Що є вихідними продуктами для отримання 7-АЦК і як застосовується 7-АЦК?
15. Які напрями створення нової біотехнології виробництва і застосування антибіотиків?

Розділ 12.

БІОТЕХНОЛОГІЯ ВИРОБНИЦТВА ГОРМОНІВ

12.1. ШЛЯХИ ОТРИМАННЯ ГОРМОНІВ

Біотехнологія сприяє розвитку нових шляхів у медицині щодо одержання таких цінних біологічно активних речовин, як гормональні препарати. В організмі людини і тварини виробляються десятки різних сполук, які беруть участь в гормональній регуляції росту, розвитку й обміну речовин. Неабиякі зрушення відбулися в напрямі синтезу пептидних гормонів, побудованих із порівняно невеликої кількості ланок – від кількох амінокислотних залишків до декількох десятків. До них належать гіпоталамічні фактори, деякі гіпофізарні гормони, гормони щитовидної залози, гормони підшлункової залози і кишечника, нейропептиди. В ендокринних клітинах гормони даної групи утворюються зі значно більших попередників шляхом специфічного ферментативного розщеплення чітко визначених пептидних зв'язків.

Гормони росту і пролактин побудовані з більшої кількості амінокислотних залишків (приблизно 190–195) і утворюються в результаті відщеплення від їх попередників – прегормонів N-кінцевого пептиду, який називають «сигнальним», розміром близько 25 амінокислотних залишків.

Донедавна пептидні гормони, необхідні для медицини, виділяли в основному з органів і тканин тварини та людини (крові донорів, видалених при операціях органів, трупного матеріалу, органів після забою тварин тощо). Із органів тварин одержували гормони для застосування у випадках, коли гормон не має вираженої видової специфічності. Єдиним джерелом одержання гормонів з надто вираженою видовою специфічністю, наприклад соматотропіну людини (гормону росту), був трупний матеріал. Для одержання невеликої кількості гормонального препарату необхідно багато матеріалу (сировини).

Перші успіхи генетичної інженерії вселили надію на те, що з часом можна буде використовувати клітини мікроорганізмів для виробництва будь-яких продуктів білкової природи шляхом введення в їх геном генів, які кодують ці білки, і створення умов для їх експресії. Розробляючи нові технології виробництва гормонів з використанням плазмід, головною метою було створити (сконструювати) рекомбінантні молекули ДНК, які містять нуклеотидні послідовності, що програмують синтез певних гормонів, ввести їх у бактерію і змусити продукувати ці гормони.

Технологія одержання гормонів за допомогою рекомбінантних ДНК включає такі етапи: 1) одержання генетичного матеріалу (генів); 2) введення генетичного матеріалу в генетичний апарат бактеріальної клітини і створення умов для його експресії.

Одержання генів. Необхідний генетичний матеріал (ген або групу генів) для їх подальшого примноження методами генетичної інженерії з метою синтезу біологічно активних білків, що кодуються цими генами, можна досягнути трьома різними методами: 1) виділенням його з ДНК; 2) хіміко-ферментативним синтезом; 3) ферментативним або матричним синтезом на основі виділеної з клітини матричної РНК (мРНК).

Перший метод полягає в тому, що з природного генетичного матеріалу – ДНК – за допомогою відповідних ферментів (рестрикційних ендонуклеаз) «вирізають» потрібний ген. Цей підхід має суттєві недоліки. По-перше, важко підібрати дію ферментів таким чином, щоб вирізати з ДНК необхідний ген. Як правило, разом з геном залишаються «по боках» зайві нуклеотидні послідовності, що заважає наступному використанню одержаного гена, або, навпаки, ферменти відрізають частину гена, що робить його функціонально неповноцінним. По-друге, гени еукаріотичних організмів мають складну «мозаїчну» (екзон-інтронну) будову, що в подальшому при розмноженні в мікроорганізмах може перешкоджати їх нормальному функціонуванню, тому що в бактеріях не відбувається видалення зайвих частин (інтронів). Тому цей прийом виділення генів краще спрацьовує стосовно вірусів і бактерій, але не еукаріот. По-третє, якщо ген становить незначну частку від цієї ДНК, з якої його виділяють, то можуть виникнути серйозні труднощі щодо його ізоляції та ідентифікації.

Другий метод полягає у хіміко-ферментативному синтезі гена, якщо відома первинна структура того білка або поліпептида, який кодується синтезованим геном. Він є важливою альтернативою «вирізанню» генів за допомогою рестриктаз із нативної ДНК. Метод включає хімічний синтез коротких (8–16 нуклеотидних) одноланцюгових фрагментів ДНК за рахунок поетапного утворення ефірних зв'язків між нуклеотидами і зшивання олігонуклеотидів між собою за допомогою ДНК-лігази з утворенням дволанцюгових полінуклеотидів.

Хіміко-ферментативний синтез дає змогу точно відтворити мінімально необхідну послідовність нуклеотидів і уникнути проблем, пов'язаних з елімінуванням зайвих нуклеотидних послідовностей у фрагментах ДНК, в т. ч. інтронів. Метод трудомісткий і дорогий. Методом хіміко-ферментативного синтезу одержані гени соматостатину, А- і В-ланцюгів інсуліну, проінсуліну, lac-оператор E.coli тощо.

Третій метод одержання генів **матричним синтезом** найбільш розповсюджений і є основним джерелом генів, які потім розмножуються у формі рекомбінантних ДНК в одноклітинних організмах, а інколи і в багатоклітинних. Суть методу полягає в одержанні генів шляхом їх ферментативного синтезу і коротко зводиться до наступного. Спочатку із клітин виділяють матричні (інформаційні) РНК (мРНК), серед яких присутня мРНК, що кодується геном, який потрібно виділити. Потім у спеціальних умовах здійснюють РНК-направляючий синтез ДНК (одноланцюгової), який каталізується ферментом зворотною транскриптазою (ревертазою). Після завершення реакції синтезовану одноланцюгову ДНК (яку називають комплементарною ДНК, кДНК) очищують і використовують як матрицю для другої реакції – ДНК залежного синтезу другої нитки ДНК. Це можливо завдяки відкриттю у 1970 році (США) ферменту зворотної транскриптази головною властивістю якої є здатність здійснювати синтез, зворотний тому, який проходить при транскрипції – синтез мРНК на матриці ДНК. Це стало науковою сенсацією і спростувало «центральну догму» молекулярної біології, яка стверджувала, що передача генетичної інформації триває тільки в одному напрямі: ДНК → РНК → білок.

Ступінь копіювання мРНК в ДНК, тобто повнота синтезу однієї з ниток гена, що синтезується, залежить від відсутності у препаратах мРНК і ферменту домішок, які могли б руйнувати мРНК або ДНК – продукт синтезу. Тому успішне проведення реакції синтезу залежить від ідеального очищення усіх компонентів.

Введення гена в бактеріальну клітину. В подальшому клонування генів відбувається за наступною схемою. Кільцеподібну молекулу вектора (частіше плазміду E. coli) розрізають ферментами рестриктазами у специфічній ділянці в обох ланцюгах ДНК, перетворюючи його із кільцевої на лінійну форму. До лінійної ДНК за допомогою ферменту ДНК-лігази (ligation – зшивання) «пришивають» ген (або гени) і потім знову замикають її у кільце за допомогою тієї ж ДНК-лігази. Одержану рекомбінантну ДНК вводять у клітину E. coli, котра розмножуючись, утворює клон, усі клітини якого містять рекомбінантну ДНК (плазміду), а тому і чужорідний ген. Останній, тепер клонований у клітинах кишкової палички, індукує в них біосинтез відповідного білка (продукту).

12.2. ОТРИМАННЯ ІНСУЛІНУ

Інсулін – гормон острівків лангерганса підшлункової залози, який регулює процеси вуглеводного обміну і підтримки нормального рівня цукру в крові. Недостатня кількість цього гормону в організмі зумовлює виникнення одного з найважчих захворювань – цукрового діабету. Згідно зі статистичними даними у 1985 р. у світі понад 80 млн. чоловік страждало на цей недуг, який знаходиться на третьому місці після серцево-судинних та онкологічних захворювань.

Інсулін – це невеликий глобулярний білок, що містить 51 амінокислотний залишок, послідовність яких була встановлена Сенгером у 1955 р. Він складається з двох поліпептидних ланцюгів А і В (відповідно 21 і 30 амінокислот), зв'язаних між собою двома дисульфідними містками. Синтезується інсулін на рибосомах в β-клітинах острівків лангерганса підшлункової залози у вигляді одноланцюгового попередника – ***препроінсуліну***

довжиною в 109 амінокислот. Перші 23 амінокислоти є сигналом для проходження молекули інсуліну крізь мембрану клітини. Вони відщеплюються, в результаті чого утворюється ***проінсулін*** довжиною 86 амінокислотних залишків. Молекула проінсуліну обертається таким чином, що початковий і кінцевий її сегменти зближуються, а центральна частина молекули відділяється під дією ферментів. Роль останньої полягає у правильному взаємному розміщенні двох ланцюгів інсуліну.

12.2.1. Традиційні шляхи отримання інсуліну

Вперше в 1921 р. Бантінг і Бест у Торонто виділили з підшлункової залози собаки гормон, який мав антидіабетичний ефект, а вже в 1922 р. інсулін, виділений з тварин, був введений людині (дев'ятирічному хлопчику, хворому на діабет) і мав надзвичайний ефект. Вже через рік американська компанія «Елі Ліллі» випустила перший препарат тваринного інсуліну.

В 1935 р. датський дослідник Хагедорн досягнув оптимізації дії інсуліну в організмі, розробивши препарат інсуліну пролонгованої дії. Його поглинання було сповільнено додаванням протаміну, а потім і цинку. В 1946 р. датські дослідники одержали нейтральний інсулін (NPH), який почали широко використовувати в інсулінотерапії. Перші кристали інсуліну були одержані в 1952 р., а розвиток методів очищення гормону (імуноелектрофорезу і рідинної хроматографії) від інших гормональних речовин та різних продуктів деградації інсуліну дозволив одержати гомогенний інсулін, який називають однокомпонентним.

Гормон не має чіткої видової специфічності, і тому тваринний інсулін може використовуватися для лікування людей. Сировиною для одержання тваринного інсуліну є підшлункова залоза великої рогатої худоби і свиней, яка не використовується в м'ясній і консервній промисловості і постачається м'ясокомбінатами. Підшлункова залоза корови має масу 200–250 г, а для одержання 100 г кристалічного інсуліну потрібно 800–1000 кг вихідної сировини. Враховуючи те, що кількість інсулінозалежних людей постійно збільшується, інсуліну, одержаного від вищезазначених тварин, буде недостатньо. Крім цього, тваринний інсулін відрізняється від людського на 1–3 амінокислотних за-

лишки і може викликати різні алергічні реакції, а при тривалому використанні викликає порушення роботи нирок і розлади зору. Найбільш прийнятним до людського є інсулін свині. Широкомасштабне терапевтичне використання інсуліну стримувалось його високою вартістю, обмеженістю ресурсів і різноманітними ускладненнями. Тому й виникла необхідність у виробництві бактеріально продукованого людського інсуліну.

12.2.2. Нові технології одержання інсуліну

Невелику молекулу інсуліну можна синтезувати штучно, приєднуючи одну амінокислоту за іншою. Але це дуже дорогий і складний синтез, з майже 170 хімічними реакціями. Він був проведений у 1963 і 1965 роках у США, Китаї і ФРН.

Простіше одержувати інсулін людини шляхом модифікації інсуліну свині, хімічно замінивши в ньому 30-у амінокислоту (ланцюга В) аланін на треонін. Цей метод був розроблено у Данії компанією «Ново індастрі» у 1980 р. В результаті був отриманий однокомпонентний інсулін людини 99 % чистоти. Порівняльне дослідження обох інсулінів (людського і свиного) показали, що вони не відрізнялися між собою за активністю і тривалістю дії. І в 1982 р. цей інсулін промислово виробляли в основному дві компанії: «Елі Ліллі» (збут у США) і «Ново індастрі» (збут у Європі).

Роботи щодо генно-інженерного методу одержання інсуліну розпочалися нещодавно і розвивалися швидкими темпами. В 1978 р. у США з'явилося повідомлення про одержання штама E. coli, який продукує щурячий інсулін. В тому ж таки 1978 р. компанія «Генентек» (США) одержала інсулін людини у спеціально сконструйованому штамі кишкової палички. Виробництво інсуліну в бактеріальних клітинах не залежить від постачання сировини, а одержаний інсулін при тривалому використанні не викликає негативних наслідків (порушення роботи нирок, розладів зору та алергічних реакцій).

Було випробувано декілька методів генетичної інженерії для одержання інсуліну. В деяких країнах (США) пішли шляхом синтезу ДНК (гена) на матриці іРНК інсуліну, тобто одержання копії ДНК (кДНК). В інших (Канада, СРСР) – шляхом

хімічного синтезу двох коротких ДНК (генів), які кодують обидва ланцюги (А і В) готового інсуліну, з подальшим синтезом кишковою паличкою (E. coli) його А- і В-ланцюгів.

У 1980 р. в США з людських тканин була виділена мРНК інсуліну, з якої шляхом зворотної транскрипції була синтезована її ДНК – копія (кДНК) і в клітинах E. coli був клонований ген людського проінсуліну. Поряд з цим у Канаді здійснено повний хіміко-ферментативний синтез гена проінсуліну.

У 1979 р. Креа, Крашевські, Хіроуз і Ітакура з Національного медичного центру «Хоуп» (Каліфорнія) і Геддель зі співробітниками компанії «Генентек» здійснили синтез генів, які кодують А- і В-ланцюги інсуліну. Кожен ген був зібраний відповідно із 18 і 11 олігонуклеотидів. Однак виявилося, що коли короткі ланцюжки чужорідного білка синтезуються в бактерії E. coli, а отже, вони руйнуються її протеолітичними ферментами. Щоб уникнути цього, ДНК (ген), який кодує кожний ланцюг інсуліну, пришивали за допомогою лігази до гена бактеріального ферменту галактозідази, розділивши їх кодоном, який кодує метіонін. В результаті в бактерії синтезувався великий білок, який складався із бактеріального ферменту і гормону. Їх розділяли один від одного хімічно, розрізаючи білок по метіоніну, відщеплювали від ферменту, проводили очищення, а ланцюги з'єднували in vitro для одержання повної молекули інсуліну.

У Радянському Союзі в Інституті біоорганічної хімії ген проінсуліну був одержаний методом тотального хіміко-ферментативного синтезу (рис. 12.1). Цей підхід має певні переваги: ***по-перше***, можна безпосередньо одержати необхідну послідовність ДНК; ***по-друге***, хімічний синтез виключає найважчу частину роботи при одержанні гена із природного джерела – виділення відповідної мРНК або геномної ДНК; ***по-третє***, він спрощує модифікацію гена і одержаного з нього білка. Цей метод одержання гена проінсуліну проходить у два етапи. На першому етапі відбувається хімічний синтез понаде 40 олігонуклеотидів – сегментів, з яких складається весь ген. На другому етапі проходить збір хімічно синтезованих сегментів за допомогою ДНК-лігази. Потім ген вводиться у плазміду кишкової палички, яка продукує проінсулін, що конверсується в активний інсулін.

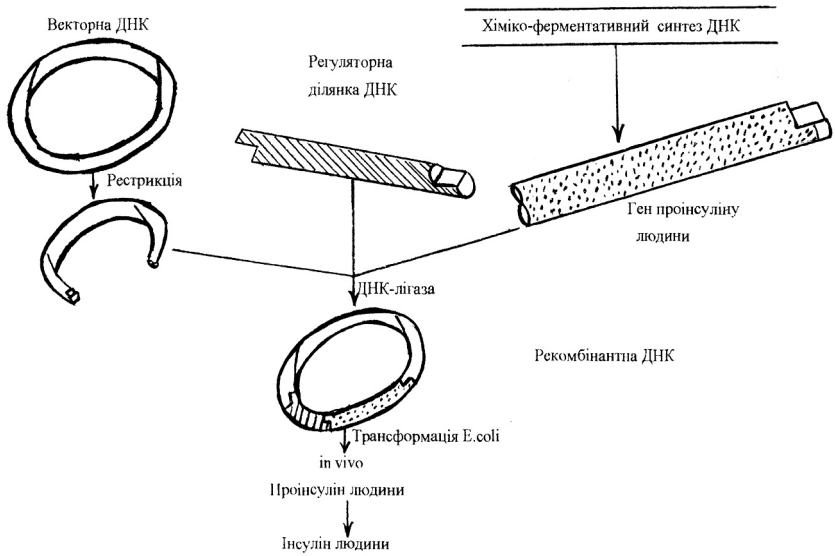


Рис. 12.1. ***Схема отримання інсуліну людини мікробіологічним шляхом***
(за Єфімовим В.А., Чахмачовою О.Г., 1984)

Вихід інсуліну можна збільшити шляхом введення в одну бактеріальну клітину декількох копій рекомбінантної плазміди. В Англії у Центрі прикладної мікробіології був одержаний таким чином високий вихід інсуліну — до 200 г з 1000 л культурального середовища. Ця кількість еквівалентна кількості інсуліну, виділеного приблизно з 1600 кг підшлункової залози свині або корови (Сассон А., 1987).

12.3. ОТРИМАННЯ СОМАТОТРОПІНУ

Соматотропін. Гормон росту людини (ГРЛ) або соматотропін — це поліпептидний гормон, який секретується передньою долею гіпофізу і складається із 191 амінокислотного залишку. Однак синтезується він більшого розміру разом з «сигнальною послідовністю», яка вилучається у процесі секреції гормону із клітини.

Вперше соматотропін був виділений і очищений у 1963 р. з гіпофізу, одержаного із трупного матеріалу. Недостатня кількість цього гормону в організмі людини призводить до гіпофізарної карликовості. Частота цього захворювання становить від 7 до 10 випадків на 1 млн чоловік (серед дітей країн Заходу вона складає 1 випадок на 5000 чоловік). Гормон має видову специфічність, тому для лікування не можуть використовуватись аналоги, одержані від тварин. Для одержання лікувального ефекту введення гормону необхідно продовжувати від 4–5-річного віку дитини і до статевої зрілості і навіть довше. А з одного трупа можна одержати тільки 4–6 мг соматотропіну. Натомість для лікування однієї дитини, яка страждає на гіпофізарну карликовість, необхідно 7 мг соматотропіну на тиждень. Наприклад, у США в 1981 р. з трупів вилучали до 60 тис. гіпофізів на рік і їх вистачало на лікування 1500 дітей — тільки на третину хворих дітей. Дефіцит соматотропіну збільшується, якщо врахувати й інші випадки використання цього гормону — при незаживаючих переломах (удавані суглоби), опіки, язви і порушення гемопоезу, а поряд з кальцитоніном (гормоном щитовидної залози) регулює обмін Ca^+ в кістковій тканині. Отже, доступна кількість соматотропіну, одержаного традиційним шляхом, була обмежена і не задовольняла попит. Хімічний же синтез гормону дуже складний через великий розмір його молекули.

Перспективним є генно-інженерний метод одержання соматотропіну. Вперше біотехнологічний гормон одержали в 1980 р. у лабораторії, а в 1985-му — у промисловому масштабі. В США фірмою «Генентек» був отриманий «квазісинтетичний» ген соматотропіну, побудований з двох частин, синтезованих різними методами. На першому етапі ензиматичним методом синтезували ***фрагмент кДНК*** (комплементарна ДНК — ензиматично синтезована двониткова ДНК – копія інформаційної або матричної РНК). Цей фрагмент гена кодує усю амінокислотну послідовність N-кінцевої частини соматотропіну, за винятком перших 23 амінокислот. Цю частину гена синтезували хімічним шляхом. Потім обидва фрагменти гена зшивали, вмонтували у плазміду E. coli і переносили у клітину бактерії для клонування. Кінцевий вихід соматотропіну становив 2,4 мкг на 1 мл культуральної рідини.

Синтезований у бактеріях гормон має необхідну молекулярну масу і не зв'язаний з будь-яким бактеріальним білком, від якого необхідно було б його відщеплювати. Єдиною структурною відмінністю гормону росту бактеріального походження від аутентичного соматотропіну є наявність залишку метіоніну на N-кінці поліпептидного ланцюга, отриманого в умовах мікробіологічного синтезу. Хоча синтез будь-якого поліпептидного ланцюга і в клітинах бактерій, і в клітинах еукаріот починається з метіоніну (або формілметіоніну), але в результаті процесингу білка є можливість виділити його N-кінцеву частину, що веде до елімінації термінального метіоніну. Це явище проходить при формуванні зрілого соматотропіну шляхом елімінації його сигнальної послідовності в клітинах тварин, тоді як соматотропін бактеріального походження відразу синтезується у формі зрілого білка, де метіонін знаходиться в N-кінцевому положенні. Свого часу висловлювались припущення, що цей зайвий метіонін може впливати на фізіологічну активність препаратів бактеріального походження або підвищувати їх імуногенність. Однак в подальшому було встановлено, що гормональні активності соматотропіну мікробного та природного походження ідентичні. Крім того, в препаратах генно-інженерного соматотропіну міститься менша кількість неактивного димерізованого гормону та продуктів його деградації, що підвищує питому активність препаратуу. Підвищена активність метіонільованого соматотропіну обумовлена не присутністю N-кінцевої метіонінової групи, а невеликими домішками бактеріального білка, який відіграє роль своєрідного ад'юванту та підвищує імуногенність препарату (Ніколайчук В.І., Горбатенко І.В., 1999).

В Інституті молекулярної біології АН СРСР був одержаний ген соматотропіну без «сигнальної послідовності» пептиду прегормону. Таким шляхом одержали з 1 л суспензії рекомбінантних клітин E. coli за 7 год стільки гормону, скільки міститься в 60 гіпофізах людини. Клінічні випробування біотехнологічного соматотропіну на хворих дітях показали збільшення росту дітей на 8–18 см за рік.

Недоліком традиційно отриманого соматотропіну є недостатня його кількість, яка не задовольняє попит. Є й інші проблеми, пов'язані з гетерогенністю гормону, який виділяється з

трупного матеріалу. Це суміш з декількох форм, тому викликає у 30 % пацієнтів алергічні реакції. Існує також небезпека, що гіпофізарний матеріал заражений вірусами, що повільно розвиваються, внаслідок чого діти, які отримували препарат, потребували тривалого медичного спостереження.

Соматотропін, одержаний біотехнологічним методом за допомогою технологій рекомбінантних ДНК, має переваги над традиційно отриманим гормоном: він доступний у великих кількостях; його препарати є біохімічно чистими і вільними від вірусних забруднень. Використання біотехнологічного соматотропіну значно знижує вартість лікування хворих дітей. Згідно з статистичними даними у 1990 р. вартість 1 міжнародної одиниці гормону знизилася від 15 до 5 доларів США.

12.3.1. Використання генно-інженерного соматотропіну у тваринництві

Після виділення гена соматотропіну людини були одержані кДНК-копії цього гена багатьох сільськогосподарських тварин (великої рогатої худоби, овець, свиней, курей) та здійснено їх клонування й експресія в клітинах E.coli та інших мікроорганізмів. Для деяких соматотропних гормонів сконструйовані штами-суперпродуценти (*Ніколайчук В.І., Горбатенко І.В.,* 1999).

Сьогодні соматотропін використовується у тваринництві для підвищення ефективності молочної і м'ясної продуктивності сільськогосподарських тварин. Як показали дослідження, соматотропін великої рогатої худоби бактеріального походження стимулює лактацію у молочних корів так само, як і природний гормон, виділений з гіпофізу. За даними різних авторів як короткострокова ін'єкція соматотропіну (протягом 14 діб), так і його довгострокове введення тваринам (188 діб) викликали стійке збільшення молочної продуктивності (за умови щоденних ін'єкцій). При добових дозах соматотропіну від 13,5 до 40,5 мг на тварину вихід молока збільшувався від 10 до 50 % залежно від дози препарату та умов утримання. На думку експертів, при масштабному впровадженні цієї біотехнології в молочному тваринництві можливо розраховувати на збільшення надоїв в середньому від 23 до 31 %.

Дослідження показали, що якість молока у корів, які тривалий час отримували соматотропін, практично не відрізняється від контрольних зразків і не містить помітної кількості введеного гормону росту. Введення соматотропіну протягом півроку негативно не впливає на інші фізіологічні, соматичні та етологічні характеристики піддослідних тварин.

Позитивні результати одержані також при використанні препаратів соматотропіну бактеріального походження в м'ясному тваринництві. Щоденні ін'єкції гормональних препаратів молодняку великої рогатої худоби помітно стимулювали ріст та формування м'язових тканин. Добові прирости живої маси залежно від виду тварин, умов утримання та дози гормону змінювалися в межах 20–30 %, що сприяло скороченню часу нагулу молодняка. Крім того, виявлено певне скорочення витрат кормів на одиницю приросту. У молодняка свиней та жуйних прискорення росту та розвитку під впливом генно-інженерного соматотропіну супроводжувалося також збільшенням вмісту білка і зменшенням вмісту жиру в тканинах, що помітно підвищувало якість та товарну цінність м'ясопродуктів. Однак зміни в метаболізмі, які відбуваються під дією екзогенного соматотропіну, у різних видів тварин неоднакові. Так, деякі автори зазначають позитивний ефект ін'єкцій соматотропіну на динаміку приростів у м'ясних овець, але при цьому жирові відкладення не зменшуються. Інтенсивне введення соматотропіну тваринам не супроводжується акумуляцією препарату в продуктах харчування, що вигідно відрізняє соматотропін від стероїдних гормонів та антибіотиків, які використовувалися з аналогічною метою.

Необхідність щоденних ін'єкцій перешкоджає широкому застосуванню соматотропіну в тваринництві, оскільки це призводить до ускладнення та подорожчання виробництва. Але останнім часом успішно проводяться дослідження з розробки і одержання таких форм гормональних препаратів, які в організмі утворюють депо тривалої дії, що дозволяє уникнути щоденних ін'єкцій.

Контрольні питання

1. Якими шляхами отримують гормони?
2. На чому базуються нові технології виробництва гормонів і їх переваги над традиційними технологіями?
3. Які етапи включає технологія одержання гормонів за допомогою рекомбінантних ДНК?
4. Яким шляхом отримуються гени гормонів?
5. Як відбувається клонування генів?
6. Біосинтез інсуліну, його будова і біологічна роль.
7. Отримання інсуліну традиційним методом, його недоліки.
8. Які існують нові технології одержання інсуліну?
9. Якими методами одержуть ген інсуліну?
10. Отримання рекомбінантного соматотропіну і його біологічна роль.
11. Які є методи отримання соматотропіну?
12. Які переваги генно-інженерного методу отримання соматотропіну?
13. Сфери застосування соматотропну.

Розділ 13.

БІОТЕХНОЛОГІЯ ВИРОБНИЦТВА ІНТЕРФЕРОНІВ

Вперше інтерферон був отриманий у 1957 р. Айзексом і Лінденманном у Національному інституті медичних досліджень в Англії. Дослідники виявили, що клітини тварин, які піддалися впливу вірусу, виділяють у середовище фактор, який здатний надавати свіжим, необробленим вірусом клітинам стійкість до вірусної інфекції. Фактор перешкоджав (інтерферував) розмноженню вірусів у клітині і отримав назву інтерферон. Це відкриття сприяло успішній боротьбі з вірусними інфекціями.

Інтерферони — це білки, до складу поліпептидного ланцюга яких входить 146–166 амінокислотних залишків. Вони синтезуються клітинами хребетних у відповідь на вірусну інфекцію і забезпечують неспецифічний противірусний імунітет. Біосинтез інтерферону як відповідь на проникнення вірусної інфекції є однією з реакцій організму, яка найшвидше реалізується і значно випереджає реакції імунної відповіді. Фактично інтерферони є першою лінією оборони проти вірусної атаки. За даними медичної статистики, серед інфекційних захворювань майже 95 % становить вірусна патологія. Ветеринарна практика підтверджує цю закономірність. Значний інтерес до препаратів інтерферонів викликаний тим, що практичні медицина і ветеринарія не мають достатньої кількості ефективних етіотропних засобів профілактики і лікування вірусних інфекцій. Крім антивірусної дії і посилюючого впливу на імунітет, інтерферони гальмують розмноження аномальних клітин, і тому використовуються як протипухлинний засіб для лікування ракових хвороб. Вони є імуномодуляторами і, виступаючи при цьому регуляторами імунологічних реакцій, проявляють антимікробну властивість і радіозахисну дію. Визначено стимулюючий вплив інтерферону на фагоцитоз і неспецифічну резистентність клітин. Загальна імунологічна реактивність організму, як правило, відповідає рівню утворення інтерферонів. Під впливом інтерфе-

ронів підвищується цитотоксичність кілерних клітин і збільшується їх кількість.

Інтерферони є відносно нешкідливими для організму в концентраціях, які забезпечують лікувальний ефект, хоча механізм дії інтерферонів і їхня біологічна роль ще недостатньо з'ясовані.

Інтерферон утворюється не тільки в організмі людини, але й в багатьох інших хребетних. Але він має видову специфічність і тому інтерферони тварин не вдається використовувати для лікування людини.

13.1. КЛАСИ І ТИПИ ІНТЕРФЕРОНІВ

Розрізняють три класи інтерферонів: лейкоцитарний (α-інтерферон), фібробластний (β-інтерферон) та імунний (γ-інтерферон).

1) ***α-інтерферон*** синтезується лейкоцитами під час дії на них вірусу. Він має майже 20 рекомбінантних варіантів (A, B, C, D, E, F... тощо), які відрізняються набором і послідовністю амінокислот у поліпептидному ланцюгу, а також біологічною активністю.

2) ***β-інтерферон*** утворюється фібробластами сполучної тканини під впливом вірусу.

3) ***γ-інтерферон*** – його біосинтез відбувається у сенсибілізованих Т-лімфоцитах у відповідь на вплив мітогенів, бактеріальних і вірусних антигенів, антисироваток проти поверхневих детермінант лімфоцитів. У β- і γ-інтерферонів рекомбінантних варіантів не виявлено.

Класи інтерферонів відрізняються структурою молекул, деякими біологічними властивостями і типом клітин, які їх продукують в організмі. Так, клас β-інтерферонів складається з декількох білків і число генів, які кодують ці білки, наближається до 20; γ-інтерферон представлений індивідуальним білком, якому відповідає один ген. Поки що виділений один ген, який відповідає β-інтерферону людин, – це інтерферон β_1. Цьому білку відповідає практично вся противірусна активність, яка виявляється після індукції фібробластів. β- і γ-інтерферони зв'язані з залишками глюкози (гліколізовані), тоді як у α-інтерферону не вияв-лено моноцукристих залишків.

Крім трьох класів, розрізняють два типи інтерферонів. α- і β-інтерферони належать до першого типу і є так званими вірусіндукованими. Імунний, або γ-інтерферон, належить до другого типу, індукція біосинтезу якого забезпечується іншими речовинами (білок А-ентеротоксин стафілококів, антигени тощо).

13.2. ТРАДИЦІЙНІ ШЛЯХИ ОТРИМАННЯ ІНТЕРФЕРОНІВ

Процес отримання інтерферону в основному однаковий для всіх типів клітин, які вирощуються в культурі й утворюють інтерферон. Клітини найчастіше заражають вірусом Сендай або хвороби Ньюкасла і через 24 години центрифугують. Із надосадової рідини одержують грубий препарат інтерферону, який піддають очищенню.

Отримання α-інтерферону. За сприяння організації Міжнародного Червоного Хреста у Фінляндії було налагоджено виробництво і випробування препаратів α-інтерферону, який отримували із лейкоцитів донорської крові. Як індуктор використовували вірус Сендай або вірус хвороби Ньюкасла. Але ефективність виробництва інтерферону шляхом простого виділення дуже низька. Із 250 л крові (її можна отримати від 500–1000 донорів) одержують 0,25–0,5 мг чистого α-інтерферону, якого достатньо для лікування 50 чоловік при легкій формі захворювання і лише однієї людини при важкій формі.

Технологія виробництва інтерферонів з лейкоцитів крові набула розповсюдження, але вона не могла повністю задовольнити потребу в цьому препараті через недоліки: по-перше, це обмеженість сировинних ресурсів (донорської крові); по-друге, нормальні, тобто неракові лейкоцити не вдається культивувати, внаслідок чого масове виробництво інтерферонів заскладне; потретє, чистота кінцевого продукту незадовільна, тому що отримується суміш α-інтерферонів; по-четверте, висока собівартість виробленого продукту.

Вченими Франції й Ізраїлю розроблена установка для виділення інтерферону з лейкоцитів людей, хворих на хронічний мієлоїдний лейкоз і оброблених вірусом Сендай. В результаті

вихід інтерферону був значно вищий, ніж при використанні нормальних лейкоцитів. Однак через те, що метод грунтується на культивуванні ракових клітин, сфера використання одержаного інтерферону обмежена.

Фібробластний інтерферон (β-інтерферон) синтезується фібробластами (клітинами сполучної тканини), які одержують із тканин плода або з матеріалу передньої плоті при обрізанні немовлят, після обробки їх вірусом Сендай.

Фібробласти можна культивувати, тому вони придатні для масового виробництва інтерферону. Це простіше, ніж отримувати його з лейкоцитів. Але метод має недоліки: у ємностях з культурою фібробласти утворюють плівку товщиною в одну клітину, що обмежує вихід інтерферону. Його вдається підвищити введенням в культуральне середовище мікроскопічних гранул, до яких приєднуються клітини.

Із культури фібробластів вихід β-інтерферону вищий, але теж дорогий. У зв'язку з тим, що при ракових захворюваннях ефективні тільки підвищені дози інтерферону, за даними американських дослідників, лікування одного ракового хворого інтерфероном коштує 20–40 тис. доларів.

Імунний, або γ-інтерферон синтезується Т-лімфоцитами. Його утворення індукується багатьма речовинами. В Техаському університеті шляхом стимуляції лімфоцитів білком А (ентеротоксином) стафілококів одержали вихід в 1000 одиниць γ-інтерферону на 1 млн клітин. Англійська фірма «Велкам» одержувала інтерферон із лімфобластоїдних клітин, взятих у новонароджених хом'ячків. В США одержували інтерферон з культури лімфоцитів донорської крові, стимульованих мітотичним агентом.

В цілому жоден метод одержання інтерферонів усіх трьох класів не міг задовольнити попиту через низький вихід продуктів; їх високу вартість (вартість промислового одержання сягає 40–50 дол. за 1 млн одиниць), а чистота препаратів недостатня.

Тому в усіх країнах розпочалися роботи, спрямовані на застосування методів генетичної інженерії для виробництва відносно дешевого інтерферону в кількостях, які давали б змогу задовольнити попит на нього з боку органів охорони здоров'я, ветеринарної медицини і тваринництва.

13.3. ГЕННО-ІНЖЕНЕРНИИ МЕТОД ОТРИМАННЯ ІНТЕРФЕРОНІВ

Розробка біотехнології виробництва інтерферону складний і багатоетапний процес. Досліди з перенесення генів інтерферонів людини в бактеріальні клітини були розпочаті наприкінці 1977 — на початку 1978 рр. майже одночасно групами дослідників у Швейцарії, Японії, США, а також у Радянському Союзі. Але на початок досліджень не було відомостей про структуру білка (інтерферону), що не давало змоги отримати ген шляхом хімічного синтезу. Крім цього, в суміші іРНК (мРНК), які кодують різні білки, частка інтерферонової мРНК невелика — приблизно 0,1 %, що ускладнювало роботу з її виділенняя. Для клонування гена інтерферону усі дослідники користувалися методом зворотної транскрипції мРНК інтерферону. За короткий проміжок часу (1979–1982 рр.) гени лейкоцитарних, фібробластного й імунного інтерферонів були клоновані в E. coli. Була отримана достатня інформація про структуру інтерферонів та їх генів. Встановлено, що інтерферони синтезуються на першій стадії у вигляді попередників, що містять на N–кінці поліпептидного ланцюга сигнальний пептид, який потім відщеплюється і в результаті утворюється зрілий інтерферон, котрий наділений повною біологічною активністю.

Першим був клонований ген фібробластного інтерферону у складі гібридної плазміди в клітинах E. coli (Японія) у 1979 р. Визначення нуклеотидної послідовності показало, що β-інтерферон синтезується в клітині у вигляді поліпептиду розміром у 187 амінокислот – преінтерферону. У процесі секреції преінтерферону з клітини від нього відщеплюється сигнальний пептид, який складається з 21 амінокислоти. Зрілий β-інтерферон містить 166 амінокислот.

У 1980 і 1982 рр. були клоновані гени α- і γ-інтерферонів. Довжина поліпептидного ланцюга проінтерферонів складає відповідно 189 і 166 амінокислотних залишків, а зрілі інтерферони – 166 і 146 амінокислот. Сигнальний пептид містить відповідно 23 і 20 амінокислот.

У колишньому Радянському Союзі перше успішне клонування гена лейкоцитарного інтерферону було здійснено у 1982 р.

(Овчінніков Ю.А. і ін.), фібробластного – у 1983 р. *(Козлов Ю.І. та ін.)* та імунного – у 1985 р. *(Свердлов Є.Д. і ін.)*.

Конструювання штамів-продуцентів інтерферонів. Технологія одержання генів. Це дуже складний і багатоетапний процес. Найчастіше ген інтерферонів отримують шляхом зворотної транскрипції – передачі інформації від структури мРНК до структури ДНК (рис. 13.1). Виділену із донорської крові суспензію лейкоцитів обробляють вірусом Сендай, який індукує біосинтез інтерферонів. В них видаляють іРНК, яка несе інформацію (кодує) про синтез інтерферонів. За допомогою ферментів зворотної транскрипції – ревертази або зворотної транскриптази на основі матриці іРНК синтезується комплементарна щодо неї копія ДНК (кДНК) одноланцюгова. Утворюється комплекс ДНК–РНК. На наступному етапі одноланцюгову кДНК відділяють від структури ДНК–РНК і на ній здійснюють синтез другої комплементарної нитки ДНК. Одержують дволанцюгову ДНК (ген). Щоб забезпечити у синтезованій кДНК комплементарність липких кінців, до них приєднують лінкери (перехідники), які є синтезованими хімічним шляхом ділянками ДНК, що мають липкі кінці.

Ген виділеного інтерферону, крім структурного гена, включає промоторну ділянку, оператор і ділянку зв'язування рибосоми (ініціації синтезу білка) і складається майже з 1,2 тис. нуклеотидів.

У колишньому Радянському Союзі і в Англії труднощі виділення гена інтерферону були подолані іншим шляхом. Ген інтерферону синтезували хімічним шляхом, приєднуючи один нуклеотид за іншим. Велику молекулу такого штучного гена, який складається з 514 нуклеотидів, збирали з 8 окремо синтезованих фрагментів. Ця робота зайняла стільки ж часу, скільки виділення гена інтерферону.

Гени α-інтерферонів можуть бути безпосередньо вилучені із геному людини, тому що вони не містять інтронів.

Експресія генів інтерферонів у клітинах. Для одержання значних кількостей гомогенних препаратів інтерферону, необхідних для широкого клінічного застосування та наукових досліджень, було здійснено численні і успішні спроби створення штамів-продуцентів на базі різних мікроорганізмів.

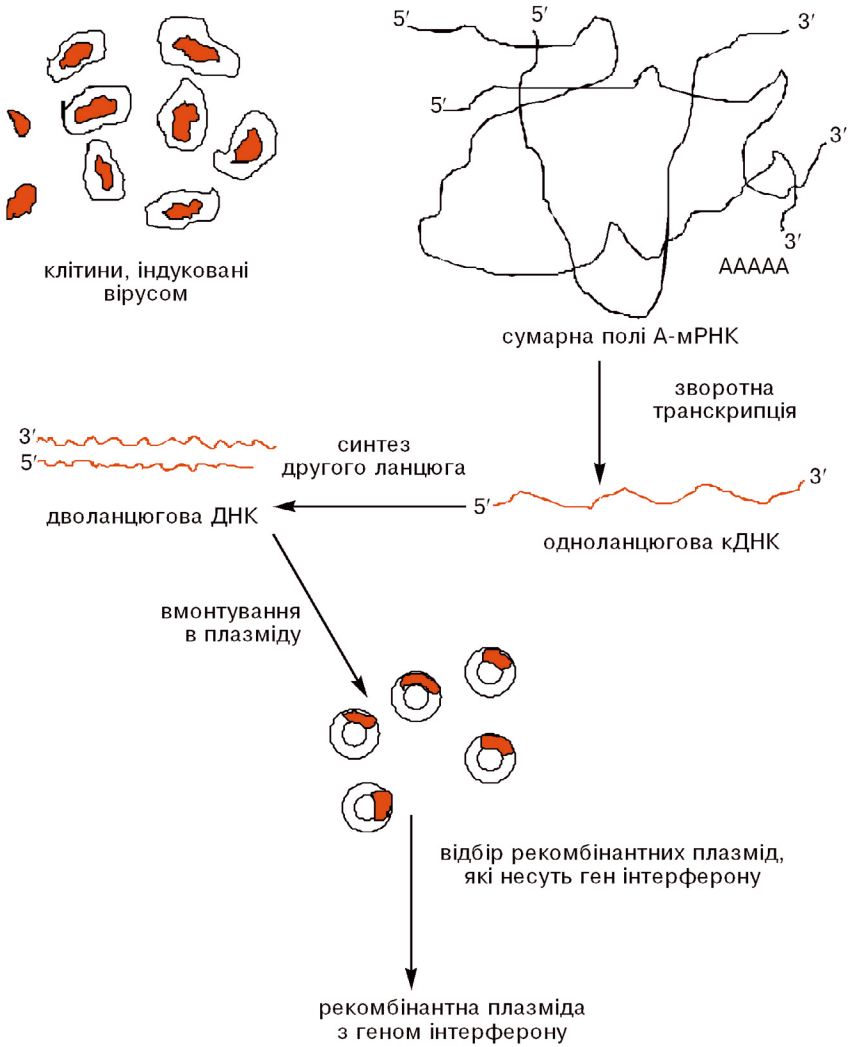


Рис. 13.1. ***Схема клонування генів інтерферону людини*** *(за Дебабовим В.Г. і Лівшіцом В.А., 1988)*

Найбільший обсяг робіт було здійснено на бактерії E. coli.

Для того щоб забезпечити синтез чужорідного білка (у конкретному випадку інтерферону) в бактерії, необхідно: 1) ввести ген цього білка у векторну бактеріальну ДНК, наприклад, плазміду; 2) приєднати до цього гена бактеріальні регуляторні елементи, які програмують його транскрипцію і трансляцію у бактерії.

Введення гена інтерферону в плазміду, вилучену з E. coli, відбувається аналогічно до гена інсуліну, соматотропіну тощо. Проводиться обробка рестрикційною ендонуклеазою (рестриктазою) кінців кДНК, а також плазміди, яка в результаті набуває лінійної форми з липкими кінцями. Це дозволяє приєднати кДНК до плазміди і за допомогою ДНК-лігази утворити кільцевидну рекомбінантну плазміду з синтезованою кДНК, в якій є ген, що кодує біосинтез інтерферону. Потім рекомбінантну плазміду вводять у бактеріальну клітину.

Експресія будь-якого еукаріотичного гена з метою одержання білка вимагає використання структурної частини гена в поєднанні з відповідними нуклеотидними послідовностями, які розпізнаються ферментами клітини-господаря як ефективні сигнали ініціації транскрипції і трансляції (рис. 13.2). Для експресії генів інтерферонів у клітинах E. coli широко застосовують регуляторні елементи триптофанового (trp) і лактозного (lac) оперонів.

Складним є також процес виділення інтерферону, який накопичується у бактеріальній клітині. Кишкова паличка «не вміє» секретувати білки, і необхідний білок потрібно виділяти та очищати від усієї маси білка бактерії. Для цього використовуються моноклональні антитіла до інтерферону, тобто імуноглобулін, який зв'язувався тільки з α-інтерфероном. Ці антитіла пришивали до поліцукристих кульок, через які пропускали суміш білків. У результаті інтерферон захоплювався антитілами і утримувався на кульках. Потім його змивали і отримували готовий препарат, який у 5000 разів краще очищений, ніж вихідний. Таким складним і багатоетапним шляхом у колишньому Радянському Союзі був одержаний продуктивний штам – продуцент E. coli: 1 л суспензії цих бактерій давав понад 10 мг α-інтерферону, тобто в 5000 разів більше, ніж одержували з 1 л крові донорів.

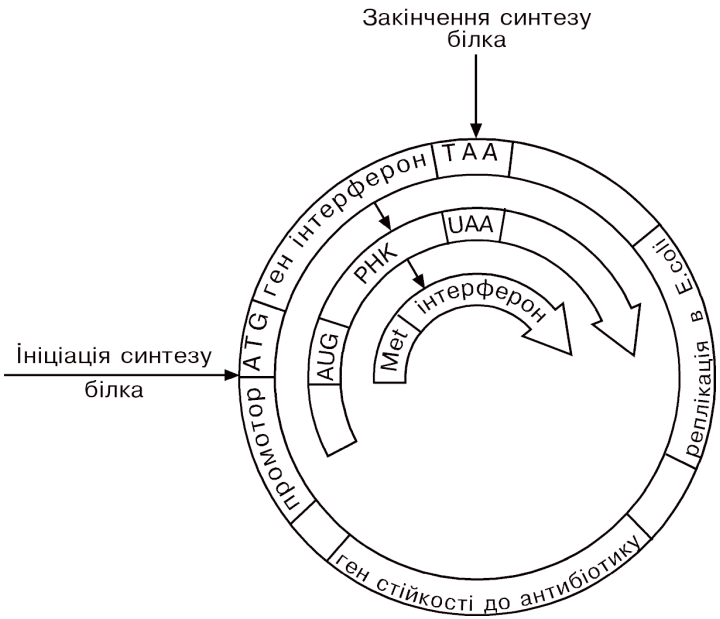


Рис. 13.2. ***Схема рекомбінантної плазміди, яка обумовлює синтез інтерферону людини в E. coli***
(за Дебабовим В.Г., Лівщіцом В.А., 1988)

Бактерії, які містять таку плазміду, синтезують інтерферон і стійкі до дії антибіотиків

Аналогічним шляхом нині продукуються й інші класи інтерферонів – β і γ, а також гібридний інтерферон, який складений з половинок молекул різних інтерферонів.

Однак інтерферон, синтезований у бактеріях, не містить необхідних за нормою вуглеводних груп, приєднаних до білка, тобто неглікозільований. Це наслідок того, що в клітинах прокаріот немає відповідних ферментів глікозілювання.

У 1981 р. у США був синтезований лейкоцитарний інтерферон з використанням генетично сконструйованої клітини дріжджів. Згодом таким методом були одержані β- і γ-інтерферони. Гени цих інтерферонів у складі рекомбінантної ДНК, введені в дріжджову клітину (найчастіше Sacharomyces cerevisiae), дають змогу у 10 разів інтенсифікувати біосинтез інтерферону порівняно з бактерією. До того ж інтерферон у дріжджовій

клітині зазнає глікозілювання. Крім дріжджових клітин, для отримання глікозільованих інтерферонів використовуються клітини вищих еукаріот.

Сьогодні α, β і γ-інтерферони з успіхом отримують шляхом використання генно-інженерних штамів E.coli, дріжджів, культивованих клітин комах (Drosophila) і ссавців. Щодо отримання γ і β-інтерферонів, то краще використовувати еукаріотичні продуценти, тому що прокаріоти не глікозілюють білки. Деякі фірми, наприклад Bioferon, використовують не генно-інженерні мутанти, а культивовані in vitro фібропласти людини.

13.4. ОДЕРЖАННЯ ВДОСКОНАЛЕНИХ ІНТЕРФЕРОНІВ

Незважаючи на спільні ознаки, кожен інтерферон має свої особливості. Наприклад, інтерферони α-типу певною мірою відрізняються за дією на клітини різного походження.

Досягнення у сфері технологій рекомбінантних ДНК і молекулярної біології відкривають можливості до покращення терапевтичних властивостей інтерферонів шляхом направлених змін їх генів. Якщо кожен з відповідних генів розрізати в певній ділянці однією і тією самою рестрикційною ендонуклеазою, виділити N- і C-кінцеві фрагменти генів, а потім до N-кінцевого фрагмента одного гена приєднати C-кінцевий фрагмент іншого і навпаки, то одержимо гібридні гени. Після їх введення в бактерії, дріжджі або іншу клітину-господар, вони програмуватимуть синтез гібридних інтерферонів.

Такі гібридні інтерферони були отримані для інтерферонів α-A і α-D швейцарськими і американськими дослідниками, а в колишньому Радянському Союзі *(Свердлов Е.Д., 1984)* – інтерферони α-A, α-D і α-F. З'ясувалося, що властивості гібридів і вихідних індивідуальних інтерферонів дуже відрізняються.

Отже, з'являється нагода створення абсолютно нових медичних препаратів. Крім одержання гібридних генів інтерферонів, методами генетичної інженерії можна змінювати будь-яку ділянку гена так, як це необхідно. Крім того, методами хімікоферментативного синтезу можна здійснити синтез повністю нових генів інтерферонів.

13.5. ВИКОРИСТАННЯ ЕКЗОГЕННОГО ІНТЕРФЕРОНУ У ВЕТЕРИНАРНІЙ МЕДИЦИНІ І ТВАРИННИЦТВІ

У США в 1982 р. запатентовано спосіб регулювання апетиту і споживання кормів тваринами за допомогою інтерферону. З цією метою використовували інтерферон, добутий з крові або носового секрету великої рогатої худоби. Для стимулювання процесу утворення інтерферонів корів вакцинували вірусом ринотрахеїту. Інтерферон крові великої рогатої худоби при введенні в організм свиней також позитивно впливає на апетит.

Велике практичне значення має встановлений у 1982 р. Н.К. Гумеровим, Н.Я. Зуєвою і Г.Г. Нурієвим факт передачі інтерферону від порісних свиноматок плоду через плаценту і позитивний вплив на стан неспецифічної резистентності новонароджених. Причому антитіла таким шляхом в організм плода не можуть надходити. Вони вводяться в організм новонародженого тільки з молозивом.

Виявлено можливість захисту інтерфероном телят від аденовірусної і риновірусної інфекцій. Є дані про те, що інтерферон, синтез якого індукований вірусом інфекційного ринотрахеїту, певний час захищає телят від аерогенного зараження аденовірусною інфекцією. Стійкість проти зараження риновірусом виробилась у телят, в носовому секреті яких містилися антитіла й інтерферон, що нейтралізують вірус. Встановлено гальмуючий вплив інтерферону на реплікацію вірусу. Незважаючи на видоспецифічність інтерферону, є приклади запобігання інфекційному ринотрахеїту при щоденному інтраназальному чи внутрішньом'язовому введенні 2–3-місячним телятам протягом 7 днів α-інтерферону людини у дозі $5 \cdot 10^7$ Од. В інтерферонізованих телят підвищення титру антитіл до вірусу інфекційного ринотрахеїту і початок виділення вірусу відбуваються в більш віддалені від початку зараження строки порівняно з тваринами контрольної групи. Встановлено можливість утворення інтерферону в клітинній культурі і в організмі лабораторних і сільськогосподарських тварин під впливом різних індукторів.

Доведено можливість застосування інтерферону людини, продукованого за допомогою технології рекомбінантної ДНК, проти рота- і коронавірусів великої рогатої худоби. Тваринам при виявленні перших ознак захворювання щоденно під час напування протягом 3–4 днів давали по одній желатиновій капсулі, що містить 10^7–2 • 10^7 Од. рекомбінантного інтерферону. При ротавірусній інфекції 88,9 % хворих телят одужували. У решти телят (11,1 %) стан здоров'я поліпшувався. Випадків загибелі молодняка не встановлено.

Ефективними індукторами у телят є комплекси полічетвертинного амонію з природною двонитковою РНК. Доцільність активної інтерферонізації тварин для стимулювання захисних сил організму є прийнятним ветеринарним заходом, широке виробниче застосування якого гальмується нестачею інтерферонів і задовільних модуляторів.

Про ефективну лікувальну дію людського рекомбінантного α-інтерферону свідчать також результати дослідів у культурі клітин, попередньо заражених рота- і коронавірусною інфекцією. Доведено, що добутий біотехнологічним шляхом інтерферон у культурі клітин свиней інгібує реплікацію вірусу трансмісивного гастроентериту свиней і вірусу везикулярного стоматиту. Факт високої антивірусної активності рекомбінантного інтерферону в культурі клітин можна вважати доведеним. Для прояву високої антивірусної активності у тонкому відділі кишечника інтерферон, мабуть, потребує захисту від деградуючого впливу травних ферментів.

В Україні на Ладижинському державному підприємстві «Ензим» були освоєні технології виробництва і налагоджений промисловий випуск генно-інженерних інтерферонів для людей і тварин. **Біаферон** має антивірусні, антипроліферативні та імуномодулюючі властивості й використовується для лікування людей. **Ринал** – для лікування і профілактики вірусних і вірусно-бактеріальних інфекцій великої рогатої худоби (парагрип, паратиф, кишкові інфекції, в основі яких лежать вірусні антигени), пушних звірів (Алеутська хвороба), птиці (хвороба Ньюкасла, Гамборо).

Контрольні питання

1. Що таке інтерферони?
2. Де застосовуються інтерферони?
3. Які є класи і типи інтерферонів?
4. Які традиційні шляхи отримання інтерферонів: лейкоцитарного, фібробластного та імунного? Недолік цих методів.
5. У чому суть генно-інженерного методу одержання інтерферонів?
6. Які переваги генно-інженерного методу одержання інтерферонів над традиційними?
7. Які шляхи одержання генів інтерферонів?
8. Як проводиться експресія генів інтерферонів у клітинах?
9. З якою метою використовується екзогенний інтерферон у ветеринарній медицині і тваринництві?

Розділ 14.

БІОТЕХНОЛОГІЯ ОДЕРЖАННЯ МОНОКЛОНАЛЬНИХ АНТИТІЛ (АНТИТІЛ ОДНОГО ЕПІТОПУ)

14.1. ТРАДИЦІЙНИЙ СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ АНТИТІЛ

Традиційно для одержання антитіл використовуються тварини (кролики, кози, барани), яким вводиться антиген. На появу в крові чужорідного антигену імунна система тварин реагує активацією розмноження В-лімфоцитів, в яких розпочинається біосинтез антитіл.

Але антиген — це не вся молекула біополімера, а антигенними є лише його окремі «активні» ділянки, так звані антигенні детермінанти або епітопи, яких на поверхні антигену може бути дуже багато. Кожен із епітопів у складі молекули того чи іншого антигену індукує синтез В-клітинами імунної системи специфічних антитіл проти себе, тобто при імунізації тварини виробляються різні за специфічністю антитіла. За сучасними даними різноманітність антитіл сягає 10^7. Це означає, що організм тварини здатний синтезувати і секретувати у кровоток не менше 10 млн молекул антитіл, які специфічно взаємодіють з різними антигенними детермінантами.

Синтезовані антитіла за допомогою своїх функціонально активних груп (рецепторів) розпізнають розміщені на поверхні молекули антигену епітопні ділянки і взаємодіють з ними. Процес взаємодії приводить до прикріплення антитіла до відповідного епітопу антигену за допомогою рецепторів і утворення нейтралізуючого біологічну активність чужорідної речовини комплексу ***антиген-антитіло***.

Синтез і секреція антитіл здійснюється спеціалізованим типом лімфоїдних клітин – В-лімфоцитами. У кожному В-лімфоциті синтезуються антитіла тільки одного типу, які здатні взаємодіяти лише з одним епітопом. У результаті утворюється

стільки різних видів антитілоутворюючих В-клітин, скільки в антигена детермінант.

В організмі вищих хребетних міститься майже 10 млн різних ліній В-лімфоцитів, які сприймають сигнали від епітопів антигену і тільки з одного В-лімфоцита-попередника утворюється клон плазматичних клітин, які виробляють моноклональні антитіла. Але при утворенні антитіл навіть на один епітоп виникає стимуляція і розмноження різних клонів В-лімфоцитів, які синтезують різні антитіла. Таким чином, одержують гетерогенні антитіла в імунній сироватці (антисироватці), тобто суміш антитіл до різних епітопів. Такі антитіла називають поліспецифічними, а частіше – поліклональними.

14.2. МОНОКЛОНАЛЬНІ АНТИТІЛА І ГІБРИДОМНА ТЕХНОЛОГІЯ

Традиційним способом практично неможливо одержати моноспецифічні або моноклональні антитіла. Для цього необхідно розділити суміш антитіл або В-лімфоцити на окремі види.

Для одержання моноклональних антитіл проти певного епітопу антигену після імунізації тварини необхідно відповідну антитілоутворюючу плазматичну клітину ізолювати, а потім розмножити її за межами організму в клітинній культурі. Але перешкодою є нездатність плазматичних клітин, які виробляють антитіла, до розмноження і тривалого життя поза організмом, в умовах клітинної культури через генетично обумовлену обмеженість кількості поділів (50–100 поділів і клітина гине). Подолати цю перешкоду вдалося шляхом створення гібридної клітини (гібридоми), яка утворює певні антитіла.

Вчені звернули увагу на те, що клітини злоякісних пухлин кісткового мозку (мієлом) продукують величезну кількість аномальних імуноглобулінів (антитіл). Ці клітини мають здатність до необмеженого росту (тобто утворюють клони) і продуковані ними імуноглобуліни ідентичні за структурою. По суті це моноклональні антитіла, однак антиген, проти якого вони виробляються, невідомий.

Одержання гібридом. Спосіб одержання гібридом розроблено вченими Г. Келером і Ц. Мільстейном у Великій Британії в 1975 р. Перш ніж опублікувати результати досліджень, вони звернулися до британського уряду з пропозицією запатентувати гібридомні технології, але отримали відмову. Після цього результати були опубліковані у журналі Nature, а Велика Британія втратила право на відкриття, яке було визнане одним із найважливіших у період з 1970 по 1980 роки.

Вченим удалося одержати в умовах пробірки ***гібридому*** шляхом злиття клітин мієломи і антитілоутворюючих клітин (лімфоцитів) селезінки миші, імунізованої еритроцитами барана. Точність щодо кількості клітин мієломи не дуже важлива і їх співвідношення з клітинами селезінки може коливатися від 1:10 до 1:1. Гібридизація клітин здійснюється за допомогою поліетиленгліколю, який розчиняє оболонки клітин. Утворена гібридна клітина успадкувала від батьківських клітин їх корисні властивості. Як і вихідні лімфоцити, вона синтезує антитіла, а подібно до пухлинних клітин має здатність до практично нескінченного розмноження у клітинній культурі.

Заслуга Келера і Мільстейна полягає в тому, що вони примусили індивідуальну В-клітину (В-лімфоцит) виробляти антитіла поза організмом, в умовах культури клітин. Такі антитіла одержали назву ***моноклональних*** через те, що вони синтезуються нащадками однієї В-клітини, яка стала «безсмертною» завдяки гібридизації з пухлинною мієломною клітиною.

Донедавна для гібридизації використовували мієломні клітини і В-лімфоцити мишей і щурів. Продуковані ними моноклональні антитіла мають обмежене терапевтичне застосування, тому що вони є чужорідним білком для людського організму. На сьогодні одержані гібридоми на основі імунних клітин людини і відповідні моноклональні антитіла. Але гібридоми людини ростуть повільно, досить нестабільні і в деяких випадках теж викликають імунні реакції. Проте людські моноклональні антитіла мають здатність розпізнавати тонкі відмінності в структурі антигену, які не розпізнаються моноклональними антитілами миші або щура.

Для збереження одержаних гібридних клітин широко застосовується метод глибинного заморожування, завдяки чому став

можливий обмін гібридомами, отриманих у різних лабораторіях світу, а також створення банків гібридом для наукової мети.

Гібридомна технологія відкрила нову еру в імунології, а робота Келера і Мільстейна була удостоєна Нобелівської премії. Нині на будь-який агент можна одержати гібридоми у необхідній кількості. Гібридомна технологія перетворилася в одну із найбільш розвинениххх галузей біотехнології.

Одержання моноклональних антитіл. Моноклональні антитіла – це однорідні за хімічним складом, структурою і специфічністю ***антитіла***, синтез яких здійснюється в клонованих гібридних клітинах (гібридомах).

Технологія одержання моноклональних антитіл включає такі етапи: I – імунізація тварин; II – гібридизація, підготовка клітин до злиття (фузії) та злиття; III – селекція – відбір гібридом, які утворюють антитіла потрібної специфічності; IV – клонування гібридомних клітин; V – культивування – одержання культуральної рідини або асциту, які містять антитіла, і виділення антитіл (рис. 14.1). Вся процедура від початку імунізації тварин до виділення антитіл триває в середньому 3–4 місяці.

Біотехнологія виробництва моноклональних антитіл гарантує елімінацію пухлинних клітин, що не злилися, а також гібридів, утворених злиттям мієломних клітин і В-лімфоцитів.

На першому етапі здійснюється ***імунізація*** тварин антигеном певного епітопу. Потім із суспензії клітин селезінки тварини виділяється відповідна антитілоутворююча клітина (АУК) та проводиться підготовка мієломних клітин.

Для ***гібридизації*** використовуються в основному мієломні клітини миші і щура, а останнім часом з'явилися повідомолення про використання мієломних клітин людини. Мієломні клітини мають бути генетично марковані так, щоб вони гинули на певному селективному середовищі.

При одержанні перших гібридом Г. Келер і Ц. Мільстейн партнерами для злиття вибрали клітини селезінки мишей, імунізованих еритроцитами барана, і клітини мієломної лінії Р3, які адаптовані до росту в культурі. Клітини цієї лінії, на відміну від нормальних лімфоцитів, не могли засвоювати гіпоксантин із поживного середовища через відсутність ферменту пуринового

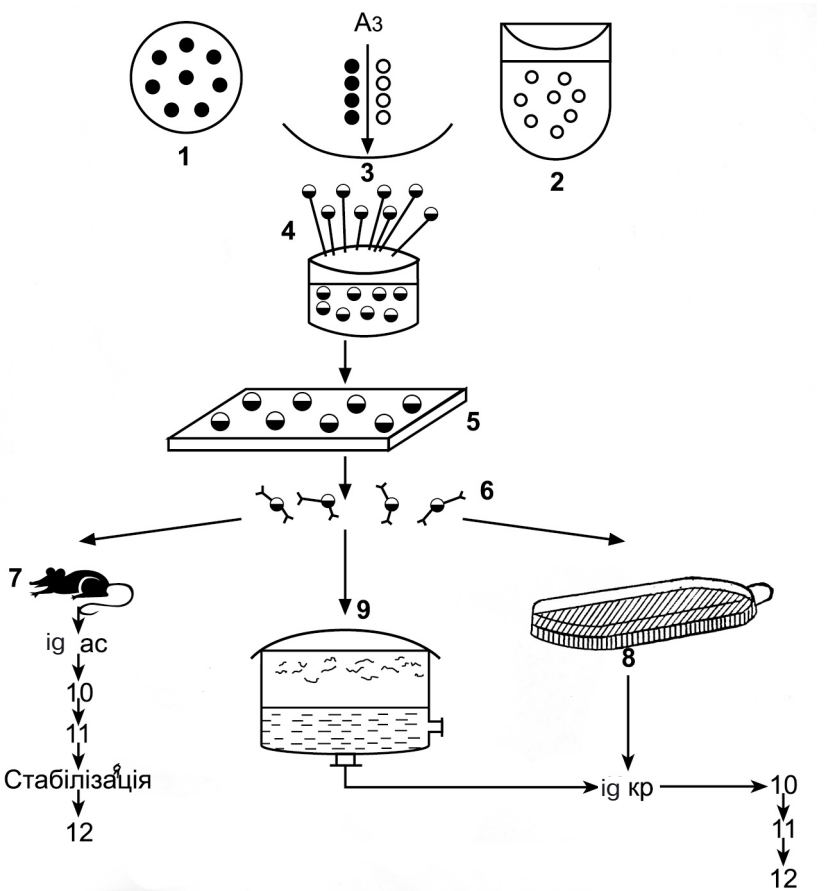


Рис. 14.1. ***Схема одержання моноклопальних антитіл за допомогою гібридомної технології*** *(за Єліновим Н.П., 1995):*
Аз — агент злиття клітин; 1 — В — клітини із селезінки імунної миші; 2 — культура мієломних клітин миші; 3 — гібридизація; 4 — гібридоми; 5 — селекція і клонування гібридом; 6 — гібридоми, які утворюють моноклональні антитіла; 7 — введення гібридом, які утворюють моноклональні антитіла, в організм сингенної миші; 8 — клітини гібридоми, що утворюють моноклональні антитіла, які культивуються в культурі тканини; 9 — вирощування гібридомних клітин, що утворюють моноклональні антитіла, у ферментері; Igкр — імуноглобуліни в культуральній рідині; ig ac — імуноглобуліни в асцитній рідині; 10 — висолювання Ig-ів сульфатом амонію; 11 — стандартизація Ig-ів; 12 — ліофілізація Ig-ів.

обміну гіпоксантин-гуанін-фосфорибозилтрансферази (ГГФРТ). Це було використано як селективний фактор при відокремленні пухлинних клітин, які не злилися з лімфоцитами, від утворених гібридом. Пухлинні клітини гинуть, а гібридоми, які одержали здатність засвоювати гіпоксантин від нормальних лімфоцитів, виживають. Антитілоутворюючі клітини селезінки, що не брали участі в утворенні гібридом, живуть в культурі всього декілька днів і теж гинуть. В культурі залишаються гібридоми, і ті, які вижили, перевіряються на здатність синтезувати антитіла певної специфічності, а потім настає найбільш відповідальний етап роботи — ***клонування.*** Необхідно виростити з однієї клітини життєздатну популяцію гібридом (клон), які секретують антитіла необхідної специфічності. Зазвичай необхідну гібридому вдається відшукати серед тисячі до неї подібних.

Культивування виділеного клону (одержання масової культури) проводиться наступними методами:

1) у культурі тканини – ***найкращий спосіб***, тому що виділені імуноглобуліни мають високу чистоту;
2) в організмі сингенних тварин (мишей, щурів) – у вигляді асцитної пухлини після введення гібридомної клітинної зависі в черевну порожнину;
3) у ферментерах (суспензійна культура).

Асцитна пухлина — це злоякісна пухлина черевної порожнини мишей у вигляді клітин, які знаходяться у зависі внутрішньочеревної рідини. Титр моноклональних антитіл в асцитній рідині на 2–3 порядки перевищує ту кількість, яка міститься у культуральному середовищі. Проте добування моноклональних антитіл в умовах клітинної культури має переваги, обумовлені більш сприятливими умовами контролю процесу біосинтезу антитіл, виділенням антитіл із культурального середовища і наступним їх очищенням.

Переведення гібридних клітин у великі об'єми середовища при масштабному культивуванні супроводжується великими труднощами, бо не кожен їхній клон виживає за таких умов. Тому на практиці проводиться розведення «маточних» клітин поступово, спочатку 1:2–1:3, а потім і більше, використовуючи спеціальні культиватори (рис. 14.2).

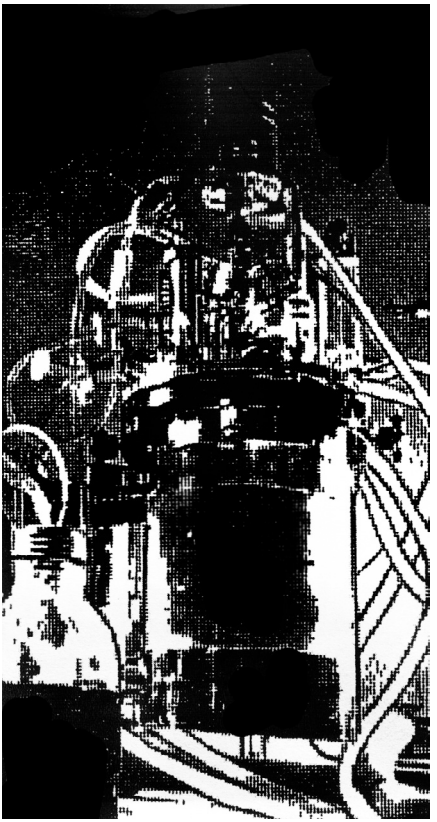


Рис. 14.2. ***Культиватор гібридомних клітин*** *(загальний вигляд) фірми IBF biotechnics (за Єліновим Н.П., 1995)*

Для вирощування гібридом у суспензійних культурах дуже важливим є застосування спеціальних безсироваткових середовищ. Фірма Sigma (США) випустила у продаж таке середовище (в сухому/рідкому стані) під назвою Hybry–Max, що не має сироватки і білків. Усього в середовищі міститься 82 компоненти (22 амінокислоти, 12 вітамінів, 27 неорганічних речовин і 21 – решта сполук). Це амінокислоти, вітаміни, нуклеотидні попередники, глюкоза, ліпіди, прогестерон, неорганічні солі і мікроелементи. Це середовище рекомендовано для злиття, клонування, вирощування гібридомних і мієлоїдних клітин, а також для підтримки на відповідному рівні продукції антитіл.

Моноклональні антитіла мають величезні переваги над звичайними імунними сироватками, оскільки забезпечують унікальну специфічність, стандартність і високу точність досліджень, підвищують їх дозвільну спроможність та інформативність.

Один із суттєвих недоліків звичайних антисироваток є їх нестандартність. Від однієї тварини не можна одержати такої кількості антисироватки, якої б вистачило для тривалого використання, а різні тварини через індивідуальні відмінності синтезують до одного й того самого антигену різні за специфічністю і спектром гетерогенності антитіла. Гібридоми ж продукують необмежену кількість препарату з абсолютно стандартними властивостями, тому що хімічна гомогенність моноклональних антитіл не змінюється у процесі їх виробництва стабільним гібридомним клоном. Крім того, у звичайній антисироватці специфічні антитіла становлять у кращому випадку, 1–5 % від загальної кількості сироваткових білків. Решта — це баластні речовини, введення яких в організм часто призводить до небажаних наслідків. При використанні моноклональних антитіл в організм вводиться невелика кількість чистого препарату, достатнього для потрібного ефекту, але без побічних явищ.

Поряд з безперечними перевагами моноклональні антитіла мають і недоліки, які створюють проблеми при їх практичному використанні. Вони нестабільні при зберіганні у висушеному стані, тоді як у суміші звичайних (поліклональних) антитіл завжди присутня група антитіл, стійких за вибраних умов зберігання. Отже, неоднорідність звичайних антитіл дає їм додатковий резерв стабільності при зміні зовнішніх умов, що відповідає одному з основних принципів надійності систем.

Моноклональні антитіла нерідко мають дуже низьку спорідненість з антигеном і надмірно вузьку специфічність. Це перешкоджає їх застосуванню проти мінливих антигенів, що характерно для інфекційних агентів і пухлинних клітин. Крім того, моноклональні антитіла на світовому ринку мають дуже високу вартість.

14.3. ЗАСТОСУВАННЯ МОНОКЛОНАЛЬНИХ АНТИТІЛ

Передусім їх застосовують у ветеринарії при створенні препаратів для діагностики вірусних інфекцій. Уже одержано гібридоми, в яких відбувається біосинтез моноклональних антитіл до епітопів вірусу венесуельського енцефаломієліту коней, африканської чуми свиней, респіраторно-синцибіального вірусу великої рогатої худоби, лейкозу, сказу, везикулярного стоматиту, грипу, парагрипу-3 та інших хвороб. Заміна в традиційних діагностикумах поліклональних антитіл на моноклональні зумовила створення діагностичних препаратів нового покоління. Їх перевагами є висока специфічність дії і чутливість, що забезпечує ідентифікацію не тільки виду збудника, але і його серотипу. Їх можна стандартизувати, і на виготовлення діагностикумів витрачається менше коштів. Завдяки використанню моноклональних антитіл вдалося підвищити ефективність таких діагностикумів, як імуноферментний аналіз (ІФА), реакція пасивної гемаглютинації, імунофлуоресцентний метод.

Моноклональні антитіла використовуються також для проведення пасивної імунізації проти деяких вірусних захворювань (сказу, кліщового енцефаліту та ін.).

Іммобілізовані моноклональні антитіла використовуються як імуносорбенти, які забезпечують безперервність процесу при очищенні інсуліну, інтерферону, соматотропного гормону та інших біологічно активних речовин, біосинтез яких ґрунтується на використанні технології рекомбінантних ДНК. Крім того, моноклональні антитіла можуть забезпечити ефективний контроль ідентичності одержаних біотехнологічним шляхом у промислових масштабах біологічно активних білків і пептидів зі зразками з натуральних джерел.

Моноклональні антитіла до антигенних детермінант мембранних білків сперматозоїдів, мічені флуоресцентними речовинами, можна використовувати для розділення детермінованих за статтю спермiїв для вирішення виробничих проблем.

За допомогою моноклональних антитіл можлива доставка лікарських речовин у клітину, яка містить відповідний епітоп. Такий підхід дає можливість підвищити ефективність лікарських препаратів проти інфекційних і ракових захворювань. Ви-

користовуючи моноклональні антитіла, які одержані в результаті імунізації тварин лікарськими препаратами, можна визначити дози цих ліків.

При аутоімунних хворобах, коли імунні клітини «повстають» проти власних органів і тканин, моноклональні антитіла відповідної специфічності можуть зв'язувати антитіла, які завдають шкоди організму. Для лікування раку пропонують використовувати моноклональні антитіла, кон'юговані з токсичними для ракових клітин сполуками. Моноклональні антитіла доставляють отруту точно за адресою, уникаючи зараження здорових клітин. Тому до моноклональних антитіл можна приєднати дуже сильні токсини.

Моноклональні антитіла викликають неабиякий інтерес для створення антиідіотипічних вакцин, які належать до нових вакцинуючих препаратів. У 1963 р. Г. Канкель зі співробітниками (США) і Ж. Уден (Франція), незалежно один від одного, встановили, що одержані при імунізації тварин антитіла (Ат-1) після їх виділення із сироватки і введення іншим тваринам індукують синтез нових антитіл — Ат-2. Останні (Ат-2) зв'язували лише Ат-1 і не вступали у взаємодію з іншими антитілами. Це дало підставу Ж. Удену епітоп антитіла Ат-1 назвати ***ідіотипом*** (грецьк. Idios — своєрідний і typos — відбиток, зразок, форма), а антитіло Ат-2, утворене в результаті індукованого впливу антигенних детермінант ідіотипу (Ат-1) — ***антиідіотипом***. В подальшому експериментально було встановлено схожість між Ат-2 і антигеном. У зв'язку з цим виникла ідея про можливість використання Ат-2 як вакцинуючого препарату, що має деякі переваги. Головна перевага полягає в тому, що, залишаючись препаратом високої специфічності, антиідіотипічні вакцини ніколи не викликають захворювання, для захисту від яких їх створено.

Цей метод є перспективним при роботі з небезпечними вірусами, а також з вірусами, виробництво яких обмежене або пов'язане зі значними труднощами. Метод має перспективу і тоді, коли до складу антигенних детермінант входять вуглеводи або ліпіди, які перешкоджають створенню вакцин за принципами генетичної інженерії.

Використання відповідних антиідіотипів є високоефективним для профілактики багатьох інфекційних захворювань і лікування деяких видів раку, а також хвороб, причинами яких є дефекти імунної системи. Антиідіотип можна використати як вакцину або терапевничний засіб для подолання синдрому набутого імунного дефіциту (СНІДу).

Контрольні питання

1. Як і які за складом антитіла одержують традиційним способом?
2. Які антитіла називаються моноклональними?
3. Що таке гібридома, технологія її одержання і властивості?
4. Які етапи включає технологія одержання моноклональних антитіл?
5. Якими методами проводиться культивування виділеного клону?
6. Які переваги мають моноклональні антитіла над звичайними імунними сироватками?
7. Де застосовуються моноклональні антитіла?
8. Які вакцини називають антиідіотипічними?
9. Яка роль моноклональних антитіл у створенні антиідіотипічних вакцин?

Розділ 15.

БІОТЕХНОЛОГІЯ І ВАКЦИНИ МАЙБУТНЬОГО

Відомо, що імуногенність або здатність індукувати в організмі біосинтез антитіл визначається присутністю на поверхні білкової молекули так званих епітопів або антигенних детермінант. Вони утворені тільки 6–10-ма амінокислотними залишками (зазвичай гідрофільними амінокислотами), що мають найбільшу спорідненість з активним центром антитіла і оточені 5–10-ма амінокислотними залишками (зазвичай це гідрофобні амінокислоти). Епітопи у складі імуногенної білкової молекули, що знаходиться на поверхні вірусної частинки чи бактеріальної клітини, або у вигляді синтезованого тим чи іншим шляхом олігопептиду, пізнаються певними клонами специфічних лімфоцитів, які забезпечують надалі біосинтез антитіл проти даного набору антигенних детермінант (епітопу).

З цього погляду вакцина, що використовується в повсякденній практиці, — це малоконтрольована надкомплексна суміш з великою кількістю баластних, у тому числі високотоксичних забруднюючих компонентів з мікробних клітин, живильного середовища, з клітин, у яких вирощуються віруси. В ідеалі для створення імунітету необхідні один-два епітопи, що не містять забруднюючих баластних речовин, токсичних неконтрольованих домішок. А в організм при вакцинації вводяться сотні найскладніших комплексів, унаслідок чого виникають важкі поствакцинальні ускладнення, настає алергезація осіб, яким зроблено щеплення (*Петров Р.В., Хаітов Р.М.,* 1986).

З огляду на вищевикладене цілком реальною є ідея оптимізації вакцини в напрямку усунення тих негативних наслідків, які супроводжують їхнє використання. Насамперед це високоефективні вакцини, за допомогою яких, незважаючи на властиві їм негативні моменти, вдалося перевести в розряд переможених низку інфекцій, що викликали колись спустошливі епідемії й епізоотії, які заподіювали населенню численні лихоліття.

Необхідність нетрадиційних підходів виникла особливо гостро при конструюванні нових вакцин, покликаних забезпечити ефективний захист від інфекцій, проти яких на сьогодні такого захисту немає. До категорії так званих непереможених інфекцій належать вірусні захворювання людини і тварин (гепатит А, гепатит В, грип, ящур, африканська чума свиней й інші заразні хвороби). У людини і тварин відсутній надійний захист від інфекційних захворювань кишечника, а також від стафілококів, стрептококів, пневмококів і паразитарних інфекцій, у тому числі малярії та інших.

Досягнення молекулярної біології і генетичної інженерії повинні бути використані для одержання насамперед противірусних вакцин.

В опублікованих протягом останнього часу роботах вітчизняні і закордонні дослідники у своїх спробах одержати антивірусні вакцини виходили насамперед з необхідності виділення з геному гена, що кодує у вірусній частинці поверхневий білок, який має антигенні властивості. Потім за участю ізольованого гена конструювали рекомбінантну молекулу ДНК, що після трансформації експресувалась у бактеріальній чи дріжджовій клітині. Передбачалося, що отриманий біотехнологічним шляхом і відповідним чином очищений капсидний білок з його антигенними властивостями може бути використаний як ефективний вакцинальний препарат субодиничного типу. Ген, що несе інформацію про білок поверхні вірусу грипу (поверхневий гемаглютинін), гепатиту в людини, поліомієліту й інших захворювань, удалося змусити експресуватись у прокаріотичній бактеріальній клітині чи в такому одноклітинному еукаріотичному організмі, як дріжджі. Залишалося очистити отриманий імуногенний білок і застосувати його як вакцинальний препарат.

Труднощі, що виникають на цьому етапі, як вважає Тихоненко Т.І. (1984), навряд чи можна подолати. Річ у тім, що паразитування багатьох вірусів у клітинах вищих еукаріотичних організмів передбачає використання ферментних систем останніх для здійснення функції відтворення вірусів, у тому числі формування капсидних вірусних білків. Однак ферментні системи, що забезпечують утворення функціонально активних молекул

РНК (процесинг) за допомогою посттранскрипційної модифікації первинної РНК, що полягає в елімінації полінуклеотидних фрагментів, які відповідають інтронам, і наступному лігіруванню фрагментів РНК, що несуть інформацію і відповідають екзонам (сплайсинг), а також посттрансляційні модифікації синтезованих білкових молекул у бактеріальних і дріжджових клітинах істотно відрізняються від тих умов, у яких відбувається відтворення вірусу при його паразитуванні в клітинах вищих еукаріот (людини і тварин насамперед). Так, у бактеріальній і дріжджовій клітинах, де експресуються гени, що кодують капсидні вірусні білки, відсутні необхідні умови для процесингу, не відбувається посттрансляційне протеолітичне розщеплення і глікозування білка вірусної оболонки, що перешкоджає формуванню такої третинної і четвертинної структури, яка утвориться при інфікуванні вірусом клітин вищих еукаріот.

Відхилення в конформації білкових молекул призводять до того, що амінокислотні залишки, з набору яких формується епітопна ділянка, екрануються іншими атомними групами. У тих випадках, коли антигенна детермінанта створюється відповідними конформаційними перебудовами за рахунок просторового зближення вилучених ділянок поліпептидного ланцюга при формуванні третинної структури або мономерних поліпептидів при утворенні надмолекулярної четвертинної структури, відповідні амінокислотні залишки взагалі не можуть бути зібрані у відповідну епітопну групу.

Незалежно від причин, що обумовили конформаційні відхилення, синтезований у бактеріальній чи дріжджовій клітині білок позбавлений головної властивості — він неімуногенний. Синтезований за допомогою технології рекомбінантних ДНК у дріжджовій клітині HBS-антиген вірусу гепатиту В мав 50 % імуногенності порівнянно з аутентичними частками 22 нм. Створенню біотехнологічного виробництва HBS-антигену і вакцини чи діагностичного препарату перешкоджають відсутність посттрансляційного глікозування при експресії гена, що кодує антигенний білок вірусу гепатиту В в дріжджах, а також необхідність руйнування дріжджових клітин для одержання антигену, тому що той у середовище не виділяється.

Тихоненко Т.І. (1983) для вирішення найбільш гострих проблем і подалання труднощів виробництва повнорозмірних імуногенних вірусних білків пропонує використовувати культуру клітин людини чи тварин з наступною її трансформацією генами капсидних вірусних білків, забезпечених регуляторними елементами еукаріот.

Вітчизняні і закордонні автори встановили, що отримані шляхом хімічного синтезу чи еліміновані з відповідної білкової молекули олігопептидні структури, адекватні по набору послідовності залишків амінокислот, а також конформації епітопних ділянок нативного капсидного вірусного білка забезпечують імуногенний ефект, подібний до активності інтактного вірусу. Цей принцип покладений в основу одержання протиящурної вакцини, синтетичні олігопептидні епітопи якої відтворюють антигенні детермінанти, що знаходяться як у мономерних поліпептидах, так і в четвертинних надмолекулярних структурах і належать до епітопів конформаційного типу. У зв'язку з цим є розходження в первинній структурі синтетичних олігопептидних епітопів і епітопів, які сформовані амінокислотними залишками в нативному капсидному білку, що, однак, не перешкоджають досягненню синтезованими епітопами імуногенного ефекту.

Білкові молекули, що у розчині приймають вторинну і третинну структури, заздалегідь визначену дослідником, використовуються в практичній імунології. Оскільки тривалість життя синтезованих генно-інженерним шляхом олігопептидних епітопів у бактеріальній клітині дуже коротка, пропонується для подолання цієї перешкоди включати антигенні детермінанти олігопептидних епітопів, що належать одному чи декільком серотипам або навіть декільком видам вірусу, до складу спеціального сконструйованого химерного білка-носія з заздалегідь установленою вторинною і третинною структурами. Це дозволяє антигенним детермінантним ділянкам прийняти положення, що забезпечує найбільшу імуногенну активність.

Цей принцип був використаний Тихоненко Т.І. (1983) при створенні вакцини проти вірусу гепатиту В людини. Ген, який входив до складу сконструйованої ним рекомбінантної ДНК, кодував біосинтез химерного білка, у складі якого знаходилися

олігопептидні ділянки, що є епітопами HBS-антигену вірусу гепатиту В людини. При парентеральному введенні тваринам цього білка було встановлене утворення нейтралізуючих вірус (протективних) антитіл. Гетерополіантигенні поліпептидні структури, названі вакцинами другого покоління, цікаві ще й тим, що їхнє виробництво може бути полегшене біотехнологічним шляхом.

При створенні вакцин третього покоління ставиться завдання використовувати для утворення антитіл консервативні епітопні ділянки, загальні не тільки для вірусів різних серотипів, але й видів, а можливо, навіть родів. Вони також розташовані на поверхні й беруть участь в утворенні капсидної оболонки, однак від антигенних детермінант, що мають високу імуногенную активність, відрізняються значною мінливістю первинної структури, у зв'язку з чим цим вірусам удається порівняно легко переборювати імунний захист клітини-господаря. Вони характеризуються дуже слабкою імуногенністю, хоча і не позбавлені потенційної здатності індукувати синтез антитіл. Синтез хімічним чи генно-інженерним шляхом консервативних антигенних детермінант, пошук прийомів, спрямованих на підвищення їхньої імуногенної активності, складають основний зміст нового підходу в конструюванні вакцин третього покоління, які, є штучними, тому що в природних умовах потенціал консервативних епітопів не реалізується. До цього варто додати здатність вакцин третього покоління індукувати синтез протективних антитіл і захищати від вірусів, ступінь генетичного споріднення між якими віднаходить відбиток в адекватності слабкоімуногенних консервативних епітопів, розташованих у консервативних ділянках капсидних поверхневих вірусних білків. Практичним підтвердженням цієї ідеї є синтез нейтралізуючих серотипи вірусу грипу А і В антитіл, що утворилися в результаті імунізації синтезованими хімічним шляхом антигенними детермінантами, локалізованими в зоні консервативних ділянок вірусного гемаглютиніну.

Провідний радянський імунолог Петров Р.В. (1984), характеризуючи план створення й основні параметри вакцини майбутнього, вказує на те, що антигенний її компонент буде представлений синтетичними олігопептидними епітопами, включеними

в полілізинову структуру, складену з багатьох сотень залишків амінокислоти лізину, тобто носієм полігетероантигенних детермінант є полііонна, а точніше, полікатіонна структура. Однієї імунізації достатньо, щоб захистити організм людини чи тварин від тих інфекцій, антигенні детермінанти яких були представлені в полікатіонному носії. Петров Р.В. пропонує нові підходи – цілеспрямований вплив на імунну систему організму за допомогою введення в штучну вакцину стимулюючого компонента на основі знання механізмів реалізації генетичного контролю імунної відповіді.

На сьогодні існує обгрунтована й експериментально підтверджена дослідженнями Петрова Р.В., Хаітова Р.М. і Кабанова В.А. наукова концепція і програма конструювання штучних антигенів нового типу, кінцевою метою якої є створення штучних макромолекулярних вакцинуючих препаратів, що не мають відповідних природних аналогів.

Щоб вакцина майбутнього, проект якої в 1973 р. представив Села М., була ефективною у всіх випадках її застосування, необхідно одержати відповідь на питання, чому деякі організми, оброблені приготованими за пастерівськими принципами ослабленими чи мертвими вакцинами або виділеними з них антигенами і в багатьох інших випадках діяли безвідмовно, залишалися неімунними. Крім того, приготовані за класичним принципом вакцини при багатьох інфекціях виявляються неефективними; не виникає імунітету до повторного зараження даним збудником навіть після хвороби, викликаної деякими інфекціями. У зв'язку з цим низка інфекцій належить до категорії непереможених. Тим часом збудники цих інфекцій є носіями антигенних детермінант. Однак заздалегідь відомо, що їхнє виділення, установлення структури з урахуванням можливих конформаційних впливів, наступний ресинтез і використання як субодиничних вакцин не матимуть ефекту. Причини нереагування чи низького реагування на введену в макроорганізм субстанцію мають геномну локалізацію, тобто є генетично детермінованими.

Села М. (1969, 1983), Петров Р.В. (1976), Петров Р.В., Хаітов Р.М., Атауллоханов Г.І. (1983) й інші з відкриттям генів імунної відповіді встановили механізм генетичного контролю

сили імунного реагування. Виявлено гени імунної відповіді (Ir-гени) і гени імунної супресії (Is-гени). При антигенному впливі на організм реакція Ir-генів реалізується у вигляді високої чи низької відповіді до даних антигенів залежно від того, який Ir-ген (високої чи низької відповіді) знаходиться в геномі. Деякі гени на антигенну детермінанту певної будови реагують розвитком вираженої імунної відповіді, інші генотипи на цей епітоп реагують слабко чи не відгукуються зовсім на антигенні детермінанти, що розрізняються за будовою. В одних випадках розвивається швидка і висока імунна реакція, в інших — розвинути таку реакцію організм не може. У тих випадках, коли в геномі міститься Ir-ген низької відповіді і (чи) Is-ген сильної супресії, традиційно приготованою вакциною ефективної імунної відповіді одержати не вдається.

За сформульованим і успішно реалізованим Петровим Р.В. і його школою принципом створення штучних вакцин допускається одержання макромолекул, що включають епітопний компонент і поліїонну штучну структуру, яка індукує імуногенез і забезпечує обхід Т-клітинного і Ir-генного контролю імунної відповіді. Незалежність такого штучного макромолекулярного комплексу від антигенної конкуренції створює принципову можливість її використання як вакцинний препарат проти тих інфекцій, що дотепер належали до категорії непереможених людиною, а також, можливо, проти раку й алергійних станів. Отже, за новим принципом створення штучних вакцин можлива участь певного епітопу в макромолекулярному вакцинуючому комплексі як обов'язкового компонента.

Вирішенню цього питання молекулярної імунології передували дослідження з моделювання антигенів. Антигенні властивості встановлені у тринітрофенолу, приєднаного до такої високомолекулярної сполуки, як полі-2-метил-5-вінілпіридин (молекулярна маса — 80–100 тис. дальтон), динітрофенолу, кон'югованого з макромолекулярною полікатіонною структурою, створеною на основі полі-L-лізину, у кон'югату тетрапептиду Тир-Глу-Ала-Ліз (сополімер тирозину, глутамінової кислоти, аланіну і лізину) з поліаніоном, утвореним у результаті полімеризації чи сополімеризації акрилової кислоти (поліакрилова кислота).

У ході цих досліджень було сформульоване поняття про антигенну детермінанту (епітоп). Установлено, що антигенна специфічність макромолекулярної структури визначається антигенною детермінантою, а за допомогою антитіл виявляються незначні зміни в структурі антигенних детермінант; були ідентифіковані гени імунної відповіді в морських свинок (1963) і виявлені Ir-гени у мишей; експериментально підтверджені слабкі антигенні властивості поліпептидів навіть у тих випадках, коли вони модифікувалися гаптенами, а також виявлена така важлива властивість поліїонних носіїв гаптенів, як здатність їх виступати ефективними імуностимуляторами. Головним при проведенні цих досліджень було те, що антигенні макромолекулярні комплекси на поліїонній основі взагалі не стимулювали біосинтез антитіл, а процес антитілоутворення тривав активно навіть у тих генотипів, що при традиційній вакцинації не залежали від тимуса і від Ir-генного контролю імунної відповіді. Остання обставина була покладена в основу при конструюванні штучних вакцин нового типу.

Крім штучних антигенних структур, інтенсивно вивчаються олігопептидні білкові ділянки, що формують антигенні детермінанти вірусів, бактерій, найпростіших. Досить грунтовно досліджуються олігоцукристі антигенні детермінанти сальмонел.

Було встановлено, що виділені з білкової структури вірусу чи отримані синтетичним шляхом олігопептиди з різною кількістю амінокислотних залишків здатні індукувати біосинтез антитіл проти цілого білка; взаємодія антитіл з білковою молекулою, що утримує антигенні детермінанти, приводить до нейтралізації вихідного вірусу. Виділені чи синтезовані олігопептидні структури з'єднували найчастіше з такими носіями, як бичачий сироватковий альбумін, полі-D,L-аланін, правцевий анатоксин, гемоціанін равлика, лізоцим, гликопептид та ін. Майже у всіх випадках сконструйовані на основі олігопептидної антигенної детермінанти і поліпептидної структури, використаної як носій, антигенні комплекси для стимулювання імуногенезу мали потребу в одночасному введенні ад'ювантів (найчастіше повного ад'юванта Фрейда, алюмінієвих квасців чи гідроокису алюмінію, які застосовувалися окремо чи в сполу-

ках). Винятком були дослідження, де як носій використовувався мурамилдипептид, що стимулює імуногенез.

Синтез олігопептидів, що імітують константні ділянки антигенної детермінанти поверхневого білка гемаглютиніну (НА) вірусу грипу, має неабиякий практичний інтерес, тому що цей принцип може бути покладений в основу конструювання вакцини, при введенні якої синтезуються протективні (віруснейтралізуючі) антитіла проти декількох різновидів вірусу грипу.

Білок 1 вірусу ящура (VP_1) є найбільш ефективним антигеном, у відповідь на введення якого індукується біосинтез віруснейтралізуючих антитіл (рис. 15.1). Крім того, відомо, що фрагмент VP_1 включає 141–160-й амінокислотні залишки і схильний до найбільших змін у різних серотипів вірусу ящура. Передбачається, що вакцина, створена кон'югуванням олігопептидів,

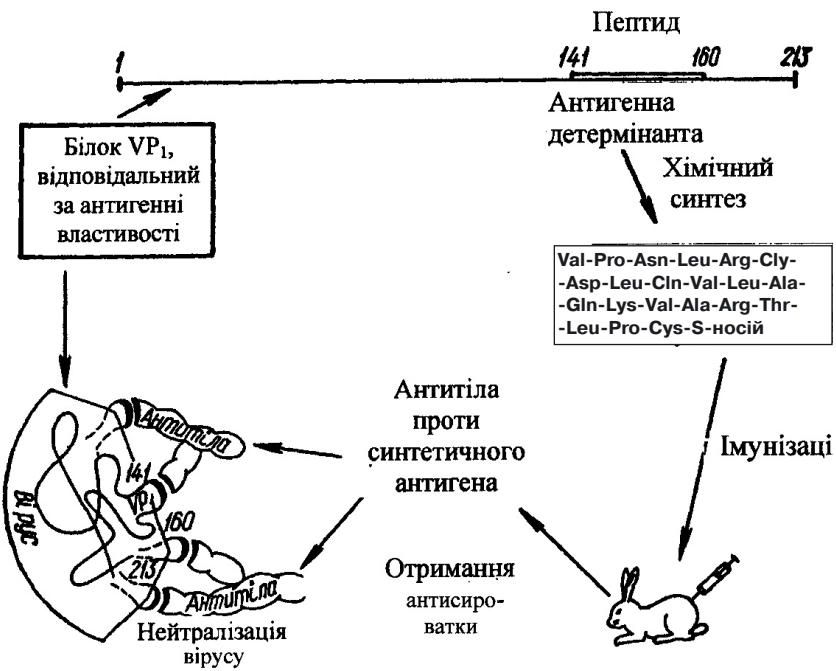


Рис. 15.1. ***Схема конструювання протиящурної вакцини*** *(за Овчінніковим Ю.А., 1986)*

характерних для кожного серотипу вірусу, на загальному білковому носії повинна забезпечити біосинтез протективних антитіл, що нейтралізують А-, О-і С-серотипи вірусу ящура *(Shinnick T.M. et al., 1983)*.

У колишньому Радянському Союзі був одержаний і пройшов виробничі випробування вакцинуючий комплекс, створений із синтезованого пентадекапептиду і його фрагментів, що включають послідовність 145–159-го залишків амінокислот VP_1-білка вірусу ящура і з'єднаних з такими носіями, як гемоціанин равлика, БСА і глікопептид *(Вольпіна О.М. й ін., 1984)*.

У дослідників, що працюють у цьому напрямку, очевидно, найбільшими труднощами є подолання Т-клітинного і Ir-генного контролю сили імунного реагування. Зазначені труднощі можна здолати за допомогою штучних вакцин нового типу .

Аналогічні прийоми були використані при створенні синтетичних олігопептидних антигенних детермінант для конструювання вакцини проти бактерій і їхніх токсинів: синтез олігопептидного фрагмента, що включає епітопну ділянку, приєднання синтезованого олігопептиду до білкового носія (бичачий сироватковий альбумін, полі-D,L-аланін, полі-L-лізин, правцевий анатоксин та ін.) за допомогою біфункціонального глутарового альдегіду чи іншим способом, введення отриманих комплексів одночасно з повним ад'ювантом Фрейда або мурамилдіпептидом в організм тварин.

Синтетичні олігопептидні фрагменти, що відтворюють антигенні детермінанти дифтерійного і холерного токсинів, а також М-білка Streptococcus pyogenes, приєднані до поліпептидного носія, індукували біосинтез пептидспецифічних антитіл, здатних взаємодіяти з інтактними токсинами і в деяких випадках їх нейтралізувати. Кон'югати олігопептидних епітопів бактеріальних білків і їхніх токсинів з поліпептидними носіями також не забезпечують обхід Т-клітинного і Ir-генного контролю імуногенезу, у зв'язку з чим створені на цій базі вакцини не можуть індукувати ефективну імунну відповідь у генетично низькореагуючих індивідуумів.

До складу структурного поверхневого білка спорозонтів P. Knowlesi входить 24-амінокислотна пептидна послідовність з властивостями антигенної детермінанти. Моноклональні анти-

тіла проти поверхневого антигенного білка P. Knowlesi вступали у взаємодію із синтезованим пептидом з 24-х залишків амінокислот, що виконують функцію антигенної детермінанти.

Отримані методом хімічного синтезу з повторюваних олігоцукристих ланок фрагменти мали властивості і специфічність антигенних детермінант О-антигену сальмонел. При з'єднанні синтетичних олігоцукристих фрагментів з бичачим сироватковим альбуміном чи дифтерійним токсином були отримані антигенні комплекси, що при кількаразових імунізаціях за участю ад'ювантів (повний ад'ювант Фрейда) набули деяких імуногенних і протективних властивостей, що охороняло генетично високореагуючих на бичачий сироватковий альбумін особин від LD_{50}, збільшеної приблизно в 10 разів. На тварин, генетично низькореагуючих на бичачий сироватковий альбумін, сконструйований у такий спосіб антигенний комплекс зовсім не викликав імунізуючого ефекту. Ця обставина ще раз підтверджує перспективність ідеї, розвинутої Петровим Р.В. і Хаітовим Р.М. та їхньою школою (1986) про необхідність фенотипічної корекції генного контролю імунної відповіді з метою вивчення підходів для переведення тварин, що слабко реагують на введений антиген, в особини з ефективною імунною відповіддю.

У результаті проведених з 1972 р. у цьому напрямку досліджень установлено, що синтетичні полііони (полі-2-метил-5-вінілпіридин — ПМВП; поліакрилова кислота — ПАК; декстрансульфат; полі-4-вінілпіридин — ПВП; N-вінілпіролідон – NВПД; четвертинні солі полі-4-вінілпіридину і поліконідину й ін.) є одним з головних компонентів у створенні штучних вакцин нового типу. Молекулярна маса полііонів коливається в межах 10–100 тис. дальтон. Ні самі полімерні з'єднання, ні мономерні ланки, з яких складаються полімерні молекули, не виявляють антигенних властивостей. Один з інтегральних ефектів, вироблених полііонами — їх імунопотенціююча дія, складовими якої є окремі ланки імуногенезу. Так, уведення полііонів значною мірою збільшує швидкість міграцій Т- і В-лімфоцитів відповідно з тимуса і кісткового мозку в кров і селезінку, де забезпечуються необхідні умови для взаємодії Т- і В-лімфоцитів, тобто Т-хелперів з В-клітинами, прискорення розмноження і диференціація останніх в антитілоутворюючі клітини (АУК).

При цьому поліаніони (ПАК, декстрансульфат) впливають тільки на В-клітини, а полікатіони активують також і Т-лімфоцити, підвищуючи в присутності макрофагів синтез ДНК: поліаніони слабко стимулюють біосинтез ДНК і тому належать до малоефективних мітогенів. Важливим для рішення розглянутої проблеми (обхід Т-клітинного і Ir-генного контролю імуногенезу) є встановлення можливості прямого стимулювання розподілу і диференціації В-лімфоцитів в АУК за допомогою поліїонів; реакція на введення безтимусним тваринам поліїонів адекватна тому ефекту, що одержують при введенні в їхній організм Т-хелперів.

У забезпеченні збалансованої функції імунної системи беруть участь Т-супресори, що під впливом поліїонів також інактивуються. Однак стимулюючий вплив поліїонів на швидкість розмноження В-лімфоцитів, їх диференціювання в антитілоутворюючі клітини й участь останніх в утворенні антитіл, збереглися. Виявлено позитивний вплив поліїонів на активність природних кілерних клітин і кілерів, що походять з кровотворної стовбурної клітини. За допомогою поліїонів досягається активування реакцій, що супроводжують імунну відповідь, яка була пригнічена внаслідок антигенної активації Т-супресорів. Дія поліїонів на імунокомпетентні клітини залежить від дози поліелектроліту і його молекулярної маси.

Поліелектролітна природа розглянутих полімерних ад'ювантів і поліфункціональність властивостей білків, укладениxx у клітинні мембрани, мають ідеальну можливість для їхньої багатоточкової кооперативної взаємодії й утворення інтерполімерних комплексів. Супутня процесу комплексоутворення агрегація білків клітинної мембрани призводить до порушення її проникливості: збільшується швидкість надходження іонів калію і кальцію за градієнтом концентрації — калій виходить із клітини, а кальцій входить в клітину. Декотрі експериментальні дані підтверджують аргументованість цієї точки зору. Так, нейтральні полімери, а також олігополімери довжиною — 0,5–5 нм позбавлені комплексоутворючої активності, не надто впливають на проникливість клітинної мембрани для калію і кальцію, а за допомогою електронної мікроскопії виявлені кластери, що поєднують поліїонні молекули 20–50 білкових глобул. До того

ж активність Na^+-, K^+-, Ca^{2+}-АТФаз, впливаючи поліїонною молекулою на клітинну мембрану, також зростає.

Сконструйовані на синтетичній поліїонній основі за участю гаптенів (тринітрофенолу – ТНФ) і білкових речовин (бичачого сироваткового альбуміну) штучні антигени без використання ад'ювантів формують імунологічну пам'ять після одноразової імунізації. Кон'югати на поліїонній основі є дуже сильними антигенами, індукуючими біосинтез специфічних до ТНФ і білкового компонента антитіл. Був отриманий штучний антиген, що є трикомпонентним комплексним з'єднанням О-поліцукру, отриманого з О-антигену сальмонел методом кислотного гідролізу, джгутикового антигену білкової природи — флагеліну, також виділеного із сальмонел, з поліаніоном ПАК. Названий комплекс має високі імуногенні властивості, що чітко реалізується у вигляді первинної і вторинної імунної відповіді. Двокомпонентні антигенні комплекси О-поліцукор-ПАК і флагелін-ПАК без застосування ад'ювантів індукують високого рівня імунну відповідь зі специфічністю відповідно О-антигену і флагеліну. Штучний трикомпонентний антигенний комплекс доцільніше використовувати для створення штучної протисальмонельозної вакцини.

Індукування процесу розмноження і диференціації В-лімфоциту в антитілоутворюючу клітину відбувається в результаті його контакту з Т-лімфоцитом, що одержали від макрофага стимулюючі сигнали, які сформувалися при взаємодії антигену і білка, що є продуктом Ir-гена. В-лімфоцит впізнає антигени самостійно. В експериментах з використанням штучних комплексів, де складовими елементами виступали поліїони, а також гаптени, білки і поліцукри, на мишах, у яких практично відсутні Т-лімфоцити (В-миші), після імунізації накопичується така ж кількість антитілоутворюючих клітин, як у нормальних мишей. Такі антигенні комплекси виявляють сильний тимуснезалежний імуногенний ефект. Крім того, було встановлено, що слабкі тимусзалежні білкові антигени (бичачий сироватковий альбумін) при з'єднанні з поліїонними макромолекулами забезпечують тимусзалежність імунної відповіді і нагромадження специфічних для цього білка антитілоутворюючих клітин у великій кількості. У цьому випадку антигенна детермінанта, що входить

до складу комплексної молекули штучного антигену, знаходить клітини зі специфічними рецепторами на їхній поверхні. Ділянки поліїонної структури, що перебувають у складі комплексної молекули і вільні від зв'язку з антигеном, вступають у взаємодію з поверхнею імунокомпетентної антигенспецифічної клітини. Агрегація мембранних білків, що відбулася в результаті такої взаємодії, підвищує іонну проникливість останньої. Усього цього достатньо для індукування процесу розподілу і диференціації В-лімфоцитів даної специфічності в антитілоутворюючі клітини без участі Т-хелперів.

Оскільки Ir- і Is-гени реалізують свою участь у контролі імунної відповіді переважно через Т-лімфоцити, використання антигенів чи антигенних детермінант у комплексі з поліїонними носіями дозволяє забезпечити незалежність імунних реакцій від впливу Т-лімфоцитів та Ir-генного контролю, у зв'язку з чим особини, що генетично не реагують або реагують на визначений антиген слабко, дають повноцінну як первинну, так і вторинну імунну відповідь. На основі цього принципу можливе створення ефективних вакцин проти інфекцій, що раніше належали до категорії непереможених, а також, можливо, проти раку й алергій.

Ідея конструювання штучних вакцин нового типу реалізована колективом під керівництвом Петрова Р.В. (1986), що створили препарат, який захищає тварин від сальмонельозної інфекції. У ході розробки штучної протисальмонельозної вакцини було встановлено, що кон'югати поліцукристого компонента, виділеного з О-антигену, і білкового компонента флагеліну (Н-антиген) з такими носіями, як поліакрилова кислота, полі-4-вінілпіридин чи сополімер акрилової кислоти і N-вінілпіролідона, у вигляді двокомпонентних (О-поліцукор–поліелектроліт або флагелін–поліелектроліт) чи трикомпонентних (О-поліцукор–флагелін–поліелектроліт) штучних антигенів забезпечують захист мишей при зараженні їх надлетальними дозами (100 LD_{50}) збудника S. typhimurium такого інфекційного захворювання, як мишачий тиф. Одночасно була підтверджена раніше висловлена думка про те, що поліелектролітний носій без відповідної антигенної детермінантної ділянки навіть у великих дозах не може захистити при інфікуванні тварин.

Крім того, у низькореагуючих на О-поліцукристий антиген і флагелін (Н-антиген) генотипів при введенні кон'югатів названих антигенів з полііонними макромолекулами стимулювання проліферації В-лімфоцитів і утворення антитіл було виражено сильніше, ніж в індивідуумів з більш високим вихідним рівнем імунної відповіді. Як стверджують Петров Р.В. і Хаітов Р.М. (1981), за допомогою полііонних носіїв можливо здійснювати фенотипічну корекцію генного контролю імунної відповіді.

Відмінною рисою штучних комплексних антигенних препаратів є їх високий протективний ефект: введені одноразово, вони забезпечують необхідний рівень набутої стійкості до сальмонельозної інфекції. Проте, штучні вакцинуючі препарати при повторному введенні О- і Н-антигенів сальмонел здатні розвивати високу імунну відповідь. Це свідчить про те, що створені штучні імуногени забезпечують прояв добре вираженої імунологічної пам'яті. Найбільш високий захисний ефект одержували при імунізації мишей трикомпонентним штучним антигеном О-поліцукор–флагелін–полііон.

З огляду на вищевикладені дані є підстава зарахувати названі штучні антигенні комплекси до принципово нового типу вакцинуючих препаратів з контрольованими структорую і імуногенністю *(Петров Р.В., Хаітов Р.М., 1987)*.

Розроблена ідея виявилася плідною і при вирішенні питання про можливість конструювання протигрипозної вакцини. Епітопи з імуногенними властивостями входять до складу основних антигенів вірусу – гемаглютиніну і нейрамінідази. Під впливом антигенних детермінант, локалізованих у гемаглютиніні і нейрамінідазі, при проникненні вірусу в організм відбувається біосинтез специфічних віруснейтралізуючих антитіл. На відміну від поверхневих антигенів (гемаглютиніну, нейрамінідази), первинна структура яких у процесі антигенного дрейфу зазнає значних змін, що створюють часом нездоланні труднощі при виготовленні ефективної протигрипозної вакцини, внутрішні антигени, зосереджені в матриксному білку (М-білку) вірусної частки, характеризуються сталістю своєї первинної структури, яка у всіх різновидів вірусу однакова, і в ході антигенного дрейфу практично не зазнають змін.

Однак М-білок є слабким антигеном, і антитіла, що утворюються під його впливом, не здатні захистити організм від вірусної інфекції. Консервативність первинної структури, що передбачає сталість його епітопних ділянок, у поєднанні з ідентичністю структури в багатьох різновидів серотипів вірусу грипу була покладена в основу конструювання штучних антигенів, що забезпечують біосинтез протективних антитіл, ефективних проти деяких різновидів вірусу грипу.

Для виготовлення вакцин необхідні антигенні препарати. Еліміновані з вірусних штамів гемаглютинін і нейрамінідаза, введені в організм тварини порізно чи разом, сприяють збільшенню кількості антитілоутворюючих клітин, які синтезують IgM, у 2–2,5 раза, чого недостатньо для забезпечення вірусонейтралізуючої функції і захисту тварин (мишей) від грипу (виживало не більше 14 % мишей). При цьому слід зазначити, що в популяції антитілоутворюючих клітин не було виявлено тих, котрі синтезують IgG.

Зовсім іншими виявилися результати імунізації мишей кон'югатами гемаглютинін–поліїон, нейрамінідаза–поліїон і гемаглютинін–нейрамінідаза–поліїон. Одноразове введення штучних антигенів на поліелектролітній основі у визначеному дозуванні забезпечувало абсолютну стійкість до вірусу.

Трикомпонентні штучні антигени (гемаглютинін–нейрамінідаза–поліелектроліт) виявилися ефективнішими за антигени, до складу яких входили гемаглютинін і поліїон. Штучні антигени, сконструйовані на поліїонній основі, підвищують також інтенсивність гіперчутливості уповільненого типу, тобто Т-клітинної імунної відповіді. Сконструйований штучний антиген, що включає виділений з віріонів М-білок і поліелектролітний носій, при імунізації тварин забезпечує виражений вірус-нейтралізуючий ефект, що дає підставу вважати реальною можливість створення штучної поліспецифічної вакцини, яка складається з константного М-білка і поліелектролітної частини компонента.

Принцип використання константної антигенної детермінанти був покладений в основу конструювання цілком штучної протигрипозної вакцини. Для цього була синтезована константна антигенна детермінанта, ідентична за будовою до N-кінцевогоу фрагменту, що включає 11 амінокислотних залишків, легко-

го ланцюга (HA_2–субодиниці) гемаглютиніну вірусу грипу А. Потім до С-кінця олігопептидного фрагмента був приєднаний гліцин, внаслідок чого отриманий додекапептид (пептид активації злиття F/A) такої амінокислотної послідовності: Глі–Лей–Фен–Глі–Ала–Іле–Ала–Глі–Фен–Іле–Глу–Глі. Кон'югати синтезованого додекапептиду з полііонними носіями мали добре виражену імуногенну активність. Вони індукували біосинтез протективних антитіл ізотипу IgG, що реагують як з гомологічною антигенною детермінантою, так і з гемаглютинінами різних серотипів вірусу грипу А. Значний вірусонейтралізуючий ефект із широким протективним спектром при одноразовому введені дає підставу зарахувати сконструйований препарат до цілком штучної протигрипозної вакцини. При цьому біосинтез антипептидних, антигемаглютинінових і протигрипозних антитіл не був виявлений у жодному з досліджень, у яких пептид F/A вводили в організм з різними носіями, що не є речовинами полііонної природи.

Ідентифікація деяких ракових антигенів (α-фетопротеїн, що виявляється при захворюванні первинною карциномою печінки, а також карциноембріональний антиген, поява якого позв'язана з аденокарциномною патологією органів травлення) і одержання їх у чистому вигляді *(Петров Р.В. і ін., 1972–1987)* дозволяють порушувати питання про створення протиракової вакцини.

Синтезований за кордоном ундекапептид, що відповідає за амінокислотною послідовністю N-кінцю карциноембріонального антигену, при з'єднанні його з поліамінокислотним носієм і бичачим сироватковим альбуміном в організмі тварин індукував синтез антитіл, які взаємодіяли з нативним карциноембріональним антигеном *(R. Arnon et al., 1976)*. У лабораторії Р.В. Петрова (1983) було отримано комплексне з'єднання, складовими якого є α-фетопротеїн і полііонний носій, які належать до класу полібетаїнів. Порівняння результатів, отриманих при застосуванні одного α-фетопротеїну і кон'югату α-фетопротеїн–полібетаїн, показало, що в другому випадку інтенсивність утворення антитіл майже в 100 разів вища, ніж у першому. Цей напрямок також є перспективним.

Використання поліелектролітних носіїв при створенні штучних антигенів і штучних вакцинуючих препаратів дало

можливість забезпечити тимуснезалежність імунної відповіді і пов'язаної з ним здатності скасовувати ефект конкуренції антигенів, обхід Ir-генного контролю сили імунного реагування, одержати ефективну імунну відповідь в особин з генетично детермінованим низьким рівнем імунної відповіді на той чи інший антиген. Це створює широкі можливості для конструювання вакцин проти інфекцій, що дотепер належали до категорії непереможених, дозволяє розраховувати на успіх при розробці поліспецифічних препаратів із включенням у кон'югат епітоп – поліелектроліт консервативного пептиду і створенні ефективних вакцин для захисту людини і тварин від протозойної інвазії, штучних протиракових і алерговакцин. Особливе значення епітоп-поліелектролітні кон'югати мають в умовах Т-клітинного дефіциту. Незважаючи на унікальність властивостей поліелектролітів, що застосовуються, триває робота над зниженням їхньої токсичності, підвищенням процесу біодеструкції і виведенням з організму, а також підвищеннюям здатності полііоних молекул виконувати функцію Т-хелперів, спонукаючи В-лімфоцити до проліферації. Це досягається за допомогою приєднання до комплексу іонофорів мурамілдипептиду й інших компонентів. Специфічність взаємодії штучного імунізуючого комплексу з В-лімфоцитом може бути підвищена за рахунок більш адекватного синтезу антигенних детермінант.

Генно-інженерний підхід у поєднанні із застосуванням поліелектролітів спроможні вже сьогодні значно поліпшити якість існуючих вакцин.

У світі проводяться широкі дослідження зі створення високоефективних вакцин для профілактики хвороб тварин за допомогою методів генетичної інженерії. Інактивовані вакцини, що застосовуються у ветеринарній практиці, мають порівняно низьку імуногенність, тому вдаються до допомоги ад'ювантів. Використання вакцин з атенуірованих штамів викликає ускладнення. Загальним недоліком тих чи інших вакцинуючих препаратів є наявність великої кількості баластового матеріалу.

Методи генетичної інженерії найбільш прийнятні для виготовлення вакцин проти вірусних захворювань. Сучасний підхід базується на використанні в складі вакцини тільки тих антигенних детермінант, що індукують антитілоутворення. Вигото-

влення вакцини включає такі етапи: виділення збудника і його розмноження; установлення структури вірусу; елімінація специфічно активної структури, яка індукує антитілогенез; синтез цього фрагмента в лабораторних умовах; визначення генетичного коду синтезованого поліпептиду; конструювання рекомбінантної ДНК і укладання рекомбінантної ДНК у бактерію.

Вмонтовуванням вірусних генів, що кодують відповідні антигенні детермінанти в геном бактерії чи еукаріотичної клітини, які знаходяться в культурі, передбачається одержувати вакцини належного складу. Необхідно довести нову технологію до того рівня, що дозволило б вакцинам нового покоління успішно конкурувати з вакцинуючими препаратами, які створюються традиційними методами.

Контрольні питання

1. Чим зумовлена імуногенність або здатність індукувати в організмі біосинтез антитіл?
2. Що таке антигенна детермінанта (епітоп)?
3. Роль епітопа у забезпеченні імунної відповіді.
4. У чому полягає механізм генетичного контролю сили імунної відповіді?
5. Чому виникла необхідність використання генно-інженерних підходів при отриманні вакцин?
6. Що покладено в основу при створенні генно-інженерних вакцин?
7. У чому сутність концепції створення штучних макромолекулярних вакцинуючих препаратів?
8. Які підходи використовуються при конструюванні штучних антигенів нового типу?
9. Назвіть основні параметри штучних генно-інженерних вакцин.
10. Які етапи включає процес виготовлення генно-інженерних вакцин?
11. Напрями створення штучних вакцин.

Розділ 16.

ДНК–ВАКЦИНИ

Явище трансдукції in vivo при введенні очищеної ДНК спостерігали ще кілька десятиліть тому, однак тривалий час цьому не надавали належної уваги. В 1960 році Ito (1960) показав можливість індукції папілом на шкірі кролика при ін'єкції екстрагованих фенолом нуклеїнових кислот з вірусу папіломи кроликів Шоупа, а в 1990 році в США з'явилося перше повідомлення про можливість генної імунізації тварин очищеною «голою» (naked) ДНК або РНК, коли Джон Вольф зі співробітниками зафіксував експресію хлорамфенікол-ацетилтрансферази, люциферази і β-галактозидази після інєкцій у скелетні м'язи миші ДНК- та РНК-експресуючих векторів, які несли відповідні гени *(Wolff I. A. et al., 1990)*.

Генна імунізація передбачає введення очищеної плазмідної ДНК, що містить гени вірусних або бактеріальних патогенів, в тканини організму з наступною експресією чужорідних генів, презентацією антигенів клітинами організму для індукції імунної відповіді, яка б забезпечувала протективний ефект *(Tang D. et al., 1992, Cohen I., 1993)*.

Основні характеристики ДНК-вакцин порівняно з класичними вакцинами наведені в табл. 16.1.

16.1. СТРУКТУРА

Конструктивно під ДНК-вакциною мають на увазі плазмідну ДНК (кільцеву ковалентно-замкнену молекулу довжиною від 4 до 6 тис. пар нуклеотидів), в яку вбудовані гени, що кодують найбільш важливі для імуногенності білки вибраного патогену і які експресують ці білки під контролем еукаріотичного промотору (ділянки ДНК, відповідальної за зв'язування РНК-полімерази, що ініціює транскрипцію). При конструюванні мо-

Таблиця 16.1.

Порівняльна характеристика класичних і ДНК-вакцин

Основні властивості	Тип вакцини		
	Жива	*Убита*	*ДНК-вакцина*
Необхідність маніпуляцій з живим патогеном при виробництві вакцини	+	+	–
Індукція клітинного імунітету	+	–	+
Індукція гуморального імунітету	+	+	+
Індукція локального імунітету	+	±	+
Наявність власної ад'ювантної дії	–	–	+
Репродукція в клітинах ссавців	+	–	–
Можливість реверсії патогенності	+	–	–
Зниження ефективності вакцинації наявністю колостральних антитіл	+	+	–
Можливість контамінації живими сторонніми агентами при виробництві вакцини	+	–	–
Трудомісткість при напрацюванні та очищенні	+	+	–
Можливість виробництва однієї вакцини проти кількох різних патогенів (касета)	–	–	+
Стійкість при нагріванні та чисельних нагріванні-проморожуванні	–	–	+

лекули ДНК-вакцини частіше використовують ранній промотор цитомегаловірусу, вірусу саркоми Рауса, вірусу мавп (SV40), аденоасоційованого вірусу (AAV), α-глобіну, β-актину, дигідрофолатредуктази, а також сигнали поліаденулювання SV40 або гормону росту ВРХ. Як селекційний маркер, необхідний для реплікації рекомбінантної плазміди в E. coli, до конструкції включають ген резистентності до антибіотиків (ампіциліну, рідше канаміцину).

Реплікація власне плазмідної ДНК відбувається тільки в бактеріальних клітинах (E. coli), тоді як транскрипція гена специфічного протективного білка (вставки) – в клітинах ссавців.

На сьогодні розроблені і більш ефективні системи, які здатні реалізовувати експресію не тільки окремих генів антигенів, а і їх сполучення *(Feltquate D. M., 1998)*, або, включивши додатково до конструкції гени термінальних повторів аденоасоційованого вірусу, інтегрувати молекулу ДНК-вакцини до хромосоми клітини *(Deryabina O. et al., 2003)*, рис. 16.1.

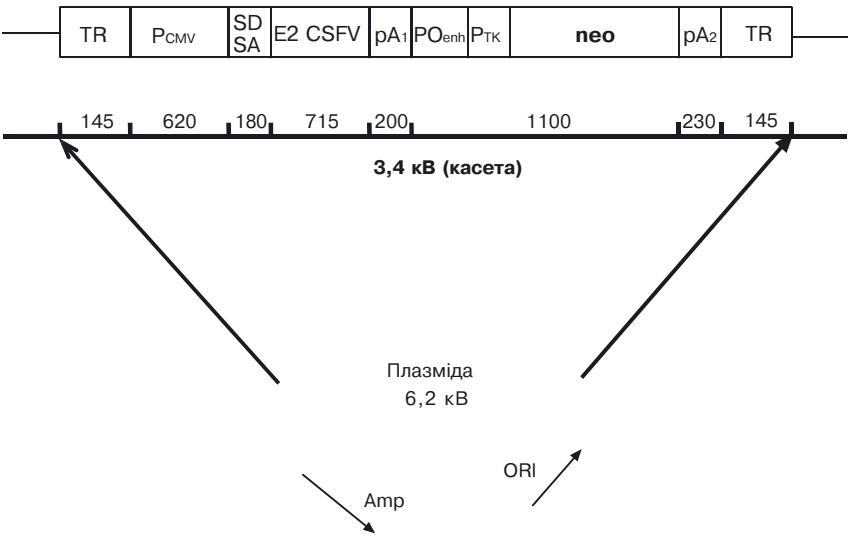


Рис. 16.1. ***Схема рекомбінантної плазміди ВКЧС-pTR-UFneo-:***
TR – кінцевий повтор аденоасоційованого вірусу (AAV), Pcmv – промоторна область цитомегаловірусу, SD/SA – донор/акцептор сплайсингу, E2 CSFV – ген білка Е2 вірусу класичної чуми свиней, pA_1 – сигнал поліаденілювання, pA_2 – сигнал поліаденілювання, neo – ген резистентності до неоміцину (селективний маркер), Amp – ген резистентності до ампіциліну (селективний маркер)

16.2. ВИБІР ГЕНІВ

Вибір генів для ДНК-вакцинації може бути виконаний шляхом конструювання генної бібліотеки (наприклад, за допомогою полімеразної ланцюгової реакції з рандомними олігонуклеотидними праймерами), включаючи клонування рестрикційних фрагментів геному патогену в різних рамках зчитування і послідовний відбір отриманих рекомбінантних плазмід, що забезпечують протективний захист. Це дозволяє визначити окремий ген, білки яких забезпечують захист організму від інфекції. У випадку, коли відомо, який білок є протективним, його ген отримують за допомогою полімеразної ланцюгової реакції зі специфічними до нього олігонуклеотидними праймерами.

Нарешті, для розширення антигенного спектру ДНК-вакцин створені вектори, до складу яких включені бібліотеки кДНК окремих патогенів. Інокуляція пулом таких векторів з експресією бібліотеки після імунізації забезпечили ефективний захист мишей проти зараження патогеном навіть у тому випадку, коли не були відомі їх протективні антигени.

Гени для конструювання ДНК-вакцин мають бути консервативними.

16.3. МЕТОДИ ТА ШЛЯХИ ВВЕДЕННЯ

Існує декілька методів доставки ДНК для трансфекції клітин. Найбільш вивченими є ін'єкції ДНК в сольовому розчині та введення ДНК за допомогою генної рушниці («gene gun»), коли клітини бомбардують часточками або мікроскопічним дротом із золота (~ 0,95–3 мкм) з адсорбованими на поверхні молекулами ДНК (Pokholenko Y. et al., 2003, Fynan E. F. et. al., 1993). Інші методи, які використовуються, це інкапсуляція ДНК в ліпосоми, комплекси ДНК з кохлеатом та використання атенуйованої шігели (*Shigella flexneri*) як транспортного засобу (Fennelly G. I. et. al., 1999). Досліджено також, що ефективне перенесення в клітини скелетних м'язів трансгену можна виконати електропорацією з високою частотою і низькою силою електричних імпульсів. Електропорація дозволяє більш ніж в

100 разів підвищити ефективність трансгенезу і отримати стійку секрецію білка при введенні лише 1 мкг чистої плазмідної ДНК *(Rizzuto G. et. al., 1999)*. Для підвищення поглинання та розподілу ДНК між клітинами іноді вводять разом з ДНК слабкі анестетики або розчин сахарози.

Для доставки ДНК до легенів у вакцинації був використаний макроагрегований альбумін. Вакцина потрапляла в легені після внутрішньовенного введення. Для приєднання ДНК до альбуміну використано поліетиленімін, після нагрівання з яким утворювалися часточки розміром 25–100 мкм. Після введення вони розподілялися в альвеолярній інтерстиціальній тканині. В результаті була отримана системна імунна відповідь та відповідь на рівні легеневої тканини. «Гола» ДНК за цих умов викликала тільки системну імунну відповідь.

При ін'єкції ДНК в сольовому розчині вона розчиняється до бажаної концентрації. Після цього сольовий розчин ДНК вводиться за допомогою шприца в різноманітні ін'єкційні місця – внутрішньом'язово, внутрішньошкірно, внутрішньовенно або інтрафолікулярно (щитовидна залоза). Крім того, епідермальна доставка супроводжується скарифікацією.

Одна з гіпотез пояснює обмеженість ефективної трансфекції ДНК еукаріотичних клітин низькою концентрацією молекул ДНК на поверхні клітин. При підвищенні їх концентрації на поверхні за допомогою кварцевих наночастинок (225 нм) ефективність трансфекції зростала в 8,5 разів *(Luo Dan., Saltzman W. M., 2000)*.

При внутрішньом'язовому введенні ДНК-вакцини велике значення має вибір певного м'яза. Існує припущення *(Vokoyama M. et. al., 1997)*, що значну роль відіграє розмір м'яза: при інокуляції певного об'єму ДНК в менший м'яз зростає гідростатичний тиск всередині м'яза, що сприяє ефективному розподілу і поглинанню ДНК.

Перспективним напрямом оптимізації методу введення ДНК-вакцини є спроба створення такого молекулярного вектора, який доставляв би рекомбінантну плазміду з геном протективного білка тільки до клітин-мішеней, захищав її від впливу нуклеаз крові, а також мав би стимулятор для проникнення ДНК-вакцини в клітини-мішені *(Лебедев Л. Р. та ін., 2001)*.

16.4. МОДУЛЯЦІЯ ІМУННОЇ ВІДПОВІДІ

В сироватках крові інтактних тварин присутні в невеликих титрах аутоантитіла проти ДНК, але вони мало специфічні. Молекули ДНК є слабкими імуногенами внаслідок своєї рухливої конформації в розчині, тому введення в тканини організму рекомбінантних плазмід не впливає на титри антитіл проти ДНК.

Для багатьох антигенів інокуляція 50–100 мкг очищеної плазмідної ДНК з/або без бустерного введення призводить до сильної імунної відповіді на відповідний білок, ген якого входить до складу ДНК-вакцини. В численних дослідах на лабораторних тваринах було встановлено, що кількість рекомбінантної плазміди, необхідної для ДНК-вакцинації, може коливатись у межах 0,001–10 мкг на 1 г маси тіла тварини, що значною мірою визначається вибраним методом та місцем введення плазмідної ДНК. Так, у деяких випадках внутрішньошкірне введення ДНК-вакцини дозволяє отримати імунну відповідь, рівну або більшу, ніж при внутрішньом'язовому введенні, при використанні плазмідної ДНК в концентраціях, в сотні разів нижчих. Це може пояснюватися тим, що шкіра та мембрани слизових оболонок є анатомічними сайтами, в які потрапляють більшість екзогенних антигенів. Лімфоїдні тканини, поєднані зі шкірою, утримують спеціалізовані клітини, які підвищують імунну відповідь. Кератиноцити продукують інтерлейкін-1 (ІЛ-1) та α-фактор некрозу пухлин, які можуть активувати лімфоцити, макрофаги та дендритні клітини. Клітини Лангерганса шкіри переносять антиген від шкіри до лімфатичних вузлів (рис. 16.2). Вони є потенційними активаторами нативних Т-лімфоцитів. Спеціальний підклас Т-лімфоцитів, які циркулюють (епідермотропні лімфоцити) прямують у шкіру і відіграють критичну роль у шкірному імунітеті. Дендритні клітини і макрофаги дерми можуть також захоплювати антиген і ініціювати імунну відповідь. Таким чином, трансфекція за допомогою генної рушниці епідермальних або дермальних клітин in vivo за допомогою ДНК може вважатись ефективним шляхом генної імунізації, що нагадує фізіологічну відповідь на патоген при інфекційному процесі або при використанні живих вакцин. Водночас існують дані *(Deruabin O. et al., 2003)*, що без докладання

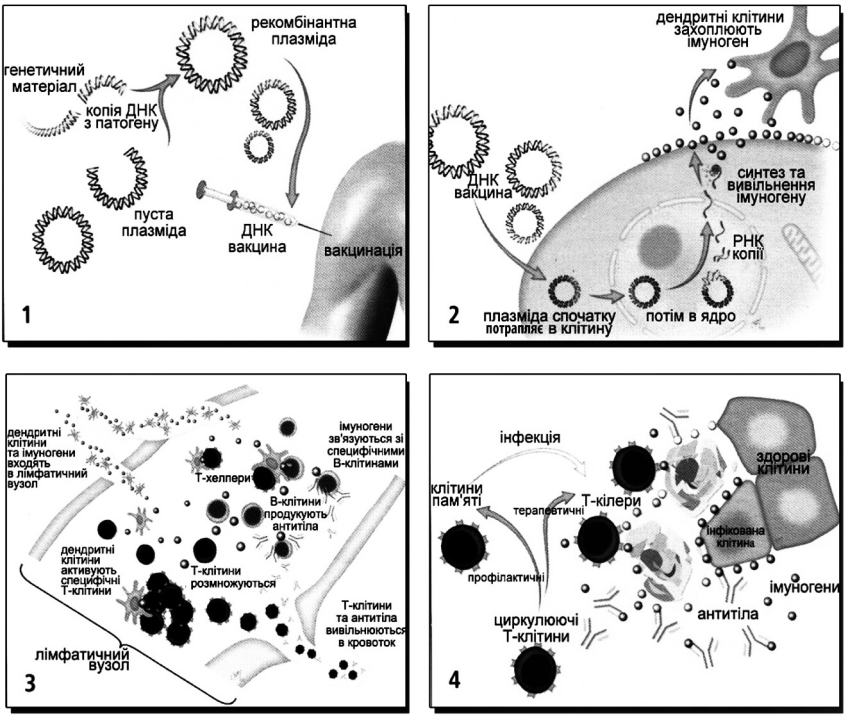


Рис. 16.2. ***Схема модуляції імунної відповіді при внутрішньошкірному введенні ДНК–вакцини***

механічних зусиль для введення ДНК безпосередньо в клітини досить ефективною є внутрішньом'язова імунізація, при якій спостерігається найвищий рівень експресії антигену. Особливістю такого введення є формування клітинного імунітету з утворенням переважно специфічних цитотоксичних лімфоцитів (ЦТЛ), а механізм індукції гуморальної імунної відповіді не визначений до кінця, тому що кількість антигенпрезентуючих клітин у м'язах незначна.

Формування імунної відповіді при введенні ДНК-вакцини має певні особливості. На прикладі вірусу кліщового енцефаліту було показано, що попри на низький рівень експресії вірусних генів при генній імунізації, який становив 10^{-12} г, відбува-

лась індукція імунної відповіді і ефективний захист тварин, тоді як імунізація розчиненими інактивованими білковими вакцинами з концентрацією вірусних білків приблизно 10^{-9} г не викликала утворення кількості антитіл, які б навіть виявлялися в імуноферментному аналізі *(Морозова О.В. та ін., 2000)*. Таким чином, введення ДНК-вакцини призводить до індукції специфічної клітинної та гуморальної відповіді.

16.5. ПІДВИЩЕННЯ ІМУНОГЕННОСТІ ДНК-ВАКЦИН

Для підвищення імуногенності ДНК-вакцин існують різні підходи:

- для одночасної експресії двох генів використовують біцистронні вектори або мультигенекспресуючі плазміди;
- для експресії білка, який секретується, використовують лідерні послідовності, до складу яких можуть входити регуляторні елементи;
- використання тканинно-специфічних промоторів для спрямування експресії генів у певних тканинах;
- використання цитокінів для посилення імунної відповіді можливе або за рахунок використання злитих генів цитокін/антиген, або включенням генів цитокінів до мультигенекспресуючих векторів;
- введення імуностимулюючих послідовностей (ІСП) CpG.

За останні роки значно збільшилася кількість даних про імуностимулюючий ефект бактеріальної ДНК та синтетичних олігонуклеотидів, що містять імуностимулюючі послідовності. У плазмідних ДНК бактерій досить часто зустрічаються CpG динуклеотиди (з частотою 1 на 16 основ, в еукаріотичній ДНК – 1 на 50 основ), CpG фланкуються двома 5′-пуринами (переважно GpA) та двома 3′-піримідінами (переважно GpC або GpT). В прокаріотичній ДНК цей мотив метильований лише на 5 %, в той час як частота метилювання цитозинів в CpG еукаріотів складає 70–90 %. Дослідження показали, що ДНК, яка містить неметильовані CpG мотиви, безпосередньо активує макрофаги, натуральні кілери (НК) та лімфоцити, які починають

секретувати цитокіни, хемокіни та/або імуноглобуліни, а також сприяють розвитку імунних відповідей по типу Th1 (опосередкованих γ-інтерфероном). Кінетичні дослідження показали *(Krieg M. A. et al., 1995)*, що активація В-клітин визначалася вже через 4 години, досягала максимуму через 24 години та повертала до вихідного значення через 48 годин. Аналіз клітинного циклу показав, що CpG олігонуклеотиди активують понад 95 % В-клітин до залучення до клітинного циклу. До того ж вони стимулюють активність натуральних кілерів та захищають лінії В-клітин від інгібіції росту, який викликаний анти-IgM.

ДНК-вакцини повністю відповідають вимогам до засобів специфічної імунопрофілактики і мають багато переваг над іншими типами вакцин. Для їх широкого використання в профілактиці інфекційних хвороб людей і тварин необхідно вирішити дві основні проблеми: визначити найбільш ефективні способи та місця введення ДНК-вакцин і розробити засоби захисту ДНК від деградації всередині клітини.

Контрольні питання

1. Що таке ДНК-вакцина?
2. Як забезпечуються антигенні властивості ДНК-вакцин?
3. Що передбачає генна імунізація?
4. Основні характеристики ДНК-вакцин.
5. Відмінності ДНК-вакцин від класичних?
6. Хімічна будова ДНК-вакцин.
7. Механізм імунної відповіді при застосуванні ДНК-вакцин.
8. Методи та шляхи введення ДНК-вакцин в організм.
9. Як забезпечується модуляція імунної відповіді?
10. Які існують підходи щодо підвищення імуногенності ДНК-вакцин?
11. Перспективи масштабного виробництва ДНК-вакцин.
12. Конкурентоспроможність ДНК-вакцин.

Розділ 17.

БІОТЕХНОЛОГІЯ ОДЕРЖАННЯ ВІТАМІНІВ

Забезпечення потреб людини і сільськогосподарських тварин достатньою кількістю вітамінів є важливою проблемою, яку в сучасних умовах неможливо вирішити лише за рахунок використання традиційних природних вітамінних ресурсів. Крім того, вітаміни, їх коферментні форми і похідні дедалі ширше застосовуються як препарати для лікування різних форм гіповітамінозів і авітамінозів, а також інших захворювань.

Термін «вітаміни» був запропонований Функом ще на початку минулого сторіччя. Сьогодні до вітамінів належить велика група низькомолекулярних органічних сполук різної хімічної природи, які присутні в організмі у незначних концентраціях, і як компоненти ферментних систем, що каталізують відповідні реакції. Вищі тварини і людина в основному потребують одержання готових вітамінів, а серед мікроорганізмів широко розповсюджена здатність до їх синтезу.

До вітамінів включають за прийнятою літерною класифікацією: в групу В (B_1 – тіамін, B_2 – рибофлавін, B_3 – пантотенова кислота, B_5 – нікотинова кислота, B_6 – піридоксин, B_c чи B_9 – фолієва кислота, B_{12} – ціанкобаламін, Н – біотин); вітамін С (аскорбінова кислота); групи А – ретиноли і провітамін А – β-каротин; D (кальциферолі і провітаміни – ергостерин, холестерин); Е (токоферолі); К (нафтохінони); їх коферментні форми та різні інші похідні.

Вітаміни групи В ще називають кофакторними вітамінами, тому що вони входять у структуру коферментів. Ці вітаміни беруть участь в метаболізмі як вищих організмів, так і мікробних клітин. Механізм дії інших вітамінів вивчений недостатньо. Деякі з них, наприклад С, А, D, не функціонують в мікробних клітинах, хоча провітаміни останніх двох – β-каротин і ергостерин – беруть участь у життєдіяльності певних типів мікроорганізмів і ними синтезуються.

Вітаміни одержують як хімічним, так і мікробіологічним синтезом.

Практичне використання здатності мікроорганізмів до біосинтезу вітамінів розпочалося в 30–40-і роки минулого століття. В першу чергу звернули увагу на пивні і пекарські дріжджі як джерело вітамінів — B_1, D_2, С тощо.

Однак широкі перспективи щодо використання мікроорганізмів для одержання вітамінів з'явилися пізніше завдяки виявленню у них здатності до так званого надсинтезу вітамінів, тобто до утворення і накопичення в культурах деяких видів набагато більшої їх кількості, ніж потрібно для виконання каталітичних функцій. На це явище вперше звернув увагу в 30-х роках XX ст. Гільєрмон, який виявив накопичення рибофлавіну в культурі гриба Eremothecium ashbyii. Його роботи показали, що мікроорганізми можуть бути такою собі фабрикою вітамінів, і викликали в усьому світі посилений інтерес до питань їх мікробіологічного синтезу.

Незабаром надсинтетики рибофлавіну були знайдені і серед інших груп мікроорганізмів — дріжджів, бактерій, міцеліальних грибів. Потім була виявлена здатність до підвищеного синтезу інших вітамінів — B_{12} (у актиноміцетів, пропіоновокислих, метанових і деяких інших груп бактерій), каротиноїдів (у гетероталічних мукорових грибів), ергостерину (у деяких сахароміцетів).

У Радянському Союзі були створені виробництва кормового препарату вітаміну B_2 з використанням активного продуцента гриба E. ashbyii, медичного і кормового препаратів вітаміну B_{12} за участю пропіоновокислих і метанових бактерій, β-каротину з грибом Blakeslea trispora і каротиногенними дріжджами, а також одержання дріжджів з підвищеним вмістом ергостерину.

Прогрес у вивченні хімізму біосинтезу вітамінів дав можливість використовувати для їх одержання не тільки активні продуценти, але й мікроорганізми, здатні здійснювати окремі етапи синтезу. Наприклад, при виробництві вітаміну С оцтовокислі бактерії використовуються для трансформації сорбіту в сорбозу.

Завдяки встановленню механізмів вітаміногенезу одержані мутанти продуцентів спроможні до надсинтезу вітамінів, що сприяло створенню більш економічних способів виробництва

продуктів порівняно з існуючими. Є дані про одержання мутантів, які накопичують у середовищі вітаміни B_1, B_6, біотин *(Діканська Е.М., 1984)*.

Крім вітамінів, мікробіологічним шляхом одержують інші речовини вітамінної природи, передусім коферменти. Дедалі ширше їх застосовують у медичній практиці, а мікробіологічний синтез в багатьох випадках єдиний або найбільш прийнятний спосіб їх одержання.

Нові перспективи практичного використання мікроорганізмів як синтетиків вітамінів відкриває використання в мікробіологічній промисловості нетрадиційних видів вуглецевих субстратів (вуглеводні, нижчі спирти і кислоти) – нехарчових субстратів.

Встановлено, що вуглець належить до факторів, задіяних у регуляції процесів вітаміногенезу, і використання вуглецевих субстратів забезпечує підвищення рівня синтезу цілої низки сполук вітамінної природи (рибофлавіну, ергостерину, пантотенової кислоти, ФАД, НАД, вітаміну B_6, коензиму Q, вітаміну B_{12}).

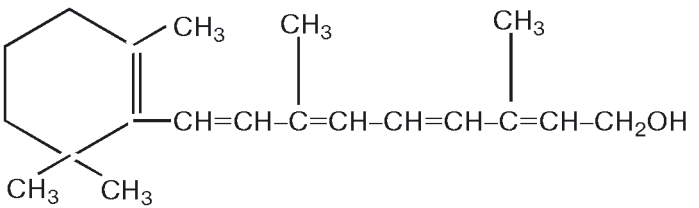
На сьогодні існують такі напрями вирішення проблеми одержання вітамінів мікробіологічним синтезом:

1. Одержання вітамінів і коферментів з використанням мікроорганізмів-продуцентів, в основному надсинтетиків, і спеціальних режимів їх культивування. До цієї категорії належать уже існуючі біотехнології одержання вітамінів B_2, B_{12}, каротиноїдів.
2. Одержання індивідуальних вітамінів і коферментів з біомаси мікроорганізмів, яку вирощують у промислових масштабах на різних вуглецевих субстратах, або використання її як комплексних вітамінних препаратів. Сьогодні, коли в усьому світі існує крупнотоннажне виробництво білка одноклітинних, цей напрям набуває великого значення, тому що мікробна білкова біомаса може слугувати комплексним джерелом вітамінів у тваринництві, а також використовуватися для виділення деяких синтезованих продуцентами білка сполук вітамінної природи.
3. Використання мікроорганізмів для здійснення окремих стадій процесу синтезу вітамінів. Можливості використання для вирощування таких мікроорганізмів нових видів нехарчової сировини розширюють межі цього напряму.

Варто наголосити, що багато вітамінів успішно одержують хімічним синтезом. Однак для деяких вітамінів і багатьох коферментів мікробіологічний спосіб їх одержання поки що залишається єдиним або найбільш ефективним. В деяких випадках мікробіологічний синтез може успішно конкурувати з хімічним, особливо коли немає необхідності виділяти окремі вітаміни, наприклад при використанні їх у тваринництві.

Каротиноїди – це ізопреноїдні сполуки, які синтезуються багатьма пігментними мікроорганізмами із родів Aleuria, Blakeslea, Corynebacterium, Flexibacter, Fusarium, Halobacterium, Phycomyces, Pseudomonas, Rhodotorula, Sarcina та ін. Всього описано майже 500 каротиноїдів.

З однієї молекули β-каротину при гідролізі утворюються дві молекули вітаміну A_1. Це відбувається, наприклад, у кишечнику людини.



ВІТАМІН A_1

Каротиноїди локалізуються у вигляді складних ефірів і глікозидів у клітинній мембрані мікроорганізмів або у вільному стані – в ліпідних гранулах у цитоплазмі. Каротиноїд «ретиналь», наприклад, у галофільного виду Halobacterium halobium сполучений з білком через залишок лізину. Він бере участь в синтезі АТФ завдяки генерації трансмембранного потенціалу. В цілому основна функція каротиноїдів – захисна. Їхньому біосинтезу в клітинах сприяє світло.

Як продуценти каротиноїдів можна використовувати бактерії, дріжджі, міцеліальні гриби. Найчастіше використовують зигоміцети Blakeslea trispora і Choanephora conjucta. При спільному культивуванні вони можуть утворювати 3–4 г каротину на 1 л середовища.

Поживні середовища для них досить складні і включають джерела вуглецю, азоту, вітамінів, мікроелементів і спеціальних стимуляторів. Останні доцільно вносити в культуральне середовище в кінці трофази.

Спочатку штами вирощують порізно, а потім – спільно при температурі 26 °С і посиленій аерації з подальшим перенесенням в основний ферментер. Умови культивування зберігаються. Тривалість ферментації – 6–7 днів. Каротиноїди вилучають ацетоном (можна будь-яким іншим полярним розчинником) і переводять у неполярний розчинник. У випадках вилучення білково-каротиноїдних комплексів використовують поверхнево-активні речовини в концентрації 1–2 %. З метою очищення і більш тонкого розділення гомологів використовуються методи хроматографії або зміни розчинників. Вітамін A_1 порівняно легко можна одержати з β-каротину при гідролізі.

У разі виготовлення каротиновмісної біомаси для згодовування тваринам і птиці можливе поєднання використання її з вітаміном А чи без нього. Для застосування вітаміну А з лікувальною метою його виготовляють в капсулах для перорального вживання.

ВІТАМІН D — це група споріднених сполук, в основі яких знаходиться ергостерин, що виявлений в клітинних мембранах еукаріот. Тому, наприклад, пекарські чи пивні дріжджі використовують для одержання ергостерину як провітаміну з антирахітичною дією. Вміст ергостерину в дріжджових клітинах коливається у межах 0,2–11 %.

За нестачі в організмі гормона 1,25 — дігідроксіхолекальциферолу, попередником якого є вітамін D_3, у дітей розвивається рахіт (аналогом рахіту в дорослих є остеомаляція).

Трансформація ергостерину у вітамін D_2 (кальциферол) відбувається під впливом ультрафіолетового опромінення. При цьому розривається зв'язок в кільці (позиції 9, 10) і утворюється подвійний зв'язок у бічному ланцюзі (позиції 22, 23). Останній гідрований у вітаміні D_3 (холекальциферол). Фізіологічна активність обох вітамінів (D_2 і D_3) однакова.

Крім дріжджів продуцентами ергостерину можуть бути міцеліальні гриби — аспергіли і пеніцили, в яких міститься 1,2–2,2% ергостерину. Виявлено, що поліенові антибіотики, які

діють на клітинну мембрану дріжджів, помітно стимулюють вміст ергостерину в біомасі.

При одержанні ергостерину у виробничих умовах можна виділити такі **етапи**: розмноження вихідної культури і накопичення інокулята; ферментація; сепарування клітин; опромінення клітин ультрафіолетовими променями; висушування і упакування цільового продукту.

Так, стосовно дріжджів інокулят одержують на середовищах, які забезпечують повноцінний розвиток клітин. Після цього основне середовище з ацетатом (активатором біосинтезу стеринів), яке містить знижену кількість азоту, але збагачене джерелом вуглецю (високе значення C:N), засівають порівняно великим об'ємом інокулята. Культивування дріжджів (ферментацію) проводять при температурі, наближеній до максимальної для конкретного штаму, і належній аерації (2 % O_2 в газовій фазі). Через 3–4 доби, залежно від ростових характеристик і біосинтетичної активності культури, клітини сепарують і піддають вакуум-висушуванню. Потім сухі дріжджі опромінюють ультрафіолетовими променями – УФП (довжина хвилі 280–300 нм) протягом оптимального часу за необхідної температури і з урахуванням домішок.

Опромінення дріжджів можна проводити до сепарації клітин у тонкому шарі 5 % суспензії, враховуючи невелику проникну здатність УФП.

Опромінені сухі дріжджі використовують у тваринництві. У промисловості їх випускають під назвою «кормові гідролізні дріжджі, збагачені вітаміном D_2». У такому препараті міститься не менше 46 % сирого білка, незамінні амінокислоти (лізин, метіонін, триптофан) і 5000 МО вітаміну D_2/г.

У випадку одержання кристалічного вітаміну D_2 клітини продуцента гідролізують соляною кислотою при температурі 110 °С. Потім температуру знижують до 75–78 °С і додають етанол. Суміш фільтрують при 10–15 °С і масу, яка залишилася після фільтрації, промивають водою, висушують, подрібнюють, нагрівають до 78 °С і двічі обробляють потрійним об'ємом етанолу. Спиртові екстракти об'єднують і упарюють до 70 %-го вмісту сухих речовин. Одержаний «ліпідний концентрат» обробляють розчином їдкого натрію. Ергостерин кристалізується з

неомиленої фракції концентрату при 0 °С. Його можна очистити повторними перекристалізаціями. Кристали висушують, розчиняють у сірчаному ефірі, опромінюють УФП, ефір відганяють, а розчин вітаміну D_2 концентрують і кристалізують.

«Кислотний фільтрат» зазвичай упарюють до 50 %-го вмісту сухих речовин і використовують як концентрат D-вітамінів. Виробляють також масляний концентрат вітаміну D_2.

Рибофлавін або ВІТАМІН B_2. Міститься в клітинах різних мікроорганізмів, будучи коферментом у складі флавопротеїнів (перш за все відповідних ферментів класу оксидоредуктаз – ФМН, ФАД). Продуцентами рибофлавіну (флавопротеїнів) можуть бути бактерії, дріжджі і нитчасті гриби. Однак найбільш перспективними є штами, які утворюють на рідких середовищах 0,5 г і більше рибофлавіну в 1 л середовища. До таких організмів належать Ashbyii gossypii, Eremothecium ashbyii і Candida guilliermondii. Враховуючи мінливість активних продуцентів названих видів за здатністю синтезувати вітамін B_2, необхідний систематичний підтримувальний відбір культур у процесі їх експлуатації на виробництві. Зазвичай активні продуценти перших двох видів формують яскраво-оранжеві колонії на агаризованих середовищах.

Методами генетичної інженерії вдалось одержати штам сінної палички, яка утворює приблизно 6 г рибофлавіну в 1 л культурального середовища, що містить патоку, білково-вітамінний концентрат і його гідролізат.

Високий вихід рибофлавіну у E. ashbyii корелює з азотом пуринів та іншими азотистими джерелами, вміст яких у середовищі має бути достатнім. Як джерело вуглецю використовують глюкозу або цукрозу, дріжджовий або кукурудзяний екстракт, соєву муку, масла (жири).

Рідкі поживні середовища для одержання інокуляту і для основної ферментації можуть дещо відрізнятися між собою. Наприклад, для одержання посівного матеріалу відоме середовище, яке містить цукрозу, пептон, кукурудзяний екстракт, калію дигідрофосфат, магнію сульфат, рослинну олію. Час вирощування продуцента на цьому середовищі — 2 доби при температурі 27–30 °С (залежно від штаму). Ферментаційне середовище

зазвичай включає кукурудзяну і соєву муку, цукрозу, кукурудзяний екстракт, калію дегідрофосфат, кальцію карбонат, натрію хлорид і ненасичений жир.

Зазвичай тривалість ферментації становить 5 діб при pH 5,5–7,7. Після використання цукрози (приблизно через 30 годин) починає помітно накопичуватися вітамін B_2, спочатку — в міцелії, а потім — у культуральній рідині.

Для використання в годівлі тварин всю біомасу висушують і в одержаному сухому продукті вологістю 8 % міститься 1,5–2,5 % рибофлавіну, 20 % білка, тіамін, нікотинова кислота, піридоксин, ціанкобаламін, мікроелементи та інші речовини.

У випадку високих вихідних показників за рибофлавіном вітамін можна виділяти індивідуально і разом із синтетичним рибофлавіном використовувати в медицині.

Для Candidia guilliermondii дуже важливо регулювати вміст заліза в поживному середовищі, оптимальна концентрація якого коливається в середньому від 0,005 до 0,05 мкг/мл. При цьому певні штами дріжджів можуть утворювати за 5–7 днів понад 0,5 г/л вітаміну. Однак для промислового виробництва рибофлавіну перевагу надають більш продуктивним видам і штамам грибів – E.ashbyii і Ashbyii gossypii.

Аскорбінова кислота, або ВІТАМІН С. Це протицинготний вітамін, який міститься у всіх вищих рослинах і тваринах. Тільки людина і мікроби не синтезують її, але людям вона вкрай необхідна, а мікроби не потребують цього вітаміну. Однак певні види оцтовокислих бактерій синтезують напівпродукт аскорбінової кислоти — L-сорбозу. Таким чином, весь процес одержання аскорбінової кислоти є змішаним, тобто хіміко-ферментативним.

Біологічна стадія процесу каталізується мембранозв'язаною поліолдегідрогеназою, а остання (хімічна) включає послідовно такі етапи: конденсація сорбози з діацетоном і одержання діацетон-L-сорбози; окислення останньої до діацетон-2-кето-L-гулонової кислоти, яку в подальшому піддають гідролізу з одержанням 2-кето-L-гулонової кислоти; останню піддають енолізації з наступною трансформацією в L-аскорбінову кислоту (рис. 17.1).

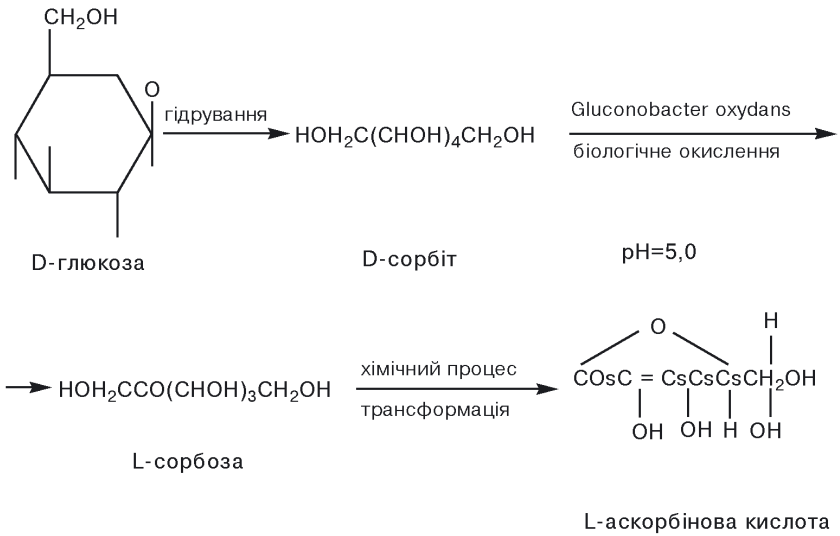


Рис. 17.1. ***Схема хіміко-ферментативного методу одержання аскорбінової кислоти***
(за Єліновим Н.П., 1995)

Ферментацію G.oxydans проводять на середовищах, які містять сорбіт (20 %), кукурудзяний або дріжджовий екстракт, при інтенсивній аерації (8–10 г O_2/л/год). Вихід L-сорбози може сягнути 98 % за одну–дві доби. При досягненні культурою log-фази можна додатково вводити в середовище сорбіт, доводячи його концентрацію до 25 %. Також установлено, що G.oxydans може окислювати і вищі концентрації поліспирту (30–50 %), який утворюється на останніх стадіях процесу. Ферментацію бактерій проводять в періодичному або безперервному режимі. Доведена можливість одержання L-сорбози із сорбіту за допомогою іммобілізованих у поліакриламідному гелі бактеріальних клітин.

Аскорбінову кислоту використовують як антиоксидант у медицині, а також у харчовій промисловості.

Ціанкобаламін, або ВІТАМІН B_{12}. Одержують тільки мікробіологічним синтезом. Його продуцентами є прокаріоти і перш за все пропіоновокислі бактерії, які в природних умовах утворюють цей вітамін. Мутанти Propionibacterium shermanii

М-82 і Pseudomonas denitrificans М-2436 продукують на рідкому середовищі до 58–59 мг/л ціанкобаламіну.

Враховуючи важливу функцію вітаміну в організмі людини (він є протианемічним фактором), його світове виробництво досягло 10 т на рік, з яких 6,5 т витрачають на медичні потреби, а 3,5 т — у тваринництві (Єлінов Н.П., 1995).

Вітчизняне виробництво ціанкобаламіну базується на використанні P. freudenreichii Var. shermanii, яка культивується у періодичному режимі без доступу кисню. Ферментативне середовище зазвичай містить глюкозу, кукурудзяний екстракт, солі амонію і кобальту. pH близько 7,0 підтримують додаванням NH_4OH. Тривалість ферментації 6 діб. Через 3 доби у середовище додають 5,6–диметилбензімідазол — попередник вітаміну B_{12} і продовжують ферментацію ще 3 доби.

Ціанкобаламін накопичується в клітинах бактерій, тому операції з виділення вітаміну полягають у наступному: сепарування клітин, ектрагування водою при pH 4,5–5,0 і температурі 85–90 °С за присутності стабілізатора (0,25 %-й розчин натрію нітриту). Екстракція відбувається протягом години, після чого водний розчин охолоджують, нейтралізують розчином NaOH, додають коагулянти білка (хлорид заліза тривалентного і алюмінію сульфату) з подальшою фільтрацією. Фільтрат упарюють і додатково очищують, використовуючи методи іонного обміну і хроматографії, потім проводять кристалізацію вітаміну при температурі 3–4 °С з водно-ацетонового розчину.

Кристалічний ціанкобаламін можна одержати за допомогою резорцину або фенолу, що утворюють з ним аддукти, які порівняно легко розкладаються на складові компоненти.

При реалізації даного біотехнологічного процесу потрібно зважати на високу чутливість до світла вітаміну B_{12}. Через це усі операції необхідно проводити в умовах затемнення (або при червоному світлі).

На ацетонобутиловій або спиртових бардах з додаванням солей кобальту і метанолу одержують кормовий препарат $КМБ_{12}$ – концентрат, який містить вітамін B_{12} та інші ростові біологічно активні речовини. Біооб'єктом є змішана культура метаногенних бактерій.

Контрольні питання

1. Якими методами одержують вітаміни?
2. У якому випадку мікробіологічний синтез вітамінів переважає над хімічним?
3. Які існують напрями вирішення проблеми одержання вітамінів мікробіологічним синтезом?
4. Які продуценти та поживні середовища використовуються для одержання каротиноїдів?
5. Як отримують вітамін D?
6. Які етапи біотехнології отримання ергостерину у виробничих умовах?
7. Яким методом отримують рибофлавін (вітамін B_2)?
8. Які особливості методу отримання аскорбінової кислоти?
9. Яким синтезом отримують вітамін B_{12}?
10. Які мікроорганізми є продуцентами вітаміну B_{12} та склад поживного середовища для їх культивування?

Розділ 18.

БІОТЕХНОЛОГІЇ ОДЕРЖАННЯ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ ПРОДУКТІВ НА ОСНОВІ МЕТАЛОКОМПЛЕКСНИХ СПОЛУК

Розробка наукових основ створення і використання біологічно активних металокомплексних сполук передбачає одержання фундаментальних знань щодо механізмів регулювання біохімічних окисно-відновних процесів із застосуванням комплексів перехідних металів з біолігандами. При конструюванні біохелатів використовуються принципи одержання ефективно діючих біонеорганічних комплексів, які функціонують у клітинах in vivo. Є можливості моделювати властивості складних біокомплексів, шляхом створення спрощених аналогів, які характеризують найбільш суттєві ознаки вихідних сполук. Для цього необхідне проведення порівняння створюваного біокомплексу і моделі з використанням структурного і (або) функціонального підходу при конструюванні, тобто модель за структурою має бути аналогічною біокомплексу, що моделюється, чи його головного активного компонента; або модель, яка не має структурної ідентичності з вихідним біокомплексом, здатна виконувати аналогічні біологічні функції.

При створенні аналогів можливе одержання структур, які за своїми характеристиками перевищують вихідні біокомплекси, оскільки останні синтезуються в клітинах при невисоких концентраціях реагуючих речовин, температурах, тиску, у вузькому інтервалі pH. При конструюванні модельних систем є можливість для широкого варіювання цих параметрів.

Сконструйовані моделі біокомплексів спроможні виконувати різноманітні біологічні функції і мати значні переваги стосовно структур, утворених in vivo. В процесі конструювання біомоделей перш за все необхідно використовувати сучасні дані про шляхи утворення і транспорту біосистем, які моделюються,

проформи, у яких вони елімінуються з оточуючого середовища, транспортуються крізь мембрани клітин і досягають кінцевого пункту, де утворюють відповідні біокомплекси. Біокомплекси металів – це їх координаційні сполуки, які виконують певні функції в організмі.

Металопротеїни – комплекси металів з білками, які відіграють важливу роль у накопиченні, транспорті й активації молекулярного кисню з використанням його в різних окислювальних процесах. Під час метаболізму енергетичні потреби клітин задовольняються за рахунок енергії, яка вивільнюється при окисленні біосполук за участю кисню.

Одним з перспективних напрямів досліджень є моделювання ферментних систем, які беруть участь в окисно-відновних процесах, для вивчення механізмів біоактивації молекулярного кисню. Окисно-відновні процеси в організмі каталізуються ферментами-оксидоредуктазами.

Для вищих форм життя велике значення має молекулярний кисень, реакція відновлення якого щодо води – основа біоенергетики клітин. Молекулярний кисень в основному стані є бірадикалом, у якого два неспарених електрони з паралельними спінами знаходяться на різних розпушуючих π_{gx} і π_{gy} молекулярних орбіталях. Саме тому молекулярний кисень є відносно інертною молекулою, бо за законом зберігання спіну в результаті взаємодії O_2 з речовинами, якими заповнені орбіталі, повинен з'явитися бірадикал, але для такої реакції потрібна висока енергія активації (заборона за спіном). Таким чином, органічні молекули існують у кисневому оточенні завдяки забороні за спіном. Спінову заборону для реакцій триплетного кисню можливо подолати послідовним додаванням електронів:

$$O_2 + e \rightarrow O^{\bullet-}_2 ;\ O^{\bullet-}_2 + H^+ \rightarrow HO^{\bullet}_2 ;\ HO^{\bullet}_2 + H^+ + e \rightarrow H_2O_2.$$

Крім цього, O_2 активно взаємодіє з органічними радикалами, у яких є неспарені електрони. Ці реакції мають важливе значення для клітин у ланцюгових радикальних процесах перекисного окислення ліпідів (ПОЛ). Кисень не вступає в прямі неферментативні реакції з органічними речовинами, але в клітинах є сформовані високоспеціалізовані ферментні системи, які беруть участь у відновленні кисню шляхом перенесення на

нього одного, двох або чотирьох електронів. Ферменти, які відновлюють O_2, є металопротеїдами, що мають активний центр з одним або декількома атомами перехідних металів (заліза, цинку, міді, марганцю, кобальту, молібдену). Ферментний контроль реакцій окислення за участю кисню зумовлюється слабкими внутрішніми магнітними збурюваннями та перемішуванням спінових станів діючих речовин у процесі окислення під впливом обмінних взаємодій з парамагнітними іонами металів. Метали активного центру виконують роль донорів електронів для кисню.

Процеси енергетичного забезпечення життєдіяльності клітин еукаріот підтримуються завдяки окисно-відновним реакціям за участю багатьох ферментних систем під контролем спінових ефектів. Проте навіть за умов високої специфічності процесів окислювального фосфорилювання в мітохондріях, або мікросомального окислення за участю монооксигеназ у всіх таких реакціях, де беруть участь металопротеїди і кисень, відбувається утворення активних метаболітів кисню — супероксиданіонрадикалу, гідроксилрадикалу, пероксиду водню, синглетного кисню та продуктів радикальних окислювальних реакцій: перекисних сполук, дієнових кон'югатів, малонового диальдегіду та інших.

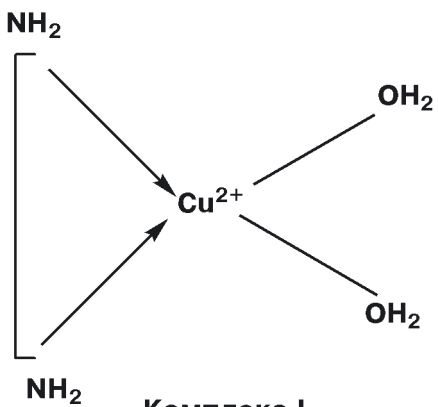
У клітинах для захисту від токсичних метаболітів кисню і продуктів їх діяльності сформовані високоспеціалізовані системи ферментних антиоксидантів. Розрізняють чотири лінії ферментного захисту клітин від активних метаболітів кисню: 1) супероксиддисмутаза (СОД); 2) глутатіонпероксидаза (ГПО) і каталаза (КТ); 3) ГПО і глутатіонтрансфераза; 4) глутатіонтрансфераза, формальдегіддегідрогеназа, гліоксилаза, хінонредуктаза, епоксигідратаза.

Для окремих ферментів антиоксидантного захисту характерні специфічність дії клітинної і органної локалізації і використання як каталізаторів елементів Zn, Cu, Fe, Mn, Se. З метою зменшення токсичного впливу активних метаболітів кисню в експериментальній терапії використовують антиоксидантні ферменти СОД і каталазу. При введенні препарату СОД спостерігається накопичення пероксиду водню, що призводить до інактивації ферменту. При спільному введенні каталази, яка ферментативно перетворює токсичний H_2O_2 на нешкідливі H_2O і O_2, СОД не втрачає активності навіть після дисмутації більше

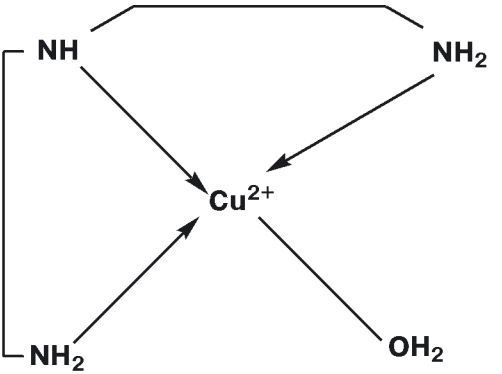
10^3 радикалів O_2^- на моль ферменту. Оскільки супероксидрадикал частково інгібує КТ, стає зрозумілим, що спільне використання комплексу антиоксидантних ферментів значно збільшує їх ефект і попереджує утворення найбільш токсичного гідроксильного радикалу.

Одним з перспективних напрямів є використання в клінічній практиці препаратів СОД і КТ, що є ефективним при різних патологіях, пов'язаних з надлишковою індукцією високотоксичних активних форм кисню. Для попередження швидкої інактивації ферменту при потраплянні в біорідини є спроби використання іммобілізованих форм ферменту, що значно збільшує тривалість дії біокаталізатора. Другим практичним напрямом є моделювання низькомолекулярних комплексів антиоксидантних металоферментів, які є високоефективними каталізаторами і, на відміну від аналогів, можуть мати набагато вищу активність.

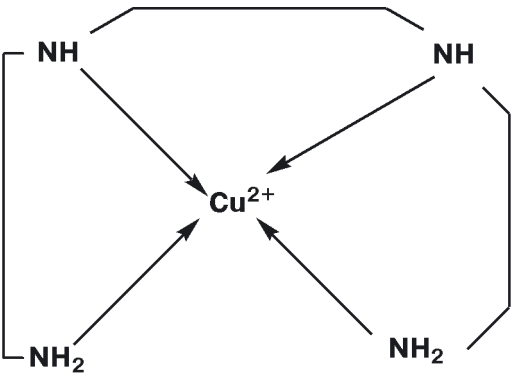
Комплекси металів з біолігандами – одна із форм найбільш наближених до оригіналу моделей металоферментів. Крім того, для низькомолекулярних моделей не існує проблеми щодо переносників і транспорту. Одним з таких прикладів є моделювання каталазної активності хелатами міді (II) з поліамінами. Так, для прояву каталітичної активності комплексу в ньому мають бути два вільних координаційних місця, натомість як металохелати, у яких усі координаційні місця зайняті, не проявляють специфічної активності.



Комплекс I



Комплекс II



Комплекс III

Моделювання дії каталази хелатними комплексами міді (II):

$CuL^{n+} + H_2O_2 \rightarrow CuL^*H_2O_2 \rightarrow CuL + 1/2\ O_2 + H_2O$ (L-ліганд).

Активність комплексів: I >> II > III ~ 0.

При координації лігандів з металами, які мають окисні або відновні властивості, окисно-відновні властивості самих лігандів можуть змінюватися. Наприклад, якщо метал є окислювачем, то координації його з лігандом сприяє окисленню ліганду. Сам факт координації, при якій відбувається зміщення електронної щільності ліганду в бік льюісової кислоти (металу), сприяє збільшенню окислювальної здатності комплексних часточок.

Практичний інтерес мають системи, в яких ліганд скоординований з іоном металу, що легко відновлюється. Відновлення металу в таких системах супроводжується перетворенням ліганду у високореакційноздатний вільний радикал. Прикладом реакцій такого типу є каталіз іонами Cu^{2+} автоокислення аскорбату. Окислення аскорбату, яке каталізується іонами металів та іонами хелатованих металів, відрізняється. У присутності хелатоутворюючих лігандів механізм дії міді (II) інший. В цьому випадку швидкість реакції не залежить від концентрації кисню, а відновлення останнього відбувається не до пероксиду водню, а до води. Тобто введення ліганду суттєво змінює перебіг реакції. В присутності деяких лігандів каталітична активність іону металу збільшується, що, можливо, пов'язане зі збільшенням його окисно-відновного потенціалу. Але необхідно враховувати, що утворені комплекси можуть бути прооксидантами і порушувати окисно-відновний гомеостаз в організмі.

З урахуванням вищезгаданих відомостей про роль, стан і форми надходження біометалів у живих організмах у НДІ екології і біотехнології БДАУ проводяться багаторічні дослідження щодо створення металовмісних препаратів для потреб ветеринарної медицини і тваринництва.

Один з напрямів досліджень — створення ефективних препаратів для профілактики і лікування анемії молодняка сільськогосподарських тварин. Високий рівень смертності поросят раннього віку залишається однією з актуальних проблем сучасного свинарства.

Важлива роль при переході організму від пренатального до постнатального розвитку, що характеризується зміною кисневого режиму і виникненням стану гіпероксії, належить системі антиоксидантного захисту (АОЗ) клітин, які регулюють рівень активних метаболітів кисню: супероксидного аніонрадикалу, гідроксильного радикалу, пероксиду водню, синглетного кисню та ін. За фізіологічних умов у організмі постійно підтримується динамічна рівновага між прооксидантними і антиоксидантними системами. Надмірне підсилення вільнорадикального окислення субстратів на фоні пригнічення систем антиоксидантного захисту призводить до розвитку оксидативного стресу, який є одним з універсальних механізмів виникнення та розвитку

багатьох патологічних процесів. У новонароджених поросят посилення інтенсивності перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) під впливом активних метаболітів кисню супроводжується загостренням анемічного стану. Для попередження анемії поросятам 3–4-денного віку внутрішньом'язово вводять препарати заліза (залізодекстран, фероглюкін-75, суїферон, суїферовіт тощо). Однак це переважно однокомпонентні препарати імпортного виробництва, які містять тільки залізо, а в препаратах, у яких містяться Cu, Co тощо, ці мікроелементи знаходяться в неорганічній формі, яка менш ефективна, ніж комплексні, хелатні сполуки мікроелементів.

В НДІ екології і біотехнології БДАУ розроблені технології і одержані препарати, як однокомпонентні — «Ферокол» (аналог імпортних «Залізодекстран», «Урсоферан»), так і полікомпонентні: «Куфер», який містить залізо і мідь, «Біомет» з цими ж елементами і кобальтом, «Полімет» (Fe, Cu, Co, Zn), «Полімет–Селен» (Fe, Cu, Co, Zn + Se), «Вітамет» (Fe, Cu, Co, Zn + комплекс вітамінів).

Адекватне забезпечення новонароджених поросят біодоступним, нетоксичним залізом є основним чинником у профілактиці залізодефіцитної анемії. Для нормалізації рівня гемоглобіну та відновлення запасів заліза в організмі потрібне введення необхідної кількості цього елемента в нетоксичній формі, яка легко засвоюється. Щоб правильно оцінити ефективність, безпечність та допустимість застосування залізовмісних препаратів слід ураховувати особливості метаболізму цього біоелемента в організмі тварин.

Залізо є обов'язковим і незамінним компонентом білків та ферментних систем організму, сприяє підтримці необхідного рівня системного і клітинного метаболізму, окисно-відновного гомеостазу в організмі в цілому. Водночас вільне, нехелатоване залізо каталізує окисно-відновні реакції, сприяє утворенню високотоксичних вільних радикалів, які спричиняють пероксидне пошкодження ліпопротеїдних клітинних мембран, порушення їхньої функції та загибель клітин.

Іони заліза відіграють важливу роль у взаємоперетвореннях в організмі активних метаболітів кисню і насамперед найбільш реакційно-здатного гідроксильного радикалу $^{\bullet}$OH. При взаємо-

дії Fe з пероксидом водню продуктом реакції є $^{\bullet}OH$ (реакція Фентона):

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + HO^- + {}^{\bullet}OH.$$

Гідроксильні радикали утворюються також у реакції взаємодії пероксиду водню з супероксиданіонрадикалом ($O^{\bullet-}_2$), яку каталізують іони Fe^{2+} (реакція Габера-Вейса):

$$H_2O_2 + O^{\bullet-}_2 \quad HO^- + {}^{\bullet}OH + {}^1O_2.$$

Таким чином, залізо — необхідний елемент для живих клітин і водночас є потужним прооксидантом. Різноманітність ефектів заліза скоординована, що сприяє утворенню спеціалізованих молекул для зв'язування заліза, його транспортування та депонування в розчинних, нетоксичних для організму формах (трансферин, феритин). Одночасно сформувалась і регуляція гомеостазу заліза, яка дозволяє підтримувати основні життєво важливі клітинні функції та уникнути можливих пошкоджень.

Отже, при конструюванні залізовмісних препаратів для профілактики і лікування анемій слід ураховувати як зазначені обставини, так і сучасні вимоги до ін'єкційних препаратів такого напряму, які повинні відповідати наступним критеріям: форма заліза має бути такою, яка може ефективно використовуватися організмом тварин для біосинтезу гемоглобіну при одноразовому його застосуванні, сумісною з біорідинами та тканинами тіла, нетоксичною на всіх етапах транспортування в організмі тварин, з відповідною в'язкістю, у фізіологічних умовах не мати прооксидантної дії та бути стабільною при тривалому зберіганні.

Препарати, створені в НДІ екології та біотехнології БДАУ задовольняють усі вимоги. В основу конструювання нетоксичної форми заліза нами було покладено будову молекули білка феритину, який бере участь у депонуванні в організмі заліза. У нещодавних дослідженнях японських вчених феритин намагалися використовувати з наступною метою. Як відомо, у деяких регіонах світу в продуктах харчування є дефіцит заліза в легкозасвоюваній організмом формі. Ця проблема надто актуальна для країн Південно-Східної Азії, де головний продукт харчування — рис. Для створення сортів рису, здатного до підвищеного накопичення заліза, проведена трансгенна операція. Із сої ви-

ділено ген феритину з підвищеною активністю, який було вбудовано в геном рису. Встановлено, що в зерні трансформованих рослин накопичення феритину втричі більше, ніж у зерні рослин вихідних ліній. Інший, оригінальний біотехнологічний підхід, в якому за основу взято будову феритину, використаний у вітчизняних дослідженнях. З тканин піддослідних тварин було виділено цей залізодепонуючий білок, вивчені у його складі форми заліза та властивості останнього. В модельних експериментах проведені та визначені умови формування кластерних сполук заліза, які характерні для нативної структури феритину.

На основі цих результатів розроблена технологія одержання залізовмісних препаратів. В отриманих препаратах залізо знаходиться у формі захищеного вуглеводною оболонкою ядра, що містить активну речовину у вигляді кристалітів (великих кластерів) гідроксиду заліза, подібних до тих, що знаходяться у складі природного залізодепонуючого білка феритину, і за фізіологічних умов не мають прооксидантної дії. Крім заліза, до складу препаратів уведено біометали (мідь, кобальт, цинк, селен), присутність яких необхідна для процесів гемопоезу, і які є простетичними групами антиоксидантних ферментів (церулоплазміну, Cu-Zn-супероксиддисмутази, глутатіонпероксидази).

Метали існують у вигляді хелатів з амінокислотами, що підвищує доступність металів у процесі їх метаболізму в організмі. Одним з основних факторів, що визначають спорідненість органічних молекул до іонів металів, є хелатний ефект. Під цим терміном розуміють чітко виражену здатність органічної молекули зв'язувати іони металів за наявності в ній двох або більшої кількості груп, здатних до хелатування.

Хелатоутворення часто змінює хімічні і фізичні властивості вихідних реагентів і відіграє значну роль у біології. Ефект хелатоутворення має місце при створенні таких важливих металовмісних молекул, як порфірини, хлорофіл, кальцієзв'язувальні білки тощо. Функціональна активність металів-біотиків у організмі, їх участь у процесах метаболізму пов'язані зі здатністю біометалів утворювати хелатні комплекси.

Комплекси метал-біоліганд мають високу біологічну активність, завдяки чому досягається їх висока засвоюваність, а за рахунок поступового розриву хелатних зв'язків – пролонгованість

дії. Після розщеплення комплексу як метали, так і біоліганди (амінокислоти та ін.) ефективно використовуються організмом у процесах метаболізму. Проведені дослідження вказують на принципову можливість використання металокомплексних каталізаторів для регулювання важливих електронтранспортних процесів клітини (для регулювання редокс-процесів клітини). Використання металохелатних препаратів дозволяє значно зменшувати дози мікроелементів у раціонах, ефективно вирішити екологічні та економічні проблеми сільськогосподарского виробництва. Широкому використанню залізодекстранових препаратів в комплексі з металохелатними сполуками перешкоджають технологічні труднощі одержання таких комплексних препаратів.

В НДІ екології і біотехнології БДАУ протягом останніх років розробляються технології одержання полікомпонентних препаратів, які містять біоелементи (залізо, мідь, кобальт) в комплексі з біолігандами. Вибір цих мікроелементів у створених препаратах пояснюється їх важливою роллю в процесах гемопоеза, обмінних і окисно-відновних процесах організму.

Залізо є компонентом важливих залізовмісних білків, у тому числі ферментів, у складі яких знаходиться в гемовій і негемовій формах. Основна маса заліза у вигляді гему включена в гемоглобін. Залізо входить до складу цитохрома Р-450, цитохромів дихального ланцюга мітохондрій, важливих антиоксидантних ферментів (каталази). Залізо необхідне не тільки для забезпечення організму киснем, а й функціонування дихального ланцюга, синтезу молекул АТФ, процесів метаболізму і детоксикації різних сполук, синтезу ДНК. Найбільш виражена форма прояву дефіциту заліза – залізодефіцитна анемія.

Мідь відіграє важливу роль у процесах біосинтезу гему і гемоглобіну. Тому дефіцит міді, як і заліза, призводить до виникнення анемії. Мідь – структурний елемент ферменту дихального ланцюга мітохондрій — цитохромоксидази, яка бере участь у процесах генерації енергії у клітинах. Важливу роль відіграє мідь в антиоксидантному захисті організму, вона поряд з цинком входить до складу тканевого антиоксидантного ферменту — супероксиддисмутази (СОД) й основного антиоксидантного білка плазми крові – церулоплазміну (ЦП). Цинк входить до структури активного центру багатьох металоферментів. Він

необхідний для функціонування ДНК- і РНК-полімераз–ферментів, які беруть участь у процесах передачі генетичної інформації і біосинтезу білків, ферменту ключової реакції біосинтезу гему, який входить до складу гемоглобіну; цитохромів дихального ланцюга мітохондрій, цитохрому Р-450, каталази, інших важливих ферментів.

Цинк є обов'язковим компонентом одного з основних антиоксидантних ферментів (Zn, Cu) — супероксиддисмутази, бере участь в індукції біосинтезу важливих захисних білків клітини – металотіонеінів, тому цей елемент належить до антиоксидантів репаративної дії. Цинк відіграє надзвичайно важливу роль у процесах реалізації гормональних функцій в організмі, впливає на продукцію і функціонування інсуліну. Цинк необхідний для функціонування тимусу і забезпечення нормального стану імунної системи організму, він є компонентом ретинолтранспортного білка, поряд з вітамінами А і С перешкоджає імуносупресії, стимулює синтез антитіл. Цинк відіграє важливу роль у протеїновому, вуглеводному і ліпідному обмінах. Характерною ознакою нестачі цинку у молодняка свиней є зроговіння шкіри, прояви паракератозу, зниження продуктивності, у хрячків затримується розвиток сім'яників.

Кобальт — необхідний компонент вітаміну B_{12}. Важливе значення має здатність вітаміну B_{12} регулювати процеси кровотворення, що пов'язано з його участю в синтезі пуринових і піримідинових основ нуклеїнових кислот, накопиченням в еритроцитах сірковмісних сполук. Роль вітаміну B_{12} в процесах метаболізму визначається його участю (у складі кобаламінових ферментів) в білковому, ліпідному і вуглеводному обмінах. Селен є кофактором ферменту йодотиронін-дейодинази, входить до складу такого важливого ферменту антиоксидантного захисту клітин, як глутатіонпероксидаза.

Селен у створених препаратах знаходиться в комплексі з амінокислотами, оскільки ця форма менш токсична, ніж неорганічні форми селену.

Залізо – важливий елемент для всіх організмів, але надлишок його призводить до негативних наслідків. Значна кількість заліза в тканинах знаходиться у вигляді гемових білків, а до негемового заліза належать деякі залізосірчані білки, а також біл-

ки, здатні депонувати залізо (феритин, гемосидерин), трансферин та незначна кількість низькомолекулярних комплексів заліза з окремими лігандами: цитратом, деякими амінокислотами, фосфатними сполуками та ін. Ці комплекси є причиною ураження тканин продуктами вільнорадикального окислення ліпідів, білків та інших речовин.

Результати багатьох досліджень вказують на те, що однією з перших реакцій організму на будь-яку стресову ситуацію (включаючи оксидативний стрес), є збільшення інтенсивності процесів перекисного окислення ліпідів у мембранних структурах клітини. Основну роль у регуляції антиоксидантних захисних систем клітини, які нейтралізують негативний вплив як токсикантів, так і метаболітів, утворених під їх впливом, відіграють ферментні системи метаболізму і детоксикації різних класів сполук. Знешкодження цих речовин є багатоступеневим процесом, у якому беруть участь спряжені ферменти системи: супероксиддисмутаза (СОД), глутатіонпероксидаза (ГП), каталаза і система глутатіону. Тому введення до складу препарату мікроелементів, здатних індукувати синтез ферментів антиоксидантного захисту, викликає певний практичний інтерес.

Є відомості, що введення тваринам залізодекстранових препаратів спричиняє виникнення оксидативного стресу, тобто призводить до активації перекисного окислення ліпідів (ПОЛ). Слід зазначити, що швидке відновлення нестачі антирадикальних речовин в організмі лімітується процесами їх транспорту. Тому більш ефективним може бути використанння синтезованих комплексів, які, з одного боку можуть індукувати синтез ферментів антиоксидантного захисту, з іншого — ці низькомолекулярні сполуки, для яких в організмі не існує специфічних транспортних механізмів, можуть самі бути інгібіторами перекисного окислення ліпідів (ПОЛ).

Таким чином, з урахуванням ролі вищезгаданих металів-біотиків в окисно-відновних процесах і процесах гемопоеза, в лабораторіях НДІ було одержано стійкі і стабільні комплексні препарати для профілактики та лікування анемій, які містять ці біометали в оптимальних співвідношеннях. На препарати складена відповідна Нормативно-технічна документація та настанови із застосування, затверджені Державним департаментом вете-

ринарної медицини МАП України. На препарати, технологію їх отримання та компонентний склад одержані патенти України.

Препарати пройшли успішну апробацію в господарствах України різних форм власності та за кордоном (Республіка Чехія). Для перевірки ефективності застосування створених препаратів протягом останніх років проводяться виробничі досліди в умовах повнораціонної годівлі та високої технології утримання тварин у Чеській Республиці. У 2002 році в навчально-дослідному господарстві Чеського аграрного університету міста Прага, Червений уєзд, район Прага-захід на поросятах віком від народження до 45 днів перевіряли ефективність створених препаратів. Було сформовано 3 групи поросят по 30 голів за принципом аналогів. Препарати вводили поросятам 4-денного віку. Зважування проводили на 4-й, 15-й, 30-й і 45-й дні життя. Результати вивчення ефективності застосування антианемічних препаратів наведені в таблицях 18.1, 18.2.

Таблиця 18.1.

Порівняльна характеристика ефективності застосування препаратів для профілактики анемій у новонароджених поросят

1 дослідна група "Феррібіон" Республіка Чехія				
Дні досліду	4-й	15-й	30-й	45-й
Жива маса, кг	1,91±0,043	3,92±0,11	8,29±0,152	12,37±0,39
2 дослідна група " Полімет " Україна				
Дні досліду	4-й	15-й	30-й	45-й
Жива маса, кг	1,98±0,063	4,14±0,095	8,68±0,14	13,08±0,29
3 дослідна група "Полімет-B_{12}" Україна				
Дні досліду	4-й	15-й	30-й	45-й
Жива маса, кг	1,93±0,051	4,16±0,107	9,73±0,23	14,03±0,42

Таблиця 18.2.

Збереженість поголів'я

Група	*Кількість голів у групі*	*Збереженість, %*
1 дослідна	30	86,7
2 дослідна	30	90,0
3 дослідна	30	93,3

Отримані результати досліджень свідчать, що такі препарати, як: залізовмісний (Феррібіон), залізомідьцинккобальтовмісний (Полімет) та комплексний (Полімет-B_{12}) є ефективними засобами профілактики аліментарних анемій поросят-сисунів. Встановлено, що препарати Полімет і Полімет-B_{12} за ефективністю дії не поступаються препарату Феррібіон (виробник – Республіка Чехія), а за технолого-економічними показниками мають переваги при профілактиці та лікуванні анемії у поросят.

Таким чином, практика багаторічних досліджень НДІ екології і біотехнології дозволила з'ясувати основні закономірності процесів комплексоутворення, залежність між структурою лігандів та їх комплексоутворюючою здатністю, що дозволило в подальшому конструювати складні біокомплекси із заданими характеристиками.

В результаті модельних, лабораторних, науково-виробничих досліджень встановлені механізми цілеспрямованого регулювання дії сконструйованих комплексів у необхідному напрямі, що дозволило створити ефективні профілактично-лікувальні засоби широкого спектра дії.

Контрольні питання

1. Які ферменти каталізують окисно-відновні реакції?
2. Чому неможлива пряма неферментна реакція оксигену з органічними сполуками?
3. Як подолати спінову заборону для реакцій триплетного оксигену?
4. Чому ферменти, що відновлюють O_2, є металопротеїдами?
5. Яку роль відіграють метали активного центру оксигеназ?
6. Для яких металів характерна прооксидантна дія?
7. Де у клітинах можливе утворення активних форм оксигену?
8. Які ферментні антиоксидантні системи функціонують в організмі?
9. Яку реакцію каталізує супероксиддисмутаза?

10. Які метали входять до складу супероксиддисмутази?
11. Які реакції каталізують глутатіонпероксидаза та каталаза?
12. Які метали входять до складу глутатіонпероксидази та каталази?
13. Як залежить каталітична активність комплексу метал-ліганд від наявності вільних координаційних місць?
14. Механізм прооксидантної дії заліза.
15. Вимоги до сучасних залізовмісних препаратів.
16. Які сполуки характерні для молекул феритину?
17. Від чого залежить функціональна активність металів-біотиків?
18. Які переваги мають металокомплексні сполуки над неорганічними солями металів?
19. Які принципи використовують при конструюванні металокомплексних сполук?
20. Які функції виконують металокомплексні сполуки в організмі?

Розділ 19.

БІОТЕХНОЛОГІЇ ОДЕРЖАННЯ L-АМІНОКИСЛОТ

Промисловий синтез біологічно активних речовин — продуктів життєдіяльності мікроорганізмів набув надзвичайно великого значення з огляду на потребу в них народного господарства. Він здійснюється різними методами, головним з яких є мікробіологічний. Але поряд з біосинтезом багато біологічно активних речовин можна одержати методами тонкого органічного синтезу. Тому вибір конкретного методу одержання продукту визначається порівняльною економічною ефективністю хімічного і біологічного (мікробіологічного) способів виробництва, які взаємно доповнюють один одного. В результаті промисловий синтез продуктів мікробного метаболізму неможливий без використання на тій чи іншій стадії методів хімічної технології, які знайшли широке розповсюдження в тонкому органічному синтезі. У свою чергу, останній теж не може обійтись без деяких технологічних стадій, які здійснюються за допомогою мікроорганізмів або виділених з них ферментів і ферментних систем.

Амінокислоти — це азотомісткі сполуки, молекули яких містять карбоксильну ($-COOH$) і амінну ($-NH_2$) групи, що мають здатність реагувати між собою з утворенням ковалентного пептидного зв'язку ($-HN-\overset{\overset{O}{\|}}{C}-$). Вони є головним будівельним матеріалом організму, з якого формуються пептиди і білки, тобто вони є мономерними одиницями білків. Порядок включення амінокислот у поліпептидний ланцюг визначається генетичним кодом (через іРНК).

Більшість мікроорганізмів і рослин можуть синтезувати усі (20) амінокислоти. Люди і тварини такої здатності не мають. В їх організмі можуть синтезуватись лише 10 амінокислот. Це замінні амінокислоти. Інші 10 амінокислот не синтезуються в

організмі тварини і людини і мають надходити ззовні — з їжею або кормом. Вони одержали назву незамінних. Серед них такі амінокислоти, як лізин, метіонін і триптофан, які ще називаються критичними завдяки своїй біологічній дії. Незамінні амінокислоти — лізин, метіонін, триптофан, гістидин, лейцин, ізолейцин, фенілаланін, треонін, валін, аргінін. Дефіцит в раціоні хоча б однієї із цих амінокислот викликає сповільнення росту дітей і тварин та сприяє виникненню різних патологій. Крім цього, амінокислоти (як замінні, так і незамінні) є важливою сировиною для забезпечення багатьох біотехнологічних процесів, а також використовуються в медицині і харчовій промисловості.

19.1. МЕТОДИ ОДЕРЖАННЯ L-АМІНОКИСЛОТ

Враховуючи потребу народного господарства в амінокислотах, налагоджено крупнотоннажне промислове їх виробництво. Промислове виробництво амінокислот базується в основному на трьох процесах: гідроліз природної білоквмісної сировини (рослинного і тваринного походження), хімічний та мікробіологічний синтез. Одержання амінокислот гідролізом білкових речовин – найдавніший і найменш ефективний метод. Основними його недоліками є: висока вартість одержаних амінокислот, обмеженість сировинних ресурсів тощо.

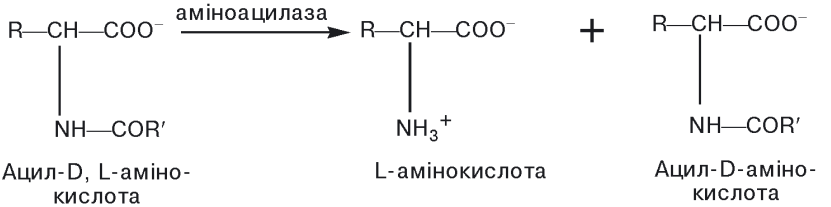
Серед методів одержання амінокислот у промисловому масштабі найбільше значення мають мікробіологічні і хімічні. У сучасній світовій практиці за допомогою мікробного синтезу одержують близько 60 % усього об'єму вироблених амінокислот.

Хімічний синтез амінокислот досить ефективний. Він дає можливість одержувати сполуки будь-якої структури й організувати виробництво з високим рівнем автоматизації. Тепер розроблено і реалізовано у промисловому масштабі виробництво багатьох амінокислот методом органічного синтезу — метіоніну, лізину, глутамінової кислоти, триптофану, гліцину тощо. За сучасними технологіями здійснюється також синтез індивідуальних амінокислот з високим виходом і високим ступенем очищення. Однак цей метод має низку суттєвих недоліків.

Так, сучасними методами тонкого органічного синтезу можна одержати D- і L-форми амінокислот у будь-яких кількостях, однак вони знаходяться у вигляді рацематів, тобто рівних за масою сумішей L- і D-амінокислот, молекули яких в L- і D-формі являють собою дзеркальне відображення одна одної. У хімічних реакціях ці ізомери не відрізняються один від одного. Але, як відомо, в організмі тварин (людей) використовується тільки L-амінокислота. Другий ізомер (D-амінокислота) не має біологічної активності і тому не може брати участі в біосинтезі білка. Білки ссавців побудовані виключно з одного типу амінокислот — L-форми. Присутність D-амінокислоти в готовому продукті завжди небажано не тільки через те, що вона є баластом, але й тому, що деякі амінокислоти мають токсичні властивості. Винятком є гліцин і метіонін. Для першого не існують оптично активні ізомери, а у другого D- та L-форми засвоюються організмом людини і тварини однаково.

Крім цього, виробництво амінокислот методом органічного синтезу передбачає здійснення великої кількості технологічних операцій. Реалізація практично кожної з них вимагає певного обладнання. Технологія такого виробництва у більшості випадків направлена на використання достатньо токсичних речовин, високоочищених реагентів і здійснення стадії розділення рацематів, що утворюються. Методи ж розділення рацемічної суміші, у свою чергу, досить складні і потребують значних витрат, а в окремих випадках для деяких амінокислот їх взагалі не розроблено.

Розділення рацемічної суміші на L- і –D-амінокислоти. З існуючих методів розділення рацемічної суміші на складові ізомери найбільш придатним є ферментативний метод, що ґрунтується на використанні плісняві аміноацилази. Як вихідну сировину використовують ацильовані Д-, L-ізомери амінокислоти, одержані за допомогою хімічного синтезу, і впливають на них аміноацилазою. Фермент вибірково гідролізує тільки ацил-L-ізомер, відщеплюючи від нього об'ємну ацильну групу. В результаті утворюється відповідна L-амінокислота, яка має вищу розчинність, ніж ацил-D-ізомер, що залишився нерозщепленим у розчині.



В результаті ферментативного гідролізу утворюється суміш, яка складається із L-амінокислоти і ацил-D-ізомера амінокислоти. Вона легко розділяється, оскільки її компоненти мають різну розчинність, і виділяється L-амінокислота. Ацил-D-амінокислота, яка залишається, при підігріванні рацемізується, тобто знову переходить у суміш ацильованих L, D-амінокислот і процес повторюється спочатку. Таким чином, єдиним продуктом є L-амінокислота.

Оскільки аміноацилаза має чітку специфічність лише до будови ацильної частини і слабку специфічність щодо будови бічного ланцюга амінокислоти, вона може бути використана для розділення багатьох амінокислот.

Вперше на промисловому рівні розділення рацемічної суміші на її складові ізомери було здійснено в Японії компанією «Танабе Сейяку» в 1969 р. Спочатку використовувався нативний фермент, а потім іммобілізований, завдяки якому економічна ефективність процесу виросла у півтора раза. Тепер компанія здійснює на промисловому рівні виробництво п'яти L-амінокислот, з яких чотири є незамінними (метіонін, валін, фенілаланін, триптофан).

Комерційні препарати аміноацилази іммобілізовані методом адсорбції на ДЕАЕ – сефадексі за рахунок іонних взаємодій (японська фірма «Танабе Сейяку») і шляхом включення ферменту у порожнисті нитки триацетату целюлози (італійська фірма «Снам Проджетті»).

Мікробний синтез – найбільш перспективний і економічно вигідний спосіб виробництва амінокислот. Він є альтернативою хімічному синтезу. За допомогою цього методу можна одержати майже всі протеїногенні амінокислоти. Принцип

мікробного методу полягає в аеробному вирощуванні мікроорганізмів у поживних розчинах, які містять різні джерела вуглецю, азоту і мінеральних солей та ростових речовин. Мікробний метод має низку переваг перед хімічним. Перш за все, ферментна система мікробної клітини утворює тільки біологічно активний L-ізомер, що забезпечує його виділення і очищення та випуск технічних препаратів з низькою вартістю і в достатній кількості.

Основою створення крупнотоннажного виробництва L-амінокислот мікробіологічним методом було відкриття японськими вченими феномена надсинтезу екстрацелюлярних амінокислот ауксотрофними бактеріальними мутантами із родів Brevibacterium, Micrococcus, Corynebacterium тощо.

Ауксотрофні мутанти — це клітини мікрорганізмів, які, з одного боку, втратили здатність самостійно синтезувати необхідні для росту і розвитку різні амінокислоти, а з іншого — набули здатності до надсинтезу цільової амінокислоти. Такі мутанти можна одержати шляхом впливу різних мутагенів фізичної і хімічної природи на вихідну культуру мікроорганізмів з подальшою селекцією штаму за наперед заданими ознаками, або методом генетичної інженерії.

Отже, спеціально підібрані, відселекціоновані, а інколи і сконструйовані методами генетичної інженерії штами-продуценти в процесі життєдіяльності, за звичай на різних стадіях розвитку, здійснюють так званий надсинтез L-амінокислот, тобто виробляють їх у кількостях, що набагато перевищують потребу самих клітин. Надлишок L-амінокислот екскретується в культуральну рідину, звідки їх і добувають.

Промислове виробництво L-амінокислот за допомогою мікроорганізмів можна здійснювати за двома технологічними схемами. В основному вони відрізняються стадією одержання культуральної рідини. У першій передбачається виробництво культуральної рідини за два етапи (двоступінчастий спосіб), а у другій — за один етап (одноступінчастий спосіб).

Двоступінчастий спосіб грунтується на використанні як сировини одного із попередника біосинтезу необхідної амінокислоти, який може одержуватись хімічним або біологічним методом. Одержання попередника — це перший ступінь виробництва. До

нього належить і біосинтез ферментного препарату (як правило, мікробного походження), за участю якого відбуватиметься трансформація попередника в цільову амінокислоту.

Друга стадія — це власне процес трансформації попередника в амінокислоту за допомогою ферментних систем мікроорганізма, вирощеного на першій стадії.

Одноступінчастий спосіб синтезу амінокислот найбільш розповсюджений і грунтується на культивуванні чітко визначеного штаму-продуцента цільової амінокислоти на середовищі певного складу при відповідних параметрах процесу ферментації. З цією метою, як правило, вибирають поліауксотрофні мутанти.

При виробництві амінокислот у вигляді високоочищених кристалічних препаратів після завершення ферментації проводять виділення клітин продуцента з культуральної рідини. Цільову амінокислоту виділяють із культуральної рідини за допомогою іонного обміну або методом осадження. Елюати або маточні розчини концентрують вакуум-випарюванням, а технічні кристали, які утворились, очищають шляхом перекристалізації із насиченого розчину. Завершується процес одержання кристалічного препарату, як правило, вакуум-сушкою очищених кристалів і їх упаковкою.

Побічними продуктами такого виробництва можуть бути різні кормові препарати, які виробляються на основі різних відходів виробництва — маточні розчини амінокислоти, біомаса продуцента, промивні води тощо, які висушуються до залишкової вологості близько 10 %.

При випуску кормових препаратів з невисоким вмістом основної амінокислоти (не більше 10 %) технологія їх виробництва передбачає тільки стабілізацію розчину культуральної рідини перед вакуум-упарюванням, концентрування сухих речовин культуральної рідини, стандартизацію розчину шляхом додавання наповнювача, сушку готового продукту і його упаковку.

При одержанні технічних або кормових препаратів з підвищеним вмістом основної речовини (амінокислоти) додатково відділяють клітини продуцента і частково концентрують амінокислоти в нативному розчині методом іонного обміну або осадження.

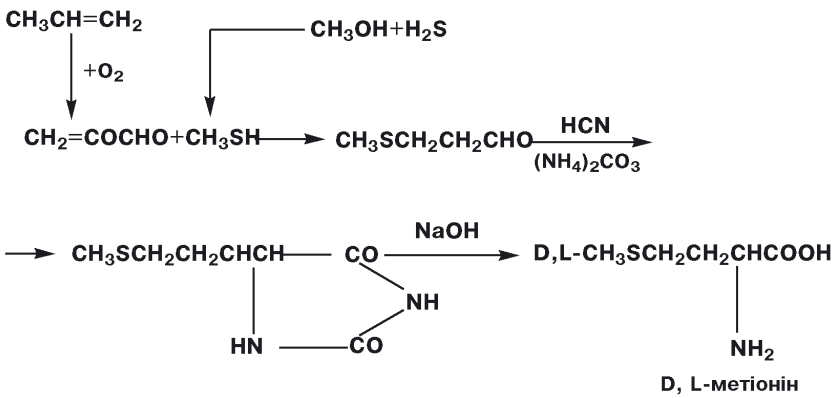
Недоліки мікробіологічного способу одержання амінокислот також полягають у специфіці застосування мікробіологічних методів. Крім цього, ми не завжди володіємо необхідними знаннями про метаболізм клітини і шляхи його регуляції.

У разі, коли шлях прямої ферментації не достатньо розроблений або економічно малоефективний, амінокислоти отримують хіміко-мікробіологічним (комбінованим) шляхом, при якому вихідна сполука утворюється в результаті хімічних реакцій, а кінцева стадія здійснюється мікроорганізмами.

Одержання амінокислот з білкових гідролізатів. Цей спосіб полягає у гідролізі (кислотному, лужному, ферментативному) деяких найбільш доступних природних білків. До них належать відходи м'ясної промисловості, казеїн молока, клейковина пшениці та інші. Недоліками цього способу є: обмеженість і нестандартність джерел сировини, багатоступенева хімічна обробка, пов'язана з виділенням амінокислот і їх очищенням. Крім того, гідроліз під дією мінеральних агентів призводить до часткового руйнування таких цінних амінокислот, як триптофан, треонін, цистеїн, серин.

19.2. БІОТЕХНОЛОГІЯ ОДЕРЖАННЯ L-МЕТІОНІНУ

Метіонін одержують синтетичним шляхом. Із акролеїну в результаті досить складних і багатостадійних хімічних перетворень одержують D, L–метіонін.



Для виробництва 1 т D, L–метіоніну витрачається майже 0,6 т акролеїну. Розділення рацемата технологією не передбачено. За допомогою цього способу у колишньому Радянському Союзі одержували весь обсяг метіоніну.

Технологія одержання L–метіоніну з використанням розчинної аміноацилази для розділення рацемічної суміші була вперше впроваджена у виробництво японською компанією «Танабе Сейяку». В 1969 р. вона розпочала крупнотоннажне виробництво L–метіоніну з використанням іммобілізованої на ДЕАЕ-сефадексі аміноацилази в реакторі з нерухомим шаром.

Комерційні препарати аміноацилази іммобілізовано методом адсорбції на ДЕАЕ-сефадексі за рахунок іонних взаємодій. Іммобілізація аміноацилази на ДЕАЕ-сефадексі здійснюється так: 1000 л сефадексу перемішують протягом 10 год з 1100–1700 л водного розчину ферменту (тобто у співвідношенні Ф : Н 1,1–1,7 : 1) при температурі 35 °С і pH 7. Суміш фільтрують, іммобілізований препарат промивають декілька разів водою. Активність іммобілізованого ферменту становить 50–60 % від нативного. Час напівінактивації іммобілізованої аміноацилази за оптимальних умов становить близько 65 діб. Вихід метіоніну в такій установці досягає 91 % теоретичного. ДЕАЕ-сефадекс може використовуватись в установці понад 8 років, а регенерація каталізатора здійснюється шляхом додавання свіжого розчину аміноацилази. Виробництво автоматизовано.

Концентрація ацил-D, L-метіоніну в рацемічній суміші на вході в реактор становить 0,2 моль/л. Розчин надходить в реактор зверху зі швидкістю 2000 л/год. Після відокремлення L-метіоніну ацил-D-метіонін, що залишився у розчині, рацемізують з утворенням ацил-D, L-ізомерів і повертають для гідролізу і виділення L-метіоніну.

Перевага нової біотехнології полягає у її відносній простоті і нескладності управління.

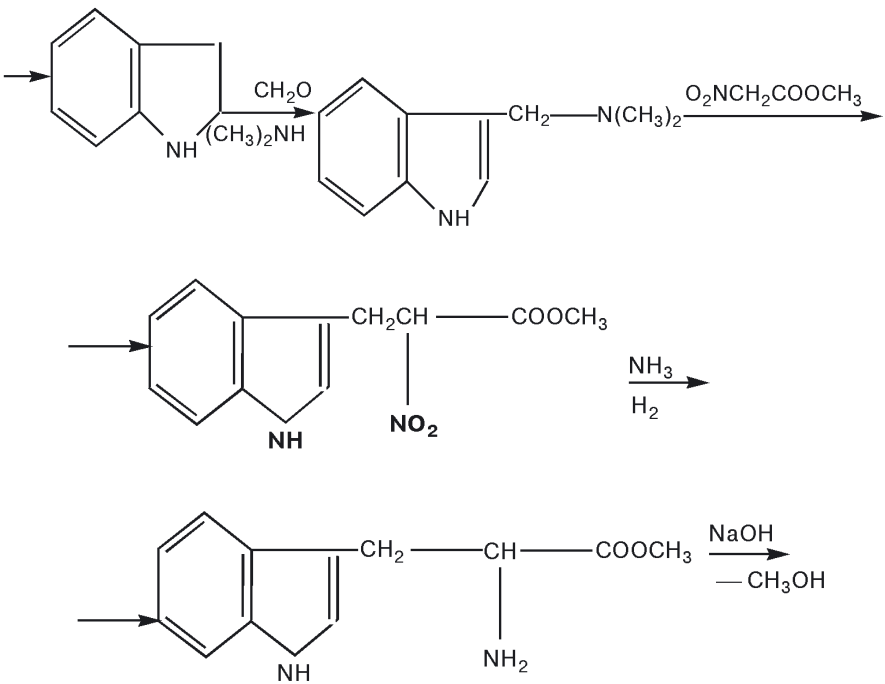
19.3. БІОТЕХНОЛОГІЯ ВИРОБНИЦТВА L-ТРИПТОФАНУ

Вміст триптофану в рослинних білках невеликий. Використовується L-триптофан як кормова добавка до раціонів сільськогосподарських тварин, а високоочищені його препарати з

вмістом основної речовини не менше 99 % знайшли застосування в медицині у виробництві компонентів лікувального харчування і в різних біохімічних дослідженнях.

Триптофан одержують як хімічним, так і мікробіологічним синтезом.

Хімічний метод. D, L-триптофан одержують з індола і нітрооцтового ефіру:



D, –L-триптофан

При використанні D, L-триптофану, одержаного за цією схемою, у годівлі сільськогосподарських тварин розділення рацемата можна не проводити.

Для розділення рацемічної суміші ацил-D, L-триптофану італійська фірма «Снам Проджетті» використала принципову схему японської фірми «Танабе Сейяку», але аміноацилаза була іммобілізована шляхом включення у порожнисті нитки триацетату целюлози. Активність іммобілізованого ферменту

при цьому знижується на 20 %, тобто становить 80 % від розчинного. При використанні 1 кг іммобілізованої аміноацилази одержують 400 кг L-триптофану, вартість якого порівняно з вартістю його виробництва за участю розчинного ферменту становить 60 %.

Мікробний синтез L-триптофану у промислових обсягах здійснюється як за допомогою спороносних штамів-мутантів бактерій Bac.subtilis, недостатніх по тирозину і фенілаланіну (одноступінчастий спосіб), так і шляхом трансформації різних попередників в L-триптофан під дією ферментних систем деяких дріжджів (двоступінчастий спосіб).

Одноступінчастий спосіб включає наступні етапи: культивування вихідного штаму-продуцента, виділення і очищення одержаного триптофану та виробництво на його основі кормових і високоочищених препаратів.

Продуктивність мутанта-продуцента складає до 10 г триптофану в 1 л культуральної рідини.

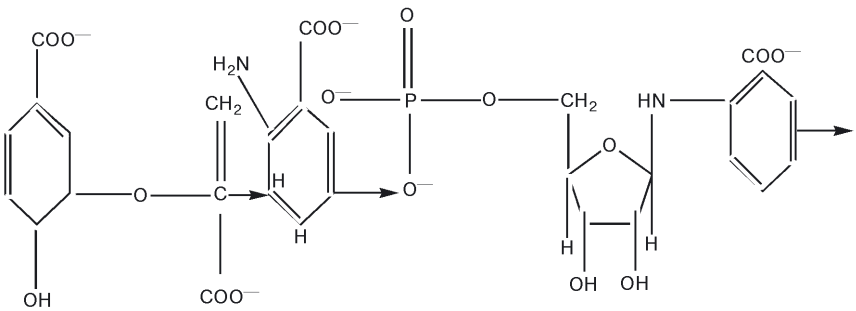
Кормовий концентрат триптофану (ККТ) одержують без відокремлення біомаси продуцента шляхом вакуум-випарювання культуральної рідини до 30–40 % вмісту сухих речовин з подальшим висушуванням.

Висококонцентровані препарати триптофану одержують з фільтрату культуральної рідини після відділення клітин продуцента. Таким чином одержують технічний препарат триптофану з вмістом амінокислоти до 45 % від вмісту в культуральній рідині. Одержують також високоочищені препарати триптофану з вмістом амінокислоти до 99 %.

Двоступінчастий шлях мікробного синтезу L-триптофану грунтується на проведенні трансформації антранілової кислоти (попередника) під дією ферментних систем Candidia utilis в L-триптофан і одержанні культуральної рідини з вмістом його до 6 г/л.

Крім цього, розроблена технологія виробництва культурального триптофану за допомогою технологій рекомбінантних ДНК. Суть методу полягає в тому, що при конструюванні рекомбінантної (гібридної) ДНК на базі плазміди E.coli, до складу останньої вводиться не один ген, а триптофановий оперон. Його клонування у складі рекомбінантної молекули ДНК, яка

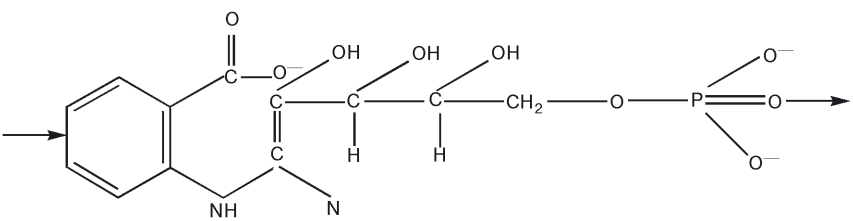
складається із фрагменту ДНК з триптофановим опероном і плазмідного вектора E.coli, супроводжується експресією. У триптофановому опероні міститься п'ять генів, що кодують п'ять ферментів, які беруть участь в утворенні з хоризмату (попередника) через такі проміжні сполуки, як антранілат, N-5′-фосфорибозилантранілат, 1-(0-карбоксифеніламіно)-1-дезоксирибулозо-5-фосфат, індол-3-гліцерофосфат, незамінної амінокислоти L-триптофану.



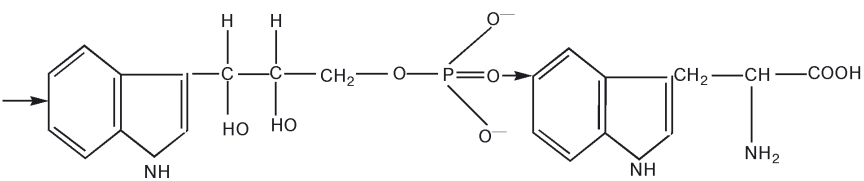
Хоризмат

Антранілат

N-5′-фосфорибозил-антранілат



1-(О-карбоксифеніламіно)-1-дезоксирибулозо-5-фосфат



Індол-3-гліцерофосфат

Триптофан

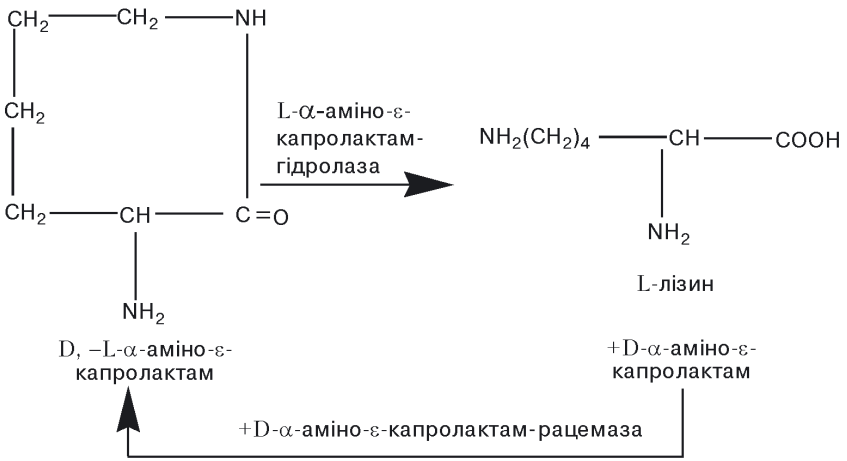
Концентрація ферментів, які кодуються генами триптофанового оперона, що входить до плазмідного вектора Co1E1, орієнтовно в 20 разів перевищує їхній вміст у звичайних клітинах E.coli. Це пов'язано з тим, що кількість гібридних молекул плазміди Co1E1 у клітині E.coli може досягати кількох десятків копій.

19.4. БІОТЕХНОЛОГІЯ ОДЕРЖАННЯ L-ЛІЗИНУ

За вмістом лізину визначається біологічна цінність білка. Він сприяє секреції харчотравних ферментів і транспорту кальцію у клітини, покращує загальний азотний баланс в організмі.

Хімічний метод. Незамінну амінокислоту L-лізин можна одержувати шляхом хімічного синтезу із циклогексанону з подальшим розділенням рацемічної суміші і виділенням L-форми. Розділення рацемічної суміші із D- і L-форм лізину грунтується на різній розчинності солей, одержаних при взаємодії рацемату з L-винною кислотою. Сіль D-лізину і винної кислоти найменш розчинна. Після розділення D- і L-ізомерів лізину солі руйнують, L-форму звільняють від L-винної кислоти за допомогою іонного обміну на колонках, а D-лізин через стадію утворення аддукту з саліциловим альдегідом направляють на рацемізацію.

Комбінований або хіміко-ензиматичний метод запропонований у 70-і роки минулого століття японською фірмою «Тойо Рейон» («Торей»). Технологія включає в себе органічний синтез D, -L-α-аміно-ε-капролактама із циклогексанона і подальший його ферментативний гідроліз. Процес відбувається за участю двох ферментів – L-гідролази і D-рацемази. Перший селективно гідролізує D, -L-α-аміно-ε-капролактам з утворенням L-лізину і D-α–аміно-ε-капролактаму. Останній в результаті впливу другого ферменту – рацемази (D-α-аміно-ε-капролактам-рацемази) піддається рацемізації і знову вводиться в реакцію:



Продуцентами гідролази L-α-аміно-ε-капролактаму є штами дріжджів роду Criptococcus, Candidia, Trichosporon, а активаторами ферменту є двовалентні іони марганцю і цинку. Фермент рацемазу D-α-аміно-ε-капролактаму можна одержати при культивуванні бактерій родів Achromobacter, Flavobacterium та ін.

Обидва ферменти, які використовуються в технології, іммобілізовані методом адсорбції на іонообмінному цукрі.

Мікробіологічний метод. В усьому світі при отриманні кормового лізину перевагу надають мікробіологічному методу. Перше підприємство з виробництва лізину за допомогою мікроорганізмів було створене у Японії в середині 50-х років минулого сторіччя. В подальшому аналогічне виробництво налагоджено в Голландії і США. У Франції була створена велика промислова фірма з виробництва цієї амінокислоти — «Євролізин».

L-лізин синтезується мікроорганізмами двома принципово різними шляхами.

Мікроводорості, гриби, дріжджі синтез лізину здійснюють із α-кетоглутарової кислоти через α-аміноадипінову кислоту – аміноадіпінатний (АА) шлях. Регуляція активності ферментів цього шляху досліджена недостатньо, тому мутантів, здатних до надсинтезу лізину, серед цих мікроорганізмів не одержано.

Для бактеріальних культур, вищих рослин, деяких водоростей характерний інший шлях біосинтезу лізину – через α-діамінопімелінову кислоту — діамінопімеліновий (ДАП) шлях, який починається з аспарагінової кислоти. Крім лізину, із аспартату утворюються також інші незамінні амінокислоти – метіонін, треонін і ізолейцин (рис. 19.1). Продуценти лізину – глутаматпродукуючі коринебактерії Corynebacterium glutamicum, Brevibacterium flavum, мають мутантні форми, які здійснюють надсинтез L-лізину.

Ще в 50-і роки минулого сторіччя японські вчені в результаті впливу мутагеном (ультрафіолетовим промінням) на суспензію бактеріальних клітин Micrococcus glutamicus одержали надпродуценти лізину. В колишньому Радянському Союзі надпродуценти лізину були одержані в 1964 р.

У промисловому виробництві лізину методом мікробного синтезу, де як продуцент використовується Corynebacterium glutamicum, відбувається інгібування продуктами реакції — лізином і треоніном, які, накопичуючись одночасно, за принципом зворотного зв'язку пригнічують активність аспартаткінази, що каталізує перетворення аспарагінової кислоти в семіальдегід аспарагінової кислоти, а отже, інгібує подальші етапи біосинтезу лізину. Для зняття обумовленої регуляторними механізмами заборони на надсинтез лізину був одержаний ауксотрофний штам (мутант), у якого відсутній фермент гомосериндегідрогеназа, що каталізує утворення із семиальдегіда аспарагінової кислоти гомосеріну, який інгібував біосинтез треоніну. Для росту мутанта (ауксотрофного штаму) необхідно екзогенне надходження у поживне середовище треоніну. Повільне введення в середовище екзогенного треоніну попереджувало включення механізму інгібування аспартаткінази продуктами реакції і біосинтез лізину у цього мутанта відбувався з максимальною швидкістю. Щоб примусити продуцент виробляти лізин і метіонін одночасно, ушкоджують механізм, який здійснює інгібування аспартаткінази продуктами реакції. Мутація гена, який кодує синтез аспартаткінази, приводить до його функціонування навіть при надлишковій кількості лізину у середовищі. У цьому випадку відбувається максимальне накопичення треоніну і лізину.

Рис. 19.1. ***Схема біосинтезу лізину***
(за Івлей Д., 1984)

Виробництво лізину включає чотири головних етапи:

- ✓ підготовка поживних субстратів і їх стерилізація;
- ✓ вирощування посівного матеріалу;
- ✓ головна ферментація;
- ✓ зневоднення продуктів ферментації шляхом вакуумного випарювання з подальшим висушуванням упареного розчину у розпорошувальній сушарці або видалення кристалічного лізину.

Основною сировиною для виробництва кормового лізину є патока і кукурудзяний екстракт. Культивування продуцентів і біосинтез лізину проводиться у промислових біореакторах (ферментерах) об'ємом 50, 63 і 100 м^3. Після закінчення ферментації готова культуральна рідина містить, крім лізину й

інших продуктів метаболізму, біомасу продуцента і залишки поживного середовища. Вміст сухої речовини у ній становить 10–13 %, в т. ч. лізину 2–3 % і 0,8–1,8 % бактеріальної біомаси.

Залежно від конкретної мети виробництва на основі культуральної рідини можна одержати такі препаративні форми лізину: рідкий концентрат лізину (РКЛ), сухий кормовий концентрат лізину (ККЛ), а також висококонцентровані кормові і високоочищені кристалічні препарати для харчової і медичної промисловості.

Рідкий концентрат лізину отримують шляхом стабілізації культуральної рідини без відокремлення біомаси продуцента з подальшим вакуум-випарюванням до 35–40 % сухих речовин. Вміст лізину в ньому складає 7–12 %.

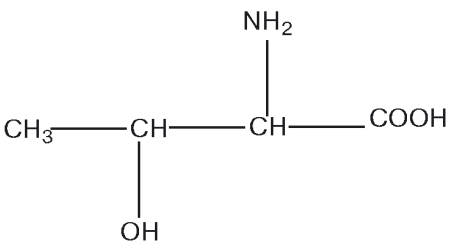
Сухий кормовий концентрат лізину одержують шляхом зневоднення рідкого концентрату. Він містить лізину від 10 до 20 %, залежно від використання наповнювачів.

Кристалічні препарати лізину одержують з культуральної рідини після відокремлення бактеріальної біомаси з вмістом 97–98 % L-лізину.

Такі товарні форми, як РКЛ і ККЛ містять, окрім лізину, і інші біологічно активні речовини – вітаміни B_1, B_2, B_3, B_4, РР тощо, які підвищують цінність кормових добавок.

19.5. БІОТЕХНОЛОГІЯ ОДЕРЖАННЯ L-ТРЕОНІНУ

Однією з найбільш важливих незамінних амінокислот є треонін, який був відкритий і виділений в 1935 р. при вивченні гідролізатів фіброїну:



Треонін синтезується у клітинах мікроорганізмів і рослин. При цьому він утворюється з аспарагінової кислоти. В організмі людини і тварини біосинтезу треоніну не відбувається. Через те, що продукти рослинництва, які складають основу раціону сільськогосподарських тварин, містять мало треоніну, його необхідно додавати в корм. При дефіциті амінокислоти у тварин спостерігається ожиріння печінки, зниження приростів живої маси і погіршується засвоєння інших амінокислот.

Треонін широко використовується також у багатьох біотехнологічних процесах. В медичній промисловості ця амінокислота необхідна для одержання деяких напівсинтетичних антибіотиків. Треонін додається у поживні середовища, призначені для культивування клітин.

Одержувати треонін можна різними шляхами: гідролізом природних білків, методом хімічного синтезу з ацетальдегіда і гліцину, а також мікробіологічним шляхом. Перші два методи не можуть задовольнити потребу народного господарства у цій амінокислоті.

Для мікробіологічного виробництва треоніну як продуценти використовують корінебактерії і ентеробактерії. Однак корінебактерії, які інтенсивно продукують глютамінову кислоту і лізин, синтезують треонін з невисокою швидкістю, що робило його промислове виробництво нерентабельним.

Кишкова паличка здійснює біосинтез треоніну із аспарагінової кислоти через низку перетворень (рис. 19.2). Крім треоніну, з аспарагінової кислоти утворюються лізин, метіонін та ізолейцин, які за нормальних умов витрачаються на синтез білків і їх концентрація в клітині незначна.

Промисловий надпродуцент треоніну одержаний на основі мутантів, виділених з вихідної культури E. coli K–12, шляхом використання методів генетичної інженерії, зокрема явища ампліфікації генів. Коли будь-який ген повторюється в геномі декілька разів, то кількість продукту, синтез якого він забезпечує, збільшиться пропорційно кількості його копій. Для культури E.coli встановлено, що гени, які кодують синтез ферментів, відповідальних за синтез треоніну, складають треоніновий оперон, який містить три гени. Отже, шляхом збільшення у клітині кишкової палички треонінових оперонів можна забезпечити пропорційний ріст синтезу амінокислоти.

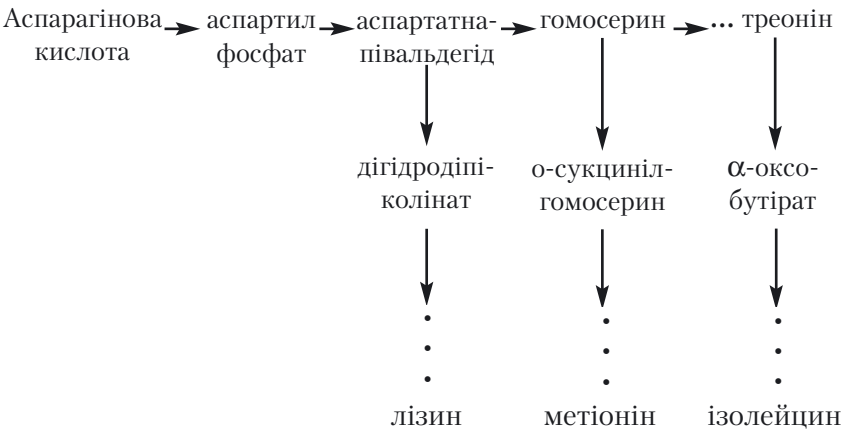


Рис. 19.2. ***Схема біосинтезу треоніну*** *(за Артамоновим В.І., 1989)*

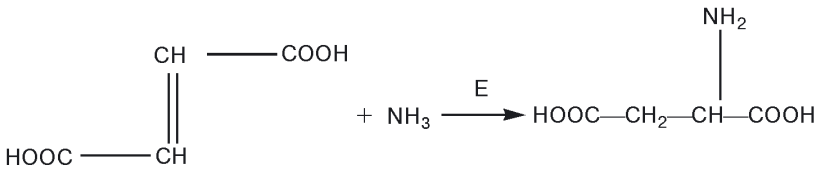
Використання цього методу дало можливість одержати штам кишкової палички, який синтезував треонін на порядок інтенсивніше порівняно з корінебактеріями – основними продуцентами амінокислот. Випробування одержаного треоніну в тваринництві підтвердили його високу якість. При використанні біотехнологічного треоніну як компонента поживних середовищ з'ясувалось, що він забезпечує більш інтенсивний ріст клітин порівняно з треоніном, одержаним хімічним синтезом.

19.6. БІОТЕХНОЛОГІЯ ОДЕРЖАННЯ L-АСПАРАГІНОВОЇ КИСЛОТИ

Аспарагінова кислота не належить до числа незамінних, але виробляється у світі у великих кількостях. Вона використовується у харчовій промисловості разом з амінокислотою гліцином і надає кондитерським виробам і напоям різні відтінки кислого і солодкого смаку.

Аспарагінову кислоту одержують за допомогою внутрішньоклітинного ферменту мікробного походження аспартази, який синтезується E. coli. Вихідними речовинами для ферментативного синтезу використовуються фумарова кислота і аміак – крупнотоннажні продукти органічного і неорганічного синтезу.

Цей процес одностадійний. В присутності ферменту молекула аміаку приєднується до фумарової кислоти з утворенням оптично активної L-аспарагінової кислоти.



фумарова кислота аспарагінова кислота

У цьому процесі вперше в технологічній практиці були використані іммобілізовані клітини в природній мікробній оболонці. Цей процес розроблено японською фірмою «Танабе Сейяку» в 1973 р.

Спочатку японські технологи спробували використовувати як каталізатор мікробну масу, що складалась із живих клітин мікроорганізмів, які містять аспартазу. Однак період напівінактивації ферменту в цих умовах складав всього 10 днів і був непридатним для технології. Після виділення аспартази з клітин та іммобілізації в гелі час напівінактивації збільшився до 30 днів. Але як внутрішньоклітинний фермент аспартаза і в іммобілізованому стані є малостабільною. Позитивних результатів досягли після того, як іммобілізували цілі клітини E.coli в поліакріламідному гелі. Період їх напівінактивації при температурі 37 °С за звичайних умов становить 120 діб.

Стабільність аспартази в складі E.coli, іммобілізованих у каррагінановому гелі, збільшується до 600 діб. Для іммобілізації клітин E.coli 40 л фізіологічного саліну змішують з 10 кг вологої клітинної маси, додаючи при цьому 7,5 кг акриламіду, 0,4 кг метиленбісакриламіду, 5 л 5 %-ного диметиламінопропіонітрилу і 5 л 2,5 %-ного персульфату калію. Через 10–15 хв при температурі 40 °С з гелю формують 2–3-міліметрові кубики, наповнюють ними колонку і пропускають через неї розчин фумарату амонію.

Вихід L-аспарагінової кислоти становить 95 % теоретичного. Процес безперервний і повністю автоматизований. Вартість L-аспарагінової кислоти, видобутої із застосуванням іммобілізованих клітин, на 40 % нижча, ніж при традиційному методі.

19.7. БІОТЕХНОЛОГІЯ ОДЕРЖАННЯ L-ГЛУТАМІНОВОЇ КИСЛОТИ

Глутамінова кислота (α-аміноглутарова) в значних кількостях входить до складу рослинних і тваринних білків. Вона належить до замінних амінокислот, але на її основі здійснюється синтез багатьох біологічно активних речовин, необхідних для життєдіяльності організму людини і тварини. Широко застосовується в харчовій промисловості і медицині для лікування захворювань печінки і нирок. У вигляді глутамату натрію (мононатрієва сіль глутамінової кислоти) використовується як смакова добавка, особливо для продуктів, які зберігаються тривалий час (в консервованому і замороженому стані).

У промисловості глутамінову кислоту і на її основі глутамат натрію одержують декількома способами: багатостадійним хімічним синтезом із акрилонітрилу, мікробіологічним синтезом за одноступінчастою і двоступінчастою технологією, виділенням із цукрової меляси або з білкових гідролізатів. Найбільше розповсюдження одержали способи виділення глутамінової кислоти із меляси і одноступінчастого мікробіологічного синтезу. Останній вважається найбільш перспективним.

У промисловому біосинтезі L-глутамінової кислоти використовуються ті самі мікроорганізми, що й в мікробіологічному виробництві L-лізину, тобто коринебактерії Corynebacterium glutamicum, Brevibacterium flavum. Крім того, промисловими продуцентами можуть бути деякі штами бактерії Micrococcus і Microbacterium. Для здійснення біосинтезу глутамінової кислоти з високим виходом використовують мутанти з порушеною ферментною системою перетворення α-кетоглутарової кислоти в янтарну.

У промисловому культивуванні як джерело вуглецю використовують вуглеводи, що легко асимілюються (цукрозу і глюкозу), які містяться у буряковій мелясі та гідролізатах крохмалю. Джерелом азоту є сечовина, рідше хлорид і сульфат амонію, кукурудзяний екстракт тощо.

Одноступінчастий спосіб одержання L-глутамінової кислоти повністю повторює схему одержання L-лізину.

Оскільки виробництво глутамінової кислоти направлено на одержання високоочищених препаратів, подальша технологічна схема передбачає виробництво продуктів, які підготовлені безпосередньо для використання як харчових добавок і лікарських форм.

Процес біосинтезу відбувається за певних асептичних умов у ферментерах об'ємом 50 м^3. Температуру культивування підтримують постійно на рівні 28–30 °С. Наприкінці процесу біосинтезу готова культуральна рідина містить 45 г/л глутамінової кислоти. Потім відбувається відокремлення глутамінової кислоти від культуральної рідини і подальше її очищення. В отриманому продукті має бути основної речовини не менше 94 %, хлориду натрію — не більше 5 %, загального азоту — не менше 7 % і вологи — не більше 1 %.

Контрольні питання

1. Які існують методи одержання незамінних критичних L-амінокислот у промисловому масштабі?
2. Які особливості має хімічний метод одержання L-амінокислот? Недоліки методу.
3. Що таке рацемічна суміш і яким шляхом проводиться її розділення?
4. Які переваги має мікробіологічний синтез над хімічним?
5. Що стало підгрунтям створення крупнотоннажного виробництва L-амінокислот мікробіологічним методом?
6. За якими технологічними схемами можна здійснювати промислове виробництво L-амінокислот?
7. У яких формах випускаються препарати амінокислот?
8. На чому базується біотехнологія одержання L-метіоніну?
9. Який біокаталізатор використовується у біотехнології одержання L-метіоніну і метод його одержання?
10. Яким шляхом одержують L-триптофан?
11. Який іммобілізований біокаталізатор використовується для розділення рацемічної суміші?

12. Які штами-продуценти використовуються для мікробного синтезу L-триптофану?
13. Які шляхи застосовуються для мікробного синтезу L-триптофану?
14. Як можна вдосконалити біотехнологію виробництва культурального триптофану?
15. Яким шляхом одержують L-лізин?
16. За участю яких ферментів проводиться розділення рацемічної суміші при хімічному синтезі L-лізину? Яким методом і на якому носії іммобілізують ці ферменти?
17. Які існують шляхи мікробного синтезу L-лізину?
18. У вигляді яких товарних форм можна отримати L-лізин?
19. Що таке L-аспарагінова кислота і де вона використовується?
20. Що є сировиною для отримання L-аспарагінової кислоти і за участю якого біокаталізатора цей процес відбувається?
21. Де застосовується L-глутамінова кислота?
22. Методи одержання у промислових обсягах L-глутамінової кислоти?
23. Які продуценти використовуються у мікробному синтезі L-глутамінової кислоти?
24. Де застосовується L-треонін?
25. Які існують шляхи одержання L-треоніну?
26. Яким методом можна вдосконалити біотехнологію виробництва L-треоніну?

Розділ 20.

БІОТЕХНОЛОГІЯ ОДЕРЖАННЯ ФЕРМЕНТІВ

У сучасній біотехнології одне з провідних місць належить ферментам. Усе живе містить ферменти, без них неможливий обмін речовин. Препаративне одержання ферментів і використання їх у різних галузях промисловості, сільського господарства, наукових дослідженнях дозволяє суттєво змінити технологічні процеси, методи аналізів, забезпечити більш високі показники і виходи у промисловості і сільському господарстві, впровадити принципово нові методи.

Ферменти (лат. fermentum – закваска або ензими) – це біологічні каталізатори, більшість з яких є розчинними глобулярними білками (актин і міозин належать до структурних білків і спільно беруть участь у гідролізі АТФ), що містяться в усіх живих клітинах. Здійснюючи перетворення речовин (субстратів), ферменти регулюють метаболізм в організмі.

Максимальну активність ферменти виявляють за оптимальних значень pH, температури, іонної сили розчину, наявності коферментів і кофакторів, відсутності інгібіторів, причому для кожного ферменту ці величини індивідуальні (свої). При різкому відхиленні температури, pH середовища від оптимальних величин ферменти можуть інактивуватися в результаті незворотної денатурації (зміни конформації, розкручування). Ферменти в процесі каталізу не витрачаються, а ферментативним реакціям властивий майже 100 %-й вихід продуктів.

На відміну від багатьох технологічних процесів у хімічній технології, яка вимагає високих тисків і температур, реакції, що відбуваються за участю ферментів як біокаталізаторів, здійснюються при температурах, які не перевищують 60–70 °С, нормальному атмосферному тиску і pH середовища в інтервалі 4,5–9,0.

На відміну від каталізаторів, які застосовуються у хімії, ферменти – біокаталізатори мають низку унікальних властивостей. Це передусім їх надзвичайно висока каталітична активність: добавка незначної кількості ферменту (10^{-7}–10^{-9} моль) може

прискорити каталізуючу реакцію більш ніж у 10^{10} разів. Інша важлива властивість – вибірковість дії або висока субстратна специфічність. По-друге, можливість здійснювати необхідні хімічні зміни однієї речовини, не зачіпивши інших складових частин субстрату, надає великі переваги в багатьох технологічних процесах під час переробки рослинної і тваринної сировини.

Тепер у науковій літературі описано понад 2000 ферментів. Майже 50 з них використовують або використовуватимуть у промисловому виробництві (табл. 20.1).

Таблиця 20.1

Основні ферменти, випущені промисловістю, і їх джерела
(за Гернетом М.В., Єгоровим А.М., 1982)

Фермент	*Джерела*	*Сфера впровадження*
Позаклітинні ферменти		
α-амілаза	Aspergillus oryzae, Bacillus subtilis, Bacillus licheniformic	Гідроліз крохмалю для виго-товлення глюкози, глюкозо-фруктозного сиропу, спирту
β-глюконаза	Aspergillus sp., Bacillus subtilis	Виробництво пива
Целюлаза	Aspergillus sp., Trichoderma viride	Гідроліз целюлозо-вмісної сировини
Декстраназа	Penicillium sp.	Гідроліз декстранів при виробництві соків
Глюкоамілаза	Aspergillus niger, Rhizopus sp.	Оцукрювання крохмалю, виробництво спирту
Геміцелюлаза	Aspergillus niger	Гідроліз полісахаридів
Лактаза	Aspergillus niger	Гідроліз лактози в харчовій промисловості
Ліпаза	Aspergillus niger, Candida cillindraccae, Mucor miehei, Mucor sp.	Перетравлювання жирів на заміну панкреатичної ліпази, виготовлення сиру
Пектиназа	Aspergillus sp., Rhizopus sp.	Виробництво соків і пива
Протеаза	Aspergillus niger, Aspergillus oryzae, Rhizopus sp., Bacillus subtilis, Bacillus licheniformic Bacillus sp. alkalophilic	Миючі порошки, гідроліз білків для годівлі і кормів, обробка шкур і м'яса, гідроліз білків зерна у пивоварінні

Продовження табл. 20.1

Фермент	*Джерела*	*Сфера впровадження*
Протеаза, мікробний реннін	Endothia parasitica, Mucor miehei	Звурджування молока
Полуланаза	Mucor pusillus, Klebsiella acrogenes	Гідроліз амілопектину при гідролізі крохмалю
Внутрішньоклітинні ферменти		
L-аспарагіназа	Escherichia coli	Лікування гострого лейкозу
Каталаза	Aspergillus niger	Видалення H_2O_2 при стерилізації молока
Холестеролоксидаза	Nocardia rhodochrous	Аналіз холестеролу
β-галактозидаза	Kluy veromyces fragilis, Saccharomyces bactis	Гідроліз лактози
Глюкозоізомераза	Bacillus coagulans, Streptomyces sp.	Виробництво глюкозо-фруктозного сиропу
Глюкозооксидаза	Aspergillus niger, Penicillium notatum	Видалення кисню, клінічні аналізи
Інвертаза	Saccharomyces cerevicae	Гідроліз сахарози
Пеніцилінацилаза	Escherichia coli	Деацилювання бензилпеніциліну

Одержання ферментів і їх використання в різних технологічних процесах становлять на сьогодні один з найважливіших розділів сучасної біотехнології.

20.1. ДЖЕРЕЛА ФЕРМЕНТІВ

На сьогодні промисловість випускає близько 20 індивідуальних ферментів і майже 40 так званих ферментних технічних препаратів (табл. 20.2), тобто сумішей, які містять, окрім цільового ферменту, значну кількість близьких за фізико-хімічними властивостями білків. Для відокремлення цих білків часто використовують трудомісткі і дорогі хроматографічні методи, що різко підвищує вартість кінцевого продукту. Тому чисті ферменти використовуються в основному в медицині та наукових дослідженнях, а в промислових процесах зазвичай використовують ферментні препарати.

Таблиця 20.2.

Асортимент технічних ферментних препаратів

(за Гернетом М.В., Єгоровим А.М., 1982)

Препарат	*Коротка характеристика препарату і способи його одержання*	*Продуцент*
1	*2*	*3*
Амілоризин Пх	Висушена поверхнева культура гриба, вирощена на пшеничних відходах; містить в основному амілолітичні ферменти	Asp. oryzae 40-A2
Глюкаваморин Пх	— » —	Asp. awamori 22
Пектаваморин Пх	Висушена поверхнева культура гриба, вирощена на буряковому жому і пшеничних висівках; містить переважно пектолітичні ферменти	Asp. awamori 16
Мальтаваморин Пх	Препарат у вигляді сиропу із поверхневої культури; одержується концентруванням дифузійної витяжки на вакуумвипарному апараті; містить в основному мальтазу і гіалуронідазу	Asp. awamori 22
Амілоризин П10х	Препарат у вигляді порошку із поверхневої культури; одержується осаджуванням етанолом із дифузійної витяжки; містить переважно амілазу і протеазу	Asp. oryzae 740-A2
Проторизин П20х	Те саме; містить переважно протеазу	Asp. oryzae КС
Амілоризин П20х	Те саме; містить переважно амілолітичні ферменти	Asp. oryzae КС
Прототеризин П10х	Те саме; містить переважно нейтральну протеазу	Asp. terricola 3371
Пектаваморин П10х	Те саме; містить переважно пектолітичні ферменти і кислостійку протеазу	Asp. awamori 16
Пектофоетидин П10х	Те саме	Asp. foetidus 45
Протосубтилін Г3х	Препарат у вигляді порошку із глибин- ної культури; одержується висушуван-ням концентрату культуральної рідини на розпилювальній сушарці; містить переважно протеолітичні ферменти	Bac. subtilis 103
Амілосубтилін Г10х	Те саме; містить переважно амілолітичні ферменти і глюконазу	Bac. subtilis 103

Продовження табл. 20.2

1	2	3
Протосубтилін Г10х	Препарат у вигляді порошку із глибин- ної культури; одержують осаджуванням еталоном культуральної рідини; містить переважно лужну протеазу	Bac. subtilis 103
Пектаваморин Г3х	Препарат у вигляді порошку із глибин- ної культури; одержується висушуван-ням концентрату куль-туральної рідини на розприскувальній сушарці; містить переважно пектолітичні ферменти	Asp. awamori 16
Пектофоєтидин Г3х	Те саме	Asp. foetidus 45
Пектоклостридин Г3х	Те саме; містить переважно пектинази і пектинтранселіміназу	Cl. pectinofer-mentans 15
Ксилаваморин Г3х	Те саме; містить переважно геміцелюлазу	Asp. awamori 16-4
Глюкоендомикопсин Г3х	Те саме; містить переважно амілолітичні ферменти	Endomycop-sis sp.
Пектаваморин Г10х	Препарат у вигляді порошку одержується осаджуванням етанолом із концентрату культуральної рідини; містить переважно пектолітичні ферменти	Asp. awamori 16
Пектофоєтидин Г10х	Те саме; містить переважно пектолітичні ферменти і кислостійку протеазу	Asp. foetidus 45
Пектоклостридин Г10х	Те саме; містить переважно пектинази і пектинтранселіміназу	Cl. pectinofer-mentans 15
Аміломезентерин Г5х	Препарат у вигляді порошку; одержується висушуванням у сублімаційній сушарці сорбату після сорбції амілази на модифікованому крохмалі; містить переважно амілолітичні ферменти	Bac. mesentericus
Протомезентерин Г5х	Те саме; одержується висушуванням у розпилювальній сушарці після відділення амілази сорбцією	Bac. mesentericus
Ренніномезентерин Г10х	Те саме; містить переважно фермент для зсідання молока і протеазу	Bac. mesentericus
Протомезентерин Г10х	Те саме; містить переважно нейтральну протеазу	Bac. mesentericus

Продовження табл. 20.2

1	2	3
Аміломезентерин Г15х	Препарат у вигляді порошку; одержується осаджуванням сульфатом амонію з концентрату культуральної рідини; містить переважно амілолітичні ферменти	Bac. mesentericus
Амілосубтилін Г15х	Те саме	Bac. subtilis 103
Аміловизин Г10х	Препарат у вигляді порошку; одержують осаджуванням ацетоном або етанолом із концентрату культуральної рідини; містить переважно амілолітичні ферменти	Asp.oryzae 3-9-15
Прототеризин Г10х	Препарат в вигляді порошку; одержують осаджуванням етанолом із концентрату культуральної рідини; містить переважно протеолітичні ферменти	Asp.terricola 3374
Целовіридин П10х	Препарат у вигляді порошку; отримується осаджуванням етанолом з дифузійної витяжки поверхневої культури; містить переважно целюлозолітичні ферменти	Tr. viride
Целовіридин Пх	Висушена поверхнева культура гриба, вирощена на пшеничних висівках і буряковому жомі; містить переважно целюлолітичні ферменти	Tr. viride
Аміловизин П20х	Препарат у вигляді порошку із поверхневої культури; добувають висушуванням ультраконцентрату дифузійного екстракту на розпилювальній сушарці; містить переважно амілолітичні ферменти	Asp.oryzae 740-A2
Протосубтилін Г20х	Препарат у вигляді порошку із глибинної культури; одержують висушуванням ультраконцентрату культуральної рідини на розпилювальній сушарці; містить переважно протеолітичні ферменти	Bac. subtilis 103
Ренніномезентерін Г20х	Те саме; містить фермент для зсідання молока і протеазу	Bac. mesentericus ПБ
Пектаваморин Г20х	Те саме; містить переважно пектолітичні ферменти	Asp. awamori 16
Пектоклостридин Г20х	Те саме; містить переважно пектинази і пектинтранселіміназу	Cl. pectinofermentans 15

Продовження табл. 20.2

1	*2*	*3*
Целовіридин Гх	Препарат у вигляді порошку; одержують висушуванням концентрату культуральної рідини на розпилювальній сушарці; містить переважно целюлолітичні ферменти	Tr. viride

Джерелом ферментів є тканини тварин, рослин і мікроорганізмів. Хоча деякі тканини тварин, наприклад підшлункова залоза, слизова оболонка шлунка багаті ферментами, крупнотоннажне виробництво ферментів тваринного, а також рослинного походження неможливе через обмеження сировинних ресурсів. Наприклад, у колишньому Радянському Союзі в рік для потреб виробництва сирів необхідно було у середньому 250 т протеолітичних ферментів (реніну), для виділення яких потрібно 10 млн. шлунків телят.

Крім цього, тканини тварин і рослин дуже вимогливі до умов культивування, що значно підвищує вартість виробництва ферментів.

Серед ферментних препаратів, які виділяються із тваринної і рослинної сировини, є і ***комплексний ферментний препарат***, який містить амілазу, ліпазу, протеїнази, рибонуклеазу тощо, одержаний з екстракту підшлункової залози; ***папаїн*** – із соку динного дерева Сасіса papaya; ***бромелін*** – зі стебел ананаса; ***фіцин*** – із соку або листя дерев роду Ficus.

Найбільш доступним і практично необмеженим джерелом одержання ферментів у промисловому масштабі є мікроорганізми: прокаріоти (бактерії, актиноміцети, рікетсії) і частина еукаріотів (дріжджі, нитчасті гриби, водорості, найпростіші). В них містяться ферменти усіх відомих тепер типів, а методи сучасної мікробіології дозволяють одержувати великі кількості ферментів за короткий час.

Мікробіологічне одержання ферментів має ***переваги над тканинним***. Перш за все мікроорганізми дуже швидко розмножуються. У деяких з них ділення відбувається щогодини або навіть щодесяток хвилин. А отже з невеликої первинної кількості бактерій за декілька днів можна одержати значну мікробну біомасу. Такі темпи абсолютно недосяжні для рослин і тварин.

По-друге, мікроорганізми здатні рости на відносно простих і дешевих поживних середовищах, які найчастіше є відходами інших виробництв. За джерело вуглецю мікроорганізми можуть використовувати вуглеводи, спирти, карбонові кислоти. Джерела азоту можуть бути трьох видів: органічні (білки, пептиди, амінокислоти), мінеральні речовини (солі амонію, аміак), а також атмосферний азот. У промислових середовищах як джерела органічного вуглецю і азоту найчастіше використовують різні сорти крохмалю (кукурудзяний, картопляний, рисовий), кукурудзяний екстракт, соєву муку, гідролізати біомаси дріжджів тощо. Потреба мікроорганізмів у макро- і мікроелементах задовольняється за рахунок солей неорганічних кислот.

По-третє, важливою особливістю мікробіального одержання ферментів є те, що кожен мікроорганізм містить великий набір ферментів. Це сприяє тому, що один і той самий вид мікроорганізмів можна використовувати як продуцент для одержання різних ферментів. Застосовуючи такий прийом, як індукція біосинтезу ферментів, можна значно збільшити продукцію того чи іншого ферменту даним видом мікроорганізмів. Суть його полягає в тому, що при введенні в поживне середовище певних речовин – індукторів (часто це специфічні субстрати одержуваних ферментів) – змінюються метаболічні шляхи в клітині так, що переважно починає синтезуватися даний фермент.

Швидкість біосинтезу ферментів мікроорганізмами досить висока. Але продуктивність штамів-продуцентів можна збільшити у 2–5 разів за допомогою селекції, підбором умов культивування та одержання високопродуктивних мутантних форм мікроорганізмів. Використовуючи біотехнології рекомбінантних ДНК, можна одержати штами мікроорганізмів, у яких вміст ферментів досягає 50 % загальної маси синтезованого білка. Усе це дало можливість різко збільшити виробництво ферментних препаратів і знизити вартість ферментів приблизно у 100–1000 разів.

Так, поєднання методів мутагенезу і селекції з методами генетичної інженерії дало можливість японським дослідникам досягти 200-кратного збільшення виходу α-амілази із Bacillus subtilis. Коли фермент здійснює гідроліз крохмалю при більш високій температурі, то виробництво цукристих речовин прискорюється. У зв'язку з цим було поставлене завдання збільши-

ти виробництво термостабільної α-амілази. Японські вчені ввели в сінну паличку ген синтезу цього ферменту із термофільної бактерії, що призвело до збільшення виходу термостабільної α-амілази.

Більшість ферментів, які синтезуються мікроорганізмами, є екстрацелюлярними продуктами і виділяються в рідке середовище, що оточує клітини. Це позаклітинні ферменти. У міцелії трьохдобової культури залишається зазвичай не більше 10–15 % ферментів. Інколи ферменти не виділяються в оточуюче середовище, будучи зв'язаними з клітинними органелами – внутрішньоклітинними ферментами. Позаклітинні ферменти є переважно гідролазами.

Ферменти можуть бути індукованими і конститутивними. Індуковані – це ферменти, які синтезуються мікроорганізмами лише в разі наявності у поживному середовищі певних речовин або індукторів. Наприклад, фермент лактаза може синтезуватися тільки за наявності в середовищі лактози. Більшість гідролітичних ферментів належать до індукованих. Біосинтез більшості з них інгібується глюкозою.

20.2. МЕТОДИ КУЛЬТИВУВАННЯ МІКРООРГАНІЗМІВ-ПРОДУЦЕНТІВ ФЕРМЕНТІВ

З точки зору характеру процесу культивування мікроорганізмів-продуцентів усі технологічні процеси виробництва ферментних препаратів поділяються на дві принципово різні групи: в першому випадку ферментація ведеться глибинним методом у рідкому поживному середовищі, а в другому – використовується поверхнева культура, яка росте на спеціально підготовленому пухкому і зволоженому поживному середовищі.

Глибинний метод культивування продуцентів. Дослідження у сфері глибинного культивування мікроорганізмів розпочались в нашій країні в 50-х роках минулого століття. Метод полягає у вирощуванні мікроорганізмів у рідкому поживному середовищі. Він технічно більш досконалий, ніж поверхневий, оскільки легко піддається механізації і автоматизації. Крім цього, усі клітини культури знаходяться в однакових, легко відтворюваних умовах. В результаті вони рівномірно забезпечуються поживними речовинами і киснем. Глибинне

культивування дає можливість чітко дозувати вміст у поживному середовищі різних компонентів. Шляхом зміни складу поживного середовища і умов культивування можна суттєво посилити синтез деяких ферментів.

Весь процес культивування має проводитися в належних асептичних умовах, що, з одного боку, є перевагою методу, а з іншого – призводить до неабияких технічних труднощів, оскільки найменше порушення асептики інколи є наслідком повного припинення утворення ферменту. Недоліком методу є й те, що концентрація ферменту в середовищі значно нижча, ніж у екстрактах поверхневої культури. Фільтрати культуральної рідини містять не більше 3 % сухих речовин. Це викликає необхідність попереднього концентрування фільтратів перед виділенням ферменту.

Поверхневий метод культивування продуцентів ферментів. При поверхневому методі культура росте на поверхні твердого зволоженого поживного середовища. Міцелій повністю обволікує і доволі міцно скріплює тверді частинки. Клітини живляться за рахунок поживних речовин середовища і використовують для дихання кисень повітря, тому для нормального забезпечення киснем потрібно проводити рихлення по всій структурі середовища з невеликою висотою шару. Це призводить до необхідності мати велику поверхню контакту рихлого середовища з повітрям, тобто значних виробничих площ, а за відсутності механізації вимагає і великих витрат ручної праці.

Крім того, тверді субстрати, які використовуються у цьому випадку, важко піддавати стерилізації, а поверхневу культуру складно оберігати від забруднення сторонньою мікрофлорою.

Поряд з недоліками поверхневий метод має і переваги над глибинним. При поверхневому культивуванні відбувається більш висока швидкість росту мікроорганізмів і досягається більша концентрація сухих речовин. Поверхневі культури можна швидко і відносно легко висушити та перевести у товарну форму. Висушену поверхневу культуру можна довго зберігати і легко транспортувати. Дуже суттєвою перевагою є і те, що у поверхневих культурах мікроорганізми синтезують ширший спектр ферментів.

20.3. ОДЕРЖАННЯ ТОВАРНИХ ФОРМ ФЕРМЕНТНИХ ПРЕПАРАТІВ

20.3.1. Виділення ферментів

Наступною стадією біотехнологічного процесу одержання ферментних препаратів є виділення цільового продукту (ферменту). Ця стадія залежить від того, чи накопичується продукт у клітині (внутрішньоклітинні ферменти) або він виділяється у культуральну рідину (позаклітинні ферменти), чи продуктом є сама клітинна маса (рис. 20.1). Найскладніше виділити фермент (продукт), який накопичується в клітинах. Для цього клітини необхідно відокремити від культуральної рідини і зруйнувати (дезінтегрувати) клітинні оболонки.

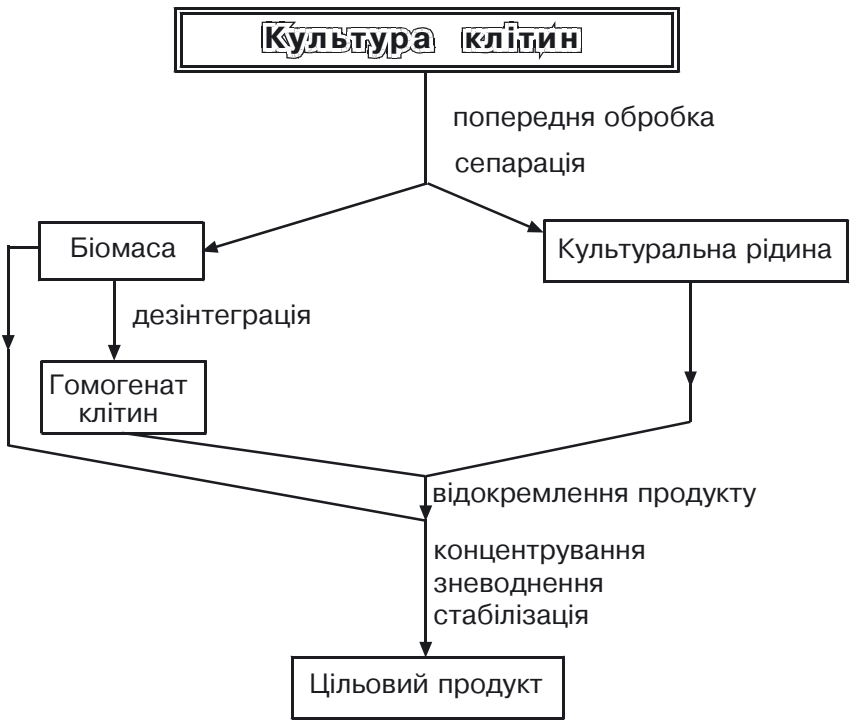


Рис. 20.1. ***Основні етапи відокремлення і очищення біотехнологічних продуктів***
(за Єгоровим Н.С. та ін., 1987)

Культура мікроорганізмів, вирощена поверхневим методом, і культуральна рідина після глибинного культивування містять велику кількість баластних речовин: біомасу продуцента, невикористані компоненти поживного середовища, продукти метаболізму. Частка ферментів становить майже 1 % для поверхневих і не більше 0,1 % — для глибинних культур.

Часто для подальшого використання ферментів їх потрібно виділити й очистити. Ці процеси трудомісткі і коштують дорого.

Виділення ферментів – це комплекс прийомів, які дають змогу отримувати ферментні препарати, придатні для використання у наукових дослідженнях, медицині і в біотехнології.

Виділення позаклітинних ферментів. Позаклітинні ферменти одержують із культуральної рідини після сепарації, тобто після розділення культуральної рідини і біомаси мікробних білків. Інколи сепарації передує спеціальна обробка культури – зміна pH, нагрівання, додавання коагулянтів білків для більш ефективного відокремлення біомаси і стабілізації продуктів. Є різні методи сепарації.

1. Флотація. Метод може бути використаним, якщо клітини продуцента в біореакторі накопичуються у поверхневих шарах рідини. Флотатори різних конструкцій зціджують, відкачують або зскрібають піну, яка містить мікробні клітини.

2. Фільтрація. Усі існуючі типи фільтрів (барабанні, дискові, стрічкові тощо) використовують один і той самий принцип – затримання біомаси на пористій фільтруючій поверхні.

3. Центрифугування. Метод ґрунтується на осаджуванні частин, які знаходяться у завислому стані в рідині з використанням центробіжної сили. Центрифугування вимагає більш дорогого обладнання, ніж фільтрування.

У деяких виробничих процесах центрифугування і фільтрація використовуються комбіновано – у фільтраційних центрифугах.

Виділення внутрішньоклітинних ферментів. Внутрішньоклітинні ферменти виділяють після руйнування (дезінтеграції) клітин.

Методи руйнування клітин. Для руйнування клітин застосовуються різні методи: механічні, фізичні, хімічні, біологічні й ензиматичні. Іноді для досягнення дезінтеграційного ефекту вдаються до сильних і надсильних впливів. Іноді засто-

сування одного методу не дає бажаного результату. У такому разі клітини мікробів обробляють комплексно.

Механічні методи – це балистичний, екструзивний і декомпресійний.

Фізичні методи – осмотичний шок, термошок, плазмоліз, заморожування-відтаювання, висушування клітин, ультразвук, іонізуюча радіація.

Хімічні методи – дія кислот, лугів, солей органічних розчинників, поверхнево-активних речовин.

Ензиматичні методи – дія лізоциму та інших літичних ферментів.

Біологічні – інгібування біосинтезу клітинної оболонки, дія фагів, одержання мутантних форм мікроорганізмів–продуцентів ферментів із легкоруйнівними стінками.

Фізичні способи дезінтеграції більш економічні, ніж хімічні і біолого-ферментативні, бо не використовуються дорогі реактиви і ферментні препарати. Але вони можуть негативно впливати на якість продукту.

Перспективним для дезінтеграції мікроорганізмів-продуцентів вважається використання іммобілізованих ферментів.

Наступним за дезінтеграцією є етап відокремлення фрагментів клітинних стінок. Використовуються для цього ті самі методи, що й при сепарації клітин – фільтрація і центрифугування.

20.3.2. Очищення ферментних препаратів

У деяких випадках ферментні препарати використовують у неочищеному вигляді: у шкіряній і спиртовій промисловості ступінь очищення не впливає на якість готової продукції, а у тваринництві введення біомаси продуцента і домішок в корми навіть підвищує їх поживну цінність. Натомість, у харчовій і мікробіологічній промисловості, в медицині можуть використовуватися тільки достатньо очищені і навіть високоочищені ферменти. У процесі очищення відбувається підвищення питомої активності препарату. На прикладі Asp. oryzae показано залежність активності α-амілази від ступеня очищення препарату (табл. 20.3).

Таблиця20.3.

Послідовність очищення α-амілази Asp. oryzae

Стадія очищення	*Марка препарату*	*Активність Е/г АСР*
Поверхнева культура гриба	Пх	38
Упарений водний екстракт із культури	П2х	120-140
Осадження етанолом із екстракту	П10х	600-800
Осадження етанолом із діалізованого екстракту	П15х	1300-1400
Повторна кристалізація	П20х	2000-2500
Кристалічна α-амілаза	—	6600

З методів, які дають змогу одержувати ферментні препарати необхідного ступеня чистоти, широко використовується ***метод розділення***, який базується на неоднаковій розчинності білків.

Розділення найчастіше проводять шляхом осаджування білків-ферментів без втрати їх каталітичної активності. Осаджувати розчинні ферменти можна фізичними або хімічними впливами. Фізичні – нагрівання, охолодження, розбавлення або концентрування розчину. Із хімічних речовин для осаджування використовують солі неорганічних кислот і частіше сульфат амонію, а також органічні розчинники (етанол, ацетон, діоксан, поліетиленгліколь, декстран).

Високого ступеня чистоти ферментів досягають за допомогою ***хроматографії*** (адсорбційної, гідрофобної, ковалентної, іонообмінної, роздільної та гель-хроматографії), яка проводиться на гелях агарози, поліакриламіду, фосфату кальцію, а також на оксиді Al, силікагелі, крохмалі, целюлозі тощо.

Із інших методів виділення й очищення використовуються:

гель-фільтрація – це фракціонування ферментів за їх молекулярною масою за допомогою сефадексів, біогелів, ультрагелів;

зонально-швидкісне центрифугування в градієнті щільності (цукрози, гліцерину, декстрану, глікогену, білків тощо);

електрофорез – коли розчин ферменту поміщають у сильне електричне поле, яке приводить в рух його іонізовані компоненти;

ізоелектрофокусування – фермент фокусується у зоні, величина pH якої дорівнює його ізоелектричній точці.

З перелічених методів розділення і очищення ферментів лише деякі (іонообмінна і афінна хроматографія) впроваджені у крупнотоннажне виробництво. Перспективним для очищення ферментів є застосування водних двохфазових систем, які містять полімери, які стабілізують фермент, що дає змогу не застосовувати низькі температури.

20.3.3. Концентрування ферментів

Цей процес завершує стадії виділення і очищення. На цій стадії відбувається остаточне виділення вологи з продукту. Концентрування розбавлених білкових розчинів здійснюється такими методами: ***ультрафільтрацією*** – це фільтрація під тиском через мембрани, які діють за принципом молекулярного фільтра; ***випарюванням під вакуумом; ліофільним сушінням*** – висушуванням при низьких температурах під вакуумом; ***осаджуванням сульфатом амонію.***

Після концентрування препарат має містити не більше 6-8 % вологи. У цьому випадку термін його зберігання без втрати каталітичної активності становить один рік.

У процесі виділення й очищення фермент може інактивуватись. Тому всі процеси проводяться при низьких температурах і за присутності різних стабілізуючих агентів: субстратів, кофакторів, комплексоутворювачів, відновлюючих агентів.

20.3.4. Стандартизація ферментних препаратів

Стандартизацією називають операцію з доведення активності препарату до стандартної, яка визначена ДЕСТ або технічними умовами. Для цього використовують різні нейтральні наповнювачі. Частіше це крохмаль, лактоза, харчова сіль. Препарат і наповнювач ретельно перемішують.

Оскільки ферменти є речовинами білкової природи, то в суміші з іншими білками визначити їх кількість практично неможливо. Наявність ферменту в препараті може бути встановлена лише за перебігом тієї реакції, яку каталізує фермент. Кількісну характеристуку можна дати за кількістю утворених продуктів реакції або за кількістю витраченого субстрату за контрольованих (стандартних) умов проходження реакції (температура, pH

середовища, концентрація субстрату тощо). За рішенням Міжнародного біохімічного союзу була прийнята так звана ***стандартна одиниця активності*** (Е) – це кількість ферменту, яка каталізує перетворення одного мікромоля субстрату за 1 хв при заданих стандартних умовах.

Активність ферментного препарату виражається в мікромолях субстрату, який прореагував під дією 1 мл ферментного розчину або 1 г препарату в оптимальних умовах за 1 хв. Якщо ферментний препарат не містить баласту, його активність виражається в тих самих стандартних одиницях на ***1 мг ферменту.*** Якщо ж баласт є, то активність розраховується на ***1 мг білка*** у ферментному препараті. Активність ферментного препарату, який випускає завод, є одним з найважливіших нормованих показників його якості.

20.3.5. Ідентифікація і індексація ферментних препаратів

Для ідентифікації ферментних препаратів, які випускаються мікробіологічною промисловістю, використовують цифрову і буквену індексацію: Пх; П3х; П5х; П10х; П15х; П20х та Гх; Г3х; Г5х; Г10х; Г15х; Г20х. Перші букви «Г» або «П» вказують на спосіб культивування продуцента – поверхневий або глибинний. Наявність ферменту у препараті позначається буквою «Х». Наступні за буквами «П» або «Г» цифри показують ступінь очищення ферменту в процесі його одержання – чим вище очищення, тим більше число.

«Пх» або «Гх» – це технічні ферментні препарати, які містять 1–5 % цільового ферменту від маси білка, що синтезується, і велику кількість баластних речовин: біомасу продуцента, компоненти поживного середовища, продукти метаболізму.

20.4. ПРОМИСЛОВІ ФЕРМЕНТНІ ПРЕПАРАТИ

В сучасних промислових технологічних процесах велике значення мають гідролітичні ферменти. Однією із суттєвих переваг порівняно з іншими класами ферментів є їх здатність здійснювати ферментативні реакції без кофакторів і коферментів. У багатьох виробництвах гідролази замінили процес кислотного гідролізу. Їх висока специфічність дає змогу одержувати готові

продукти з мінімальною кількістю сторонніх речовин без зміни вихідних смаку й аромату.

Найчастіше використовуються такі групи ферментів:

Амілолітичні ферменти – α-амілаза і глюкоамілаза. Субстратом для них є крохмаль. Амілаза розщеплює крохмаль до більш простих поліцукрів – декстринів, а глюкоамілаза – декстрини і крохмаль до глюкози. Ці ферменти використовуються у харчовій, спиртовій промисловості та у тваринництві.

Протеолітичні ферменти утворюють клас пептидгідролаз (протеаз). Їх дія полягає у прискоренні гідролізу пептидних зв'язків у білках і пептидах. Важлива їх особливість – вибіркова, селективна дія на пептидні зв'язки у білковій молекулі. Наприклад, пепсин діє тільки на зв'язок з ароматичними кислотами, трипсин – тільки на зв'язок між аргініном і лізином.

Ферментів цього класу дуже багато. В промисловості їх класифікують за здатністю проявляти активність у певній області pH: pH 1,5–3,7 – кислі протеази; pH 6,5–7,5 – нейтральні протеази; pH → 8,0 – лужні протеази.

Використання протеаз широке: м'ясна промисловість – для розм'якшення м'яса; шкіряна промисловість – при видаленні шерсті (волосся) та розм'якшенні шкір; кіновиробництво; парфумерія – добавки у зубну пасту, креми, лосьйони; промисловість синтетичних миючих засобів; медицина – при лікуванні запальних процесів, опіків, тромбозів; тваринництво – домішки до раціонів сільськогосподарських тварин.

Пектолітичні ферменти (пектинази) – гідролізують пектинові речовини з утворенням органічних кислот. Використовуються: в текстильній промисловості – вимочування льону перед переробкою; у виноробстві – освітлення вин, знищення муті; у консервуванні – для виготовлення фруктових соків; у тваринництві – домішка до раціонів тварин для покращення перетравлення поживних речовин.

Целюлолітичні ферменти (целюлази) дуже специфічні, їх дія проявляється тільки у деполімеризації молекул целюлози. Зазвичай вони діють у вигляді комплексу, який в цілому доводить гідроліз целюлози до глюкози. Їх використання є дуже перспективним: в гідролізній промисловості – це отримання глюкози із целюлози; в медицині – виділення лікарських речовин (стероїдів) з рослин; у харчовій – покращення якості рослинних масел; у сільському господарстві – як домішки у комбікорми для жуйних.

Контрольні питання

1. В яких галузях народного господарства використовуються ферментні препарати?
2. Які існують джерела ферментів і які з них є перспективними для налагодження крупнотоннажного їх виробництва?
3. Які переваги мають мікроорганізми як джерела ферментів?
4. Які елементи є необхідними для росту мікроорганізмів – продуцентів ферментів?
5. Якими шляхами можна підвищити продуктивність штамів-продуцентів?
6. Чим відрізняються позаклітинні ферменти від внутрішньоклітинних і індуковані від конститутивних?
7. Які методи використовуються для культивування мікроорганізмів–продуцентів ферментів?
8. Які переваги та недоліки має глибинний метод культивування продуцентів?
9. Які переваги та недоліки поверхневого методу культивування продуцентів ферментів?
10. Які основні етапи одержання товарних форм ферментних препаратів?
11. Якими методами виділяють позаклітинні ферменти?
12. Як виділяють внутрішньоклітинні ферменти та які методи застосовують для дезінтеграції (руйнування) клітин?
13. У яких виробництвах використовують неочищені ферментні препарати?
14. Якими методами можна одержати очищені ферментні препарати?
15. Якими методами проводиться концентрування ферментного препарату?
16. Що таке стандартизація ферментів?
17. Як ідентифікуються ферментні препарати?
18. Чим відрізняються технічні ферментні препарати від очищених і які сфери їх застосування?
19. Як класифікуються промислові ферментні препарати і де їх застосовують?

Розділ 21.

БІОТЕХНОЛОГІЯ ВИРОБНИЦТВА БІЛКА

Однією із першочергових є проблема білка, яка потребує якнайшвидшого вирішення. Вона актуальна як для людей, так і для тварин: якщо рослини мають здатність до синтезу амінокислот із неорганічних азотомістких речовин, то людина і тварина мають одержувати білки у готовому вигляді разом з харчовими продуктами та кормом.

Якщо нестачу харчової енергії в раціоні людини і тварини можна певною мірою компенсувати зниженням рухливості, то ні в людини, ні у тварини немає біологічних механізмів зменшення потреби в білку. За нестачі білка знижується працездатність і резистентність людини, а дефіцит білка в раціоні тварини не дає змогу реалізувати генетичний потенціал продуктивності і забезпечити на належному рівні стан здоров'я та їх відтворювальну здатність. Проблема поглиблюється тим, що потреба тварин у білку збільшується при підвищенні рівня продуктивності і при багатьох захворюваннях, а також у стресових ситуаціях.

Всередині XX століття стало очевидним, що задовольнити зростаючу потребу людей і свійських тварин у білках традиційними шляхами нереально. Наприклад, у 1982 р. потреби тваринництва в білку задовольнялись лише на 70–75 %. Дефіцит кормового білка призводить до зниження продуктивності тварин на 30–35 %, підвищення собівартості тваринницької продукції і витрати кормів приблизно у півтора раза.

Однак проблема не зводиться тільки до одержання з раціоном певної кількості білка. Необхідно, щоб у ньому була достатня кількість незамінних амінокислот у певному співвідношенні.

Традиційно основним джерелом білка у раціоні тварин є зерна злакових культур, але в них мало білка і він є неповноцінним через недостатній вміст незамінних амінокислот. Джерелом повноцінного білка є корми тваринного походження – антиіди м'ясна, м'ясо-кісткова, рибна, молоко і відходи його переробки. Але ці корми дефіцитні і мають високу вартість.

Найбільш розповсюдженим у світі способом балансування раціонів за білком є добавка до них соєвої муки, білок якої за своєю біологічною повноцінністю наближається до кормів тваринного походження. Але ця культура трудомістка, врожаї ще досить низькі, а звідси висока її вартість. Головним постачальником сої на світовий ринок є США, на долю яких припадає 2/3 світового її виробництва. Переважно на американській соєвій муці базується інтенсивне тваринництво Америки, Західної Європи і Японії.

21.1. ВИРОБНИЦТВО БІЛКІВ ОДНОКЛІТИННИХ ОРГАНІЗМІВ

Альтернативним соєвому є білок, одержаний мікробіологічним шляхом за допомогою ***мікроорганізмів***.

Вперше вислів «білки одноклітинних організмів» (БОО) використали в 60-ті роки XX ст. стосовно мікробних білків, які продукуються масовими культурами дріжджів або бактерій, що використовуються у харчуванні людей або годівлі тварин. Перевагою біотехнологічного виробництва білка є те, що воно не залежить від погодних і кліматичних умов, не потребує посівних площ, є високоінтенсивним і піддається автоматизації.

Мікроорганізми – продуценти білків відзначаються дуже високою інтенсивністю накопичення біомаси, яка в 500–5000 разів вище, ніж у рослин або тварин. Мікробні клітини здатні накопичувати дуже великі кількості білка (дріжджі – до 60 %, бактерії – до 75 % за масою). Коливання вмісту білка у сухій речовині біомаси мікроорганізмів може складати від 19 до 90 % (табл. 21.1). У мікробіологічному виробництві за рахунок високої специфічності мікроорганізмів відсутня багатостадійність, а сам процес біосинтезу відбувається у м'яких умовах при температурі 30–45 °С, pH 3–6 і тиску ~ 0,1 МПа, він менш трудомісткий порівняно з одержанням сільськогосподарської продукції і органічним синтезом білків.

Мікроорганізми як продуценти білка мають перевагу і в тому, що можуть використовувати як субстрат різноманітні речовини, які в основному є відходами інших виробництв. Джерелом сировини для них є рідкі парафіни нафти, метан природного газу і біогазу, метиловий і етиловий спирти, рос-

линна сировина, відходи і побічні продукти сільського господарства і промисловості (солома, корзинки соняшника після видалення насіння, костриця льону, коноплі, гичка, дерев'яна тирса, стружка, целюлоза, меляса, молочна сироватка, гнойова біомаса тощо).

Таблиця 21.1.

Вміст білка в клітинах деяких бактерій і грибів,
% від сухої маси (Єлінов Н.П., 1995)

Мікроорганізм	*Білок, %*	*Мікроорганізм*	*Білок, %*
Aspergillus flavus	19	Rhodotorula rubra	56
Aspergillus niger	33	Saccharomyces cerevisiae	56
Rhizopus nigricans	36	Streptomyces griseus	57
Penicillium notatum	38	Bacillus subtilis	63
Bacillus megaterium	39	Staphylococcus aureus	65
Candidia arborea	46	Eserihia coli	82
Lactobacillus casei	47	Lactobacillus fermentans	87
Candidia utilis	53	Methanobacterium sp.	90
Hansenula suaweolens	53		

Із мікроорганізмів для одержання білка найчастіше використовують як продуценти дріжджі, бактерії, мікроскопічні гриби, одноклітинні водорості. Різноманітність типів живлення мікроорганізмів і їх видового складу дозволяє вибирати сировину, яка найбільше підходить для біосинтезу, і кращі штами – продуценти білка.

Одноклітинні організми характеризуються високим вмістом білка – від 40 до 80 % і більше. Білок одноклітинних містить усі (10) незамінні амінокислоти (табл. 21.2), багатий на лізин, який визначає його біологічну повноцінність. Добавка біомаси одноклітинних до дефіцитних за лізином рослинних кормів дає можливість наблизити їх амінокислотний склад до оптимального. Недоліком біомаси одноклітинних є дефіцит сірковмісних амінокислот, в першу чергу метіоніну. В одноклітинних його приблизно удвічі рази менше, ніж у рибній муці. Однак цей недолік має і білок сої.

Багата білками біомаса одноклітинних з високою ефективністю засвоюється сільськогосподарськими тваринами. Так, 1 т

кормових дріжджів дає можливість одержати 0,4–0,6 т свинини, до 1,5 т м'яса птиці, 25–30 тис. яєць і заощадити 5–7 т зерна. Це має велике народногосподарське значення, оскільки майже 80 % площ сільськогосподарських угідь у світі відведено для виробництва кормів.

Таблиця 21.2.

Вміст незамінних амінокислот у білку мікробного, рослинного і тваринного походження, *% (Хазін Д.А., 1987).*

Шляхом селекції можна відібрати найбільш продуктивні штами мікроорганізмів–продуцентів, які здатні ефективно використовувати нові джерела сировини. Широкі можливості дають біотехнології рекомбінантних ДНК, завдяки яким можливо удосконалювати або одержувати нові продуценти.

Усі ці переваги і визначили швидкий розвиток технології одержання мікробного білка, яка є найбільш крупнотоннажною галуззю біотехнології. Уже в 1980 р. провідним у світі виробником білків одноклітинних організмів став Радянський Союз. Виробництво білків у країні тоді досягло 1,1 млн т на рік.

21.2. МІКРООРГАНІЗМИ–ПРОДУЦЕНТИ БІЛКА

Дріжджі використовуються у різноманітних мікробіологічних процесах і є дуже перспективними продуцентами білка. Для одержання кормової білкової біомаси використовують різні раси дріжджів, але найчастіше – культури родів Candidia, Torulopsis і Saccharomyces. Ці роди мають здатність використовувати як гексози, так і пентози й органічні кислоти. У процесі виробництва вони швидко адаптуються до токсичних та інгібуючих речовин. Добре ростуть при pH 4,2–4,4.

При виробництві дріжджів використовується легкодоступна і дешева сировина. Традиційними для культивування дріжджів є вуглецеві субстрати (меляса, гідролізати деревини, молочна сироватка, відходи крохмального виробництва і сільського господарства). Нетрадиційна сировина – дистиляти нафти, н-алкани, синтетичний етанол і метанол тощо.

Дріжджі як продуценти білка мають низку переваг порівняно з іншими мікроорганізмами: спосіб їх культивування в промислових умовах достатньо відпрацьований; клітини дріжджів більші за клітини бактерій, що полегшує сепарацію; поживна цінність і гігієнічні якості біомаси добре вивчені.

Вміст поживних речовин у дріджовій біомасі залежить від виду дріжджів, умов культивування і субстрату. Кількість білка коливається від 40 до 60 % від сухої речовини біомаси. За якістю білка дріжджі, як і інші мікроорганізми, значно перевершують рослинні корми і прирівнюються до білків тваринного походження. Так, кормові дріжджі містять у 5 разів більше білка (в тому числі лізину – в 10, метіоніну – у 5 разів і триптофану – тричи), ніж ячмінь.

Особливу цінність кормовим дріжджам надає наявність в них комплексу вітамінів групи В, які беруть участь в розщепленні вуглеводів з виділенням енергії. За вмістом цих вітамінів дріжджі перевершують усі протеїнові корми рослинного і тваринного походження.

Поряд з позитивними якостями дріжджі мають і деякі недоліки. Білок дріжджів бідний на сірковмісні амінокислоти (вміст метіоніну удвічі-тричі менший, ніж у м'ясному білку) і містить порівняно велику кількість (3–6 %) нуклеїнових кислот. Клітини дріжджів мають міцну оболонку, що ускладнює доступ хар-

чотравних ферментів до поживних речовин клітин і їх потрібно дезінтегрувати (руйнувати).

Джерелом азоту для дріжджів є солі амонію або нітрати. Вуглець вони одержують із різноманітних органічних субстратів. Перетворення неорганічного азоту в білок і асиміляція різних органічних субстратів як джерела вуглецю – це основні процеси, які сприяли виробленню білка дріжджами у промисловому масштабі.

Непатогенні бактерії. Бактерії як продуценти білка привертають увагу великою швидкістю росту: вони ростуть у середньому в 4 рази швидше дріжджів і майже в 30 разів швидше водоростей. Перевагою також є більш високий вміст білка порівняно з іншими мікроорганізмами – 60–83 % від сухої речовини, а також амінокислот метіоніну і цистіну порівняно з дріжджами. Стінки клітин бактерій легше руйнуються.

До основних недоліків бактерій можна зарахувати високий рівень в білку нуклеїнових кислот (до 25 %), наявність в клітинах низку компонентів, нешкідливість яких для тварин викликає сумнів (циклопропанові і мультирозгалужені жирні кислоти, полі-β–оксимасляна кислота, α-амінокислоти тощо); більш низький коефіцієнт виходу біомаси і порівняно складний процес виділення її з культурального середовища через малий розмір клітин.

Плісняві гриби невибагливі до умов культивування і ростуть у різних умовах кислотності, температури і осмотичного тиску. Відмінною особливістю мікроскопічних грибів є їх здатність синтезувати комплекс гідролітичних ферментів, які можуть утилізувати складні поліцукри і лігнін, що є малодоступними для інших мікроорганізмів. Це створює можливість прямої трансформації целюлозо- і крохмалевмісних субстратів у білок і робить мікроскопічні гриби перспективними продуцентами мікробного білка з відходів сільського і лісового господарства та деяких галузей харчової промисловості.

Як продуценти білка, амінокислот, вітамінів та інших біологічно активних речовин використовують гриби родів Aspergillus, Fusarium, Trichoderma тощо.

Грибний білковий продукт має низку переваг: він містить ароматичні речовини, які надають йому приємного запаху; нитчаста природа грибного білка забезпечує відносно легке відокремлення біомаси під час промислового виробництва; аміно-

кислотний склад відзначається більш високим рівнем сірковмісних амінокислот і наближається до амінокислотного складу м'яса; грибний білок містить незначні кількості (1–4 %) нуклеїнових кислот; клітинна стінка грибів тонка, завдяки чому білок легко перетравлюється без попередньої обробки. Перспективні як продуценти для одержання кормових білків. Грибні препарати використовуються для підвищення перетравності грубих кормів і збагачення їх різними біологічно активними речовинами.

До недоліків грибів належить порівняно низький рівень протеїну, який коливається в широких межах (20–60 % від сухої речовини) і відносно повільний ріст – швидкість подвоєння біомаси грибів складає 4–16 год, дріжджів – 2–3 год.

Мікроводорості. Одноклітинні водорості є фототрофними мікроорганізмами й потребують для росту відмінних умов, порівняно з іншими мікроорганізмами – продуцентами білків. Для їх росту необхідно: світло, достатня кількість вуглекислого газу, мінеральних речовин і певний температурний режим, а сам процес потребує значних об'ємів води.

Серед великої кількості видів одноклітинних водоростей найбільш прийнятними продуцентами є зелені протококові водорості роду Chlorella і Scenedesmus, а також синьо-зелена спіралеподібна водорость Spirulina. Розмір спіруліни приблизно в 100 разів більший, ніж хлорели і сценедесмуса – 500 мкм. Вона добре росте в лужному середовищі з pH 9–11, а хлорела і сценедесмус – у середовищі, близькому до нейтрального. Протококові водорості мають міцну целюлозну оболонку, а у спіруліни її немає.

Мікроводорості у штучних умовах культивують в основному на мінеральних середовищах, але вони добре ростуть і на стічних водах, гнойовій біомасі, у солоних, прісних і лужних водоймищах (спіруліна).

Мікроводорості належать до організмів з активним біосинтезом білків, вітамінів, жироподібних та інших біологічно активних речовин. Вміст білка у зелених водоростей складає 45–55 %, а у спіруліни – 60 %. Білок мікроводоростей має у своєму складі усі (10) незамінні амінокислоти. За вмістом цих амінокислот його можна порівняти з білком кормових дріжджів і сої. Натомість білок водоростей має низький вміст сірковмісних амінокислот, а білок спіруліни ще й низький вміст лізину і досить високий вміст нуклеїнових кислот.

Світовий досвід показує, що біомаса водоростей за вмістом протеїну перевищує соєву дерть (40–65 % проти 35–40 % відповідно), але поступається перед соєю за вмістом жиру (2–15 % проти 15–20 % відповідно). Але рівень збалансованості протеїну біомаси водоростей за амінокислотами виявився нижчим порівняно з білком сої. Перетравність протеїну протококових водоростей коливається в межах 45–46 % через міцну їх оболонку, а спіруліни – 70 %.

Біомаса мікроводоростей багата каротином (1500 мг/кг сухої біомаси, що у 7–9 разів більше, ніж у трав'яній муці вищої якості з люцерни), містить багато вітамінів, макро- і мікроелементів.

Хімічний склад мікроводоростей лабільний і визначається значною мірою умовами їх культивування. Змінюючи склад поживного середовища й інші умови (температуру, освітлення) можна підвищувати в мікроводоростях вміст білка від 8 до 60 %, вуглеводів – від 6 до 37 %, ліпідів – від 5 до 85 %.

Серед мікроводоростей більш перспективною для одержання білка є спіруліна, біомаса якої містить в середньому 65 % білка, однак у білку міститься мало лізину.

21.3. ПРИНЦИПОВА ТЕХНОЛОГІЧНА СХЕМА ОДЕРЖАННЯ МІКРОБНОГО БІЛКА

Незалежно від виду сировини, яка використовується, технологія одержання білка шляхом накопичення біомаси мікроорганізмів (дріжджів, бактерій, мікроскопічних грибів) має загальну технологічну схему (рис. 21.1). Основною серед етапів технології є стадія ферментації, а головним апаратом є ферментер, у якому відбувається ріст і розвиток мікроорганізмів-продуцентів. Під ферментацією мають на увазі всю сукупність послідовних операцій від внесення у заздалегідь підготовлене живильне середовище продуцента і до завершення процесів росту, біосинтезу або біотрансформації внаслідок вичерпування поживних елементів середовища, припинення біосинтезу, втрати активності культурою або з інших причин.

У ферментер з культурою мікроорганізмів постійно подається органічна сировина (джерело вуглецю), розчини мінеральних солей, аміак і повітря, а з ферментера відбирається

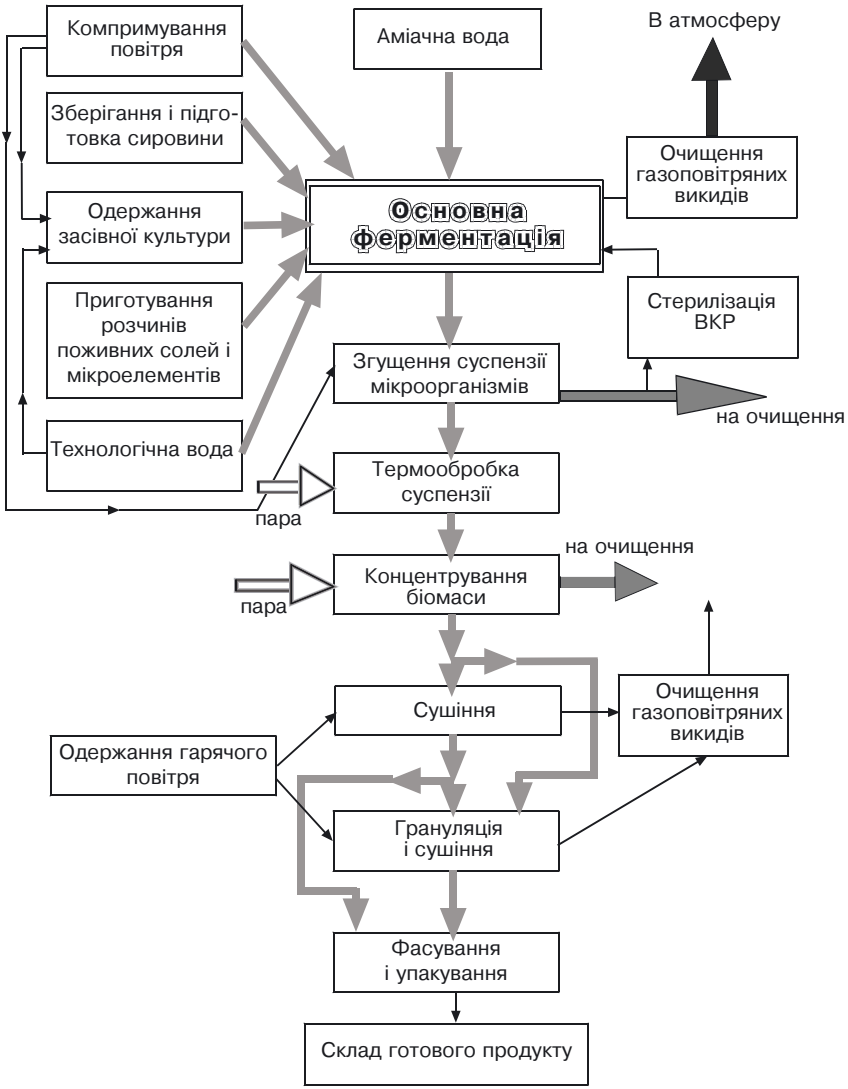


Рис. 21.1. ***Принципова технологічна схема одержання кормової біомаси***
(за В.А. Биковим та ін., 1987).

суспензія клітин у водному середовищі. Клітини відділяють від водного розчину сепарацією, обробляють теплом і висушують. Продукт може бути випущений у пилоподібній або гранульованій формі. Вміст білка в продукті складає 50–66 %. Повноцінність виробленого мікробного білка визначається за вмістом лізину (незамінної амінокислоти). У дріжджах його міститься з розрахунку на білок близько 10 % (для порівняння – вміст лізину в сої становить трохи більше 6 %).

Обов'язковою стадією технологічної схеми одержання білкових речовин є процес очищення газоповітряних викидів (ГПВ), в яких містяться живі клітини мікроорганізмів, білковий пил та інші продукти білкового синтезу.

21.4. ОДЕРЖАННЯ МІКРОБНОГО БІЛКА НА ВІДХОДАХ ПЕРЕРОБКИ НАФТИ

Ще донедавна вуглеводні нафти (очищені н-парафіни і нафтові дистиляти) були одним із перспективних джерел сировини для одержання кормового білка. Їх засвоює особлива група мікроорганізмів, до складу яких входить не менше тисячі видів. Вченими було установлено, що здатність використовувати нафту і нафтопродукти мають багато бактерій і мікроскопічних грибів, які розповсюджені на ґрунті нафтових родовищ та промислів.

У 60-ті роки XX ст. західні нафтові компанії розробили технологію вирощування біомаси дріжджів Candidia lipolitica на очищених н-парафінах (н-алканах), виділених із нафти. А уже в 1973 р. у Радянському Союзі почав функціонувати перший у світі завод з виробництва кормових дріжджів на н-алканах нафти потужністю 70 тис. т на рік. Станом на 1988 рік у країні працювало 86 установок, які виробляли мікробний білок.

Як продуценти можна використовувати дріжджові або бактеріальні культури, однак розповсюдження одержали майже всі дріжджі роду Candidia: C. guilliermondii, C. maltoza, C. sake. Ці мікроорганізми за оптимальних умов культивування здатні забезпечити високий коефіцієнт засвоєння субстрату (н-алканів) – до 40 % і накопичувати велику кількість білка (вище 60 %).

Продукт (білок), одержаний на рідких парафінах або н-алканах (паприн), містить близько 60 % сирого протеїну, жи-

рів – до 5 %, легко перетравних вуглеводів – 10–20 %, мінеральних речовин – 5–8 %, вітаміни групи В, ергостерин.

Однак у зв'язку з обмеженістю сировинних ресурсів і підвищенням їх вартості ця технологія тепер не використовується для крупнотоннажного промислового виробництва білка.

Альтернативними субстратами для одержання мікробіального білка є гази, які містять метан, нижчі спирти (метанол, етанол), вуглеводи рослинного походження і в перспективі водень.

21.5. ОДЕРЖАННЯ МІКРОБНОГО БІЛКА НА ПРИРОДНОМУ ГАЗІ (МЕТАНІ)

Природний газ як сировина для одержання мікробного білка теж втратив перспективу через обмеженість ресурсів і високу вартість на світовому ринку.

Дослідження, проведені в 60–70-х роках XX ст., дали можливість виділити чисті культури мікроорганізмів, здатних ефективно перетворювати метан природного газу на білок. Це метанокислюючі бактерії, і основним з них є Metylococcus capsulatus, який належить до облігатних метилотрофних мікроорганізмів.

Специфічність процесу культивування метаноокислюючих бактерій на природному газі полягає в тому, що основні поживні речовини – це гази (метан і кисень), які необхідно підвести у достатній кількості до стінок клітин, а оптимальна концентрація метану залежить від співвідношення метан : повітря або метан: кисень. Встановлено, що потреба бактерій у кисні у 2–3 рази перевищує їх потребу у метані.

Культивування мікроорганізмів на метані порівняно з вирощуванням на інших субстратах має як переваги, так і недоліки.

До переваг належить чистота природного газу, який на відміну від парафінів нафти не містить речовин, котрі потрібно було б видаляти з біомаси. Крім того, природний газ легко транспортується по трубах.

До недоліків природного газу як субстрату слід віднести погану його розчинність у культуральному середовищі, повільний ріст метаноокислюючих бактерій, підвищене споживання кисню (у 5 разів вище, ніж на вуглеводах, і у 2–2,5 рази вище, ніж на н-парафінах) та вибухонебезпечність.

Дослідження щодо використання метану як сировини для одержання білка, розпочаті компанією «Шелл» (Велика Британія) в 1975 р., досить швидко припинилися через недостатню ефективність створеного з цією метою обладнання. Виявилось, що вигідніше попередньо окислювати метан у метиловий спирт хімічним шляхом, а потім використовувати його як субстрат для вирощування мікроорганізмів.

Одержана на метані кормова бактеріальна біомаса (гаприн) містить до 75 % протеїну, ліпідів – до 5 і золи – до 10 %. Білок за амінокислотним складом і поживною цінністю прирівнюється до рибної муки або соєвого шроту.

21.6. ОДЕРЖАННЯ МІКРОБНОГО БІЛКА НА НИЖЧИХ СПИРТАХ — МЕТАНОЛІ І ЕТАНОЛІ

Метанол, який є продуктом окислення метану, вважається найперспективнішим субстратом для одержання мікробного білка. Джерелом крупнотоннажного виробництва метанолу є не тільки метан природного газу, запаси якого обмежені, а й метан біогазу, який одержують із поновлюваної рослинної біомаси.

Основними перевагами цього субстрату є висока чистота метанолу, добра його розчинність у воді, висока леткість, яка дозволяє легко видаляти його залишки із готового продукту. Крім того, мікробна біомаса, одержана на метанолі, не містить небажаних домішок, що дає змогу уникнути в технологічному процесі стадії очищення. Недоліком метанолу як субстрату є його горючість і можливість утворення з повітрям вибухонебезпечних сумішей у діапазоні концентрації 6–35 % (за об'ємом), а також високу токсичність метанолу, що вимагає при роботі з ним дотримання правил техніки безпеки.

Мікроорганізмами-продуцентами є як дріжджові, так і бактеріальні штами. Із дріжджів використовуються Candidia boidinii, Hansenula polymorpha і Piehia pastoris, а з бактеріальних культур – Methylomonas clara, Pseudomonas rosea та інші.

Дуже важливим моментом при використанні метанолу є вибір ефективного штаму-продуценту. Установлено, що бактерії утилізують метанол з більшим виходом мікробної біомаси порівняно з дріжджами, проте дріжджі мають низку технологічних переваг над бактеріями. Первинне окислення метанолу в дріжджів

каталізується оксидазною реакцією, а в бактерій – дегідрогеназою. Перспективним є об'єднання переваг обох мікроорганізмів у одній клітині методами генетичної інженерії. Для цього за допомогою біотехнології рекомбінантних ДНК ген, що кодує синтез бактеріального ферменту метанолдегідрогенази, яка каталізує первинне окислення метанолу, переносять з бактеріальної у дріжджову клітину і створюють умови для його експресії.

Перспективним також є використання сумішей культур, одні з яких споживають тільки метиловий спирт, а інші – решту субстратів і продуктів власного метаболізму.

Одержані на метанолі кормові дріжджі (меприн) містять 56–62 % сирого протеїну, а бактеріальна біомаса – 70–74 %.

Етанол як субстрат для одержання мікробного білка має такі переваги: мала токсичність, добра розчинність у воді, досить висока летючість, невелика кількість домішок і можливість легкої його утилізації практично всіма мікроорганізмами. Крім того, за рахунок наявності в молекулі спирту кисню, потреба в кисні або повітрі нижча, а звідси менші тепловиділення й інтенсивність аерації. Але разом з тим етанол – це легкозаймиста рідина, яка утворює з повітрям вибухонебезпечні суміші в інтервалі концентрацій 3–20 % (за об'ємом).

Вартість очищеного етанолу на світовому ринку удвічі більша, ніж метанолу, але етанол відрізняється високою ефективністю біоконверсії. З 1 кг етанолу можна одержати до 880 г дріжджової маси, а з 1 кг метанолу – до 440 г. На етанолі одержують високоякісний білок, який може використовуватись у харчуванні людей.

Як мікроорганізми-продуценти білка на етиловому спирті (єдиному джерелі вуглецю) можуть використовуватись дріжджі (Candidia utilis, Saccharomyces lambica, Hansenula anomala) і бактерії (Acinetobacter calcoaceticus), однак останні мають менше практичне значення.

Дріжджовий кормовий білок, одержаний на етанолі (еприн), містить 60–62 % сирого протеїну і дуже багатий на лізин – до 7 %. Недоліком білка є невелика кількість сірковмісних амінокислот і перш за все метіоніну, що знижує його біологічну повноцінність.

21.7. ОДЕРЖАННЯ МІКРОБНОГО БІЛКА НА ГІДРОЛІЗАТАХ РОСЛИННИХ ВІДХОДІВ

Історично одним з перших субстратів, які використовувались для одержання кормової мікробної біомаси, були гідролізати рослинних відходів, предгідролізати і сульфітний луг – відходи целюлозо-паперової промисловості.

В середині 30-х років XX ст. у колишньому Радянському Союзі було розпочато виробництво кормових дріжджів на гідролізатах рослинної сировини. Ця технологія не знайшла розповсюдження на Заході. Суть цієї технології одержання білка – це кислотний гідроліз рослинних поліцукрів до пентоз і гексоз (при одностадійному гідролізі), або тільки до пентоз і тільки до гексоз (при двостадійному гідролізі), які можуть використовуватись або безпосередньо як джерело вуглецю і енергії для вирощування дріжджів, або з названих моноцукрів одержують етанол з подальшою його трансформацією у дріжджову біомасу.

Основними промисловими штамами-продуцентами є різні види дріжджів – Candidia utilis, C. scottii і C. tropicalis, здатні засвоювати пентози і гексози і навіть переносити наявність фурфуролу у середовищі.

Основна перевага технології – це одержання продукту без залишків вихідної сировини, а отже, більш стабільного і контрольованого складу та поновлення сировинних джерел (рослинної біомаси). Недоліком є необхідність використання агресивних середовищ і високих тисків на стадії гідролізу, значні витрати на його проведення та транспортування рослинної сировини. Гідролізні підприємства мають невеликі потужності і свого часу внесли великий вклад у вирішення проблеми кормового білка. Кормові дріжджі, одержані на гідролізатах рослинної сировини, містять до 43–58 % білка.

Крім рослинних, використовуються і гідролізати відходів тваринництва (гнойових стоків від свиней) для вирощування кормових дріжджів. Ця технологія використовувалась у Чехословаччині.

21.8. ОДЕРЖАННЯ БІЛКА ОДНОКЛІТИННИХ ВОДОРОСТЕЙ

Одноклітинні водорості є одним із суттєвих резервів харчового і кормового білка.

На відміну від технології вирощування бактерій і дріжджів культивування мікроводоростей не належить до безперервних процесів, оскільки проходить за рахунок фотосинтезу. Ефективність виробництва біомаси водоростей залежить від умов освітлення, температури та складу живильного середовища, а сам процес потребує великих об'ємів води.

Вирощувати одноклітинні водорості можна як у природних умовах у прісних, солоних і лужних водоймищах, так і спеціальних фітобіологічних реакторах на штучних середовищах та гнойових стоках тваринницьких підприємств.

Крупнотоннажне культивування зелених водоростей здійснюється у багатьох країнах. Так, у Японії шляхом розмноження у прісних водоймищах одноклітинної водорості хлорели вдалось одержати близько 16 т білка з 1 га поверхні водоймища. Для порівняння – з 1 га посівів арахісу можна одержати лише 471 кг білка.

Вчені розробили фітобіологічні реактори, призначені для культивування морських водоростей. У спрощеному вигляді такий реактор являє собою скляну або пластикову трубу, в якій вирощують певний вид водоростей. Її щільність за допомогою ЕОМ і мікропроцесорів підтримується на оптимальному рівні, а вихід біомаси регулюється залежно від інтенсивності сонячного освітлення. Такий реактор може бути споруджений над морем. Він може бути використаний для виробництва великих кількостей кисню, необхідного для різних галузей промисловості. Вчені розрахували, що в такому реакторі може використовуватись до 14 % сонячної енергії. Для порівняння – у полі рослини засвоюють лише 1 % енергії.

В Орегонському університеті (США) проведені дослідження з вирощування мікроводоростей – хлорели, спіруліни, сценедесмус на гнойових стоках, які збирали зі свинарників по трубах у спеціальний басейн, в якому підтримували певні умови освітлення і температуру. Найкращий ріст хлорели спостерігався при температурі 35 С і вмісті в 1 л середовища 250 мг азоту.

У колишньому Радянському Союзі була також розроблена технологія вирощування хлорели на стоках свинарських комплексів з подальшим використанням біомаси тваринам.

В Україні в 50–60-х роках XX ст. була зроблена спроба вирощування хлорели у виробничих умовах. Досвід культивування цієї водорості показав, що її доцільно розмножувати з метою отримання кормової добавки для тварин і птиці. Проте значних успіхів у використанні хлорели досягти не вдалось, що пов'язано зі складнощами, які виникали під час концентрування біомаси та її нарощування.

Більш перспективною для одержання білка є синьо-зелена водорость спіруліна (Spirulina platensis, S. maxima), яка краще розмножується на штучних середовищах порівняно з хлорелою.

У комісії Європейського співтовариства розглянуто декілька ефективних і перспективних систем для вирощування біомаси спіруліни на кормові і харчові цілі: турбулярно-циліндрично-канальчата система Монтедісона; відкрита турбулярна система з розмноженням в лотках для заводських умов; система $E_1 – E_6$ для виробництва біомаси на стічних водах.

На інтенсивність росту і швидкість нагромадження біомаси та її хімічний склад значний вплив має температура, освітлення та склад живильного середовища і особливо концентрація в ньому азоту. У всіх водоростей зі зростанням рівня азотного живлення з 8 мг/л до 450 мг/л спостерігалось зростання інтенсивності нарощування біомаси та підвищення вмісту протеїну в біомасі з 8 до 54 %.

Оптимальною для вирощування спіруліни є температура 30–42 °С. Із подальшим зростанням температури інтенсивність росту водорості та кількість протеїну у біомасі знижується.

При культивуванні спіруліни в умовах нестачі сонячного випромінювання і в туманні дні інтенсивність росту спіруліни різко знижувалась.

На відміну від дріжджів та деяких інших видів мікроорганізмів спіруліна може інтенсивно розмножуватись у широких діапазонах концентрацій мінеральних речовин. Для культивування спіруліни найчастіше використовують середовище Заррука, в якому міститься значна кількість бікарбонату натрію (16,8 г/л), що створює pH на рівні 9,5.

Генетичне вдосконалення штамів спіруліни може значно підвищити інтенсивність росту і накопичення біомаси. В Мек-

сиці методами генної інженерії були одержані штами, які росли на різноманітних лужних середовищах і в штучних умовах. Вихід біомаси спіруліни досягнув 10–20 т на 1 га.

Аналізи зразків Spirulina, одержаних у лабораторних умовах і зібраних у природі, проведені у Французькому інституті нафти, а також в Японії, Італії, Мексиці показали, що у ній міститься в середньому 65 % білків (значно більше, ніж у сої), 19 % вуглеводів, 6 % пігментів, 4 % ліпідів, 3 % волокон і 3 % золи. Клітинні оболонки краще перетравлюються, порівняно з хлорелою і сценедесмус.

В умовах збалансованості біогенними макро- і мікроелементами, достатнім рівнем забезпечення теплом і світлом спіруліна може синтезувати органічну речовину з високим вмістом протеїну (87–91 %), в тому числі 60–70 % білка, небілкових азотовмісних сполук 21–27 %, безазотистих екстрактивних речовин 8–10 % та 6–8 % золи. За рівнем збалансованості білків незамінними амінокислотами спіруліна займає проміжне положення між білками рослинного та тваринного походження *(Кир'яченко С.П., 1997)*.

На кормові і харчові цілі можуть використовуватись три види продуктів, виготовлених зі спіруліни: пастоподібна суспензія після сепарування; суха зневоднена біомаса методом ліофільного висушування або висушена на барабанних сушарках та методом розпилювального сушіння в камерах; суха маса, отримана після ферментації і екстракції легкорозчинних речовин.

21.9. ОТРИМАННЯ ВИСОКОБІЛКОВИХ КОРМОВИХ ПРЕПАРАТІВ ІЗ СИРОВИНИ, ЩО ПОСТІЙНО ВІДНОВЛЮЄТЬСЯ

Вирощування дріжджів і бактерій на очищених рідких парафінах нафти, природному газі, а також на їх окислених похідних – спиртах і кислотах іще донедавна був основним способом крупномасштабного промислового виробництва кормових білкових концентратів.

Однак зростаючий дефіцит цих видів сировини у світі, ріст цін на нафтопродукти і газ стимулювали пошуки нових джерел сировини для мікробіологічної промисловості. Такими перспек-

тивними видами сировини є рослинна біомаса і відходи тваринництва. Рослинна біомаса належить до поновлюваних джерел сировини. Це різні плоди і соки, крохмалевмісні клубні, трав'яниста, кущова, дерев'яниста рослинність, а також численні і різноманітні відходи їх промислової переробки і сільськогосподарського виробництва.

Рослинна сировина є практично необмеженим ресурсом для виробництва білкових речовин. Ресурси біомаси у світі величезні і оцінюються в 100 млрд. т сухої речовини на рік. При її переробці утворюється велика кількість відходів. Так, при переробці деревини у целюлозо-паперовій промисловості ефективно використовується лише 50 % її маси. Згідно з розрахунками французьких фахівців, світові ресурси вуглеводів, які містяться у рослинних відходах сільськогосподарського виробництва (соломі, висівках тощо) сягає 585 млн. т на рік.

Розроблена безвідходна технологія утилізації рисової соломи, яка не використовується ні в годівлі тварин, ні як підстилка через жорсткість. Із тонни рисової соломи можна одержати 100 кг кормових дріжджів і 200 $м^3$ теплоізоляційних волокнистих плит. За прогнозами українських спеціалістів, за умови створення у трьох основних рисосіючих гегіонах України (АРКрим, Одеській і Херсонській областях) відповідних виробничих потужностей, можна буде одержувати щорічно 20–25 тис. т кормових дріжджів і 40–45 тис. $м^2$ теплоізоляційних плит *(Ю.П. Лебединський і ін., 1990)*.

Таким чином, рослини утворюють величезну біомасу, яка на сьогодні використовується ще недостатньо. Ця маса багата вуглеводами, але бідна азотом і білком. Використовуючи біомасу як субстрат для мікроорганізмів, її можна перетворити на багаті білком, жирами, вітамінами кормові препарати. Для цього використовуються такі принципово різні технологічні прийоми, як ферментація у зануреній культурі і твердофазова ферментація рослинної сировини.

У колишньому Радянському Союзі у ВНДІ біотехніка була розроблена біотехнологія одержання кормових продуктів на основі мікробіологічного синтезу з використанням як сировини різних целюлозовмісних відходів промислового і сільськогосподарського виробництва (жом, виноградні вижимки, пивна дробина, корзинки соняшника, костриця льону, коноплі тощо). Методами глибинної і твердофазової ферментації одержали

продукт, який, залежно від якості сировини, містить 25–50 % протеїну, ферменти целюлолітичної дії, вітаміни, ліпіди.

Отже, усі рослинні відходи можна перетворити на багаті білком, жирами, вітамінами кормові препарати мікробного походження. Для цього використовують декілька принципово різних технологічних рішень – культури мікроорганізмів вирощують глибинним або поверхневим методом.

21.9.1. Ферментація у зануреній культурі, або глибинне культивування мікроорганізмів

При цьому типові ферментації використовується як крохмалевмісна, так і целюлозовмісна рослинна сировина.

Для ферментаціїї ***крохмалевмісної сировини*** використовуються мікроорганізми-продуценти, які мають ферменти для гідролізу крохмалю (амілази). Це дріжджі роду Candidia та деякі плісняві гриби (роди Fusarium, Chrysosporium, Aspergillus, Myrothecium та ін.). Мікроорганізми-продуценти вирощують у звичайних ферментерах на синтетичних середовищах, куди як джерела вуглецю і енергії додають крохмаль або крохмалевмісну сировину (картоплю і продукти її переробки, подрібнене зерно кукурудзи тощо).

Продуктом такої ферментації є препарат, який містить залишки вихідної сировини, збагаченої на 17–20 % білком за рахунок біомаси дріжджів і пліснявих грибів.

Для одержання збагачених мікробним білком кормових препаратів із ***важкодоступної для мікроорганізмів рослинної сировини***, такої як солома, деревина, тирса й інші промислові і сільськогосподарські відходи (які складаються в основному із целюлози і лігніну) використовують мікроорганізми, які мають целюлозолітичні ферменти. Найчастіше — це міцеліальні гриби і рідше бактерії.

Складна надмолекулярна структура лігнінцелюлозного рослинного субстрату дуже стійка до ферментативної дії. Щоб полегшити доступ ферментів мікроорганізмів до поліцукрів рослинної сировини, проводиться попередня її обробка різними способами. Найчастіше використовують хімічний спосіб у поєднанні з термічним – це обробка субстратів слабкими лугами при підвищеній температурі. Використовуються також інші методи руйнування лігнінцелюлозних надмолекулярних структур – механічний, фізичний (наприклад, плющення соломи).

Збагачення білком лігнінцелюлозної сировини шляхом ферментації у зануреній культурі досягає 10–12 %. Канадські вчені розробили технологію «Проект Ватерлоо», яка базується на вирощуванні грибної культури Chaetomium cellulolyticum на оброблених лугом при підвищеній температурі субстратах (тирса, солома, тверда фракція гною жуйних тварин). Одержаний продукт містить від 20 до 45 % сирого протеїну (білка – 12–14 %, 35 % вуглеводів, 10 % ліпідів). Білок містить 6,8 % лізину, 2,6 % метіоніну + цистеїну і 6,1 % треоніну і належить до повноцінних. Використовується як білкова добавка до раціонів тварин.

21.9.2. Твердофазова ферментація рослинної сировини

Ферментація у зануреній культурі є на сьогодні основним способом мікробіологічного синтезу. Одним із можливих альтернативних варіантів мікробіологічної технології є твердофазова ферментація.

Твердофазовою ферментацією називаються мікробіологічні процеси, які відбуваються не у водній фазі, а в масі легкозволоженого субстрату. Оптимальна вологість залежить від властивостей субстрату і мікроорганізму-продуцента, який використовується, і становить від 25 до 75 %. Водна фаза у цих умовах представлена лише плівками на поверхні частин субстрату і водою, яка сорбована субстратом. Таким чином, ріст мікроорганізмів при твердофазовій ферментації проходить на межі фаз «твердий субстрат : вода : повітря» і в деяких випадках – усередині частинок субстрату.

Як субстрат використовується крохмалевмісна або целюлозовмісна сировина. Із мікроорганізмів-продуцентів, які ростуть в умовах твердофазової ферментації, частіше використовуються міцеліальні гриби, макроміцети у міцеліальній формі, інколи – змішані культури грибів і дріжджів, а для ферментації крохмалевмісної сировини – чисті культури дріжджів.

Твердофазова ферментація використовувалася протягом багатьох століть у країнах Далекого Сходу та Індокитаю для приготування традиційних національних страв. Європейці ознайомились з цією технологією на початку XX століття і до 50-х років вона була широко розповсюджена, а потім почала витіснятись глибинною ферментацією. Зараз знову повертаються до твердофазової ферментації через низку об'єктивних причин.

По-перше, використання нерозчинного у воді субстрату (рослинної сировини) суттєво ускладнює ферментацію у зануреній культурі, вимагаючи додаткових операцій завантаження субстрату і вивантаження продукту, а безперервні процеси робить майже нездійсненними. По-друге, це екстенсивний варіант технології, а отже, і дешевий. По-третє, було встановлено, що деякі процеси відбуваються в умовах твердофазової ферментації у багато разів інтенсивніше.

Найпростішими технологічними варіантами твердофазової ферментації є компостна купа і поверхневий ріст плісняви. Похідними цих варіантів є такі типи твердофазової ферментації, які використовуються як в лабораторній практиці, так і виробництві.

1. Поверхнева твердофазова ферментація (так званий «тонкий шар»), при якій культура мікроорганізмів росте у шарі субстрату товщиною 3–7 см в камері, де підтримується необхідна температура і вологість повітря. Роль біореакторів виконують великі, площею до декількох квадратних метрів, таці із алюмінію, або культиваційні камери (рис. 21.2).
2. Глибинна твердофазова ферментація у шарі, що перемішується (так званий «високий шар»). При ньому культура мікроорганізмів росте по всій масі субстрату, що досягається відповідними методами аерації (вентиляції) маси.
3. Твердофазова ферментація у масі субстрату, що перемішується і аерується. Субстрат може бути гомогенним (напіврідкий гній) або складатись із частинок твердого субстрату, що знаходиться у завислому стані (перехідний варіант між твердофазовим процесом і процесом у рідкій фазі). Зазвичай використовують біореактори з низькошвидкісними змішувачами. Перемішування при великій кількості твердої фази травмує біооб'єкт, що особливо відчутно для міцеліальних грибів. М'яке перемішування досягається при використанні шнекових (гвинтових) змішувачів або коли біореактор є обертальним барабаном.

Інтерес до твердофазових процесів пояснюється їх перевагами порівняно з процесами, які відбуваються у рідкому середовищі:

1) вони вимагають менших витрат на обладнання і експлуатацію;

2) характер субстрату полегшує відділення й очищення продукту;
3) низький вміст води у субстраті перешкоджає зараженню культури продуцента сторонньою мікрофлорою;
4) на відміну від процесів в рідкій фазі твердофазові процеси не пов'язані з викидом в оточуюче середовище великої кількості стічних вод – потенційного джерела його забруднення.

Твердофазове культивування має і певні недоліки. У більшості твердофазових процесів відсутнє перемішування, а ріст мікроорганізмів відбувається за принципом колонізації: роз-

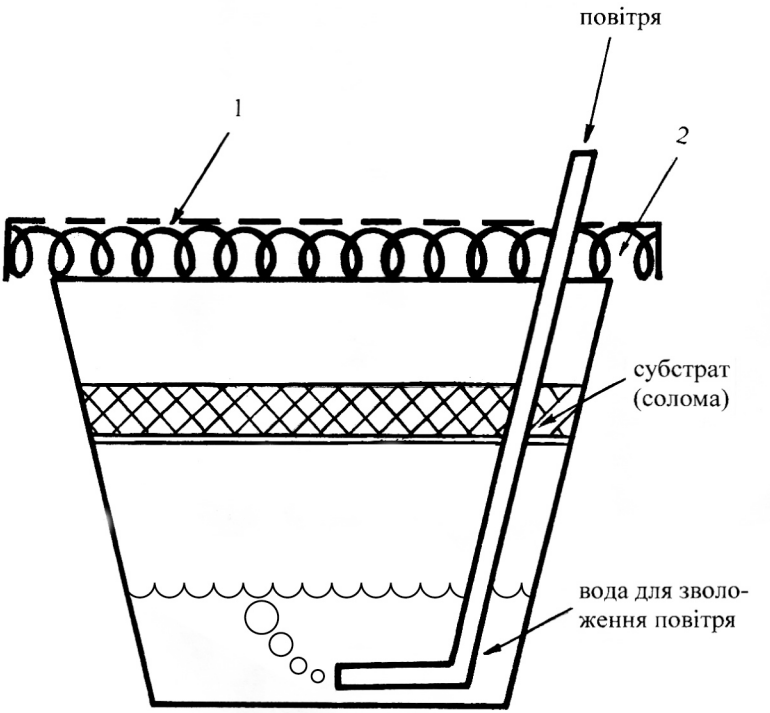


Рис. 21.2. ***Біореактор (культиваційна камера) для твердофазового поверхневого культивування***
(за Єгоровим Н.С. та ін., 1987):
субстрат (солома) опирається на металеву сітку; відпрацьований газ покидає апарат через пори в кришці (1); скляна вата (2) утворює фільтр, який запобігає попаданню сторонньої мікрофлори до біореактора.

множуючись вони розповсюджуються із точок внесення в субстрат по всьому об'єму . При цьому окремі зони у товщі субстрату надлишково населяються клітинами і виникає локальна нестача поживних речовин, в той час коли значна частина субстрату залишається незайманою. До кінця не вирішеною проблемою є також контроль за ефективністю аерації різних ділянок субстрату, температурою і рівнем вологості.

Одержаний після твердофазової ферментації продукт має залишки вихідної сировини, збагаченої на 6–22 % білком залежно від складу субстрату. Наприклад, при твердофазовій ферментації у шарі, що перемішується і аерується, з використанням продуценту Aspergillus niger або дріжджів і гранульованих крохмалевмісних субстратів одержали продукт, який містить 17–20 % білка. Оброблена лугом тирса після її ферментації в тонкому шарі містила до 12 % протеїну, а необроблена – до 6–8 %.

Твердофазова ферментація як метод покращення поживної цінності грубих рослинних кормів має широкі перспективи в Україні як основа для створення технології малотоннажного виробництва кормових препаратів – рівня невеликих ферм і тваринницьких підприємств. Ця технологія, орієнтуючись на дешеву місцеву сировину, таку як солома, різні відходи місцевої промисловості і сільського господарства, може стати одним із основних шляхів виробництва білка для тваринництва. Це дасть можливість прискорити процеси реформування аграрного сектора економіки у нашій державі.

Як субстрат для виробництва дріжджів можна використовувати також молочну сироватку – доступний побічний продукт сироваріння. У Франції в 1979 р. три підприємства з виробничою потужністю 6000 т на рік випускали білок для годівлі тварин і харчування людей.

21.10. МІКРОБНИЙ БІЛОК У ХАРЧУВАННІ ЛЮДЕЙ

Одержаний біотехнологічним шляхом білок одноклітинних може бути використаний для виготовлення продуктів харчування.

Ще в роки Першої світової війни з метою вирішення проблеми нестачі продовольства у Німеччині розпочали крупно-

масштабне культивування пивних дріжджів Saccharomyces cerevisiae, які додавали до супів і ковбас. А в роки Другої світової війни в Німеччині важливим компонентом харчування також були харчові дріжджі (Candidia arborea і C. utilis).

Тепер також за рахунок виробництва білка одноклітинних планується вирішення певною мірою продовольчої проблеми. У США білок сої уже давно вводиться в такі м'ясні продукти, як ковбаси, сосиски, паштети, а фірма Amoco Foods використовує з цією метою як білкові добавки біомасу мікробів. У Чехословаччині свого часу розроблена програма введення в ковбасні вироби білка дріжджів. У колишньому Радянському Союзі була розроблена технологія виробництва дріжджів на етанолі з подальшим додаванням висушеної біомаси у пшеничний хліб, що підвищує вміст білка в ньому у 1,5 рази.

Перші повідомлення про використання спіруліни у харчуванні людей з'явились ще в 1521 р. Тоді водорость Spirulina maxima діставали з сильнолужного озера Текскоко поблизу Мехіко і висушували для одержання галет синього або зеленого кольору, які продавались на базарі за назвою «текуітлатл». Пізніше, в 1964 р. бельгійська експедиція у Сахарі звернула увагу на галети синьо-зеленого кольору, які місцеві жителі називали «діхе». Мікроскопічні дослідження показали, що вони складаються з одного виду водоростей – S. platensis і містять до 70 % білка у сухій речовині. Водорость добували з лужних ставків навколо озера Чад. Головним постачальником муки зі спіруліни на світовий ринок (до Японії, США, Європейських країн) є Мексика. З неї готують білкові концентрати, дієтичні продукти харчування у вигляді таблеток, капсул, галет, кондитерських виробів з високим вмістом білка.

З 1983 р. існують міжнародні стандарти на мікроорганізми, які використовуються для введення у харчові продукти, а також розроблені уніфіковані методи їх оцінки.

Слід зазначити, що впровадження харчових продуктів із мікроорганізмів стримується консервативними традиціями у суб'єктивній оцінці харчових продуктів. Споживач найперше звертає увагу не на поживну цінність їжі, а на її органолептичні властивості – консистенцію, колір, смак, запах тощо.

Психологічний бар'єр, з яким стикається виробництво «мікробної їжі» у країнах Європи і Японії пов'язаний із «сумнівними» смаковими якостями «їжі майбутнього». Експерт з

проблем харчування, скуштувавши зразок бактеріальної біомаси, сказав: «Вона має усі ті властивості, якими повинна бути наділена нова людська їжа: не має ні запаху, ні кольору, ні структури, ні смаку» *(Єгоров Н.С. та ін., 1987)*.

Варто сподіватись, що в епоху, коли білок одноклітинних увійде у вжиток, біотехнологія зможе повною мірою використати створений потенціал рослинних і мікробних клітин як продуцентів смакових, ароматизуючих і структуруючих їжу добавок. Перспективними з цією метою є культивування грибів (Fusarium), ціанобактерій (Spirulina), зелених водоростей (Chlorella, Scenedesmus), які мають консистенцію й інші органолептичні властивості, що є більш звичними для людини. Волокнисту масу Fusarium на базі картопляного або пшеничного крохмалю як джерела їжі для людини нині виробляє компанія Rank Hovis Mc. Dongall.

Контрольні питання

1. В чому сутність проблем забезпечення білком людства і тваринництва?
2. Які шляхи існують для усунення проблеми дефіциту білка?
3. Які переваги має біотехнологічний підхід виробництва білка над традиційним?
4. Які мікроорганізми використовуються як продуценти білка?
5. Які особливості мають дріжджі як продуценти білка?
6. Які переваги і недоліки мають непатогенні бактерії – продуценти білка?
7. Яку відмінну особливість мають продуценти – мікроскопічні гриби?
8. Чим відрізняються від інших продуцентів білка мікроводорості за процесом культивування та складом одержаного продукту?
9. За якою принциповою технологічною схемою відбувається процес одержання мікробного білка?
10. Яка сировина використовується для одержання мікробного білка?

11. Які перспективи має біотехнологія одержання білка на відходах переробки нафти?
12. Які особливості процесу культивування мікроорганізмів – продуцентів білка на природному газі (метані)?
13. Які штами-продуценти є ефективними при використанні як субстрату метанолу?
14. Чим характеризується білок (еприн), отриманий на етиловому спирті?
15. Отримання білка одноклітинних водоростей. Яке розповсюдження набула технологія в Україні?
16. Чим обумовлена перспектива використання як сировини для одержання білка відходів агропромислового комплексу?
17. Які особливості і перспективи глибинного культивування мікроорганізмів або ферментації у зануреній культурі?
18. Суть і типи твердофазової ферментації?
19. Перспективи використання мікробного білка у харчуванні людей?

Розділ 22.

БІОТЕХНОЛОГІЇ УТИЛІЗАЦІЇ І БІОКОНВЕРСІЇ ВІДХОДІВ АГРОПРОМИСЛОВОГО КОМПЛЕКСУ

Утилізація (від латинського utilis – корисний) – застосування з користю, наприклад відходів.

Біоконверсія – це трансформація речовин з однієї форми в іншу біологічними агентами (живими організмами або ферментами). За допомогою біоконверсії з відходів різного походження (рослинництва, тваринництва, побутових і промислових) можна одержати різноманітну продукцію – альтернативні носії енергії, високоякісне органічне добриво, білкові та вітамінні кормові добавки.

22.1. НЕГАТИВНИЙ ВПЛИВ ВІДХОДІВ ТВАРИННИЦТВА НА НАВКОЛИШНЄ СЕРЕДОВИЩЕ

При експлуатації тваринницьких ферм і комплексів виникає багато проблем — санітарно-гігієнічних, екологічних, економічних, соціальних тощо.

Це зумовлено передусім значною концентрацією тварин на обмеженому просторі та порушенням рівноваги між поголів'ям і площею земельних угідь, що супроводжується накопиченням великої кількості гною, стічних вод та інших органомістких відходів у розрахунку на одиницю земельної площі. Гній містить значну кількість патогенних мікроорганізмів, яєць і личинок гельмінтів, насіння бур'янів, солей важких металів та інших ксенобіотиків. Потрапляючи у ґрунт і водоймища, гнойова рідина спричинює забруднення ґрунтових вод, біологічне зараження ґрунту патогенними мікроорганізмами та викликає масові отруєння водних організмів. У воді різко збільшується вміст аміаку і зменшується кількість кисню.

Такі компоненти відходів, як метан, діоксид вуглецю, аміак і сірководень, забруднюють повітря. Метан, потрапляючи в

атмосферу, зумовлює парниковий ефект, який у 22–30 разів перевершує вплив діоксиду вуглецю і призводить до глобальних змін клімату. За Міжнародною Конвенцією, яку підписала Україна, кожній країні виділена певна квота метану, який може потрапити у навколишнє середовище. Понаднормові його викиди призводять до штрафних санкцій, а у разі зменшення викидів метану в атмосферу надає право країні реалізувати певну частку своєї квоти на світовому ринку.

Проблеми поглиблюються тим, що сільськогосподарські угіддя як біологічні системи утилізації можуть сприймати підвищені дози органічних добрив у вигляді гною в обмеженій кількості. Критерієм є вміст азоту, максимально допустима концентрація якого складає 250–300 кг/га.

Таким чином, гнойова біомаса є забрудником навколишнього середовища як органічними, так і біогенними елементами. На її частку припадає 43–66 % загального біологічного навантаження на природні системи.

Для усунення цих негативних явищ необхідна спеціальна технологічна обробка гною, що дало б можливість підвищити концентрацію поживних речовин в одиниці об'єму гною і одночасно усунути запахи, загальмувати або знищити патогенні мікроорганізми, знизити вміст токсичних речовин та викиди шкідливих газів у атмосферу.

22.2. МЕТОДИ УТИЛІЗАЦІЇ ГНОЮ

Усі існуючі методи утилізації відходів тваринництва умовно можна поділити на дві групи: традиційні і нетрадиційні.

При традиційних методах для утилізації використовують такі природні біологічні системи, як ґрунт і водоймища. Утилізація здійснюється біологічними агентами (об'єктами) – мікроорганізмами, дощовими черв'яками, членистоногими тощо. Вибір біологічної системи суттєво залежить від консистенції гнойової біомаси, яка, залежно від технології утримання і гноєвидалення, може бути: твердою (вологість до 80 %), напіврідкою (вологість 81–90 %) і рідкою (вологість більше 91 %).

До нетрадиційних методів належить утилізація гною шляхом метанового зброджування та вермікультивування з використанням біологічних агентів – анаеробних метаноутворюючих мікроорганізмів і дощових черв'яків.

22.2.1. Традиційні методи. Використання гною як органічного добрива

Найбільш розповсюдженим методом утилізації гною є використання його для покращення родючості ґрунтів. Зумовлено це тим, що в сухій речовині гною міститься значна кількість азоту (1,9–6,5 %), калію (1,0–2,9 %), фосфору (0,2–2,7 %) і органічної речовини (70–85 %). За еталон органічного добрива прийнята тонна безпідстилкового гною, після переробки якого (до часу внесення у ґрунт) у ньому міститься 35–40 % сухої речовини, 0,05 азоту, 0,25 фосфору і 0,6 % калію. Крім цього, гній є джерелом гумусу – основного фактора родючості ґрунтів. У середньому 1 т гною дає 40–50 кг гумусу. Тому гній позитивно впливає на родючість, фізико-хімічні, агрофізичні та біологічні властивості ґрунту. Як джерело макро- і мікроелементів, вуглекислого газу, гній суттєво поліпшує баланс біогенних елементів у ґрунті. Внесення гною у ґрунт значно підвищує його енергоємність, що є одним із факторів, який сприяє збільшенню виходу наземної біомаси з одиниці земельної площі, а також підвищенню синтетичної активності аутотрофних мікроорганізмів.

Цей метод використовують в основному для утилізації твердої фракції гною (підстилковий гній) вологістю не вище 70 %. Його складують на спеціальних майданчиках для накопичення, карантинування і біотермічного знезараження. Біотермічний метод базується на утворенні в знезаражуваній масі високої (60 °С) температури і витримуванні протягом одного місяця у теплий період року і два місяці – у холодний. Якщо вологість гною перевищує 70 %, період витримування треба збільшити до 5–6 місяців. Після цього гній вивозять на поля під заорювання.

У ґрунті органічні речовини гною трансформуються аутотрофними мікроорганізмами й іншими біологічними об'єктами (черв'яками, членистоногими). Неорганічні речовини адсорбуються частинками ґрунту або осаджуються, але не руйнуються. Особливо небезпечні стосовно цього важкі метали, тому їх кількість у ґрунті суворо лімітується.

Рідкий гній (безпідстилковий ВРХ і гнойові стоки свинарських комплексів) спочатку розділяють у відстійниках на тверду фракцію і рідку або стічні води. Тверда фракція складується для біотермічного знезараження і використовується як органічне добриво.

Рідка фракція теж використовується як рідке органічне добриво для поливу сільськогосподарських культур. При зрошуванні стічними водами відбувається їх ґрунтове доочищення, що створює сприятливі умови для охорони навколишнього середовища.

Широке розповсюдження методу гальмується санітарно-гігієнічними та економічними вимогами. Так, патогенні мікроорганізми, які містяться в гнойовій біомасі, мають властивості тривалого збереження в зовнішньому середовищі і можуть бути причиною епідемій та епізоотій. Забезпечення ветеринарно-санітарного благополуччя у цьому випадку можна досягти за рахунок знезараження відходів тваринництва термічною стерилізацією при високій температурі, що є енергоємним заходом.

Значні економічні проблеми пов'язані з витратами на видалення, транспортування, зберігання і використання гною в рослинництві, а також на знезараження його термічною стерилізацією для забезпечення ветеринарно-санітарного благополуччя.

22.2.2. Мінералізація органічних речовин у ґрунті та водоймищах

Цим методом утилізують рідку фракцію, тобто стічні води.

Процес утилізації відбувається за рахунок життєдіяльності різних груп організмів (бактерій, грибів, водоростей, найпростіших, черв'яків і членистоногих), які використовують органічні та неорганічні сполуки стічних вод як поживні речовини і джерело енергії. Аеробні мікроорганізми за участю кисню повітря перетворюють органічні речовини на мінеральні сполуки – аміак, діоксид вуглецю і воду.

Серед відомих методів очищення стічних вод біологічне знезасаження залишається найбільш доступним і надійним у санітарному відношенні.

Існують дві великі групи аеробних процесів біологічного очищення стічних вод – екстенсивні та інтенсивні.

До екстенсивних належать методи, не пов'язані безпосередньо з керованим культивуванням мікроорганізмів – це поля зрошення, поля фільтрації, біоставки. Мікроорганізми, які знаходяться у верхніх шарах ґрунту полів зрошення і фільтрації або у воді біоставків, утворюють біоценози, за рахунок діяльності яких проходить очищення води.

В основі інтенсивних способів лежить діяльність активного мулу або біологічної плівки, тобто природно виниклого біоценозу, який формується на конкретному виробництві залежно від складу стічних вод і вибраного режиму очищення. Формування біоценозу – процес досить тривалий і проходить постійно під час очищення стічних вод у спеціальних спорудах – аеротенках або біологічних фільтрах.

Аеротенки – це бетонні або залізобетонні резервуари, крізь які повільно протікає суміш активного мулу і попередньо відстояної стічної рідини. В них очищення стічних вод відбувається за допомогою активного мулу. Активний мул – це субстрат у вигляді темно-коричневих пластівців і складається на 70 % з природної асоціації аеробних мікроорганізмів (різних бактерій і найпростіших) та 30 % твердих частинок неорганічної природи. Мікроорганізми разом з твердими частинками, до яких вони прикріплені, утворюють зооглей – симбіоз популяцій організмів, покритих спільною слизовою оболонкою. На активному мулі адсорбуються і окислюються за участю кисню повітря органічні речовини стічних вод. Суміш стоків і активного мулу безперервно аерується для підтримки мулу в завислому стані та подачі кисню.

Аеротенки працюють в комплекті з відстійниками, в яких осаджується мул, що накопичується у великих кількостях. Частина активного мулу знову повертається у систему очищення, а надлишковий активний мул, який утворився в результаті росту мікроорганізмів, надходить на мулові майданчики з подальшим вивезенням його після зневоднювання на поля.

В Україні для очищення стічних вод спиртзаводів використовують біотенки (аеротенки), в яких функціонують іммобілізовані мікроорганізми на нерухомому носії. Цей волокнистий носій має велику питому поверхню (1 кг носія – 8–10 тис. $м^2$ площі), високу адгезійну здатність. Завдяки цьому на ньому закріплюється значна кількість біомаси, що сприяє інтенсифікації очищення та усуває утилізацію надлишкового активного мулу, оскільки його приріст фактично відсутній. Тому зі схеми очищення вилучається ціла низка споруд – вторинний відстійник для виділення надлишкової біомаси, мінералізатор, мулові майданчики. Це робить очисні споруди малогабаритними, компактними, спрощує їх обслуговування. Крім цього, носій є біологічно інертним, тобто практично не рйцнується мікроорга-

нізмами і може працювати без заміни багато років *(Кошель М. та ін., 2002)*.

Біологічні фільтри – це металеві або залізобетонні резервуари, заповнені фільтрувальним матеріалом (шлаком, керамзитом, гравієм, пластмасою, щебінкою та ін.). Мікроорганізми у них знаходяться в нерухомому стані, закріпленими на фільтрувальному матеріалі (носії) у вигляді біологічної плівки.

Біологічна плівка – це об'єкти зі складною структурою з живих і мертвих клітин, клітинних фрагментів і позаклітинних полімерів, які закріплені на поверхні *(Іпполітов К. Г. та ін., 2003)*. Всередині біологічних плівок міститься суміш популяцій, що постійно змінюється. На поверхні біоплівки відбувається активне розмноження клітин, тому що тут найвища концентрація субстрату. Ближче до поверхні носія концентрація субстрату стає лімітуючою, що є причиною руйнування внутрішньої структури біоплівки. Значна частина біоплівки втрачається через ерозію поверхні під впливом сил потоку рідини, або її відриву внаслідок розшаровування. Регенерація біоплівки під час процесу здійснюється за рахунок відриву та віднесення її частини і розвитку на звільненому місці нової, більш активної. Стічні води надходять зверху і повільно проходять вниз через біофільтри, де відбувається мінералізація органічних речовин, а в щілини між гранулами знизу вгору надходить повітря природним шляхом або примусово (аерація). Потужність біологічних фільтрів залежить від площі поверхні наповнювача. Схема біофільтра показана на рис. 22.1.

У процесах біологічного очищення стічних вод у спеціальних спорудах широко використовують три основні режими культивування біомаси мікроорганізмів: безперервний, періодичний і відлучно-доливний.

Відлучно-доливний метод має переваги над іншими. Перш за все це компактність очисних споруд, оскільки в одному реакторі поєднуються процеси очищення води і відділення активного мулу шляхом відстоювання. Навіть при використанні декількох реакторів така система займає меншу площу, ніж традиційна система «аеротенк – вторинний відстійник». Тепер цей режим використовують при очищенні стічних вод в усьому світі. Так, в Баварії (ФРН) з 1990 по 2000 рр. кількість реакторів, які працюють за цією схемою, збільшилася у 25 разів *(Шагінуров Г.І. та ін., 2003)*.

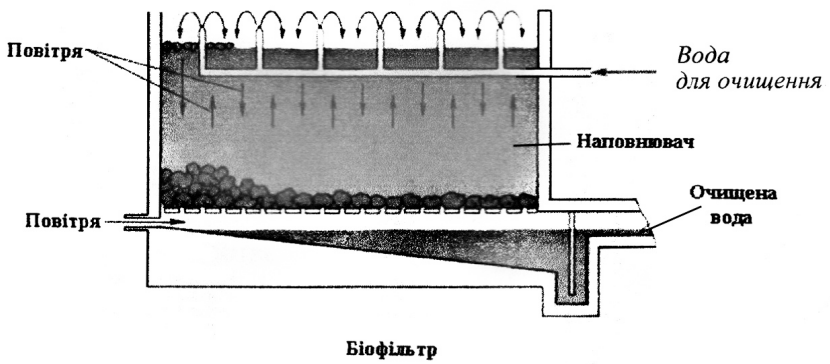


Рис. 22.1. ***Біофільтр*** *(за Биковим В.А., 1987)*

Збільшення окислювальної потужності біологічних очисних споруд при відлучно-доливному процесі на відміну від інших режимів досягають не методом іммобілізації (адгезійної і/або адсорбційної) на поверхні носіїв, а шляхом одержання щільних мікробних гранул. Мікробні агрегати, відомі в літературі як «мікробні гранули», являють собою сферичну біоплівку, яка утворюється за певних умов шляхом самоіммобілізації мікроорганізмів активного мулу *(Шагінуров Г.І. та ін., 2003)*. Основними перевагами гранул над пластівцями активного мулу є висока швидкість осідання через великі розміри і, як наслідок, швидке розділення рідкої і твердої фаз, а також висока активність.

Біологічні ставки – водоростеві, рачкові, рибоводні. Недоліком є повна безконтрольність процесу і те, що функціонують вони лише у теплий період року. У водоростевому ставку проходить очищення стоків за допомогою аерування їх мікроводоростями, які утилізують біогенні елементи стоків, збагачують середовище киснем, підлужують його до pH 9–10, що сприяє інгібуванню сапрофітної і патогенної мікрофлори. В ньому, крім водоростей, активно розвивається біомаса непатогенних бактерій і найпростіших.

Із водоростевого ставка стоки, збагачені продуктами метаболізму бактерій, найпростіших, водоростей і їх біомасою, надходять у рачковий ставок. У ньому очищення відбувається за

участю личинок різних комах, вислоногих і рачків-фільтратів. Із рачкового ставка очищені стоки надходять у рибоводний ставок, в якому біоценоз збагачується новими видами гідробіонтів – мальками риб (коропа), кормом для яких є біоценоз рачкового ставка. Тут відбувається остаточне очищення стічних вод.

Використовуються біологічні ставки як безпосередньо для очищення стічних вод без попередніх стадій, так і для доочищення стоків після очисних споруд у випадку, коли домішки, які залишаються, ускладнюють процес подальшої їх утилізації.

Поля зрошення і фільтрації — це спеціально відведені ділянки землі для очищення стічних вод. Вони відрізняються між собою тим, що поля фільтрації не використовуються для вирощування сільськогосподарських культур.

Процес самоочищення води відбувається за рахунок життєдіяльності різних груп ґрунтових організмів – бактерій, грибів, водоростей, найпростіших, черв'яків і членистоногих. На поверхні ґрунтових грудочок утворюється біологічна плівка.

Недоліки методу мінералізації органічних речовин у ґрунті та водоймищах:

1) економічний – вимагає великих капіталовкладень і витрат енергії на механічну очистку стічних вод. Вартість очисних споруд в середньому становить 20–25 % суми, витраченої на спорудження крупного свинарського комплексу;

2) мінералізація органічних сполук відбувається тільки в поверхневому шарі ґрунту, тому що кисень проникає у ґрунт тільки на глибину 20–30 см.

22.2.3. Включення гною до раціонів сільськогосподарських тварин

До раціонів сільськогосподарських тварин додається переважно курячий послід. Гній попередньо висушується і обеззаражується, а за наявності підстилки – подрібнюється. Це вимагає певного обладнання і значних витрат енергії.

Крім того, до сьогодні нема одностайної оцінки якості продукції, одержаної на раціонах з добавками гною. Але передбачається, що при тривалому використанні гною як домішки до раціонів сільськогосподарських тварин у тваринницькій продукції збільшується вміст важких металів, антибіотиків та інших чужорідних речовин (ксенобіотиків).

Цей метод має і соціально-психологічну проблему, яка виникає при використанні продукції, одержаної з добавками гною. Через це метод не має широкого розповсюдження і вимагає більш детального вивчення.

Наведені традиційні методи не відповідають усім вимогам щодо утилізації і знезараження відходів, які забезпечували б санітарно-гігієнічне та екологічне благополуччя і були рентабельними з точки зору собівартості продукції. Витрати на переробку і знезараження тваринницьких відходів можуть в деяких випадках сягати до 40 % усіх витрат на одержання продукції тваринництва.

Методом, який відповідає цим вимогам, є анаеробне зброджування гнойової біомаси за допомогою анаеробних метаноутворюючих мікроорганізмів.

22.3. НЕТРАДИЦІЙНІ МЕТОДИ. БІОТЕХНОЛОГІЯ ОДЕРЖАННЯ БІОГАЗУ ШЛЯХОМ АНАЕРОБНОГО ЗБРОДЖУВАННЯ ВІДХОДІВ

Одним із найбільш перспективних методів утилізації відходів агропромислового комплексу (рослинництва, тваринництва) є їх біоконверсія в енергоносій біогаз шляхом мікробіологічної ферментації.

Біомаса (рослинна та гнойова) належить до поновлюваних джерел енергії. Біомаса – це органічна речовина, яка утворюється в процесі фотосинтезу, коли за допомогою хлорофілу рослинна клітина вловлює (фіксує) сонячну енергію з наступним перетворенням її в енергію хімічних зв'язків синтезованих органічних сполук. Рослинна біомаса Землі має енергетичний потенціал, який відповідає усім відомим запасам енергії корисних копалин.

Гнойова біомаса теж містить значну кількість енергії. Науковими дослідженнями було встановлено, що сільськогосподарські тварини використовують енергію, яка міститься в органічних речовинах рослинних кормів, з низьким коефіцієнтом. Так, в організмі тварин внаслідок складних багатоетапних біохімічних процесів енергія рослинних кормів трансформується у продукцію в середньому на 16,4 %; 25,6 % енергії витрачається на перетравлення та засвоєння кормів, а 58 % енергії переходить у гній.

Високий енергетичний потенціал гною дає можливість використовувати його як субстрат для інших організмів, які потім можна використати на корм тваринам, а також для одержання палива.

Метанове анаеробне зброджування є найбільш раціональним шляхом використання енергії відходів. Воно відбувається у спеціальних біогазових або біоенергетичних установках, у яких за рахунок анаеробної біоконверсії метаноутворюючими мікроорганізмами органічних речовин одержують енергоносій у вигляді біогазу, високоякісне знешкоджене органічне добриво і, навіть, кормові добавки.

Цей напрям біоконверсії в умовах поступового виснаження традиційних енергетичних ресурсів (нафти, газу, вугілля тощо) і особливо зростаючого дефіциту пального у сільській місцевості та ускладненням централізованого забезпечення її природним газом має важливе значення.

В умовах реформування аграрного сектора економіки України це дозволить на першому етапі зменшити споживання електроенергії для потреб фермерських господарств, а в подальшому, широко впроваджуючи мотор-генератори на біогазі, повністю перейти на самозабезпечення господарств електроенергією.

Крім енергетичної і економічної проблеми, біотехнологія анаеробного зброджування дає можливість вирішувати екологічні та санітарно-гігієнічні проблеми. В результаті переробки гною шляхом анаеробного бродіння гине патогенна мікрофлора, яйця і личинки гельмінтів, насіння бур'янів, а також відбувається дезодорація гною.

Біотехнологія утилізації відходів з одержанням біогазу широко розповсюджена як у промислово розвинених країнах, так і країнах, що розвиваються. Нині більш ніж у 60-ти країнах світу енергетичні та економічні проблеми вирішуються за допомогою біогазових установок. У багатьох державах тваринницькі ферми створюються паралельно з установками метанового бродіння, тобто БГУ входять до складу тваринницького комплексу.

22.3.1. Біометаногенез та його етапи

Біометаногенез – це процес перетворення органічних сполук біомаси на біогаз за участю метаноутворюючих анаеробних мікроорганізмів. Коефіцієнт трансформації енергії біомаси в

енергію метану при цьому процесі досягає 80 %. Це давно відомий процес, відкритий ще 1776 р. Вольтом, який встановив наявність метану в болотному газі.

Процес біометаногенезу проходить за участю метаноутворюючих мікроорганізмів, яких ідентифіковано від 30 до 50 видів. Це симбіотичне угруповання і завдяки тому, що воно може змінювати свої шляхи ферментації, функціонує як саморегулююча система, яка підтримує оптимальні значення pH, окислювально-відновний потенціал і термодинамічну рівновагу в реакторі.

Формування мікрофлори метантенка відбувається за рахунок мікроорганізмів, які потрапили в нього разом з субстратом (гнойовою біомасою, стічними водами тощо). Поряд з облігатними анаеробами в метантенку можуть бути і факультативні анаероби. Загальна кількість бактерій в субстраті коливається від 1 до 15 мг/мл.

До складу природної популяції мікроорганізмів, які здійснюють процес метаногенезу, входять різні види анаеробів ті, що руйнують клітковину і зброджують прості вуглеводи, розщіплюючи білки, пептиди і амінокислоти, ліпіди, завдяки чому біомаса різного походження може бути вихідною сировиною для одержання біогазу.

Біометаногенез – це багатостадійний процес, у ході якого біополімери перетворюються на ацетат, форміат, метанол, метиламін, оксид і діоксид вуглецю, аміак, сірководень і водень. Він проходить у три послідовні етапи або стадії, і кожна з них здійснюється певною групою мікроорганізмів.

1-й етап гідролізу. На цьому етапі беруть участь грамнегативні неспороутворюючі мікроорганізми, які володіють амілолітичною, целюлолітичною, протеолітичною, ліполітичною й іншими видами активності. За допомогою ферментів гідролаз, які синтезуються цими мікроорганізмами, відбувається розкладання біополімерних сполук (вуглеводів, білків, ліпідів, нуклеїнових кислот) до низькомолекулярних органічних речовин (моно- і олігоцукрів, амінокислот і пептидів, гліцерину і карбонових кислот, пуринових і піримідинових основ). Склад домінуючої на цьому етапі мікрофлори залежить від складу мікрофлори, яка є на субстраті, що надходить в метантенк, а також від хімічного складу субстрату.

На цій стадії утворюється також невелика кількість діоксиду вуглецю і водню.

2-й етап ацидогенезу. На ньому із одержаних на першому етапі низькомолекулярних органічних речовин за участю кислотоутворюючих мікроорганізмів утворюються різні органічні кислоти (масляна, пропіонова) і їх солі. Потім вони окислюються до ацетату і діоксиду вуглецю. На цьому етапі також утворюються водень, аміак і сірководень.

Кислотоутворюючі бактерії є факультативними анаеробними гетеротрофами і найкраще функціонують в діапазоні pH від 4,0 до 6,5. Головним продуктом цього етапу є ацетат.

Наприклад, із 1 моль субстрату (глюкози) утворюється 4 моль водню і 2 моль ацетату:

$$C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \rightarrow 2CH_3COOH + 4H_2 + 2CO_2.$$

Конверсія низькомолекулярних органічних речовин відбувається таким чином:

$$\underset{\text{глюкоза}}{C_6H_{12}O_6} + 2H_2 \rightarrow \underset{\text{пропіонова кислота}}{2C_2H_5COOH} + 2H_2O;$$

$$\underset{\text{пропіонова кислота}}{C_2H_5COOH} + 2H_2O \rightarrow \underset{\text{ацетат}}{CH_3COOH} + CO_2 + 3H_2;$$

$$\underset{\text{глюкоза}}{C_6H_{12}O_6} \rightarrow \underset{\text{масляна кислота}}{C_3H_7COOH} + 2CO_2 + 2H_2;$$

$$\underset{\text{масляна кислота}}{C_3H_7COOH} + 2H_2O \rightarrow \underset{\text{ацетат}}{2CH_3COOH} + 2H_2.$$

На цьому етапі близько 76 % органічних речовин переходить в органічні кислоти (з них 52 % – в ацетат) і 24 % – у водень.

Власне метанове бродіння відбувається на третьому етапі.

Третій етап метаногенний. На цьому етапі за участю ферментів метаногенних споро- і неспороутворюючих мікроорганізмів проходить остаточне перетворення органічних речовин на метан і діоксид вуглецю. Також на третьому етапі з

раніше одержаних діоксиду вуглецю і водню теж утворюється метан. Так, з ацетату утворюється 72 % метану, а із H_2 і CO_2 – 28 % метану.

Метаногенні мікроорганізми цього етапу є облігатними (строгими) анаеробами. Вони проявляють найбільшу активність в більш вузькому діапазоні pH від 7,0 до 7,8. Метаногени належать до найдавніших живих істот – архібактерій. Вони відрізняються від інших прокаріот тим, що у них маленький геном – близько 1/3 генома кишкової палички. За формою клітин метаногени є коками або паличками різних розмірів і рухливості, а деякі можуть утворювати навіть ниткоподібні клітини.

В основі життєдіяльності метаноутворюючих мікроорганізмів лежить здатність відновлювати діоксид вуглецю за такою реакцією:

$$CO_2 + 2H_2O \rightarrow CH_4 + 4O \text{ (енергія)}$$

З біохімічної точки зору метанове бродіння є не що інше, як анаеробне дихання, в ході якого електрони з органічних речовин переносяться на діоксид вуглецю, що відновлюється до метану.

Метаногени синтезують метан за такими реакціями:

$$4H_2 + CO_2 \rightarrow CH_4 + 2H_2O;$$

$$3H_2 + CO \rightarrow CH_4 + H_2O;$$

$$2H_2O + 4CO \rightarrow CH_4 + 3CO_2;$$

$$4HCOOH \rightarrow CH_4 + 3CO_2 + 2H_2O;$$

мурашина кислота

$$4CH_3OH \rightarrow 3CH_4 + CO_2 + 2H_2O;$$

метанол

$$CH_3COOH \rightarrow CH_4 + CO_2.$$

ацетат

Основним субстратом для метаногенів є ацетат:

$$CH_3COOH \rightarrow CH_4 + CO_2.$$

Деякі метаногени використовують як субстрат форміат, який трансформується ними в метан:

$$4HCOOH \rightarrow CH_4 + 3CO_2 + 2H_2O.$$

Суть процесу біометаногенезу можна виразити наступними реакціями:

$$C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \rightarrow 2CH_3COOH + 4H_2 + 2CO_2;$$

$$4H_2 + 2CO_2 \rightarrow CH_4 + CO_2 + 2H_2O;$$

$$2CH_3COOH \rightarrow 2CH_4 + 2CO_2;$$

$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 3CH_4 + 3CO_2.$$

Співвідношення проміжних і кінцевих продуктів у процесі метанового бродіння залежить від хімічного складу біомаси, умов ферментації і наявної мікрофлори.

Не вся органічна сировина потребує проходження трьох фаз ферментації. Багато відходів, наприклад екскременти тварин, містять велику кількість частково розщепленої речовини, що підлягає проходженню послідовних фаз процесу ферментації. Водночас деякі органічні сполуки (наприклад лігнін) і всі неорганічні складові не піддаються зброджуванню.

Реакції, що відбуваються при зброджуванні органічної речовини, мають екзотермічний характер. У процесі їх проходження виділяється приблизно 1,5 МДж теплоти на 1 кг сухої речовини біомаси, що зброджується, тобто 25 кДж/моль $C_6H_{10}O_5$ (целюлози). Цієї теплової енергії, як правило, недостатньо для підтримання відповідної температури біомаси, яку зброджують.

На практиці зброджування рідко доводять до кінця, бо це надто збільшує тривалість процесу. Зазвичай зброджують приблизно 60 % вихідного продукту.

22.3.2. Фактори, які впливають на біометаногенез і їх оптимізація

Кількість біогазу, яку можна отримати з різноманітних сільськогосподарських відходів, залежить від багатьох факторів: складу субстрату, умов проходження процесу анаеробного зброджування і особливо від тривалості знаходження субстрату в біореакторі та мікробіального складу в ньому.

У природних умовах швидкість метаногенезу під впливом асоціації анаеробних мікроорганізмів, які містяться в гнойовій

або іншій біомасі, доволі низька. Факторами, які впливають на біометаногенез є температура, склад і pH середовища, достатня концентрація поживних речовин, відсутність або низька концентрація токсичних речовин тощо.

Для інтенсифікації процесу метанового зброджування ці фактори потрібно оптимізувати.

1. Склад середовища

Сприятливим для життєдіяльності метаноутворюючих мікроорганізмів є середовище, в якому концентрація сухої речовини знаходиться на рівні 8–12 %. Ця кількість сухої речовини забезпечує таку в'язкість субстрату, що дає змогу вільно переміщатися твердим частинкам субстрату і мікробним клітинам. Більша концентрація твердих частин підвищує в'язкість субстрату, що погіршує інтенсивність перемішування і знижує вихід біогазу.

Натомість при низькій концентрації органічної речовини і високій вологості (понад 97 %) зменшується вихід біогазу і збільшуються витрати енергії на підігрів біомаси.

Оптимізувати цей фактор можна шляхом контролю вмісту сухої речовини (8–12 %) і довжини частинок біомаси – не більше 30 мм.

2. Вміст поживних елементів (C і N)

Біомаса метаноутворюючих мікроорганізмів має у своєму складі до 54 % вуглецю, 20 – кисню, 10 – водню, 12 – азоту, 2 – фосфору, 1 % сірки, а також деякі макро- і мікроелементи (K, Na, Ca, Mg, Co, Mo, Ni).

Тому для забезпечення росту мікроорганізмів і високої інтенсивності анаеробного зброджування біомаси необхідно, щоб у ній були в достатній кількості елементи, які сприяють росту бактерій. Найбільш важливими з них є вуглець та азот. Оптимальним співвідношенням цих елементів є 10–30 : 1 (C : N). Якщо це співвідношення завелике, тобто коли багато вуглецю, то в цьому випадку дефіцит азоту буде фактором, який обмежує процес бродіння. Якщо ж це співвідношення мале, тобто коли багато азоту, то утворюється велика кількість аміаку, що є токсичним для бактерій. Для підтримки співвідношення C : N в оптимальних межах у виробничих умовах гнойову біомасу змішують з відходами, які містять або велику кількість азоту (курячий послід), або велику кількість вуглецю (подрібнена солома).

Органічні відходи, які використовуються для метанового зброджування, мають різні співвідношення C : N, що не завжди є оптимальними для процесу (табл. 22.1).

Таблиця 22.1.

Співвідношення C : N у сільськогосподарських відходах
(за Баадером В., 1982)

Відходи	*C : N*	*Відходи*	*C : N*
Гній свиней	4–15	Силосний сік	10
Гній ВРХ	9–18	Рисові стебла	83,5
Гній коней	25	Сира тирса	208
Гній дійних корів	18–19	Суміш відходів боєн	2
Послід курей	7–15	Кров	3
Сеча	0,8	Солома	4,8–15,0
Відходи льону	56		

Для оптимізації співвідношення C : N змішують різні відходи і одержують більший вихід біогазу (таблиця 22.2).

Таблиця 22.2.

Збільшення виходу біогазу при змішуванні різних відходів
(за Баадером В. та ін., 1982; Бієстром У. та ін., 1987)

Відходи	*Вихід біогазу $м^3$/кг сухої речовини*	*Збільшення продукції біогазу, %*
Гній ВРХ	0,380	-
Гній свиней	0,569	-
Послід птиці	0,617	-
Бур'яни	0,277	-
Гній ВРХ + гній свиней (1:1)	0,510	7,0
Гній ВРХ + бур'яни (1:1)	0,363	5,0
Гній ВРХ + послід птиці (1:1)	0,528	6,0
Гній свиней + послід птиці (1:1)	0,634	6,0
Гній свиней + послід птиці + гній ВРХ (1:0,5:0,5)	0,585	11,0

3. Реакція поживного середовища

Суттєвий вплив на швидкість метаногенезу має реакція поживного середовища. У процесі метанового бродіння можна виділити кислу і лужну фази. Кисла фаза або воднева – це перший і другий етапи біометаногенезу, а лужна – це третя метанова фаза. Протягом першої фази значення pH знижується внаслідок утворення низькомолекулярних летких жирних кислот. В подальшому відбувається розщеплення метаноутворюючими бактеріями летких кислот (3-й етап) та нейтралізація кислих продуктів до слаболужної реакції (7,2–7,6).

Встановлено, що найбільш інтенсивне утворення метану проходить при значеннях pH, близьких до нейтральних або слаболужних. Метаноутворюючі бактерії добре розвиваються і метаболізують субстрат у метан при pH 6–8, тоді як для кислоутворюючих необхідно pH 4,0–6,5. Створення умов, які були б задовільними для кислотоутворюючих бактерій, забезпечується підтримкою pH 6,8–7,4, що й вважаються оптимальними. З точки зору забезпечення необхідного діапазону pH бажані системи з належною буферною ємністю для підтримки стабільності процесу зброджування. Поживне середовище в реакторі має буферні властивості завдяки таким реакціям:

1) утворення гідроксилу амонію з аміаку і води
   $NH_3 + H_2O \rightarrow NH_4OH$, яка після нейтралізації кислих продуктів першої фази зумовлює характерне для метанового бродіння слаболужне середовище (pH 7,2–7,6). Ця природна буферна система виникає при високій концентрації в субстраті азотомістких поживних речовин і може використовуватися за умови, що концентрація вільного аміаку не досягає токсичних значень;
2) реакція утворення вуглекислого і двовуглекислого амонію з аміаку і вуглекислоти.

При підвищенні активності кислотоутворюючих мікроорганізмів збільшується кількість кислот до такого рівня, коли буферна ємність втрачається на нейтралізацію кислих продуктів і pH зменшується нижче допустимих величин, у зв'язку з чим гальмується утворення метану.

За відсутності амонійного буферу підлужування може здійснюватися гідроксидами, карбонатами або гідрокарбонатами. В цьому випадку утворюється буферна система карбонат/гідрокарбонат.

Висока швидкість утворення біогазу досягається при концентрації у середовищі летких кислот у межах 50–500 мг/л. При збільшенні їх концентрації вище наведеного рівня й одночасному зниженні pH можна підлужувати середовище хімічними речовинами (наприклад вапном). Кількість лугу може сягати до 6000 мг/л. Бажано, щоб співвідношення ЛЖК до лугу, наприклад до $CaCO_3$, було 1 : 6.

Необхідно враховувати, що в консорціумі мікроорганізмів, які беруть участь в утворенні метану, кислотоутворюючі бактерії краще адаптовані до зміни умов і мають вищу продуктивність порівняно з метановими бактеріями.

Метаногенні бактерії – найбільш примхлива з погляду культивування група серед симбіонтів, які беруть участь в анаеробному бродінні. Для росту вони потребують широкого спектра поживних речовин, включаючи вуглець, фосфор, азот, кальцій, сірку, магній, калій, амінокислоти, вітаміни та мікроелементи.

4. Концентрація в середовищі токсичних речовин

Швидкість розмноження метаноутворюючих мікроорганізмів залежить від концентрації у середовищі іонів важких металів, амонію, натрію, калію, кальцію, магнію, нітратів, сульфідів, а також різних ксенобіотиків, які при великих концентраціях можуть бути токсичними для мікроорганізмів.

Джерелом токсичних речовин можуть бути відходи тварин, які одержували великі дози антибіотиків або сполук металів (наприклад, Cu, Zn, Mn, Fe), що використовуються у тваринництві для балансування раціонів тварин за цими факторами живлення.

Для подолання токсичності можна використати такі прийоми: видалення токсичної рідкої фази, розчинення біомаси (водою, чистою біомасою) для зниження концентрації токсичних речовин, додавання антагоніста виявленого токсина, осадження токсичних речовин, адсорбція токсинів, наприклад, активованим вугіллям тощо, зв'язування токсинів у хелатний комплекс. Це дає можливість знизити концентрацію токсичних речовин до рівня, який не буде перешкоджати бродінню. В іншому випадку біомаса не використовується для одержання біогазу.

При анаеробному зброджуванні курячого посліду потенційну токсичність, яка виникає внаслідок підвищеного вмісту аміаку, усувають шляхом додавання біомаси з високим умістом

вуглецю (частіше подрібненої соломи) або розчиняють водою. В іншому випадку висока концентрація вільного аміаку на початковій стадії анаеробної ферментації може призвести до загибелі метаноутворюючих мікроорганізмів. Рівень токсичності іонів аміаку становить 1500–2000 мг/л; K, Na, Ca – 3000–6000 мг/л; ціаніду – 0,5–1,0 мг/л.

5. Температурний режим

Температурний режим є одним із суттєвих параметрів, які впливають на метаболічну активність і швидкість розмноження метаноутворюючих мікроорганізмів та вихід біогазу.

У природі зустрічаються різні метаноутворюючі мікроорганізми, які відрізняються між собою за температурним оптимумом – психрофіли (0–20 °С), мезофіли (20–40 °С) і термофіли (40–60 °С), які виживають навіть при температурі 97 °С. Тому і метан у природі утворюється при широкому діапазоні температур – від 0 до 97°С. За даними Дубровіна В. та ін. (2004), метанова ферментація починається при температурі 6 °С. При нижчій температурі виділення метану припиняється.

Але оптимальними температурами, за яких життєдіяльність мікроорганізмів відбувається найбільш активно, є: для психрофітів – 6–20 °С, мезофілів – 32–33 °С, а для термофілів 52–54 °С.

Розрізняють три температурних режими одержання біогазу:

1) психрофільний – від 0 до 20 °С;

2) мезофільний – від 20 до 40 °С;

3) термофільний – від 40 до 60 °С.

Кожен температурний режим сприяє росту і підвищенню метаболічної активності певної групи метаногенів. Краще анаеробне зброджування біомаси проходить при температурі 30–40 °С і 50–60 °С (при розвитку мезофільної і термофільної мікрофлори). Термофільні бактерії продуктивніші, ніж мезофільні.

При утилізації біомаси в термофільних умовах швидкість утворення біогазу у 2,5–3 рази вища, ніж при мезофільному режимі.

В установках, що працюють у мезофільному режимі, добовий вихід біогазу складає 1,0 м^3, у термофільному режимі – 2,0 м^3 біогазу з 1 м^3 робочого об'єму метантенка.

Термофільні бактерії за час зброджування протягом 12–14 днів мінералізують стільки ж органічних речовин, скільки мезофільні бактерії за 21–36 днів (Дубровін В. та ін., 2004). Завдяки цьому при однаковій кількості біомаси для зброджування місткість реактора буде меншою при термофільному режимі роботи БГУ порівняно з мезофільним. Але при мезофільному режимі досягається економія енергії, необхідної для підігрівання зброджуваної біомаси, і мікробна популяція, яка культивується при цьому режимі, менш чутлива до складу поживного середовища. Проте є дані, що в біогазі, добутому за термофільних умов, зменшується частка метану.

Тривалість процесу ферментації біомаси при одержанні біогазу залежно від температурного режиму і конструкційних особливостей БГУ складає від 5 до 30–40 діб і більше. За мезофільних температурних умов процес зброджування найчастіше триває 24–28 діб, а при температурі в біореакторі 10 °С тривалість зброджування – до 4 місяців і більше.

Час зброджування також залежить від хімічного складу біомаси. Найтривалішим він буде при підвищеному вмісті целюлози та геміцелюлози, коротшим – у разі наявності білків і жирів, а найкоротшим – для цукрів.

6. Хімічний склад біомаси

Максимальний вихід біогазу на стадії найбільш інтенсивного метаногенезу залежить від хімічного складу біомаси, яка зброджується, що, в свою чергу, визначається видовим складом рослинних решток та видом тварин і відповідно раціоном, який вони отримують (табл. 22.3 та 22.4).

Так, з 1 кг сухої речовини гнойової біомаси великої рогатої худоби, внесеної в реактор біогазової установки, теоретично можна одержати в середньому 0,4–0,6 м^3 біогазу. Враховуючи, що лише 40–60 % сухої речовини гною в процесі метаногенезу трансформується в біогаз, реальний вихід біогазу з 1 кг сухої речовини гною великої рогатої худоби становить у середньому 0,2–0,5 м^3; з еквівалентної маси свинячого гною – 0,3–0,7 м^3, а з біомаси курячого посліду ще більше (табл. 22.5).

При ферментації екскрементів від однієї тварини можна отримати біогазу в середньому за добу: великої рогатої худоби (жива маса 500–600 кг) – 1,5 м^3; свині (жива маса 80–100 кг) – 0,2 м^3; курки або кроля – 0,015 м^3.

Таблиця 22.3.

Хімічний склад відходів рослинництва, % на суху речовину
(за Баадером В., 1982)

Складова	Солома		Стебла кукурудзи	Гичка буряків	Картоплиння
	житня	пшенична			
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	14,6
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	2,00	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	0,06	0,07	0,30	0,60	0,83

Таблиця 22.4.

Хімічний склад гною сільськогосподарських тварин і птиці,
% на суху речовину (за Баадером В., 1982)

Складова	Велика рогата худоба	Свині	Кури
Органічна речовина	77–85	77–84	76–77
Сира клітковина	27,6–50,3	19,5–21,4	13,0–17,8
Сирий жир	2,9–4,3	3,5–4,0	2,4–5,0
Сирий протеїн	9,3–20,7	16,4–21,5	20,5–42,1
Лігнін	16–30	–	9,6–14,3
Співвідношення C:N	9,5–15	9–15	9–15
Азот	1,9–6,5	4,0–10,3	2,3–5,7
Фосфор	0,2–0,7	1,9–2,5	1,0–2,7
Калій	2,4	1,4–3,1	1,0–2,9
Кальцій	2,3–4,9	–	5,6–11,6
Магній	–	–	0,9–1,1

Таблиця 22.5.

Вихід біогазу (метану) при анаеробному зброджуванні сільськогосподарських відходів

(за Дубровським В.С., Вієстур У.Е., 1988)

Відходи	*Вихід біогазу на 1 кг сухої органічної речовини, м³*	*Вміст CH_4, %*
Гній великої рогатої худоби:	0,380	
- дійні корови	0,208	55,0
- бички на відгодівлі	0,290	56,6
Гній свиней	0,569–0,580	77,5
Курячий послід	0,630	79,2
Послід індиків	0,640	62,0
Гній коней	0,250	60,0
Солома	0,342	58,0
Силосні відходи	0,280	84,0
Молочні відходи	0,625	82,0

Середня кількість біогазу, яку можна отримати з 1 м³ гною тварин, оцінюється у 20–25 м³, хоча з техніко-економічної точки зору рентабельною кількістю вважається 30–35 м³. Таку кількість біогазу можна отримати шляхом поєднання різних відходів тваринництв з іншою сировиною, яка відрізняється високим умістом сухої органічної маси, а саме з відходами підприємств харчової промисловості тощо.

Крім кількості сухої речовини, суттєвим параметром, який впливає на вихід біогазу, є вміст та склад органічної речовини, особливо кількість жирів, білків, вуглеводів.

Вуглеводи, як правило, знаходяться у формі полі цукрів, тому потребують більш тривалої ферментації. Помітно знижується утворення біогазу в присутності лігніну, тому що у процесі метанового бродіння той практично не розкладається.

Найбільший вихід біогазу на 1 кг розщепленої органічної речовини дають білки (1,4–1,6 м³), потім жири (1,1–1,4 м³) і найменше — вуглеводи – 0,8–0,9 м³ (табл. 22.6). Але, враховуючи, що ступінь розкладання білків нижчий, ніж жирів, то реальний вихід біогазу з 1 кг білків становить 0,6–0,7 м³.

Таблиця 22.6.

Вихід біогазу і вміст CH4 при метановому бродінні жирів, білків, вуглеводів

(за Бієстру У.Е. та ін., 1987)

Органічна речовина	*CH_4, %*	*Вихід біогазу на 1 кг розкладеної органічної речовини, $м^3$*	*Ступінь розкладу речовини, %*
Вуглеводи	50,0–60,0	0,79–0,88	64,0–65,0
Жири	62,0–72,0	1,12–1,43	69,0–70,0
Білки	72,0–84,0	1,44–1,58	47,0–48,0

Співвідношення кількості біогазу, який можна виділити з органічної речовини гнойової біомаси дійних корів (Д), відгодівельних бичків (Б), свиней (С) і курей (К) в процесі метанового бродіння при температурі 33 °С, орієнтовно може бути таким: Д : Б : С : К = 5 : 7 : 8 : 10.

Практично з розрахунку на 1 кг сухої органічної речовини максимальний вихід біогазу в середньому становить: 0,35 $м^3$ — з гною ВРХ; 0,45 $м^3$ — з гною молочної худоби; 0,5 $м^3$ — з гною свиней і 0,7 $м^3$ — з пташиного посліду.

Від хімічного складу біомаси залежить і якість біогазу. При зброджуванні біомаси з великим умістом клітковини в біогазі містяться однакові кількості метану і діоксиду вуглецю. Збільшення у складі біомаси азотомістких речовин і жиру супроводжується підвищенням у біогазі концентрації метану і зменшенням кількості діоксиду вуглецю (табл. 22.6).

За даними В.А. Бикова та ін. (1987), при зброджуванні 1 г жироподібних речовин в середньому утворюється 1200 мл біогазу, до складу якого входить метану 68 % і діоксиду вуглецю 32 %, а з 1 г вуглеводистих речовин – відповідно 800 мл біогазу з умістом CH_4 – 50 % і CO_2 – 50 %.

При використанні відходів рослинництва (соломи, гички буряків і картоплі, відходів переробки льону тощо) з високим умістом вуглецю для забезпечення високої швидкості біометаногенезу і виходу біогазу необхідно оптимізувати співвідношення вуглецю до азоту (C : N). В умовах виробництва з цією метою до біомаси, що утилізується, додають відходи з високим умістом азоту (гній курей або свиней).

В деяких країнах використовується технологія непрямої утилізації гною. Гній піддається механічній обробці, а потім подається не в біогазову установку, а використовується як субстрат для вирощування гідробіонтів, що спеціально селекціоновані для цих умов. Вони вирізняються високою швидкістю фотосинтезу й ефективним використанням поживних речовин гнойової біомаси. В Індії позитивний результат досягли при змішуванні біомаси водяного гіацинту з гноєм у співвідношенні 2 : 3. Вихід біогазу в цьому випадку збільшився майже на 50 %, а в шламі підвищився вміст азоту, фосфору, калію, що покращило якість шламу як органічного добрива.

Технологія непрямої утилізації гною має суттєві переваги над технологією утилізації гнойової біомаси шляхом прямої анаеробної ферментації з одержанням біогазу. Технологія непрямої утилізації ефективніша за рахунок акумулювання сонячної енергії, яка накопичується у вигляді енергії хімічних зв'язків органічних сполук.

Використання біотехнології виробництва біомаси гідробіонтів – є перспективним для одержання біогазу. В 1980 р. у Московському університеті була створена експериментальна бісолярна установка з виробництва біомаси мікроводоростей з подальшою утилізацією її у метан. Конструкція системи забезпечує рециркуляцію усіх біогенних елементів (рис. 22.2). Фотосинтетичний блок бісолярної установки площею 30 $м^2$ забезпечує одержання біомаси хлорели, яка після концентрування і гомогенізації з метою руйнування клітинних структур подається у бродильну камеру, де проходить анаеробна ферментація біомаси й утворення біогазу, який складається з метану (80 %), діоксиду вуглецю (16 %) і водню (2 %). На частку інших домішок припадає близько 2 %. Конструкція бісолярної установки передбачає введення додаткових кількостей CO_2 повітря у фотосинтетичний блок.

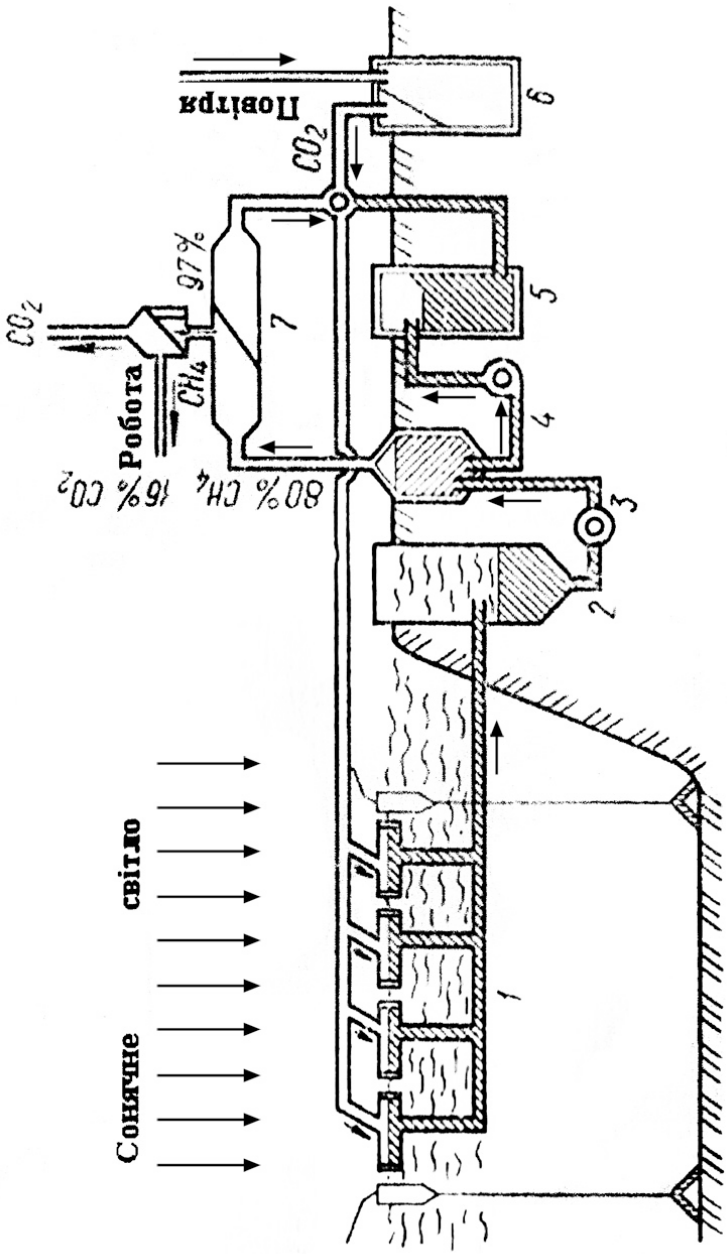


Рис. 22.2. ***Бісолярна установка*** *(за Алексєєвим В.В., Ляміним М.Я., 1985):*
1 — фотосинтетичний блок; 2 — відстійник; 3 — декомпресор; 4 — бродильна камера (метантенк); 5 — регенератор; 6 — концентратор CO_2; 7 — сепаратор.

22.3.3. Техніко-технологічні аспекти виробництва біогазу

22.3.3.1. Склад та розповсюдження БГУ у світі

Процес одержання біогазу шляхом анаеробного бродіння відбувається у спеціальних установках, які називаються біогазовими або біоенергетичними (БГУ або БЕУ).

БГУ – це комплект устаткування, що включає (залежно від техніко-технологічного рівня): ємність для збирання і зберігання гною, резервуар для зброджування гною (ферментер, реактор, метантенк, бродильна камера, дайджестер), резервуар для збирання біогазу (газозбірник, газгольдер), нагрівальні та перемішувальні пристрої, системи трубопроводів, помп і газових компресорів, центрифугових пристроїв, контрольно-вимірювальної апаратури і засобів автоматизації.

Біогазовий реактор, в якому відбувається метанова ферментація, – це основний елемент біогазової установки будь-якого технологічного рівня. З резервуару для збирання гною перемішану біомасу подають до камери ферментації, де починається процес виробництва біогазу. Ферментаційна камера (біореактор) – це герметичний теплоізольований резервуар, оснащений обладнанням для подачі нових порцій сировини, відведення біогазу і шламу та механізмами для підтримки однорідності біомаси в камері (пристосування для перемішування маси та розбивання кірки), а також системами підтримки необхідної температури процесу ферментації.

Ємність газгольдерів буває різною і залежить від добового виробництва біогазу та його витрат. Проте вона не має бути меншою за максимальне добове виробництво біогазу. Однак витрати на резервуари для біогазу (газгольдери) складають суттєву частину загальних витрат на БГУ. Тому на практиці не будують надто великих місткостей, а в разі необхідності надлишок виробленого біогазу викидають у повітря.

Перші БГУ з'явилися ще до заснування наукових основ метаногенезу. В Індії вони були ще в 1900 р. Як сировину використовували відходи тваринництва та рослинні рештки. Аналогічні установки були збудовані в 1918 р. у Німеччині, в 1922 р. – в Англії, а в 1930 р. – у США. Це така собі бочка, в яку з тваринницьких приміщень трубами та жолобами стікав гній. В бочці

відбувалось метанове бродіння тривалістю 40 діб і більше. Такі установки давали дуже низький вихід біогазу, а в холодну пору вони взагалі не працювали.

Вивчення основ процесу метаногенезу дало можливість перейти від примітивних конструкцій до установок підвищеної продуктивності.

Перші більш досконалі й продуктивні БГУ, з ємністю реактора від 300 до 2500 м^3 та часом зброджування 10–20 діб, були сконструйовані в Німеччині в 1947–1950 рр. Після цього масове виробництво установок розпочалося в багатьох країнах світу – Китаї, Індії, Англії, США, Франції тощо.

В Україні дослідження в цій сфері розпочалися в 1949 р., а вже в 1959 р. в Запорізькому філіалі НДІ електрифікації сільського господарства була сконструйована БГУ, яка працювала в мезофільному режимі. В подальшому були розроблені БГУ «Біогаз–301» для утилізації гною свиней (до 3000 гол.), установка УкрНІІ агропроект, Кобос–1 та ін.

Нині у світі розроблені та експлуатуються понгад 60 різновидів БГУ, які відрізняються між собою складністю обладнання, конструкційними особливостями, принципом дії, потужністю – від малогабаритних сімейних установок до потужних промислових підприємств з ємкістю реакторів відповідно від 1 до 6000 м^3.

Загальна кількість промислових біогазових установок на території ЄС сьогодні складає близько 750 одиниць, з них найбільше (500) знаходиться у Німеччині, Австрії – 120, Італії – 70, Швейцарії – 59 і Данії – 40 *(Дубровін В. та ін., 2004)*. Сьогодні у Данії існує близько 20 великих централізованих об'єктів типу CAD (Centralised Anaerobic Digestion), що обслуговують господарства в радіусі 10–15 км. В Австрії функціонують 3 об'єкти такого типу, у Швеції – 8, в Італії – 5 і в Німеччині – 3. Великі CAD-системи щорічно постачають з аграрних кооперативів по декілька сотень тонн сільськогосподарських відходів. Перевагами централізованих систем є можливості використання передових технологій знезаражування та звільнення сировини від великої кількості баластних речовин. Такі централізовані CAD-системи мають реактори місткістю до 10000 м^3, в яких можна виробляти енергію у кількості від кількох сотень кВт до декількох МВт. Одним з недоліків централізованих систем є великі відстані, на які необхідно перевозити субстрати.

Ферментація у невеликих реакторах без додаткового підігріву системи, де сировиною можуть бути гнойова біомаса та комунальні відходи, можлива в країнах з високою середньою річною температурою навколишнього середовища та іншими, ніж у розвинених країнах, структурами сільського господарства. Реактори місткістю 4–12 м^3, що обслуговують одне або декілька господарств, найбільш популярні у країнах Африки та Азії. Біогаз, який виробляється в малих системах, задовольняє енергетичні потреби господарств, використовується для приготування їжі та освітлення приміщень. Найбільша кількість таких установок (8 мільйонів ферментаційних камер) знаходиться у Китаї.

22.3.3.2. Конструкційні особливості реактора БГУ

Реактори або бродильні камери є основними складовими БГУ. Рентабельність біогазового виробництва значною мірою залежить від конструкційних особливостей бродильної камери. При її проектуванні необхідно враховувати об'єм біомаси, яка підлягає утилізації, а також об'єм біогазу, необхідний для задоволення енергетичних виробничих потреб.

В діючих БГУ використовуються реактори овальної, циліндричної, циліндроконічної, кубічної форми та у вигляді паралелепіпеда. Найбільші переваги мають реактори овальної і циліндроконічної форми. В них краще перемішується субстрат, вивантажується шлам, видаляється біогаз. В реакторах іншої форми погіршуються умови для перемішування біомаси, руйнування плаваючої кірки, видалення біогазу і шламу.

Будівельним матеріалом для виготовлення реакторів є цегла, бетон, залізобетон, стальний лист, склопластик, полімерна плівка. Еластичні реактори будують з прогумованого матеріалу або пластмасової оболонки і надають їм овальної форми. При експлуатації, щоб уникнути травмування, їх закопують у грунт або огороджують жорсткими конструкціями.

З метою підвищення ефективності одержання біогазу та зниження його собівартості промисловість США і Німеччини розпочала випуск дешевих штампованих швидкозбірних реакторів, виготовлених із пластика з теплоізоляційною прокладкою із синтетичних матеріалів. Ці реактори швидко і легко монтуються на фермі, добре очищуються від гною і залишкового шламу, мають низький коефіцієнт теплопередачі.

Отже, бродильна камера має відповідати наступним вимогам: бути абсолютно герметичною, мати досконалу теплоізоляцію і високу корозійну стійкість. Всередині камери повинна підтримуватися постійна температура (залежно від температурного режиму), бо метаноутворюючі мікроорганізми дуже чутливі до різких коливань температури. Тому біомаса, яка надходить в реактор, підігрівається за допомогою спеціальних пристроїв до необхідної температури. Для цього витрачається орієнтовно до 30 % влітку і 60 % взимку енергії виробленого біогазу.

У відходах сільськогосподарського виробництва є різні тверді частинки. Деякі з них, щільність яких вища за щільність рідини (пісок, цемент, глина тощо), зумовлюють утворення осаду, решта утворюють на поверхні кірку.

У процесі ферментації біомаса в реакторі має тенденцію до розділення на три фракції. Верхня – кірка утворюється з великих частин, які піднімаються бульбашками утвореного біогазу. Через деякий час вона може стати досить твердою і заважатиме виділенню біогазу. В середній частині реактора скупчується рідина, а нижня грязеподібна фракція випадає в осад. Метаноутворюючі бактерії найбільш активні в середній зоні. Тому для оптимізації умов метаногенезу у бродильній камері та підвищення виходу біогазу біомасу в реакторі потрібно періодично перемішувати (мінімум раз на добу, а бажано до шести разів).

Для перемішування використовуються різні механічні та гідравлічні змішувальні пристрої, а також біогаз, який подається в реактор компресором. Швидкість руху біомаси при перемішуванні не повинна перевищувати 0,5 м/сек. За більш високих швидкостей проходить розрив оболонки мікробних клітин.

Процес перемішування дозволяє:

- ✓ підтримувати однорідність розподілу сировини, яка завантажується, і постійний контакт її з мікроорганізмами, що дає можливість максимально утилізувати свіжі поживні речовини;
- ✓ зберегти на низькому рівні концентрацію продуктів розпаду за рахунок рівномірного їх розподілу за всім об'ємом реактора;
- ✓ забезпечити однорідність середовища як за температурою, так і за концентрацією поживних елементів, що створює сприятливі умови для життєдіяльності мікрофлори;

- ✓ усунути концентрацію інгібуючих речовин у певній окремій зоні реактора, що обмежує їх вплив на процес метанового бродіння;
- ✓ запобігти утворенню кірки на поверхні та утворенню нерухомого густого осаду на дні;
- ✓ зменшити кількість ділянок у біореакторі, в яких можуть міститися нерухомі речовини, що не розклалися, і відпрацьована рідина.

22.3.3.3. Класифікація БГУ за принципом дії

За принципом дії усі БГУ можна розподілити на три основних види:

БГУ безперервної дії або проточні БГУ. В них гній безперервно або з короткими інтервалами подається у постійно заповнений реактор, в якому оптимальні умови анаеробного розкладання створюються механічним перемішуванням і підігріванням маси. Свіжий матеріал надходить у верхню частину камери, а відводиться з нижньої частини (над дном камери). При кожному завантаженні об'єм свіжого гною має відповідати об'єму гною, який перебродив і вивантажується. Така технологічна схема забезпечує найбільшу продуктивність БГУ і за нею працює основна частина вітчизняних і зарубіжних установок, які сьогодні експлуатуються. Ця технологія потребує найменших ферментаційних камер, які можуть встановлюватися горизонтально або вертикально.

Однак вони мають певні недоліки. В установках проточного типу при підвищенні проходження вихідного гною через реактор відбувається винесення колоній метаноутворюючих мікроорганізмів, що у свою чергу призводить до зменшення виходу біогазу. Для усунення цього недоліку в установках проточного типу необхідно використовувати системи автоматичного управління процесом, які могли б виявити відхилення в технологічному процесі, ліквідувати їх, а також підтримувати оптимальні параметри процесу біометаногенезу.

БГУ з періодичною або циклічною системою використання метантенків. Переробка гною в них проводиться у послідовно з'єднаних метантенках (2-х або більше), які почергово заповнюються свіжою гнойовою біомасою. Чим більше реакторів, тим коротші перерви між циклами виробництва біогазу.

Особливістю експлуатації установок є неповне видалення з реактора шламу, який відіграє роль затравки. Завдяки цьому уже через кілька діб після заповнення бродильної камери свіжим гноєм розпочинається метаногенез.

Використання об'єму бродильних камер при цій системі менш ефективне. Періодичність у заповненні реакторів викликає необхідність мати достатній запас гною, що потребує будівництво гноєсховищ. Крім цього, щоб під час вивантаження шламу в реактор не потрапило повітря, тобто, щоб не відбувалося розгерметизації реактора, його потрібно заповнювати біогазом із додаткових, спеціально призначених для цього ємностей (газозбірників).

БГУ з накопичувальною системою. В них один і той самий резервуар є одночасно реактором і ємністю для зберігання шламу, аж до вивезення його на поля. Ця система має ще й іншу назву акумулятивна або басейнова. Вона мало застосовується для виробництва біогазу.

22.3.3.4. Техніко-технологічні рівні БГУ

Існуючі БГУ відрізняються між собою за складом споруд, обладнання, конструкційними особливостями, принципом дії, параметрами процесу біометаногенезу, продуктивністю тощо. Враховуючи це, можна виділити чотири рівні БГУ.

БГУ першого рівня. Це найбільш простий технічний рівень. Такі БГУ використовуються в країнах з тропічним кліматом. В них метантенк і газгольдер суміщені і, як правило, заглиблені в грунт. Зброджувана біомаса не підігрівається і не перемішується. Відсутні також регулювання і контроль процесу анаеробного бродіння. Процес одержання біогазу триває 40 діб і більше. До цього технічного рівня належить установка «Габор», яка експлуатується в Китаї та Індії. Продуктивність установки – 1,7 м^3 біогазу на добу та 0,2–0,5 м^3 на 1 м^3 об'єму бродильної камери.

На Кубі розроблена й експлуатується БГУ у вигляді анаеробної лагуни, яка герметично закривається поліетиленовою плівкою, з клапанами для виведення біогазу. Після завершення процесу біометаногенезу в лагуні зі шламом можна вирощувати мікроводорості.

В Західній Європі, наприклад, у Румунії та Італії, вже понад 20 років масово використовуються прості малогабаритні БГУ

для індивідуальних господарств з об'ємом реактора 6–12 м^3. Конструкційно-технологічні схеми таких біогазових установок наведені на рис. 22.3. Стрілками позначені технологічні переміщення вихідної органічної маси, газу, мулу. Установки – це така собі яма, облицьована цеглою або залізобетонними плитами, які штукатурять цементним розчином і для герметичності покривають смолою (рис. 22.3, а) або покрівельним залізом, листи якого щільно зварюють (рис. 22.3, в). Зверху ями розміщують купол, виготовлений із пофарбованого покрівельного заліза (жорсткий) або з поліетиленової плівки, у горішній частині якого встановлюють патрубок для відведення біогазу. Довкола ями-ферментера влаштовують гідростулку – бетонну канавку глибиною до 1 м, заповнену водою, в яку занурюють нижній бортик купола на 0,5 м.

Газ, який збирається під куполом або плівкою, надходить по газопроводу до місця його використання. Щоб запобігати вибуху газу на випускному патрубку рекомендується встановити відрегульований на певний тиск клапан. Однак небезпека вибуху малоймовірна через те, що при значному підвищенні тиску газу під куполом той буде підійматись у гідростулці до критичної висоти і перекинеться, випустивши при цьому газ. Виробництво біогазу може знижуватися через те, що на поверхні органічної сировини у ферментері при її зброджуванні утворюється кірка. Для того щоб вона не перешкоджала виходу біогазу, її руйнують шляхом перемішування біомаси у ферментері. З цією метою знизу до купола можна приєднати металеву вилку. Купол піднімається у гідростулці на певну висоту при накопиченні біогазу й опускається по мірі його використання. Через систематичний рух купола зверху-вниз з'єднані з куполом вилки руйнуватимуть кірку.

Розроблена БГУ з підігрівом зброджуваної біомаси теплом, яке виділяється при розкладанні гною в аеробному ферментері (рис. 22.4). До неї входять: металевий ферментер циліндричної форми із заливною горловиною, зливним краном, механічним змішувачем і патрубком для виведення біогазу. Ззовні реактора розміщується прямокутний ферментер, виготовлений з дерев'яних розкладних конструкцій для полегшення вивантаження відпрацьованого гною. Підлога ферментера решітчаста, через неї по технологічному каналу продувається повітря і гній активно аерується. Зверху ферментер закривають дерев'яними

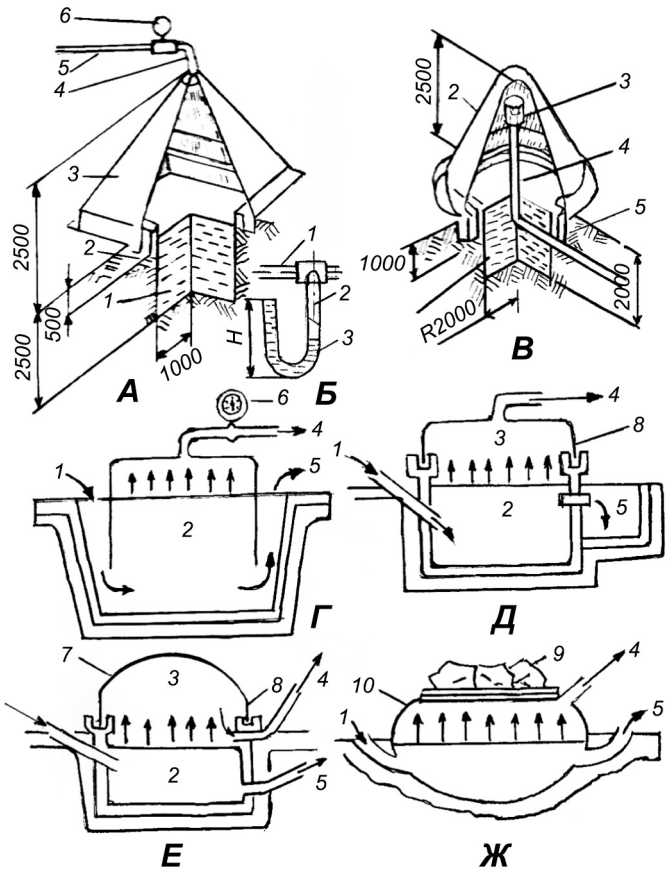


Рис. 22.3. ***Схеми простіших біогазових установок:***

А — з пірамідальним куполом: 1 — яма для гною; 2 — канавка-гідростулка; 3 — купол для збору газу; 4, 5 — патрубок для відведення газу; 6 — манометр.

Б — пристрій для відведення конденсату: 1 — трубопровід для відведення газу; 2 — U-подібна труба для конденсату; 3 — конденсат.

В — з конічним куполом: 1 — яма для гною; 2 — купол; 3 — розширена частина патрубка; 4 — труба для відведення газу; 5 — канавка-гідростулка.

Г-Ж — схеми варіантів простіших установок: 1 — подача органічних відходів; 2 — ємність для органічних відходів; 3 — місце накопичення газу під куполом; 4 — патрубок для відведення газу; 5 — відведення мулу; 6 — манометр; 7 — купол із поліетиленової плівки; 8 — водяна стулка; 9 — вантаж; 10 — цільноскроєний поліетиленовий мішок

щитами. Щоб зменшити втрати тепла, стінки і днище виготовляють з теплоізоляційним прошарком.

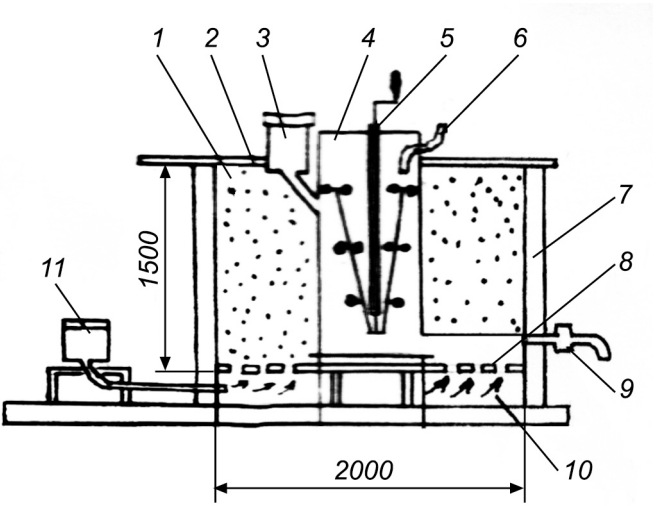


Рис. 22.4. ***Схема біогазової установки з підігрівом:***
1 — ферментер; 2 — дерев'яний щит; 3 — заливна горловина; 4 — метантенк; 5 — мішалка; 6 — патрубок для відбору біогазу; 7 — теплоізоляційний прошарок; 8 — решітка; 9 — зливний кран для переробленої біомаси; 10 — канал для подачі повітря; 11 — повітродувка

Працює установка таким чином: в метантенк через горловину заливають попередньо підготовлений рідкий гній вологістю 88–92 %. Аеробний ферментер через верх заповнюють підстилковим гноєм або сумішшю гною з пухким сухим органічним наповнювачем (солома, тирса) вологістю 65–69 %. При подачі повітря через технологічний канал у ферментері починає розкладатись органічна маса і виділяється тепло, яким підігрівається біомаса у реакторі. Одержаний біогаз накопичується у верхній частині метантенка і через патрубок його використовують для побутових потреб. Така установка окупить себе уже через рік тільки за рахунок утилізації відходів в особистому господарстві.

Для підігріву ферментера використовується також ефект теплиці. Над ємністю (реактором) споруджується металевий каркас, який накривають поліетиленовою плівкою. За нес-

приятливих погодних умов вона зберігає тепло і дозволяє помітно прискорити процес розкладання сировини. Для забезпечення оптимальних умов процесу біометаногенезу гній можна змішувати з гарячою водою (якщо дозволяє вологість).

В колишньому Радянському Союзі була розроблена індивідуальна біогазова установка (ІБГУ-1) для селянської сім'ї, яка має від 2 до 6 корів або 20–60 свиней, або 100–300 голів птиці (рис. 22.5). Установка щодобово може переробляти від 100 до 300 кг гною і виробляти 3–12 м^3 біогазу. Для приготування їжі на сім'ю з 3–4 чоловік необхідно спалити 3–4 м^3 біогазу на добу, а для опалення будинку площею 50–60 м^2 – 10–11 м^3 біогазу. Установка може працювати в будь-якій кліматичній зоні. Серійне виробництво ІБГУ-1 було налагоджено на заводах у містах Тулі та Орлі.

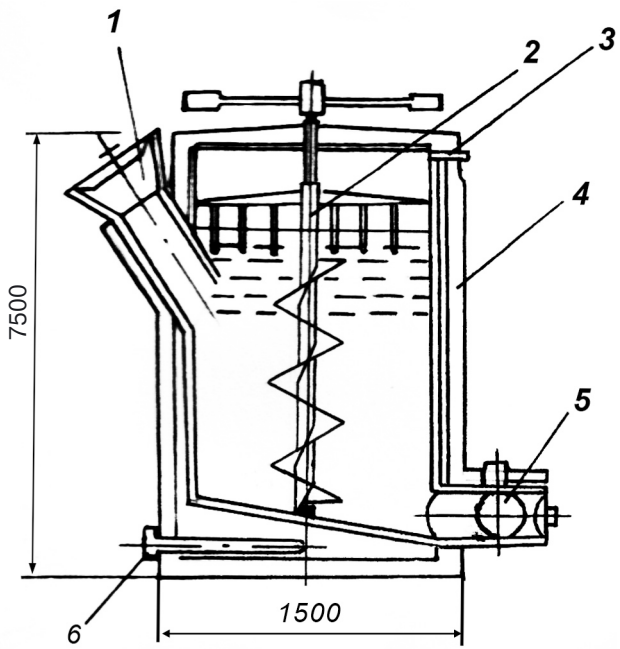


Рис. 22.5. ***Схема індивідуальної біогазової установки ІБГУ-1:***
1 — заливна горловина; 2 — мішалка; 3 — патрубок для відбору газу; 4 — теплоізоляційний прошарок; 5 — патрубок з краном для вивантаження переробленої маси; 6 — термометр

Наведені конструкційно-технологічні схеми найпростіших біогазових установок можуть використовуватися в Україні цілорічно у південних регіонах та посезонно в інших областях.

БГУ другого рівня — є більш продуктивними та економічно вигідними. В них передбачено підігрівання і перемішування зброджуваної біомаси, а за необхідності – й подрібнення. Установкою такого типу є модель «Дормштадт». У ній з 1 м^3 об'єму метантенка одержують біогазу вчетверо більше, ніж у БГУ «Габор», тобто 1,2–2 м^3. Однак установка має конструкційні недоліки: недостатня тепло- і гідроізоляція, викликана заглибленням реактора в грунт, можливість утворенння застійних зон при перемішуванні біомаси і додаткові енергетичні витрати на руйнування плаваючої кірки, яка утворюється на всій поверхні бродильної камери при виділенні біогазу.

БГУ третього рівня. Це установки, виготовлені в Німеччині: Ліпп, Райки, Біма, МББ; вітчизняні – Кобос-1, Біогаз-301, УкрНДІагропроект; Енбом – Фінляндія та ін. (рис. 22.6). У них передбачені конструкційні зміни – двокамерний реактор, а в деяких – двокамерний газгольдер. Це дало можливість проводити двоступінчасте метанове бродіння біомаси: перший ступінь – перший та другий етапи біометаногенезу, тобто зброджування органічних речовин до ацетату в першій камері, та другий ступінь – власне метанове бродіння у другій камері.

Крім цього, конструкцією німецьких БГУ (Ліпп, Райки, МББ, Біма) передбачені також різні температурні режими в різних камерах. У першій камері, куди надходить підготовлена до зброджування підігріта біомаса і де проходить процес утворення органічних кислот, підтримується температура 35 °С. У другій камері, яка розміщена в центрі метантенка, проходить термофільний процес. Такі конструктивні вдосконалення дозволили збільшити продуктивність біогазових установок і одержати 7 м^3 біогазу з розрахунку на 1 м^3 корисного об'му реактора.

Вітчизняна БГУ «Кобос-1» – це комплект обладнання для анаеробного зброджування гною з одержанням товарного біогазу і високопоживних органічних добрив. Він складається з реактора, підігрівача-витримувача, газгольдера, помп, компресора і водогрійного котла (рис. 22.7).

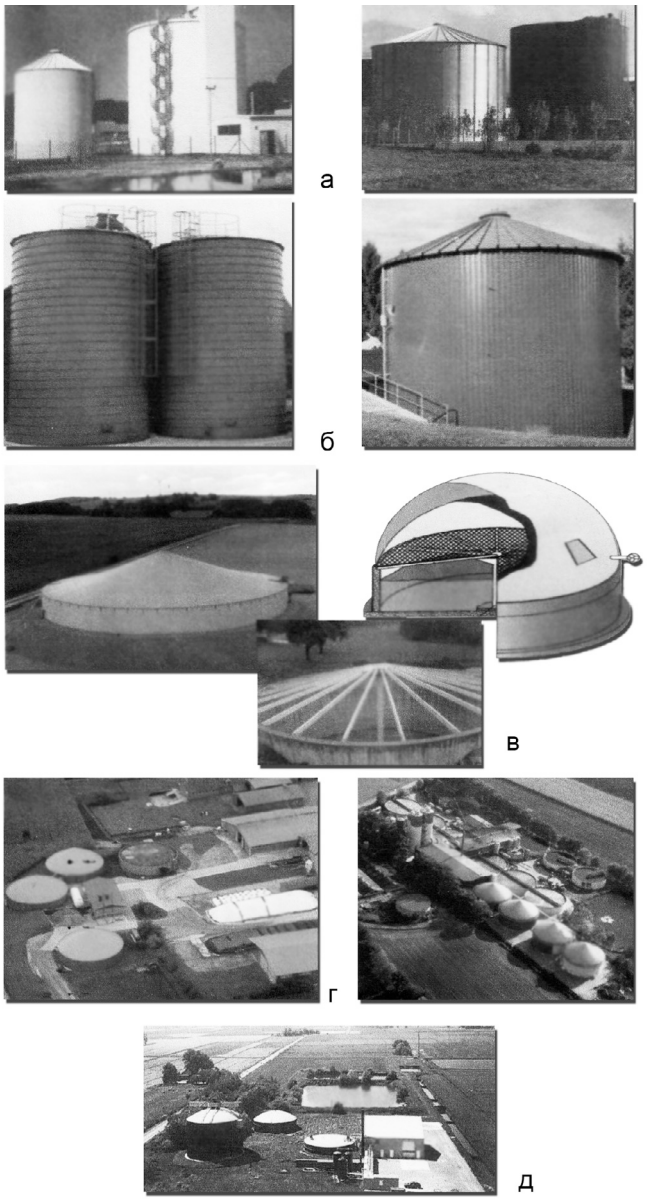


Рис. 22.6. ***Деякі різновидності біогазових установок, які нині експлуатуються у Німеччині:***
а — Біма; б — Ліпп; в — еластичні реактори; г — загальний вигляд біогазового виробництва; д — Дормштадт

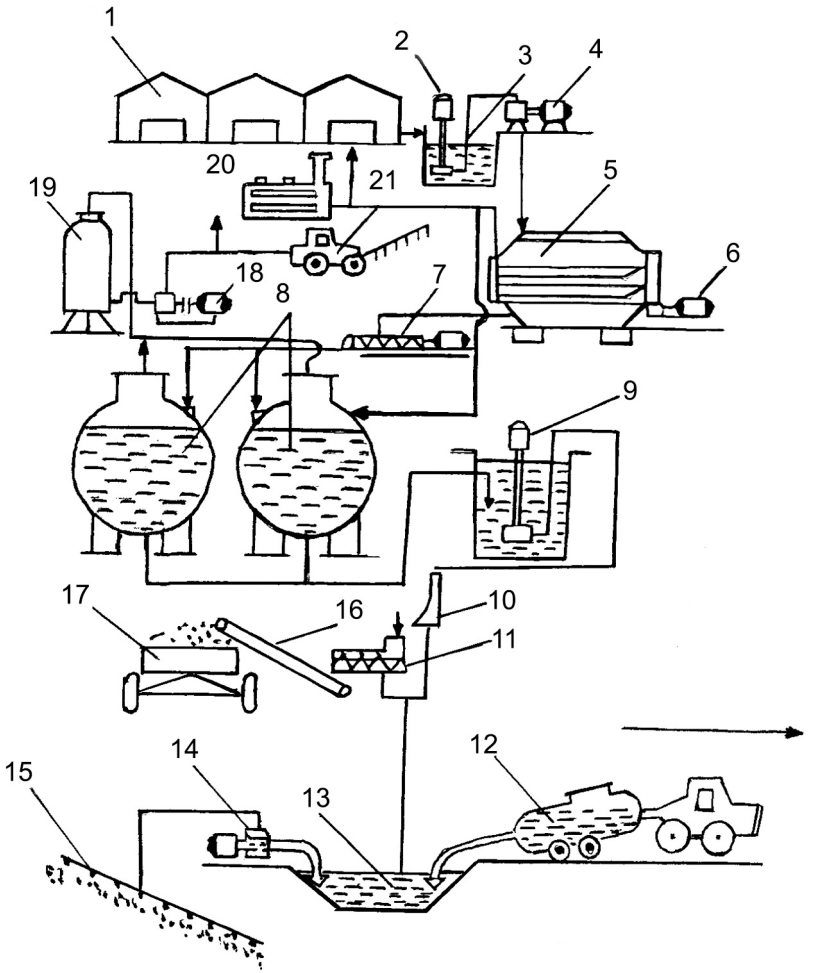


Рис. 22.7. ***Технологічна схема комплекса обладнання «Кобос-1»*** *(за Погорілим Л.В., Луценко М.М, 1992):*

1 — ферма; 2 — помпа для рідкого гною; 3 — колектор; 4 — подрібнювач; 5 — підігрівач-витримувач; 6, 9 — гнойові помпи; 7 — гвинтова помпа; 8 — реактори; 10 — дугове сито; 11 — прес-фільтр; 12 — цистерна-розкидувач; 13 — гноєсховище; 14 — помпа; 15 — зрошувальна система; 16 — транспортер; 17 — візок; 18 — компресор; 19 — газгольдер; 20 — котел; 21 — трактор, який працює на біогазі

Кобос-1 розрахований для використання на фермах і комплексах великої рогатої худоби на 400 голів або 4000 голів свиней і має два реактори ємністю по 125 м^3 кожен. Для комплексів на 600 і 800 голів кількість реакторів збільшується. Конструкцією БГУ передбачено двоступінчасте метанове бродіння.

Гній з ферми надходить на подрібнювач, де руйнуються довговолокнисті домішки (солома, гичка), а потім поипою подається в першу камеру – підігрівач-витримувач ємністю 25 м^3. Це циліндричний резервуар з теплообмінником, який є замкнутою системою за принципом «труба в трубі», де гній підігрівається до температури 40 °С. У цій камері проходить гідроліз високомолекулярних сполук до низькомолекулярних і утворення органічних кислот, діоксиду вуглецю, аміаку та ін. З підігрівача-витримувача помпою-дозатором гній періодично (4 рази на добу) подається в реактор, де проходить остаточне перетворення органічних речовин на біогаз.

Підтримування необхідної мезофільної температури (+40 °С) на постійному рівні, компенсація теплових витрат в реакторах і камері забезпечується за допомогою теплообмінних пристроїв, через які подається гаряча вода (70 °С), яку одержують при спалюванні біогазу.

За основними якісними і кількісними показниками «Кобос-1» не поступається зарубіжним аналогам, а за такими, як продуктивність за зброджуваною масою, виходом біогазу та тривалістю зброджування (5 діб) навіть має переваги.

Установка «Біогаз-301» (Сумське машинобудівне НВО) призначена для утилізації й знезараження відходів ферм з поголів'ям 3000 свиней. Вона є складовою частиною ферми. Технологічний процес здійснюється в конкретних анаеробних умовах у двостадійному режимі при температурі 40 °С і циклом зброджування 8 діб.

БГУ четвертого рівня. В них передбачено автоматичне регулювання процесу анаеробного зброджування за програмою ЕОМ.

22.3.4. Фракції, що утворюються в процесі біометаногенезу

Принципова схема виробництва біогазу передбачає наступні етапи:

1) накопичення і підготовка біомаси;
2) трансформація біомаси в біогаз (безпосередньо метанове бродіння);
3) раціональне використання продуктів метанового бродіння (біогазу та органомінерального добрива).

При утилізації біомаси будь-якого походження шляхом анаеробної ферментації утворюються такі фракції:

1) біогаз (суміш газів);
2) нерозщеплені мікроорганізмами органічні речовини (тверда фракція або шлам) вологістю 65–70 %;
3) рідка фракція або надосадова рідина.

Біогаз, утворений у ферментаційній камері, як більш легкий, накопичується над масою, що ферментується, звідки трубопроводами відводиться у газовий резервуар (газгольдер).

Поділ біомаси після зброджування на тверду і рідку фракції можна проводити за допомогою центрифуги або віброгрохота.

В середньому з 1 кг органічної речовини, біологічно розкладеної на 70 %, можна одержати 0,5 кг біогазу, 0,2 кг води і 0,3 кг нерозщепленого залишку або шламу.

22.3.4.1. Біогаз, його склад та використання

Біогаз – це суміш газів, яка складається з метану (50–85 %), діоксиду вуглецю (15–50 %), невеликої кількості сірководню (до 2 %), а також домішок водню, аміаку, оксидів азоту. Головним компонентом біогазу є метан. Присутність діоксиду вуглецю обмежує теплоутворюючу здатність біогазу як палива, що залежно від співвідношення CH_4/CO_2 досягає 20,9–33,4 МДж/м^3.

Енергетична цінність 1 м^3 біогазу, який складається на 50 % з метану, досягає 17,8 МДж, а при збільшенні вмісту метану до 70 %, його енергетичний потенціал підвищується до 25 МДж. Енергетична цінність таких традиційних енергоносіїв, як природний газ і рідке паливо, з розрахунку на 1 м^3 і 1 кг складає 34 і 42 МДж відповідно.

Основними домішками в біогазі, які знижують його якість, є діоксид вуглецю і сірководень. При використанні біогазу як

пального вони (особливо сірководень) викликають значну корозію технологічного обладнання. Для очищення біогазу від забруднюючих домішок, використовують такі методи, як сухе, «мокре» і лужне очищення, рідинну абсорбцію і напірну сепарацію.

Для підвищення економічної ефективності потужних БГУ промислового типу використовують водяні газоочисники, які збільшують питому вагу метану в біогазі до 95 %. Це сприяє підвищенню теплоутворюючої здатності біогазу майже удвічі.

Ефективність використання біогазових установок визначають методами перетворення одержаного біогазу як енергоносія. Можна визначити такі напрями використання біогазу:

– спалювання в котельних агрегатах для нагрівання води та використання її у технологічному процесі або іншими споживачами;
– підготовка біогазу відповідно до вимог нормативно-технічної документації та подавання його в газорозподільні мережі місцевих споживачів природного газу (змішування з природним газом);
– очищення, висушування, стиснення і заправлення біогазом газобалонних автомобілів, тракторів та інших сільгоспмашин;
– вироблення електроенергії.

Біогаз має усі переваги, що властиві природному газу. Він легко транспортується газопроводами, згоряє без диму, кіптяви й залишку (попелу, шлаку). Прилади, які працюють на газі, прості, безпечні, швидко вводяться у дію, легко регулюються і переводяться в автоматичний режим.

Біогаз може використовуватися безпосередньо в газоспалювальних пристроях для опалення і освітлення, для постачання енергією кормопідготовчих цехів, стерилізації й зневоднення твердої фракції гною після сепарування, для двигунів внутрішнього згоряння тощо.

Найпростіше спалювати біогаз замість природного газу в газових горілках, до яких він може підводитись з резервуара (газгольдера) під низьким тиском. Більшість сучасного теплотехнічного обладнання тваринницьких ферм, яке працює на природному або зрідженому газі, може бути переведена на біогаз без суттєвих модернізацій і помітного зниження ефективності роботи. Промисловість США, Німеччини та інших країн розпочали постачання калориферів з біогазовими горілками, а також теплових генераторів, які використовують біогаз як пальне.

Але вигідніше використовувати біогаз для одержання механічної та електричної енергії. Це дасть можливість створити власну енергетичну базу, яка може забезпечити потреби тваринницької ферми і навіть житлового сектора. З 1 м^3 біогазу можна отримати 1,6–2,3 кВт/год електроенергії.

Італійська фірма «Фіат» розробила універсальний енергоблок «Тотем», який працює на будь-якому виді палива, в тому числі й на біогазі. Енергоблок складається з комплекта, до складу якого входить дизель, електрогенератор, теплообмінник, що акумулює тепло вихлопних газів, двигуна внутрішнього згоряння та подає його на теплотехнічні потреби. Загальний коефіцієнт корисної дії (ККД) з урахуванням тепла, яке утворюється при виробництві електроенергії, досягає 80–85 %, а безпосередньо на електроенергію перетворюється 33 % хімічної енергії біометану.

Біогаз використовується також як пальне для автомобільних двигунів, причому ефективність його в цьому випадку залежить від вмісту метану і наявності домішок. На метані можуть працювати як карбюраторні, так і дизельні двигуни. Та оскільки метан є високооктановим пальним (октанове число цього пального 110–115, а нижня межа спалаху – 645 °С), ефективніше використовувати його у дизельних двигунах.

Промисловістю випускаються пристрої для двигунів внутрішнього згоряння, які можуть працювати як на бензині, так і на метані. Використання метану в автотранспорті має деякі переваги: порівняно низька вартість, значно менше забруднення навколишнього середовища порівняно з бензином і дизельним пальним.

Установки метанового бродіння є особливо перспективними для енергозабезпечення сільської місцевості через складність централізованого постачання природного газу та в умовах поступового вичерпування традиційних енергетичних ресурсів (нафти, газу, вугілля тощо). У сільській місцевості біогаз може використовуватись як замінник природного газу для приготування їжі, забезпечення гарячою водою, опалення житлових приміщень і адміністративних будинків, обігрівання тепличнопарникового господарства, сушіння зерна і фруктів, газопостачання автотракторного парку тощо. За підрахунками фахівців 1 м^3 біогазу дає можливість приготувати обід на 6–7 осіб або освітлювати приміщення середніх розмірів протягом 6–8 годин.

1 м^3 біогазу еквівалентний енергії, яка міститься в: 0,65 м^3 природного газу, 0,7 л нафти, 0,65 л дизпального, 0,64 л бензину, 0,6 л гасу, 3,5 кг дров та 1,5 кг кам'яного вугілля.

В деяких випадках здійснюється комплексна утилізація біогазу: частина його скеровується на задоволення енергетичних потреб господарства, в тому числі для забезпечення енергетичних потреб самого процесу метанового бродіння (підігрів реактора), а залишок продається комерційно в місцевій або загальнонаціональній системі газозабезпечення. Прикладом такого використання є постачання газу до м. Чикаго (США), організоване компанією Calorific Recovery Anaerobic Process, переробне підприємство якої знаходиться поблизу м. Гаймон у штаті Оклахома. Щоденно на підприємстві переробляється 500 т гною, з якого одержують 45,3 тис. м^3 біогазу. Цієї кількості вистачає для опалення 3,5 тис. житлових приміщень в Чикаго. Постачання газу здійснюється за допомогою спеціально побудованого газогону. Біогаз, який надходить, складається на 99,8 % з метану після попереднього очищення від діоксиду вуглецю, сірководню та інших домішок.

На думку деяких авторів, одержання біогазу з тваринницьких відходів і використання його на потреби сільського господарства дозволить на 3–4 % скоротити використання інших видів енергії.

Крім цього, діоксид вуглецю, який міститься в біогазі, може бути використаний як консервант для кормів, для підвищення ККД фотосинтезу в теплицях та при вирощуванні гідробіонтів (хлорели, спіруліни) тощо.

22.3.4.2. Шлам, його склад та використання

Тверда фракція гною або шлам, який утворюється в процесі одержання біогазу, містить значну кількість поживних речовин і може використовуватись як цінне знешкоджене органічне добриво або кормові добавки. Він не має специфічного запаху.

Анаеробна ферментація гнойової біомаси супроводжується зменшенням у шламі майже на 50 % сухої органічної речовини порівняно з вихідним гноєм за рахунок включення 10–15 % вуглецю субстрату в мікробну масу, а також у такі компоненти біогазу, як метан і діоксид вуглецю.

Склад шламу залежить від хімічного складу вихідної сировини, а також параметрів процесу біометаногенезу. До органічної частини шламу входять речовини трьох видів:

1) речовини, які є у вихідній сировині й захищені від дії мікроорганізмів лігніном і кутіном;

2) нові бактеріальні клітини;

3) невелика кількість летких жирних кислот.

Шлам є цінним органічним, азотним і мінеральним добривом, в якому поживні речовини знаходяться в більш доступній формі. При анаеробному зброджуванні зберігаються необхідні для рослин біогенні елементи (N, P, K), натомість при компостуванні їх втрати складають до 40 %.

Головна перевага анаеробного зброджування над аеробним полягає у збереженні в органічній або амонійній формі майже всього азоту, який містився у вихідній гнойовій біомасі. Так, з 37 кг азоту, який містився у гноєві, після його аеробної обробки у ґрунт повертається тільки 12–15 кг, а після анаеробної ферментації у ґрунт повертається 36 кг *(Алексєєв В.В., Лямін М.Я., 1985)*. Співвідношення органічного та аміачного азоту в шламі залежить від їх співвідношення у біомасі, яка зброджується. Щоб звести до мінімуму втрати аміачного азоту, шлам зберігають у глибоких ямах або резервуарах з мінімальною площею поверхні, з якої звітрюється аміак. Найкраще азот зберігається, коли шлам вносять у ґрунт за декілька днів до посіву або культивації. Якщо шлам розкидається по поверхні ґрунту і при цьому тривалий час не випадають опади, майже весь аміачний азот звітрюється.

В багатьох випадках його висушують, що дає змогу транспортувати шлам на значну відстань.

Шлам використовується як білкова і вітамінна (вітамін B_{12}) кормова добавка. Цей спосіб широко розповсюджений у США не тільки для забезпечення потреб власних господарств, але й для комерційного продажу. Так, в США існує компанія «Термотенікс», яка виробляє зі шламу кормові добавки з умістом протеїну до 12 %, а в перспективі – від 26 до 28 %.

На комплексі з відгодівлі 10 тис. голів молодняку великої рогатої худоби компанії Kaplan Industries у Флориді США при переробці відходів у біогаз методом анаеробного зброджування як побічний продукт одержують кормовий білок, що за поживною цінністю перевершує муку з насіння бавовника, яка широко використовується як кормова добавка.

Аналіз шламу на наявність патогенної мікрофлори свідчить, що кишкові мікроорганізми гинуть при температурі

зброджування 37 °С (тобто при мезофільному режимі). Вірогідність зараження сільськогосподарських культур патогенними мікроорганізмами може бути зведена нанівець пастеризацією шламу.

Крім цього, шлам може використовуватися як субстрат для черв'яків без попередньої підготовки (ферментації).

22.3.4.3. Рідка фракція, склад і використання

Рідка фракція після анаеробної переробки гною відповідає вимогам, які висуваються органами охорони природи щодо якості стічних вод. Вона, як і шлам, не має специфічного запаху і містить органічних речовин на 80 % менше, а її біологічна потреба в кисні на 80 % нижча, ніж до анаеробної ферментації. Санітарно-гігієнічні показники надосадової рідини дозволяють складати їх у каналізаційну мережу або водоймища. Але це нераціонально, тому що вона містить значну кількість поживних речовин і може використовуватись як рідке органічне добриво. Рідка фракція гною містить в середньому (%): сухої речовини – 1,0–5,0; органічної речовини – 0,25–4,2; азоту – 0,3–1,1; фосфору – 0,05–0,7; pH – 6,5–8,3.

Крім того, рідка фракція може бути субстратом для вирощування мікроводоростей (хлорели, спіруліни – синьо-зеленої водорості), біомаса яких є цінною білковою і вітамінно-мікромінеральною кормовою добавкою до раціонів сільськогосподарських тварин, а спіруліна – сировиною для фармацевтичної промисловості. Біомаса гідробіонтів може використовуватись також для виробництва біогазу.

При визначенні економічної ефективності біотехнології метанового зброджування необхідно враховувати не тільки значення біогазу у вирішенні енергетичних проблем, особливо у сільській місцевості, а й ефект від знезараження гною, виробництва високоякісних добрив і захисту навколишнього середовища. Розрахунки показують, що незважаючи на значні капітальні вкладення, термін окупності промислової біогазової установки складає приблизно три роки *(Дубровін В. та ін., 2004)*.

22.3.5. Шляхи вдосконалення біогазового виробництва

1. Створення активних метаногенних штамів мікроорганізмів з використанням методів генетичної інженерії, тобто з використанням технологій рекомбінантних ДНК.
2. Використання збалансованої асоціації мікроорганізмів для скорочення часу виведення БГУ на робочий режим.
3. Введення в зброджувану біомасу органічних каталізаторів для інтенсифікації анаеробного бродіння – глюкози, целюлози, ацетату, метанолу.
4. Створення системи автоматичного управління БГУ і програм ЕОМ для оптимізації параметрів бродильного процесу.
5. Іммобілізація або адгезія метаногенів (мікроорганізмів третього етапу) на носіях (щітках з капронових волокон, гранулах) з метою підвищення швидкості росту метаноутворюючих бактерій. Дослідженнями доведено, що на щітках уже через 2–3 тижні ферментації накопичується удвічі-тричі більше метаногенів, ніж у рідині.
6. Інтенсифікація метанового бродіння шляхом розділення процесу на дві стадії: першу – попередню, у якій в окремій ємності проводиться гідроліз субстрату до ацетату (тобто перші два етапи) і другу – власне метаногенез.

Це дозволяє локалізувати специфічну для кожної стадії мікрофлору і забезпечити найбільш сприятливі умови для її розвитку.

22.3.6. Сучасний стан виробництва біогазу в Європі та світі

Загострення проблеми забруднення навколишнього середовища різноманітними органічними відходами, в тому числі відходами тваринницької галузі, а також зростаючий дефіцит енергетичних ресурсів є головними мотивами інтенсифікації Європейських розробок у галузі виробництва та ефективного використання біогазу. Підтримується інтерес до біогазових технологій також дієвим екологічним законодавством і державним дотуванням впровадження нетрадиційних відновлювальних джерел енергії (особливо в Німеччині), а також введенням світових квот на забруднення довкілля.

Потенціал органічних відходів, придатних для одержання біогазу, у 15 країнах ЄС такий (млн т): гній – 1124; відходи

муніципальних господарств – 46,9; стічні води – 22,32; індустріальні органічні відходи – 35,04 (Йенс Бо Гольм – Нільсен, Теодоріта Аль Сеаді, 2002).

У сучасній Європі найбільшого поширення набули три концепції виробництва біогазу:

1) виробниче біогазове обладнання при фермерських господарствах;

2) потужні лінії з переробки гною, розраховані на задоволення спільних потреб кількох господарств;

3) найпотужніші біогазові підприємства, що спеціалізуються на переробці органічних відходів різноманітного походження.

Обладнання для фермерських господарств розраховане на одержання біогазу з гною та на забезпечення потреб господарств в опаленні й електроенергії. Перероблений гній використовується як органічне добриво. Надлишок електроенергії може реалізуватися енергетичним компаніям і в такий спосіб приносити фермі додатковий прибуток. Як правило, таке обладнання складається з резервуарів для попереднього зберігання гною, анаеробних реакторів з системами керування й обігрівання, помп для завантажування й розвантажування, резервуарів для зберігання відпрацьованого гною, системи для зберігання і транспортування газу, а також універсального модуля для опалення та вироблення електроенергії.

Спільні переробні підприємства створюються для переробки гною, що утворюється у кількох тваринницьких господарствах – здебільшого свинарських, молочних та птахівничих (від 5 до 100 ферм). Газ можна одержувати з гною у суміші з іншими органічними відходами. Підприємство має кілька блоків. Блок попереднього зберігання містить окремі резервуари для гною та органічних відходів, а також резервуари для гомогенізації й теплообмінники, в яких тепло вже перероблеої маси використовується для попереднього розігрівання сировини.

Анаеробні реактори, оснащені системами автоматичного керування, мають вигляд сталевих резервуарів з конічним дном. Температурний процес – мезофільний або термофільний. Підприємстсва, орієнтовані на термофільний процес, поширені більше через ліпшу відповідність такого зброджування санітарним вимогам, оскільки мезофільне зброджування потребує додаткового технологічного етапу пастеризації.

Отриманий біогаз перетворюється на теплову та електричну енергію за допомогою універсального переробного модуля. Теплова енергія використовується для технологічних потреб підприємства, а її надлишок постачається місцевим господарствам. Електрика реалізується енергетичним компаніям. Деякі господарства транспортують біогаз трубопроводом для використання в електро- та опалювальних станціях найближчих міст. У Швеції, Швейцарії та деяких інших країнах біогаз після додаткового очищення використовують як автомобільне пальне.

Підприємства, спеціалізовані на переробці органічних відходів різноманітного походження, оснащені найбільш технологічно досконалими виробничими лініями для одержання біогазу як з рідких, так і з твердих органічних відходів. Анаеробне зброджування не відрізняється від того, що практикується на спільних підприємствах, але в деяких випадках йому передує додатковий технологічний етап гідролізу.

Спільні переробні підприємства набули найбільшого поширення у таких північних країнах Європи, як Швеція та Данія, а також у деяких регіонах Німеччини.

Ефективність підприємств перебуває у прямій залежності від їхніх масштабів, тобто вартість переробки кожного кубометра біомаси є тим меншою, чим більшим є розміри підприємства. Додатковою перевагою спільних переробних підприємств порівняно з індивідуальними є висока кваліфікація та спеціалізація обслуговуючого персоналу.

У Німеччині нині понад 1300 ферм обладнано устаткуванням для одержання біогазу і в майбутньому їх кількість буде зростати. Остання генерація обладнання вирізняється конструктивною простотою та високим рівнем стандартизації. На думку німецьких фермерів, виробництво біогазу дає найбільш відчутний економічний ефект малим господарствам, у яких потужність генераторів не перевищує 500 кВт. Реалізаційна вартість виробленої фермерами енергії становить 0,2 DM за кіловат-годину.

В Австрії кількість ферм, обладнаних устаткуванням для одержання біогазу, перевищує сотню. Тут як сировину використовують гній та пасовищні культури або лише пасовищні культури. У великих свинарських господарствах, у яких поголів'я перевершує 500 свиноматок, виникає проблема утилізації надмірної кількості гною, якого утворюється набагато більше, ніж потрібно

для використання як органічного добрива, що негативно впливає на довкілля. Особливо гостро ця проблема постала у Греції, Іспанії, Португалії, Ірландії, Великій Британії, Франції, Голландії та Данії. Ці країни зацікавлені у застосуванні біотехнології одержання біогазу, що дасть їм змогу досягти енергетичної незалежності, а також вирішити екологічні проблеми, пов'язані зі смородом та порушенням санітарно-епідеміологічних вимог.

Передбачається, що у Європі до 2010 р. питома вага електроенергії, що вироблятиметься з відновлювальних джерел енергії, подвоїться. Слід очікувати на зростання закупівельних цін на «зелену електроенергію», які будуть підтримуватися на високому рівні з метою заохочення європейського фермерства до використання обладнання для переробки відходів у біогаз.

Технології переробки органічних відходів у біогаз, що активно розробляються протягом останнього десятиріччя, нині достатньо визріли для промислового впровадження. Наступним важливим кроком стане налагодження стандартизованого та масового виробництва обладнання, що дасть змогу істотно знизити його собівартість.

Що стосується складності обладнання, то, як свідчить аналіз доступних інформаційних джерел, розвиток біогазових установок у світі відбувається двома напрямами *(Ясенецький В., Клименко В., 2001)*. Перший – це раціональне спрощення, а відповідно, і здешевлення установок, призначених для невеликих фермерських господарств. Другий напрям – це створення сучасних високопродуктивних повнокомплектних біогазових установок на основі новітніх удосконалених конструкцій біореакторів, сучасних автоматизованих систем керування технологічним процесом, високоефективного теплотехнічного, електротехнічного і технологічного обладнання.

Характерними зразками БГУ першого напряму є установки, розроблені німецькими фірмами «ІТТ Флюгт Пумпен ГмбХ» і «У.Т.С. Умвелт-Технік-Сид ГмбХ». Така установка оснащена двома послідовно з'єднаними мікробіологічними реакторами, тобто закритими зверху стандартними ємностями для зберігання гною та обладнані пропелерними змішувачами-гомогенізаторами. Подання рідкого гною в реактори здійснюється за допомогою помпа-подрібнювача. Біогаз із реакторів надходить безпосередньо в модульну теплоелектроустановку, де перетворюється на теплову та електричну енергію.

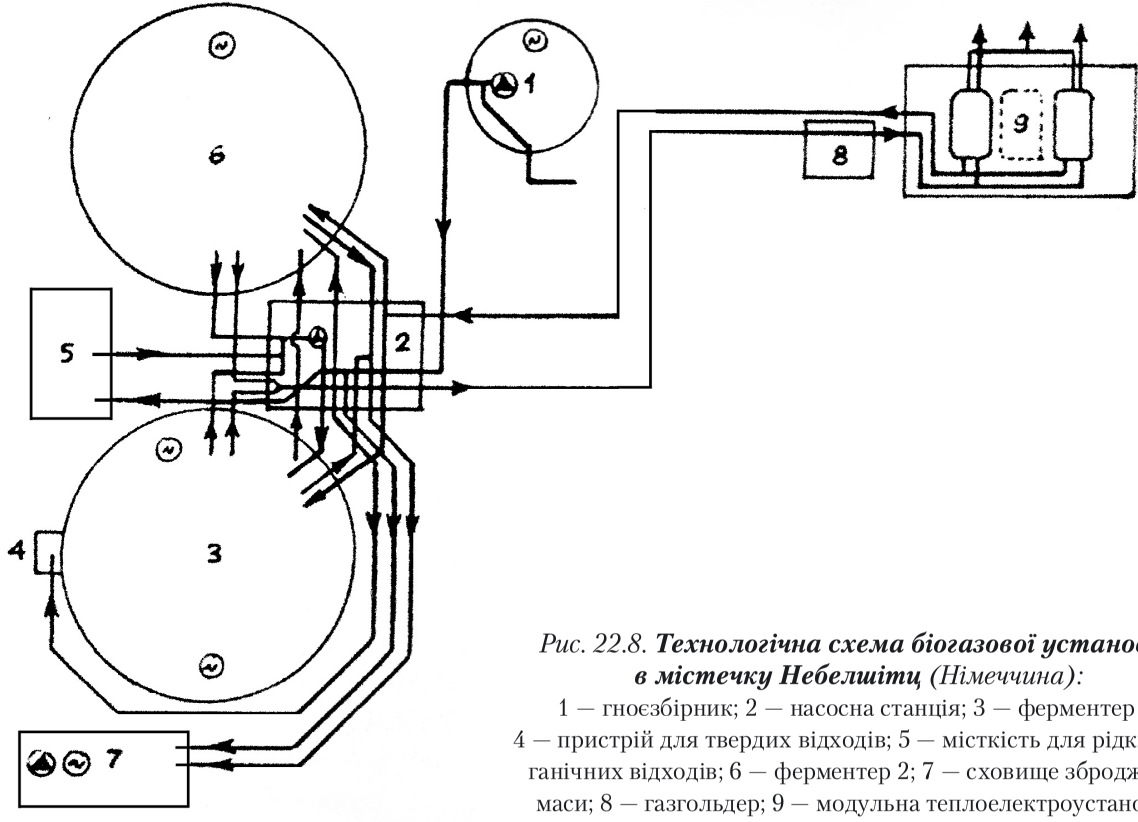


Рис. 22.8. ***Технологічна схема біогазової установки в містечку Небелшітц*** *(Німеччина):*
1 — гноєзбірник; 2 — насосна станція; 3 — ферментер 1; 4 — пристрій для твердих відходів; 5 — місткість для рідких органічних відходів; 6 — ферментер 2; 7 — сховище зброджeної маси; 8 — газгольдер; 9 — модульна теплоелектроустановка

Фірма «У.Т.С. Умвелт-Технік-Сид ГмбХ» розробила також біогазову установку більшої продуктивності, яка експлуатується у м. Небелшітц (Німеччина). До складу установки (рис. 22.8) входять гноєзбірник, два ферментери, ємність для інших органічних відходів, відстійник зброджeної біомаси, газгольдер і модульна теплоелектроустановка. Об'єм гноєзбірника – 115 м^3, ферментерів – по 883 м^3 кожний, які виготовлені з бетону і мають термоізоляцію. Біогаз акумулюється в газгольдері місткістю 300 м^3, а звідти надходить до модульних теплоелектроустановок потужністю по 75 кВт. Продуктивність установки: 1100–1400 м^3/добу біогазу, електроенергії – 2000–2500 кВт/год/добу, тепла – 3300–4200 кВт/год/добу. Вартість установки DM 625 на 1 м^3 об'єму реактора.

Німецька фірма «Фарматік Біотех Енергі АГ» розробила і збудувала понад 20 БГУ різної продуктивності для утилізації рідкого гною та інших органічних відходів, які тепер експлуатуються не тільки в Німеччині, а й в інших країнах Західної Європи та Азії. У 2000 році в містечку Нойбуков (Німеччина) введено в дію БГУ для двоступеневої мезофільної коферментації рідкого гною та органічних відходів. Річна продуктивність установки – 80000 т відходів, вартість – DM 9,8 млн. Установка

Рис. 22.9. ***Біогазова установка в містечку Нойбуков (Німеччина) розробки фірми «Фарматік Біотех Енергі АГ»***
(за Ясенецьким В., Клименко В., 2001)

складається з двох ферментерів об'ємом по 2300 м^3 кожний, двох гідролізерів по 550 м^3, змішувального резервуара місткістю 550 м^3, газгольдера об'ємом 1000 м^3, сховища на 5000 м^3 збродженої біомаси та модульної теплоелектроустановки. Санітарна обробка відходів здійснюється витримуванням їх за температури 70 °С упродовж години (за необхідності – 90 °С). БГУ обладнана системою автоматичного керування (рис. 22.9).

Оригінальну БГУ розробила данська фірма «Біоскан А/С». Технологія «Біорек» дає змогу переробляти рідкий гній тваринницьких ферм і рідкі органічні відходи (стічні води та осад стічних вод) на очищену воду, добриво і енергію. Зброджений стік з біореактора надходить на ультрафільтраційну установку, яка пропускає тільки воду з розчиненими в ній речовинами, а бактерії і нерозщеплені залишки органічних речовин повертає на повторну переробку до біореактора. Відфільтрований стік надходить на аміачну установку, де відбувається виділення наявного азоту у формі аміачного концентрату, а потім на установку зворотного осмосу, де стік розділяється на очищену воду і калійно-фосфорне добриво.

Для переробки твердих і пастоподібних органічних відходів розроблено технологію «Бабрек». У ній передбачено додатково технологічні операції гомогенізації, гідролізу і санітарної обробки вихідної біомаси.

Повністю автоматизовану БГУ розробила німецька фірма «ТЕВЕ-Електронік ГмбХ і КоКГ» спільно з фірмою «Ліпп ГмбХ» (рис. 22.10). Особливістю цієї технологічної схеми є попереднє підігрівання біомаси перед зброджуванням. Підігрівач субстрату – це ємність з високоякісної сталі габаритними розмірами 4,0 х 2,0 х 2,1 м і масою 1000 кг. Усередині ємності розміщено циліндричний резервуар-нагромаджувач біомаси місткістю 2000 л зі змішувачем і змійовик, по якому біомаса надходить до нагромаджувача. Субстрат підігрівається гарячою водою (90–95 °С), яка подається в ємність. Конструкція підігрівача дає змогу регулювати температуру вихідного субстрату.

До складу цієї установки входить метантенк із вбудованим газгольдером «КомБіо-Реактор» (рис. 22.11). Об'єм реактора може становити від 100 до 800 м^3 залежно від кількості біомаси, що підлягає переробці. Система перемішування з використанням запатентованого механічного змішувача «Ліпп» дає змогу водночас горизонтально і вертикально перемішувати біомасу і

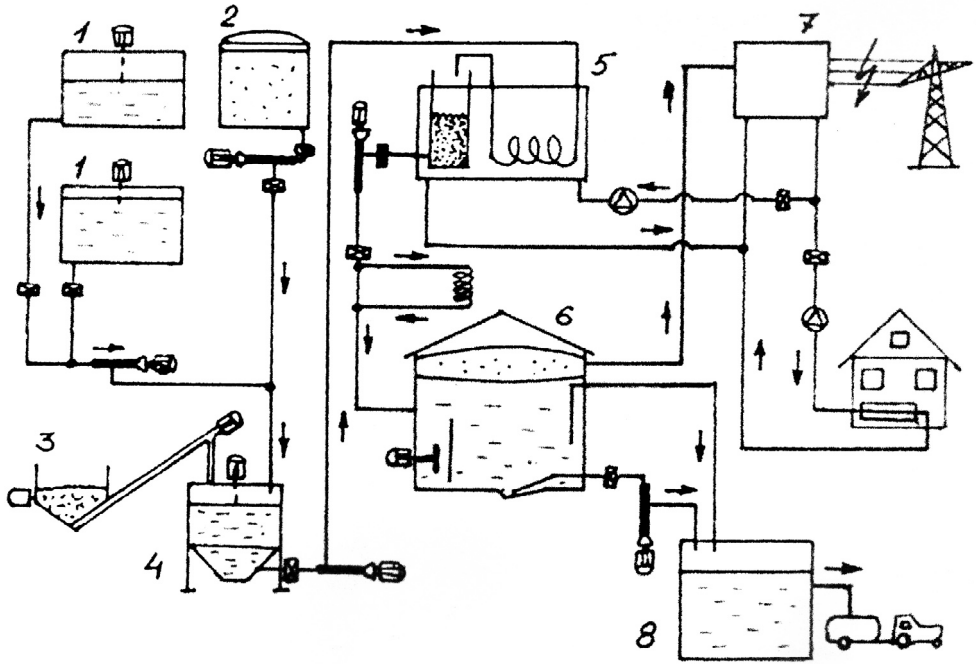


Рис. 22.10. ***Технологічна схема повністю автоматизованої біогазової установки модульного збирання розробки фірм «ТЕВЕ-Електронік ГмбХ» і «Ліпп ГмбХ»:***

1 — гноєзбірник із мішалкою; 2 — ємкість для рідкої консервованої біомаси кормових культур; 3 — пристрій для подрібнення інших видів біомаси; 4 — вагодозувальний пристрій із мішалкою; 5 — підігрівач субстрату; 6 — біореактор із мішалкою «Ліпп» і вбудованим газгольдером; 7 — модульна теплоелектроустановка; 8 — сховище збродженої маси

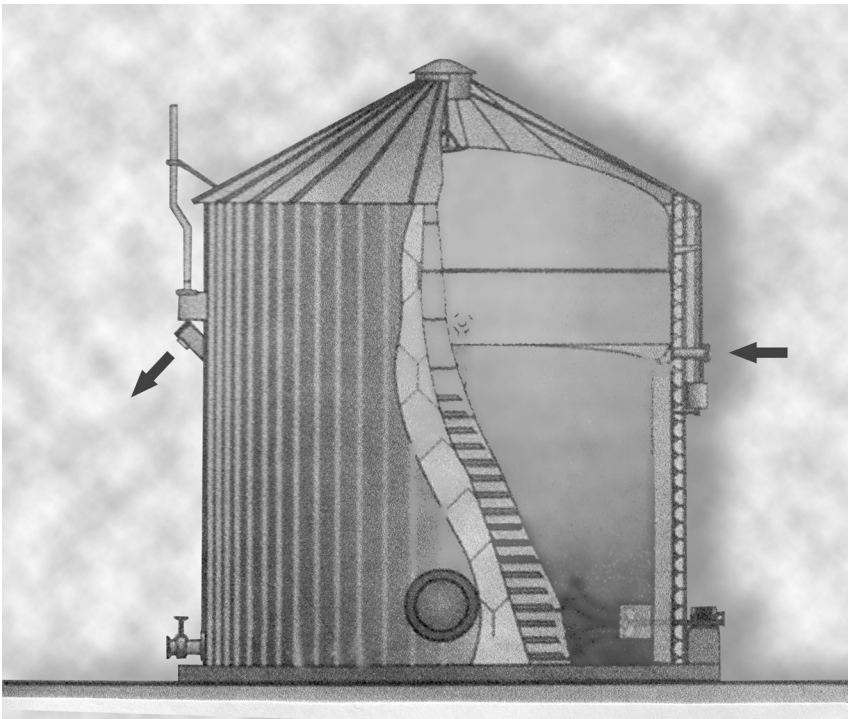


Рис. 22.11. ***Схема метантенка з вбудованим газгольдером «Ком-Біо-Реактор» розробки фірми «Ліпп ГмбХ»***
(за Ясенецьким В., Клименко В., 2001)

запобігає утворенню кірки та осаду. Використання такого біореактора сприяє зменшенню кількості технологічних трубопроводів і виробничої площі для розташування установки, а також знижує капіталовкладення в будівництво. Метантенки з убудованим газгольдером використовують також і в біогазових установках німецьких фірм «ЕнвіТекМалл ГмбХ», «БІОГАЗ вересмс ГмбХ і КоКГ», «Хенце Харвесторе ГмбХ».

Оригінальну конструкцію біореактора вертикального типу розробила австрійська фірма «Ентек ГмбХ». Біореактор «БІМА-ферментер» (рис. 22.12) має дві камери – головну бродильну і камеру дозброджування, які розділені проміжною перегородкою. Між собою камери з'єднуються за допомогою вертикальної центральної труби із змішуючими лопастями знизу і змішуючої шахти, розташованої біля бічної стінки біореактора, а також газового ковпака з автоматичним клапаном. Реактор

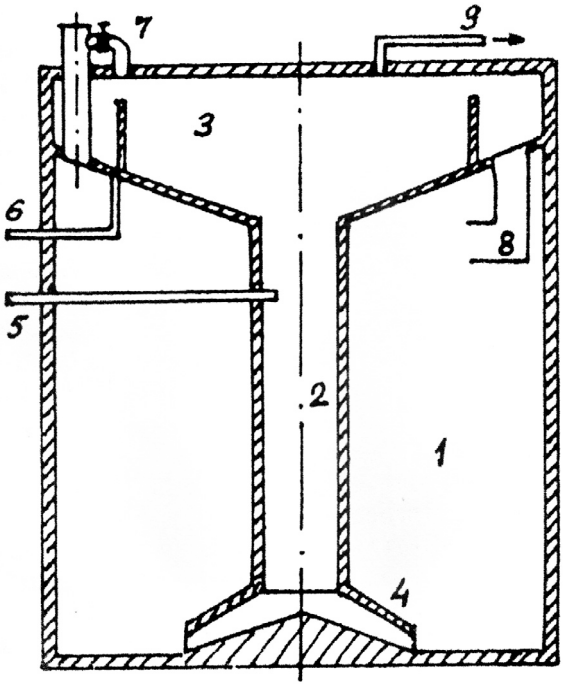


Рис. 22.12. ***Схема біореактора «БІМА-Ферментер»***
(за Ясенецьким В., Клименко В., 2001):
1 — головна бродильна камера; 2 — центральна труба; 3 — камера дозброджування; 4 — лопатевий змішувач; 5 — завантажувальний трубопровід; 6 — зливний трубопровід; 7 — газовий ковпак з автоматичним клапаном; 8 — змішувальна шахта; 9 — газовідвід

має також завантажувальний трубопровід, з'єднаний з центральною трубою, а також зливний і газовивідний трубопроводи, з'єднані з камерою дозброджування. Процес змішування біомаси в такому реакторі відбувається завдяки перетіканню рідини при відборі біогазу.

Біореактори такої конструкції об'ємом від 750 до 1700 м^3 успішно експлуатуються в складі біогазових установок у Нідерландах та Австрії. Залежно від виду відходів (комунальні стоки, суміш відходів тваринницьких ферм з органічними промисловими відходами, рідкі відходи переробної галузі) навантаження цих біореакторів становить від 2,0 до 6,5 кг сухої органічної речовини на 1 м^3 об'єму реактора за добу при експозиції зброджування від 6,5 до 30 діб.

Деякі фірми («Новатех ГмбХ», «Шмак Біогаз ГмбХ», «Борсіг Енергі») застосовують у біогазових установках реактори горизонтального типу (як металеві, так і бетонні) з механічним перемішуванням біомаси. Деякі з них обладнані також похилими шнековими транспортерами для вилучення шламу.

В описаних конструкціях біогазових установок переважно використовуються стандартні ємності для приймання, нагромадження та витримування відходів і зберігання продуктів переробки або ці ємності певного об'єму збираються з відповідних елементів конструкцій. Нерідко це стосується і конструкцій біореакторів.

Аналіз технологічних і технічних рішень сучасних біогазових установок у світі показав наступні основні тенденції їх розвитку:

- спрощення конструкцій прифермерських біогазових установок завдяки переведенню їх на психрофільний режим і компонування серійним обладнанням (стандартні суцільні або збірні металеві ємності, помпи-подрібнювачі, пропелерні змішувачі);
- розробка високопродуктивних промислових повнокомплектних повністю автоматизованих БГУ для переробки різних видів органічних відходів;
- подальше вдосконалення конструкцій біореакторів, спрямоване на зниження енергоємності процесу перемішування субстрату і створення оптимальних умов для нагромадження активної біомаси;
- широке застосування біореакторів із вбудованим газгольдером, що знижує потреби в технологічних трубопроводах і виробничій площі;
- виготовлення ємностей різного призначення, що входять до складу БГУ, у тому числі й біореакторів зі збірних елементів, виготовлених з листового або гофрованого металу з високоякісним антикорозійним покриттям;
- зменшення частки біореакторів горизонтального типу у БГУ;
- розробка і широке впровадження при створенні БГУ нових технологічних рішень, спрямованих на підвищення їх ефективності: післяферментаційне витримування біомаси в додаткових ємностях, коферментація (ферментація сумішей різних видів органічних відходів), попереднє перегрівання

вихідної біомаси (до 79 °С) з подальшим термостатуванням у біореакторі тощо.

За умов достатніх інвестицій у науково-дослідні розробки та програми, спрямовані на подальший розвиток технологій виробництва та утилізації біогазу, уже протягом кількох наступних років (починаючи з 2002 р.) очікується підвищення загальних європейських біоенергетичних потужностей до 1000 МВт.

22.3.7. Стан виробництва біогазу в Україні

У державній програмі виробництва машин і технологічного обладнання для сільського господарства України на 1996–2005 рр. передбачено виготовлення комплектів обладнання для анаеробної переробки гною з реакторами від 3 до 3000 м^3. У сільській місцевості України експлуатуються та на стадії будівництва знаходяться близько 20 біогазових установок різної продуктивності з реакторами місткістю від 1 до 500 м^3. Цього вкрай недостатньо за сучасних потреб країни щодо використання нетрадиційних джерел енергії.

Певний досвід розробки БГУ в Україні мають підприємства УкрНДІагропроект, «Стелком», «Альтек» та інші, в яких є відповідна проектно-технічна документація. Проте, на жаль, з різних причин (переважно фінансових) великих БГУ, що їх використовували б комерційно, наразі в Україні немає.

На великих біогазових установках можна отримати достатню рентабельність, організувати механізацію та автоматизацію процесу анаеробного зброджування, досягти цілорічного споживання біогазу.

Нині запропонована концепція, яка передбачає спорудження в Україні насамперед великих біогазових установок (з об'ємом метантенка від 800 м^3). Такі установки можуть бути побудовані на фермах ВРХ з поголів'ям від 600 голів, на свинофермах з поголів'ям від 6000 голів, на птахофабриках з поголів'ям від 200 тис. голів. Для забезпечення рентабельності вміст сухої речовини у гнойових стоках має становити 8–10 % (8–12 %), а органічної речовини – 85 %. Це, як правило, забезпечують скребкові (транспортерні) системи прибирання гною, і, навпаки, – не забезпечують системи гідрозмивання та гідросплавлення.

Г. Гелетуха, С. Кобзарь (2001) визначили потенціал гною (ВРХ, свиней, птиці), придатного для анаеробного зброджування в Україні (табл. 22.7).

Таблиця 22.7.

Потенціал гною в Україні *(за даними 1999 р.*)*

Вид гною	*Загальна кількість гною, млн т/рік*	*Коефіцієнт доступності ***	*Кількість гною, придатного для зброджування, млн т/рік*	*Виробіток біогазу, $10^9 м^3$/рік*	*Енергетичний потенціал гною, млн т у.п/рік*
ВРХ (W*** = 88–89%)	94,2	0,62	58,4	1,46	1,144
Свині (W=90%)	7,7	0,62	4,79	0,124	0,088
Птиця (W=70%)	2,8	1	2,8	0,11	0,079
Разом	104,7	–	65,99	1,694	1,311

* У розрахунках брали до уваги лише тварин, що утримувалися на підприємствах; поголів'я приватних підсобних господарств не враховувалося.

** За коефіцієнтом доступності 0,62 враховується зменшення кількості гною ВРХ, який втрачається під час літнього утримання на пасовищах; для свиного гною за цим коефіцієнтом враховується зменшення кількості придатного для зброджування гною на фермах з гідрозмиванням та гідросплавленням.

W*** – вологість.

Зважаючи на потенціал гною, придатного для анаеробного зброджування, та світовий досвід, було здійснено оцінку кількості біогазових установок, що їх можна спорудити в Україні (табл. 22.8).

Спорудження 2865 установок із середнім об'ємом метантенка 1000 $м^3$ дасть можливість замінити у сільських районах близько 1 млн т умовного палива та створити незалежні джерела електро- і теплопостачання, джерела високоякісних органічних добрив, а також внести значний вклад у поліпшення екологічного стану в Україні.

Об'єднання УкрНДІагропроект *(Смірнов О., 2000)* займається розробкою установок для анаеробного зброджування

Таблиця 22.8.

Кількість біогазових установок, які можна спорудити в аграрному секторі України

(Гелетуха Г., Кобзарь С., 2001)

Галузь тваринництва	*Приблизна місткість ринку, установки (з метантенком 1000 м³)*	*Заміна викопного палива, млн т у.п/рік*	*Капітальні затрати, $ млн**
ВРХ	2400	0,80	480
Свині	315	0,062	63
Птиця	150	0,055	30
Разом	2865	0,917	573

* Дані ґрунтуються виходячи з питомої вартості $ 200 за 1 м³ метантенка.

гною в господарствах різної потужності: великих, фермерських та індивідуальних. Створено різноманітні модифікації установок для фермерських господарств у вертикальному і горизонтальному виконанні. Вертикальний реактор, заглиблений в грунт, дає змогу скоротити витрати на ізоляцію корпуса і нагрівання біомаси в реакторі, але має труднощі з вивантаженням збродженої біомаси. Горизонтально розташований реактор над поверхнею землі не має цього недоліку, але потребує механізації завантаження вихідною сировиною у високо розташовану завантажувальну вирву. Реактор – це труба діаметром 1–1,2 м завдовжки 2,5–3 м, яка з торців закрита фланцями. Робоча порожнина реактора (труби) опущена до половини діаметра в місткість, заповнену водою, з системою труб для підтримання потрібної температури завдяки циркуляції у них гарячої води. У реакторі встановлено рамний змішувач, що здійснює 2–3 об./хв., упродовж 15 хвилин кожні 2–3 год. Реактор має завантажувальну вирву, зливну трубу для вивантаження шламу та газовивідну трубу, обладнану грязеводовіддільником. Установка має газгольдер із плаваючою кришкою і котел для підтримання тепла в реакторі. Продуктивність установки – до 4 м³ біогазу на добу. Ця установка була змонтована в Обухові Київської обл. Її вартість складає $ 500–600 *(Смірнов О., 2000)*.

В Кам'янець-Подільському районі Хмельницької області *(Крушневич Т. та ін., 2000)* розпочато будівництво біоенергетичного комплексу, що має принципово нову технологію метанового зброджування посліду птахофабрик і гною великої рогатої худоби та свиней, яка поляга в додатковій обробці продуктів зброджування для збагачення і зв'язування азоту (Інститут газу НАН України, ТОВ «Альтек»). Технологією передбачено компримірування, охолодження та очищення біогазу.

Товарний біогаз використовуватиметься як паливо в газодизельних електроагрегатах з виробленням електроенергії, а надлишок біогазу постачатиметься іншим споживачам чи використовуватиметься для підігрівання води. Для технологічних потреб енергокомплексу використовуватиметься тепло відпрацьованих газів двигунів і тепло системи їх охолодження.

Проведені розрахунки свідчать, що на базі тваринницького комплексу на 1200 голів великої рогатої худоби можна одержати 65 м^3 біогазу/год, за добу – 1560 м^3, а за рік – 569400 м^3. За теплотворною здатністю ця кількість біогазу еквівалентна відповідно 42,10 та 367920 м^3 природного газу і 315,4 т дизельного пального (за рік). З виробленого біогазу можна одержати за рік 1314000 кВт/год електроенергії.

Орієнтовні витрати на створення біоенергетичної установки – $ 246000. Будівництво установки виконано майже на 50 %, але роботи припинені через відсутність фінансування (рис. 22.13).

Запропонований біоенергетичний комплекс дає змогу розв'язати такі завдання: забезпечення електроенергією власного господарства; підвищення родючості ґрунтів (на 15–25 %); експорт високоякісного екологічно чистого органічного добрива; забезпечення охорони навколишнього середовища; забезпечення належного санітарно-гігієнічного стану ферм.

Велика БГУ побудована на свинофермі компанії «Агро-Овен» у селі Оленівка Магдалинівського району Дніпропетровської області (рис. 22.14) в рамках проекту технічної допомоги уряду Королівства Нідерландів. Обладнання компанії BTG (Нідерланди), а проектні роботи, шефмонтаж, налаголження і навчання виконували УкрНДІагропроект, НТЦ «Біомаса». Установка призначена для переробки 80 т/добу гнойових стоків зі свиноферми з 15-тисячним поголів'ям.

Рис. 22.13. ***Біоенергетичний комплекс в Кам'янець-Подільському районі Хмельницької області***
(за Крушневич Т., Писарєвим С, Кацинським Б., 2000)

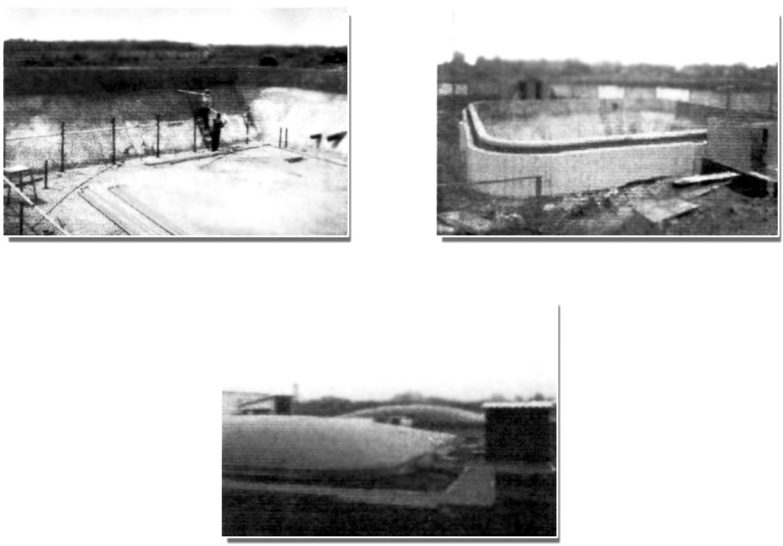


Рис. 22.14. ***Біогазова установка у селі Оленівка Магдалинівського району Дніпропетровської області, Україна***
(за Гелетухою Г, Кобзарь С., 2001)

БГУ складається з двох метантенків, двох когенераційних установок (по 80 кВт/год електричних та 160 кВт теплових кожна) та системи зневоднення зброджeного гною. Об'єм реактора становить 1200 м^3. Установка працюватиме на мезофільному режимі. У БГУ передбачено підігрівання і перемішування біомаси.

Гній надходить у метантенки зі свиноферми крізь змішувальну ємність. Зброджений гній після реактора виходитиме до сепаратора для розділення на тверду і рідку фракції.

Газгольдер із гнучкої пластикової плівки у вигляді «намета» над поверхнею метантенка складає з ними одне ціле. «Намет»-газгольдер має два шари плівки: зовнішній, здатний витримувати механічні навантаження, і внутрішній, стійкий до дії біогазу. У простір між шарами наповнюється повітря, що додатково буде запобігати деформації купола метантенка від снігу, вітру тощо.

Біогаз від реактора надходить трубопроводом до газового двигуна з електрогенератором, де біогаз перетворюється на електроенергію, а вихлопні гази проходять через теплообмінник і нагрівають воду циркуляційного контуру. Вироблене двигуном тепло використовується для нагрівання метантенка, а надлишок — для обігрівання ферми, теплиці, для гарячого водопостачання тощо.

Економічна ефективність експлуатації установки наведена у табл. 22.9

Таблиця 22.9.

Розрахункові фінансові показники БГУ в Оленівці

Параметр	*Показник*
Капітальні затрати, тис. $	413,3
Експлуатаційні затрати, тис. $	21,22
Прибуток, тис. $/рік, за рахунок:	
електроенергії	41,38
тепла	5,6
добрив	25,0
Разом	71,97
Термін окупності, років	8,14

Розрахунки дійсні за комплектації БГУ нідерландським обладнанням. За часткової комплектації установки українським обладнанням термін її окупності можна знизити принаймні вдвічі.

Крім сільськогосподарських підприємств, значний потенціал впровадження БГУ мають підприємства харчової (цукрові, спиртові, молочні заводи, пивоварні тощо), фармацевтичної та ферментної промисловості, станції обробки каналізаційних стічних вод, підприємства громадського харчування, ринки, а також побутові відходи.

Спиртова промисловість України – одна з провідних галузей щодо утворення відходів і стічних вод. За даними М. Кошель та ін. (2002, УкрНДІспиртбіопрод), в Україні нараховується понад 80 спиртзаводів, на яких протягом року утворюються близько 4 млн $м^3$ мелясної та 3,6–3,8 млн $м^3$ зернової барди, а також близько 8 млн $м^3$ малозабруднених стічних вод. Мелясна барда на більшості заводів не утилізується і без очищення разом зі стічними водами скидається у відстійники, де загниває, забруднюючи ґрунтові води і повітря. В той же час на спиртових заводах найбільш сприятливі умови для організації виробництва біогазу: наявні відходи з температурою 40–50 °С, а також вторинні джерела тепла (конденсати, лютерна вода тощо). Усе це дає змогу організувати виробництво біогазу без витрат одержуваного біоенергетичного палива на підігрів середовища у метантенках.

УкрНДІспиртбіопрод має досвід проведення метанового зброджування відходів спиртових заводів, оскільки ще у 1970 р. на Андрушівському спиртзаводі за їх участю було введено в експлуатацію цех з виробництва кормового вітаміну B_{12}, продуцентами якого є метаноутворюючі мікроорганізми. Цех працював понад 20 років (до 1991 р.), виробляючи протягом року 250–300 кг вітаміну B_{12} (у перерахунку на хімічно чисту речовину) і біогаз, спалювання якого в котлах заощаджувало близько 13–15 % палива, що його споживав комбінат у цілому.

Відходи спиртових заводів є добрим живильним середовищем для метаноутворюючих бактерій. Вихід біогазу при зброджуванні 1 $м^3$ цих відходів становить 28–30 $м^3$. На одному спиртзаводі середньої потужності можна одержати за добу 24 тис. $м^3$ газу, а за рік – близько 6 млн $м^3$. Спалювання біогазу дасть змогу заощаджувати близько 4800 т умовного палива на

рік. Тобто економія теплової енергії при виробництві етанолу може сягати 40 %.

Особливістю метанового бродіння відходів спиртової промисловості є те, що приблизно 95 % органічних речовин, що розкладаються, трансформуються у біогаз і лише 4–5 % витрачаються на енергетичні та синтетичні потреби бактерій. Тому приріст біомаси бактерій порівняно невеликий, що спричинює велику тривалість метанового зброджування відходів. Скорочення терміну зброджування досягається за рахунок: підвищення концентрації біомаси бактерій шляхом її виділення і повернення в метантенк або іммобілізації бактерій на спеціальних нерухомих носіях, або використання біореакторів з гранульованою біомасою.

Для утилізації відходів спиртових заводів УкрНДІспиртбіопрод *(Кошель М. та ін., 2002)* був запропонований біореактор (рис. 22.15), у верхній частині якого є пристрій (сепаратор біомаси і біогазу), який запобігає винесенню біомаси з реактора і сприяє її грануляції. Завдяки йому в біореакторі досягається велика концентрація біомаси (до 60 г/дм^3), що дає змогу скоротити тривалість метанового бродіння з 10–17 до 2 діб. На спиртовому заводі середньої потужності найбільш доцільно установити чотири біореактори по 600 м^3. Затрати на їх установку окупляться протягом року за рахунок економії палива.

Розроблена також технологія утилізації відходів спиртзаводів, що переробляють зерно, отримуючи, крім біогазу і вітаміну B_{12}, сухий білковий корм *(Кошель М. та ін., 2002)*. Згідно з цією технологією за допомогою центрифуги виділяється дробина, яку потім висушують на паровій сушарці. Фугат зброджується метаноутворюючими бактеріями в анаеробному біореакторі з одержанням біогазу. Вихід біогазу – 15 м^3/ м^3 фугату.

Аеробне доочищення фугату, що пройшов анаеробне зброджування, проводиться в біотенках (аеротенках) іммобілізованими на нерухомому носії мікроорганізмами. Волокнистий носій має велику питому поверхню (1 кг носія – 8–10 тис. м^2 площі), високу адгезійну здатність, завдяки чому на ньому закріплюється значна кількість мікроорганізмів, що сприяє інтенсифікації очищення. Крім того, носій є біологічно інертним і може працювати без заміни багато років.

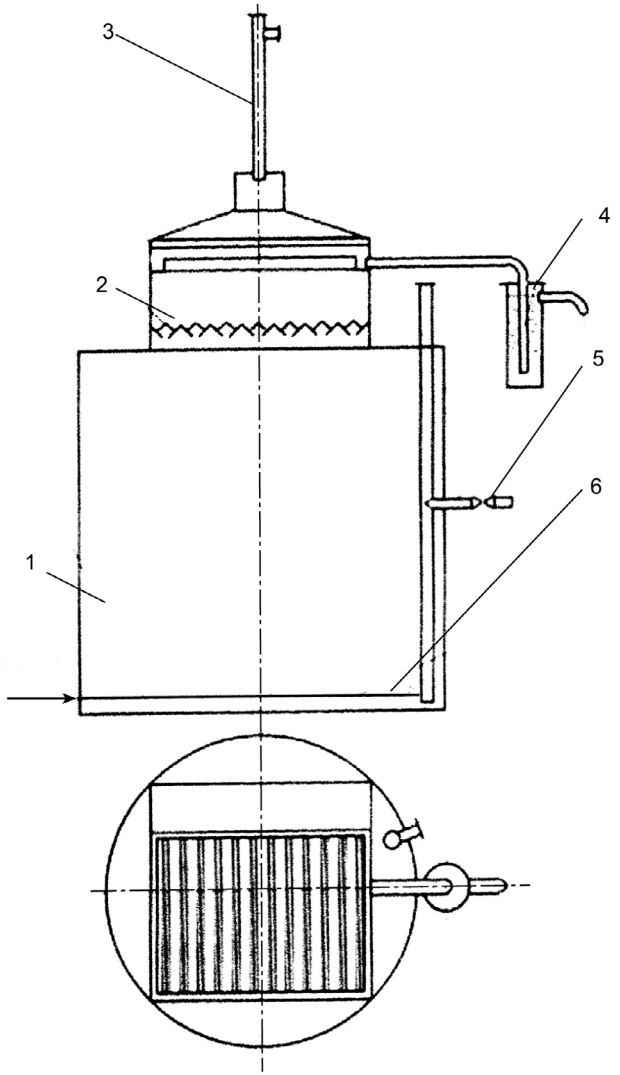


Рис. 22.15. ***Біореактор для зброджування відходів спиртових заводів***
(за Кошель М. та ін., 2002):
1 — корпус; 2 — сепаратор біомаси; 3 — трубопровід для біогазу; 4 — гідрозатвор; 5 — трубопровід для видалення надлишкового активного мулу; 6 — колектор для подавання стічних вод

Контрольні питання

1. Який зміст термінів утилізація і біоконверсія?
2. Як впливають відходи тваринництва на навколишнє середовище?
3. Які методи утилізації гнойової біомаси?
4. Які методи утилізації гною належать до традиційних і які біологічні системи та об'єкти використовуються при цьому?
5. Використання гною як органічного добрива. Що є критерієм при визначенні дози внесення гною у ґрунт?
6. Включення гною до раціонів сільськогосподарських тварин. Проблеми цього методу?
7. Утилізація гною шляхом мінералізації органічних речовин у ґрунті і водоймищах. Які біологічні системи і об'єкти при цьому використовуються?
8. Особливості мінералізації органічних речовин гною в аеротенках і біологічних фільтрах.
9. Використання біологічних ставків і полів зрошення та фільтрації для очищення стічних вод.
10. Недоліки традиційних методів утилізації. Яким вимогам не задовольняють ці методи?
11. Біотехнологія одержання біогазу шляхом метанового анаеробного зброджування. Які проблеми при цьому вирішуються?
12. Які переваги має нетрадиційний метод утилізації гною (метанове анаеробне зброджування) над традиційними методами?
13. Що таке енергетичний потенціал гною і чим він обумовлений?
14. Що таке процес біометаногенезу і його етапи? Які продукти утворюються на кожному етапі?
15. За участю яких біологічних об'єктів відбувається процес біометаногенезу і в зв'язку з чим органічна речовина різно-

го походження може бути вихідною сировиною для одержання біогазу?
16. Які фактори впливають на біометаногенез?
17. Яка оптимальна кількість сухої речовини має міститись у субстраті і назвіть шляхи її оптимізації?
18. При яких температурних режимах можна отримувати біогаз, їх переваги і недоліки?
19. Як впливає на вихід біогазу і його якість хімічний склад субстрату, вид та вік тварин?
20. Які поживні елементи повинні обов'язково бути присутніми у субстраті і назвіть їх співвідношення? Чим можна оптимізувати співвідношення елементів у виробничих умовах?
21. Яким оптимальним є pH середовища для проходження процесу біометаногенезу та для метанутворюючих організмів кожного етапу? Які фази можна виділити в процесі метанового бродіння?
22. Які речовини можуть бути токсичними для метанутворюючих мікроорганізмів і назвіть шляхи усунення їх токсичності?
23. Що таке біогазові установки (БГУ), їх склад і розповсюдження у світі?
24. Які конструкційні особливості реакторів БГУ і які з них мають найбільші переваги?
25. Які вимоги висуваються до реакторів БГУ?
26. Як класифікуються БГУ за принципом дії?
27. Які техніко-технологічні рівні БГУ можна виділити і що покладено в основу цього розподілу?
28. Чим характеризуються БГУ першого рівня і як їх можна вдосконалити?
29. Чим забезпечується більш високий техніко-технологічний рівень БГУ (другий, третій, четвертий)? Які БГУ належать до цих рівнів?
30. Охарактеризуйте вітчизняну БГУ «Кобос-1». Які її переваги над зарубіжними аналогами?
31. Які фракції одержують у процесі біометаногенезу та їх співвідношення?

32. З чого складається біогаз, чим визначається його кількість і якість?
33. Аспекти використання біогазу. Скільки можна одержати з 1м^3 біогазу теплової та електричної енергії і замінити нею енергію природних носіїв?
34. За якими параметрами визначається рентабельність біогазового виробництва?
35. Що таке товарний біогаз і які фактори впливають на нього?
36. Яка залишкова продукція отримується після метанового бродіння гнойової біомаси? Як відбувається її розділення?
37. Шлам, його склад та використання. Від чого залежить склад шламу?
38. Рідка фракція гною, її склад та використання.
39. Які існують шляхи вдосконалення біогазового виробництва?
40. Які відходи, крім тваринних і рослинних, є перспективними для отримання біогазу, вітамінної і білкової кормових добавок?
41. Стан біогазового виробництва в Україні.
42. Тенденції розвитку біогазового виробництва в Європі і світі.

Розділ 23.

БІОТЕХНОЛОГІЯ УТИЛІЗАЦІЇ ОРГАНІЧНИХ ВІДХОДІВ МЕТОДОМ ВЕРМІКУЛЬТИВУВАННЯ

Ефективним і екологічно безпечним методом утилізації різних відходів (тваринництва, рослинництва, побутових і промислових) є метод вермікультивування, тобто використання дощових черв'яків.

Метод вермікультивування дає можливість трансформувати різні відходи, які до цього були основними забруднювачами навколишнього середовища, з одного боку, в повноцінний білок тваринного походження, придатний для використання у годівлі тварин та харчуванні людей (черв'ячна біомаса), а з іншого боку — у зернисте гумусне добриво (біогумус). На компост за допомогою дощових черв'яків переробляють навіть відходи, які важко піддаються утилізації — відходи целюлозо-паперової промисловості.

Ідея використання дощових черв'яків для переробки гною й інших органічних відходів з метою одержання цінного органічного добрива і білкового корму не була новою. Ще в 1798 р. Готхард опублікував книгу «О разведении червей». Він рекомендував згодовувати дощових черв'яків курам, від чого «...вони ставали плідними і міцними».

Першими повідомленнями про корисність дощових черв'яків слід вважати вислови Арістотеля, що черв'як є «світовим шлунком», а великий натураліст Ч. Дарвін, виступаючи понад 150 років тому в Лондонському геологічному товаристві з доповіддю, стверджував, що дощові черв'яки — це умілі хлібороби і в природних умовах відіграють роль «архітектора» родючого шару ґрунту. Однак перші спроби використання дощових черв'яків відносяться до часів Стародавнього Єгипту. Перероблений дощовими черв'яками намул річки Ніл використовувався для вирощування сільськогосподарських культур. Єгиптяни обожнювали дощового черв'яка, вважали його священною твариною і забороняли вивозити із країни.

У 30-ті роки XX століття американським фермером і ветеринарним лікарем Барретом в Каліфорнії були розпочаті спроби вирощування черв'яків промисловим способом у дерев'яних ящиках та траншеях, а наприкінці 1940 р. були створені перші господарства зі штучного розведення черв'яків, які використовувались як наживка для лову риби. А в 1959 р. був виведений за допомогою методів селекції на основі гнойового і дощового черв'яка культурний гібрид дощового черв'яка, який відрізнявся від природних форм у 10 разів більшою плодючістю і вчетверо більшою тривалістю життя. Гібрид більш технологічний, його можна вирощувати у відкритих культиваторах типу городніх грядок. Він має комерційну назву червоний каліфорнійський гібрид.

У 1980 р. у США уже діяло понад 1500 великих спеціалізованих господарств з переробки різних відходів методом вермікультивування і на їх базі було організовано фірми, які продають біогумус, черв'яків, консультують фермерів з питань організації вермікомпостування відходів. Нині метод вермікультивування набув широкого розповсюдження у багатьох країнах світу — Китаї, Японії, Філіпінах, Австралії, на Кубі, у Франції, Італії, Німеччині, Швейцарії та ін. Вермікомпостуванню піддаються різні відходи — рослинництва, тваринництва, побутові та промислові, осади стічних вод; продукція життєдіяльності дощових черв'яків (черв'ячна біомаса і біогумус) для окремих країн стала предметом комерції не тільки на внутрішньому ринку, але й для експорту.

Із країн Східної Європи першою почала займатись вермікультивуванням у 1985 р. Угорщина, а в Україні — Івано-Франківська область, у якій при облсільгоспхімії був організований кооператив «Плодородие», який займався вдосконаленням та розповсюдженням біотехнології. Кооператив мав 8 філій у різних областях України.

У 1989 р. на базі кооперативу створено асоціацію «Біоконверсія», до якої зараз входять більше 250 різних організацій — навчальні та науково-дослідні заклади, сільськогосподарські організації, фермерські та індивідуальні господарства, зарубіжні фірми.

У Німеччині створено Об'єднання сприяння розвитку вермікультури, яке працює в тісному контакті з Міністерством охорони навколишнього середовища. Воно надає допомогу в прове-

денні наукових досліджень з вермікультури, у вивченні придатності різних відходів для розведення черв'яків, сприяє розширенню сфери використання вермікомпосту. Вермікультивуванням у Німеччині займаються близько 70 господарств.

23.1. ЗАГАЛЬНІ ВІДОМОСТІ Й БІОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ДОЩОВИХ ЧЕРВ'ЯКІВ

Дощові черв'яки належать до класу малощетинкових Oligocheta (Олігохета) типу кільчастих (Аннеліда) черв'яків. Більшість видів, розповсюджених на території колишнього Радянського Союзу, є представниками родини Люмбрицид (Lumbricidae), яка включає близько 180 видів черв'яків, але найбільш розповсюджені 15–16 видів.

Серед усіх видів дощових черв'яків лише деякі можна розводити в штучних умовах. До них належать червоні черв'яки, зокрема червоний каліфорнійський гібрид, який у процесі селекції набув унікальну властивість — він не залишає своє місце перебування навіть за несприятливих умов. Це дає можливість розводити його в грядах просто неба, не побоюючись втрати популяції.

Червоний черв'як темно-червоного кольору живе на територіях з помірним кліматом. Доросла особина досягає у довжину 8–10 см, у діаметрі 3–5 мм, масою 0,8 – 1 г (рис. 23.1). Температура тіла – 19–20 °С. За день споживає кількість корму, що приблизно дорівнює його масі (близько 1 г), після перетравлення якого виділяється 0,8–0,9 г копролітів. Найкрупніші частинки, які може проковтнути черв'як, мають розміри до 1 мм.

Тривалість життя – майже 16 років (дикі форми — 4 роки). Дуже плодючий. Статева зрілість настає у тримісячному віці і за оптимальних умов одна особина може принести приплід в середньому 1500 особин за рік.

Цей черв'як гермафродит. Кожна особина має чоловічі й жіночі статеві органи, але не може самозапліднюватись. Статевозрілі особини обопільно запліднюють одне одного (рис. 23.2, а). Запліднені яйцеклітини відділяються від тіла черв'яків і вкладаються у білкове кільце, або капсулу (кокон), який має спочатку жовтий, а потім коричневий колір (рис. 23.2, б, в).

Рис. 23.1. ***Загальний вигляд червоного каліфорнійського гібрида*** *(за Sulzberger R., 1998)*

Починаючи з 90-го дня він регулярно спарюється через кожні 7 днів. У результаті спарювання двох особин утворюються 2 яйця або капсули по 1 на кожну особин у, які дозрівають і розкриваються через 14–21 день залежно від умов утримання. У кожній капсулі міститься від 2 до 20 черв'яків. Кокони містять рідину, якою живиться молодняк до моменту прокльовування. Молодняк має білий колір (рис. 23.2, в).

Оптимальною є температура 20–22 °С, а критичною — нижче 0 °С та вище 42 °С. При температурі +7 °С впадає у стан анабіозу, тобто черв'як живий, але нерухливий і не харчується. Оптимальна вологість – 75–88 %, а критична — нижче 60 % і вище 90 %.

Практика показала, що культивовані черв'яки не хворіють і не піддаються жодним епізоотіям. Вони можуть гинути тільки при порушенні технології їх розведення. Найчастіше загибель черв'яків викликає отруєння протеїном при незакінченій ферментації субстрату. В результаті черв'як стає «кислотним» і виділяє шкідливі гази, які є смертельними для інших черв'яків.

Ворогами дощових черв'яків є кроти, їжаки, жаби, змії, птиця, які їх поїдають.

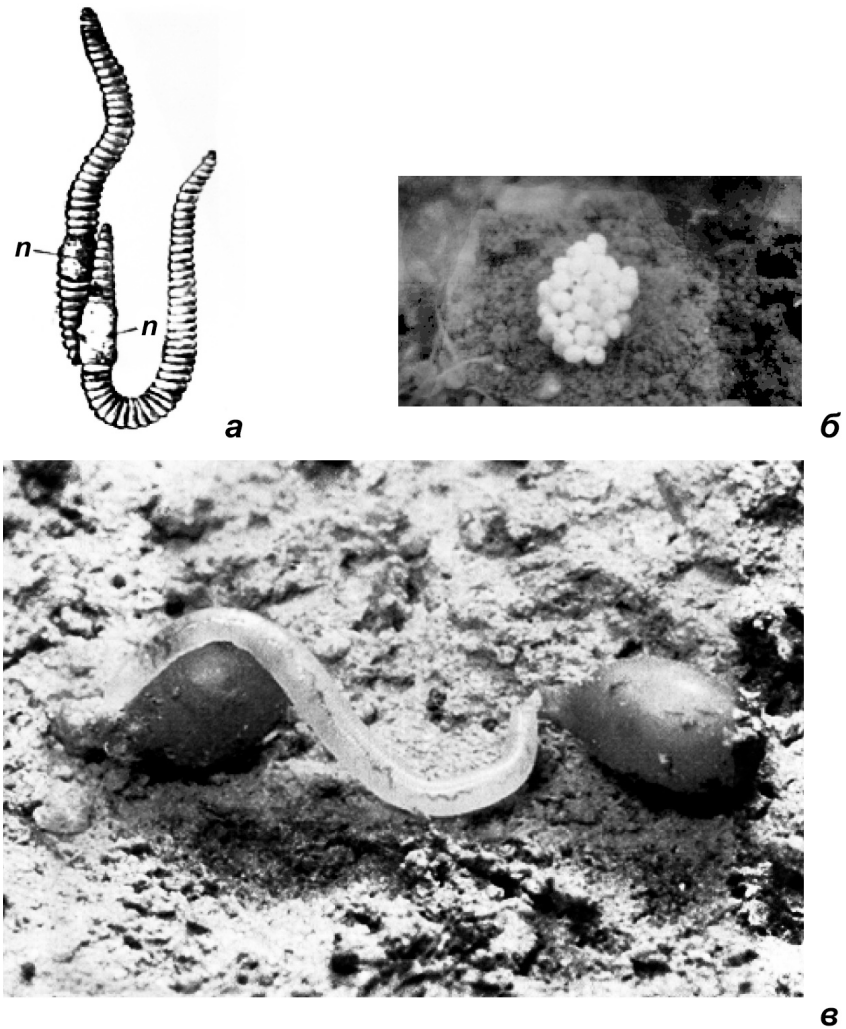


Рис. 23.2. ***Розмноження дощових черв'яків:***
а — спарювання дощових черв'яків; б — молоді кокони; в — старші кокони і молода особина дощового черв'яка.

23.2. СПОСОБИ ВИРОЩУВАННЯ ЧЕРВ'ЯКІВ

Промислове вирощування черв'яків можна проводити як просто неба, так і в закритих приміщеннях. Усі розрахунки, пов'язані з облаштуванням ділянок для вермікультивування, заселенням та годівлею черв'яків, доглядом за ними й іншими операціями, виконуються з розрахунку на стандартну грядку, яка називається ложем. Ложе — це одиниця виміру, якою користувалися американські дослідники, з ділянкою площею 2 м^2 (2 х 1 м).

Щільність заселення одного ложа може коливатись від 30 до 100 тис. черв'яків (дорослих, молодих і коконів з яйцями). На 1 ложе потрібно 10–12 ц органічних відходів на рік. Із них 40 % використовується на задоволення життєвих потреб черв'яків, а 60 % виділяється у вигляді копролітів, тобто біогумусу. Одне ложе дає щорічно 4–6 ц біогумусу і близько 30–100 кг біомаси черв'яка.

Цілорічне вермікультивування з влаштуванням лож на відкритих земельних ділянках можливе тільки в регіонах з м'яким кліматом, тому що взимку активність черв'яків значно знижується, а догляд за ними ускладнюється. А в інших регіонах – сезонне – з квітня по жовтень.

Ложа краще всього влаштовувати на ділянках з певним нахилом для забезпечення нормального стоку води під час дощів і запобігання утворенню калюж. Крім того, бажано, щоб підстилаючий ґрунт був піщаним або кам'янистим. Дощові черв'яки дуже бояться вітру, тому слід вибирати для влаштування лож захищені від нього місця. Для захисту від шкідників ложа потрібно влаштовувати на металевих сітках із загнутими краями з висотою бортиків 25 см, бетонних лотках з цегляними стінами та ін. (рис. 23.3).

За схемою ряд дослідників черв'яки утримуються на бетонованих майданчиках або в траншеях завширшки 2 м і глибиною 0,3–0,4 м. Довжина майданчика або траншей залежить від розмірів ділянки, відведеної під вермікультивування (рис. 23.4). Ложі виготовляються з металевої оцинкованої сітки з нішами 15 х 15 мм. Площа ложа – 2 м^2 (2 х 1 м), висота – 15–30 см. Ложа розміщуються секціями довжиною до 50 м з відстанню між ними 0,5–0,8 м. В кожній секції 25 лож. Дві секції утворюють сектор. Відстань між секторами становить 2,5–3 м. Вітчизняні дослід-

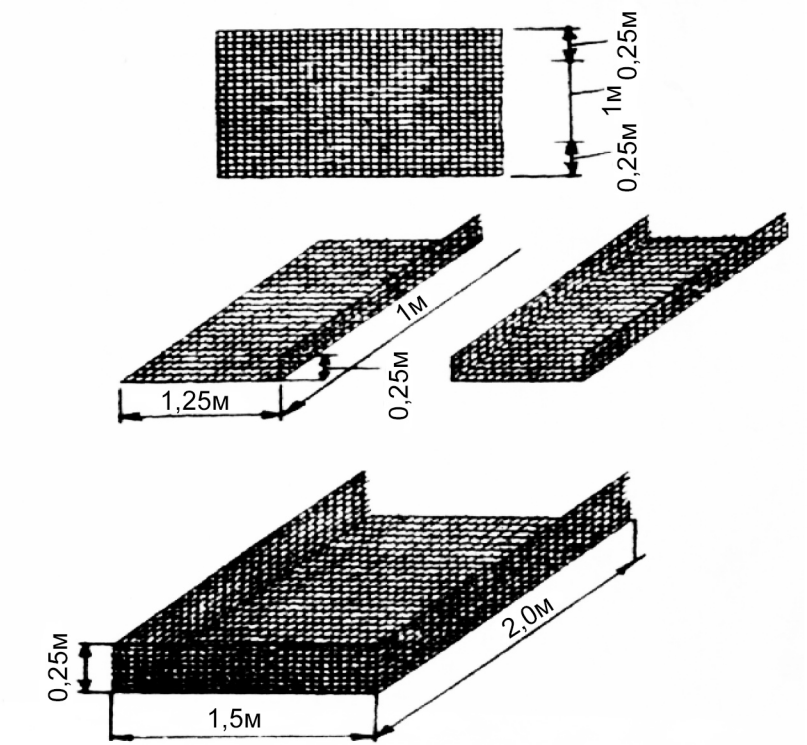


Рис. 23.3. ***Ложа для вермікультивування*** *(за Городнім М.М. та ін., 1996)*

ники рекомендують робити ложа шириною 2 м, довжиною 50 м з відстанню між ними, яка забезпечить проїзд техніки.

В закритих приміщеннях (в тому числі й різні сільськогосподарські будівлі, які не використовуються) черв'яків можна культивувати цілорічно з влаштуванням лож на бетонній підлозі або на стелажах в дерев'яних, металевих або пластикових ящиках, які розміщуються ярусами. Досліджено, що в закритих приміщеннях 1 м^2 площі дає удвічі більше біомаси черв'яків і органічного добрива — біогумусу, ніж просто неба.

Для вермігосподарства оптимальною кількістю є 1200 лож площею не менше 1 га.

Французькою компанією Green Frere сконструйована установка для вермікомпостування відходів. Це циліндрична башта,

яка складається із 24 пластикових піддонів діаметром 230 см, поставлених один на один. Піддони заповнюють відходами і заселяють черв'яками. Весь процес компостування повністю автоматизований.

23.3. ПІДГОТОВКА СУБСТРАТУ (КОРМУ) ДЛЯ ЧЕРВ'ЯКІВ

Кормом для черв'яків є різні органічні відходи з високим умістом целюлози, які пройшли процес ферментації. Основою раціону для черв'яків є гнойова біомаса, до якої додають певну кількість інших органічних відходів.

Для одержання якісного корму для черв'яків до вихідного органічного субстрату (відходів) існують вимоги: вологість 70–80 %, pH 6,8–7,2, вміст оксидів заліза не більше 10 %, відсутність твердих частин — металевих, дерев'яних, камінців, скла тощо.

Для проведення ферментації органічні відходи буртують на рівному майданчику з допустимим нахилом 1–3. Бурти можуть мати різні розміри: ширина – 1,7–2 м, довжина – 15–80 і висота – 1,5–2 м. Це залежить від наявної робочої сили і засобів механізації. Бурти мають бути витягнуті з півночі на південь для кращого прогрівання субстрату.

В умовах доступу води і кисню під впливом мікроорганізмів-аеробів, які є на субстраті (грибів, актиноміцетів, бактерій), органічні відходи розкладаються. В результаті гідролітичного розщеплення високомолекулярних сполук (білків, жирів, вуглеводів) утворюються проміжні й кінцеві низькомолекулярні продукти, які споживаються черв'яками.

Процес ферментації субстрату проходить у двох температурних режимах. Після закладки буртів температура всередині субстрату підвищується до термофільних величин (50–60 °С), а потім зменшується до мезофільних значень (25–35 °С) і через декілька місяців знижується до температури навколишнього середовища. Стабільність цього показника свідчить про закінчення ферментації і придатності субстрату для годівлі черв'яків. Біотермічні процеси, які відбуваються при температурі 50–60 °С, згубно діють на патогенну мікрофлору, яйця і личинки гельмінтів, насіння бур'янів, а сечовина і гіпурова кислота, які містять-

ся в гноєві, розкладаються до аміаку, двоокису вуглецю і води. Крім аміаку, виділяється також певна кількість метану, який також згубно діє на черв'яків.

У літній період при високих температурах бурти періодично поливають водою, гноєвою рідиною або стоками для підтримки вологості на рівні 70 %.

Під час проходження ферментації у субстраті контролюють pH середовища. Незначне коливання pH від оптимального (6,8–7,2) негативно впливає на ріст і розвиток аеробної мікрофлори, а отже і на інтенсивність процесів ферментації. Надмірну кислотність нейтралізують шляхом додавання необхідної кількості вапна, крейди, дефекату, сланцевої золи, мергелю й інших речовин, які є одночасно й мінеральними добавками. Високу лужність усувають надмірним поливом.

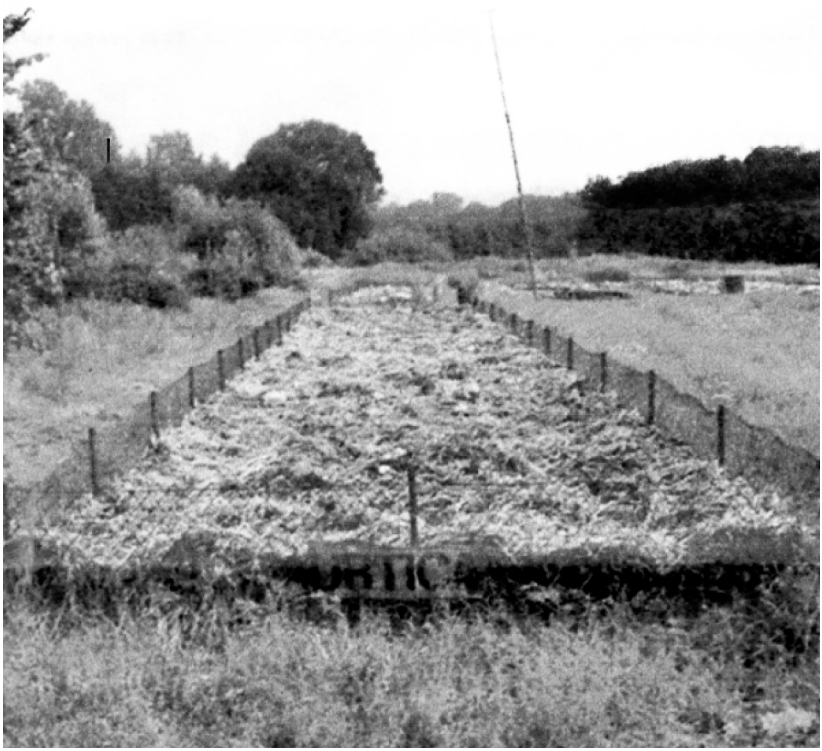


Рис. 23.4. ***Вермікультивування в траншеях***
(за Sulzberger R., 1998)

Для забезпечення достатньої аерації субстрату, який ферментується, активізації мікробіологічних процесів, вирівнювання вологості субстрату по всьому об'єму, усунення аеробних загниваючих зон у глибині бурта, він перемішується. Нерівномірність перемішування субстрату не повинна перевищувати 10 % за коефіцієнтом варіації вологості в масі.

Повний термін ферментації субстрату в буртах за природного режиму ферментації залежить від виду органічних відходів і може тривати до 6–12 міс. Прискорити цей процес до 1–3 міс. можна шляхом вдування гарячого пару через труби в субстрат.

Візуально субстрат, готовий до споживання черв'яками, має вигляд напівперепрівшої (солома має темно-коричневий колір і легко розривається) або перепрівшої (має вигляд чорнуватої маслянистої суміші і наявність соломи у ній непомітна) маси. Показником готовності субстрату є співвідношення вуглецю до азоту (C : N), яке має бути в межах 20.

В кормі для черв'яків не повинно міститись пестицидів, великої кількості протеїну (не більше 25–30 %), аміаку, метану, патогенної мікрофлори, яєць і личинок гельмінтів. При вмісті в кормі 40 % протеїну черв'яки гинуть.

Як свідчить практика, кормом для черв'яків можуть бути різні органічні відходи як сільськогосподарського, так і промислового виробництва. Але найкраще, щоб основою будь-якого раціону для черв'яків був гній, до якого додають у певній пропорції інші органічні компоненти. Великі органічні частинки відходів потрібно подрібнити (до 1 мм, не більше), тому що вони не поїдаються черв'яками.

Гній коней є добрим кормом для черв'яків, оскількик містить значну кількість целюлози. Процеси ферментації у ньому тривають 5–6 міс.

Гній корів має високу лужність і після 6–8 міс. ферментації в суміші з 20–25 % подрібненої соломи є добрим кормом для черв'яків.

Гній телят може мати залежно від особливостей годівлі підвищений вміст протеїну через неповне його засвоєння тваринами. Для зниження рівня протеїну в гнойовій біомасі до неї додають подрібнені солому або картон і збільшують термін ферментації з 7–8 до 13 міс.

Гній овець є високолужним. У вівчарнях він утрамбовується тваринами. Для застосування його вирізають пластами, силь-

но зволожують і розрихлюють, а потім буртують для ферментації (до 8 міс.).

Гній свиней має високу кислотність і містить значну кількість протеїну. У зв'язку з цим до нього додають 30–40 % соломи або картону і ферментують 9–10 міс. Встановлено, що тверду фракцію гною свиней, видаленого гідрозмивом, можна додавати в корм черв'якам у свіжому вигляді без попередньої ферментації, а рідку фракцію використати для зволоження буртів. При переробці рідкого гною методом вермікультури його спочатку піддають механічному сепаруванню, а з твердої фракції формують бурти або траншеї, лотки.

Гній кроликів можна згодовувати черв'якам у свіжому вигляді, але за умови, що екскременти будуть відділятись від сечі. В іншому випадку його піддають ферментації протягом 5–7 міс.

В деяких господарствах з вирощування кроликів утилізація гною методом вермікультури проводиться таким чином: під клітки з кроликами ставлять ящики з укладеною на дні сумішшю ґрунту, подрібненого паперу і піску, в яку запускають черв'яків. Свіжі екскременти, які надходять з кліток, переробляються черв'яками. Додавання піску необхідно для нормального харчотравлення черв'яків.

Курячий послід належить до висококислотних субстратів, тому до нього потрібно додавати відходи рослинництва або картон у співвідношенні 1:1 і ферментувати протягом 15–16 міс.

При використанні гнойової біомаси необхідно дотримуватися деяких умов: не можна використовувати як базовий субстрат гній, що не пройшов процес ферментації, а для годівлі черв'яків гній, який пролежав більше 2-х років після ферментації та змішаний з сечею через уміст аміаку, сірководню та ін. Встановлено, що для підгодівлі черв'яків можна використовувати неферментований гній, який добре перевірений на придатність (кислотність, температура, вологість, проба 50-ти черв'яків). Оскільки він вноситься шаром усього 5 см, то небезпеки ферментації немає.

Незалежно від виду субстрату, який ферментується, корм повинен містити 20–25 % целюлози у вигляді січки із соломи, паперу, картону та ін.

23.4. МЕТОДИКА ФОРМУВАННЯ ЛОЖ І ТЕХНІКА ЗАКЛАДКИ МАТОЧНОГО ПОГОЛІВ'Я В СУБСТРАТ

Відходи після закінчення процесу ферментації закладають у ложа як базовий субстрат або корм. Він виконує різні функції: захищає черв'яків від підстилаючого ґрунту і тому товщина його коливається від 15 см влітку до 25–30 см взимку. Крім того, він є кормом для черв'яків і повинен містить достатню кількість целюлози (20–25 %), мати оптимальну вологість (70–80 %), температуру (19–20 °С) і кислотність (6,8–7,2).

Після закладки базовий субстрат безперервно зволожують 1 раз на день протягом 4-х днів (за сухої погоди — двічі), а потім щотижнево протягом 30 діб. Це забезпечує вимивання із субстрату решток сечової кислоти, розчинення вуглекислого кальцію і нейтралізацію надмірної кислотності, насичення його киснем та підтримку оптимальної вологості.

Одночасно з поливом в ложах вимірюється температура і кислотність. Оптимальною є температура 19–20 °С, а pH — 6,8–7,2. Підвищену кислотність корегують шляхом внесення на поверхню субстрату гашеного вапна або крейди (300 г/м^2), після чого його ретельно поливають, щоб вода пройшла через усю товщу субстрату.

Кожна партія органічного субстрату, який закладається в ложа, перевіряється на кислотність. Для цього користуються лакмусовим папером або pH-метром. Смужку лакмусового паперу разом з грудкою вологого субстрату тримають в кулаці 20–30 с, а потім порівнюють його з контрольною кольоровою шкалою на упаковці.

Вологість субстрату визначається відповідними приладами або органолептично. При останньому способі субстрат беруть в долоню і повільно стискають. Якщо рідина не просочується крізь пальці, то субстрат сухий, а якщо стікає з долоні — перезволожений. Перезволоження найчастіше відбувається в період тривалих дощів. У цей час потрібно прикривати ложі плівкою або матами з соломи.

Через 30 днів після закладки базового корму ложа заселяють черв'яками. Але перед цим знову потрібно виміряти усі показники (вологість, температуру, кислотність) та визначити пробу 50-ти черв'яків (тест 50-ти черв'яків). Суть тесту полягає в наступному. У дерев'яний ящик розміром 50 х 50 х 15 см з

дренажними отворами або в 2–4-літрову ємність поміщають базовий субстрат і 50 черв'яків, де вони утримуються добу при температурі 20 °С. Потім їх вибирають, підраховують і визначають їх стан. Якщо усі черв'яки живі й нормально рухливі, то це є свідченням придатності корму для черв'яків. У разі їх загибелі або кволості та пасивності необхідно ретельно перевірити, чи пройшов субстрат процес ферментації, і визначити усі показники (вологість, кислотність).

З біологічних показників, крім тесту 50-ти черв'яків, можна використати простішу схему. На поверхню субстрату випускають декілька десятків черв'яків. Якщо вони швидко заглиблюються в нього, це свідчить про його придатність як корму для черв'яків. Якщо черв'яки розповзаються по поверхні й не заглиблюються в нього, то субстрат не використовується.

Ложа заселяються черв'яками разом з компостом, в якому вони знаходилися. Їх рівномірно розподіляють по поверхні ложа механізованим способом або вручну 4-рожковими вилами з заокругленими краями. Заселення проводиться у денні години, тому що черв'яки бояться світла і швидко занурюються в субстрат. Після цього поверхня ложа зволожується і покривається соломою або мішковиною.

23.5. УМОВИ УТРИМАННЯ ЧЕРВ'ЯКІВ У ЛОЖАХ

Після формування лож і закладки в них маточного поголів'я необхідно регулярно контролювати фізико-хімічні показники (температуру, вологість, кислотність, тест 50-ти черв'яків) корму і слідкувати за станом популяції черв'яків.

Нову порцію корму після заселення маточного поголів'я рекомендується вносити тільки через 25–35 днів. Після цього черв'яків підгодовують регулярно і тільки після переробки попереднього корму. Навесні, влітку і восени через – 7–10 діб, а взимку — через 25–35 діб. Кожний новий корм має пройти ферментацію і перевірку на якість, в тому числі і по тесту 50-ти черв'яків.

Новий корм вноситься шаром товщиною 5–7 см не на всю поверхню ложа, а спочатку на площу 1,4–1,6 м^2 (або 70–80 %), а решта 0,4–0,6 м^2 площі ложі залишається вільною і відіграє роль додаткового страхового майданчика на той випадок, коли

новий корм не відповідає вимогам. Черв'яки сповзаються на цю ділянку, уникаючи нового корму. Якщо протягом доби немає міграції черв'яків, то й цю частину площі ложа заповнюють кормом.

Слід чітко дотримуватись графіка годівлі черв'яків й одночасно слідкувати за її повноцінністю, бо при недостатній кількості корму черв'яки виповзають із лож, а при надмірній його кількості утруднюються газообмін і дихання черв'яків.

При недостатній активності черв'яків та поганому поїданні корму рекомендується перетрушувати субстрат тупими вилами (розпушувати), не допускаючи змішування його різних шарів. Це потрібно робити систематично 1–2 рази на тиждень, що покращує аерацію у ложі, сприяє виходу з нього шкідливих газів і притоку свіжого повітря в культуру. Коли аерація погіршується, то черв'яки починають «задихатись» і гинуть, бо вони дихають всією поверхнею тіла.

Для підтримання оптимальної вологості в ложах їх періодично зволожують. Це найкраще робити вранці і ввечері, щоб запобігти різкому контрасту між температурою води і температурою вмісту лож. В години високої інсоляції ложа потрібно прикривати матами, змоченими водою.

Вода, яка використовується для зволоження лож з черв'яками, має відповідати певним вимогам. Воду можна використовувати з криниці, річки, каналу, свердловин. Обов'язково необхідно проводити хіманаліз води на наявність в ній токсичних речовин або провести біотест на рибі. Її поміщають в бак з водою, яка буде використовуватись для зволоження лож. Якщо риба не гине, то вода придатна для зрошення.

23.6. ОЦІНКА СТАНУ ПОПУЛЯЦІЇ ЧЕРВ'ЯКІВ

Стан популяції черв'яків оцінюється за показниками росту і розвитку шляхом щомісячного підрахунку їх чисельності та визначення вікового складу. Проводиться це наступним чином. В різних місцях ложа (в шаховому порядку або по діагоналі) беруться проби субстрату з черв'яками площею 10х10 см з усієї його глибини. Із цих проб вибираються усі черв'яки, підраховується їх кількість і визначається біомаса (тобто зважуються). Потім одержані середні результати перемножують на 100 і та-

ким чином визначається середня чисельність і біомаса черв'яків з розрахунку на 1 м^2.

Однак збільшення маси черв'яків не є однозначним показником. При згодовуванні поживного корму можна одержати значний приріст маси черв'яків, але коконів вони не відкладатимуть.

На розмноження черв'яків впливає щільність популяції. При її збільшенні підвищується збудливість черв'яків і стрес від перенаселення негативно вплине на розмноження. Отже, займаючись розведенням вермікультури, необхідно визначити оптимальну щільність популяції, яка, в свою чергу, буде суттєво залежати від кінцевої мети — одержання біогумусу чи черв'ячної біомаси.

На інтенсивність розмноження черв'яків значний вплив має також корм: його доступність, якість, калорійність, привабливість, різноманітність.

Тому під час проведення кількісного обліку чисельності черв'яків визначається також віковий склад популяції шляхом підрахунку окремо коконів, молодих і дорослих черв'яків, а в коконах визначається середня кількість зародків. Співвідношення різних вікових груп дає уявлення не тільки про загальний стан популяції, але й про можливу перспективу. Так, якщо в популяції переважають дорослі черв'яки і кокони над молодими формами, то це свідчить, що умови вермікультивування перешкоджають розвитку зародків і виходу молодняку. Правильний аналіз дасть можливість внести зміни в умови утримання і оптимізувати параметри процесу вермікультивування.

Для відбору проб зручно користуватись 4-рожковими тупими вилами з шириною захвату 10 см.

23.7. МЕТОДИКА РОЗДІЛЕННЯ ЛОЖ

Періоди розділення черв'яків і формування нових лож залежать від кліматичних умов регіону. В районах з помірним і теплим кліматом черв'яків можна розводити тричі: у квітні, липні та жовтні. Слід враховувати, що це трудомісткий і тривалий процес, що вимагає ретельної підготовки і відпрацювання різних технологічних прийомів.

Розділяють ложі з вибіркою і без вибірки біогумусу.

При підготовці до розділення лож корм потрібно вносити регулярно, причому нові порції мають бути «смачнішими» за попередні.

Для розділення лож, тобто для формування нових лож із попередніх, використовуються різні технологічні прийоми вибірки черв'яків із субстрату.

Технологічні прийоми вибірки черв'яків

1-й спосіб — пошарове видалення черв'яків. Перед внесенням нового корму в ложі знімають 5-сантиметровий шар попереднього. Через 6–7 днів знову знімають такої самої товщини шар, в якому знаходиться 50–60 % популяції черв'яків, і переносять у нове ложе. На місце знятого шару вносять такої самої товщини свіжий корм. Знову через 6–7 днів цей шар знімають, і в ньому міститься 25–35 % популяції черв'яків. Їх також переносять у нове ложе. Знову вносять новий корм і в ньому будуть залишки популяції, яку вибирають через 6–7 днів. Таким методом досягається майже повна (95–97 %) і, що дуже важливо, безболісна для черв'яків вибірка популяції.

2-й спосіб. Збирають весь верхній шар субстрату на глибину 12–15 см і переносять у ємність конічної форми, яка встановлена на світлі (сонячному або від електроламп). Через 2–3 год черв'яки переміщуються на дно ємності. Верхній шар (субстрат) знімається, а внизу залишаються черв'яки. Але цей спосіб малопродуктивний. Краще розміщувати субстрат з черв'яками на бетонному майданчику у вигляді куп висотою до 1 м. На світлі черв'яки заглиблюються і після зняття верхнього шару субстрату вони залишаються на бетонній підлозі.

3-й спосіб. У Прикарпатті використовують при розділенні лож метод голодної дієти. Протягом 3-х тижнів черв'яків тримають на «голодній дієті», тобто на поверхню лож не додають нових порцій корму. Через 3 тижні на поверхню лож вносять новий корм і зволожують його. Черв'яки виповзають на цей шар для харчування і його знімають разом з черв'яками.

Розділення лож. Перше розділення — квітневе, трикратне. Якщо господарство працює цілорічно, то в квітні проводять перше розділення лож. Кожне квітневе ложе розділяють на 3 нових (тобто трикратне) з вибіркою усієї популяції черв'яків і вибіркою біогумусу. Нові закладені ложа дозрівають для їх роз-

ділення в липні. Вибірку черв'яків проводять одним із розглянутих вище способів.

Друге розділення лож — липневе, двократне, тобто одне ложе ділиться на два без вибірки біогумусу. Це розділення має свої особливості. Якщо при розділенні квітневих лож верхній шар субстрату знімали по всій поверхні ложа, то з липневих знімають тільки з половини поверхні по ширині ложа. Новий корм не вноситься, а проводиться трикратне знімання 5-сантиметрового шару субстрату через 5–7 днів. В результаті одна половина ложа буде вищою на 15 см за іншу. Після вибірки черв'яків обидві половини субстрату вирівнюють за висотою.

Третє розділення лож проводиться у жовтні. У цей період проводять трикратне розділення лож, які були закладені у квітні, з вибіркою біогумусу і чотирикратне розділення лож, сформованих у липні, без вибірки біогумусу, з яким вони входять у зимівлю і розділення їх з вибіркою біогумусу буде проводитись у квітні наступного року. Отже, період формування біогумусу становить 6 місяців.

Вибирають черв'яків при розділенні лож механічним методом за допомогою 4-рожкових вил з заокругленими краями. Крім цього, існують різні механізми — вібраційні грохоти, лійкоподібні сита, спеціальні машини з циліндричними решетами.

Розроблені також засоби теплового, світлового, електричного і хімічного (дія формаліну) впливу на черв'яків, щоб вони самостійно залишали субстрат.

23.8. ТЕХНОЛОГІЯ ВЕРМІКУЛЬТИВУВАННЯ ВЗИМКУ

Ця технологія має свої особливості, головними з яких є вимоги до температури і вологості. Оптимальна температура – 20–22 °С, критична – 0–4 °С. Оптимальна вологість становить 82 %, а критичні – менше 60 і більше 90 %. При +7 °С черв'яки впадають в анабіоз і не споживають корм.

Взимку необхідно постійно слідкувати за температурою в різних шарах ложа, не порушуючи їх. Для цього найбільш придатним є ґрунтовий термометр, який можна занурити на глибину 40–60 см.

При утриманні вермікультури в закритому приміщенні потрібно слідкувати, щоб основа ложа не була теплопровідною.

Так, дуже швидко охолоджується бетон. В цьому випадку добре використати для теплоізоляції полімерну плівку.

Найкращим місцем для вермікультивування взимку є опалювальне приміщення. За цієї умови черв'яки розмножуються і чисельність їх може збільшуватись у 3–4 рази. У теплому приміщенні верхній шар субстрату пересихає і його потрібно зволожувати, а в холодному — залишається в належному стані.

При утриманні вермікультури просто неба ложа зволожувати не варто. Для підтримки оптимальної температури ложа взимку накривають соломою, свіжою гнойовою біомасою коней або великої рогатої худоби, листям (крім хвойних дерев).

Розмір зимового ложа відрізняється від літнього тільки за висотою, тому що при його формуванні знизу укладається шар свіжого гною, який не пройшов ферментації, товщиною 25–30 см. При його дозріванні утворюється тепло, яке обігріває шар субстрату над ним товщиною 25 см. Щоб черв'яки не переповзали із субстрату у свіжий гній, його відділяють полімерною плівкою. Для підтримання оптимальної температури зимове ложе зверху покривають шаром подрібненої соломи (8–10 см), листям дерев (крім хвойних, дуба і бука), свіжим гноєм коней або великої рогатої худоби товщиною 20–30 см. Під час ферментації гною виділяється тепло, яке направляють в ложе. Зверху ложа накривають ще одним шаром соломи (рис. 23.5).

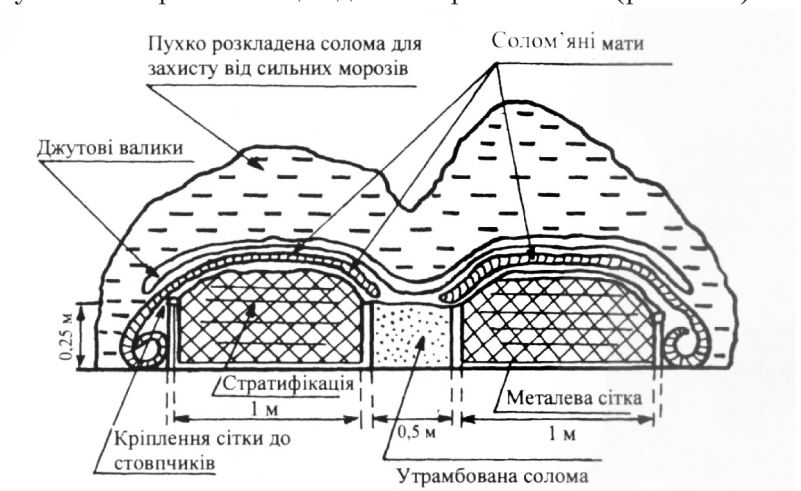


Рис. 23.5. ***Будова і форма ложа для зимового вермікультивування*** *(за Городнім М.М. та ін., 1996)*

Над ложами можна поставити тунель із плівки для утворення повітряної подушки. Відстань між поверхнею ложа і плівкою має бути 10–15 см. Використовується тільки прозора плівка. Ложа не можна зверху накривати плівкою, тому що це порушить аерацію й ускладнить дихання черв'яків. Ложе має добре аеруватись.

Верхній шар субстрату може перемерзати й утворювати мерзлий шар товщиною 5 см. Він виконує теплоізоляційну функцію.

В холодний період року каліфорнійський гібрид може не впадати в сплячку, навіть розмножуватись, але з меншою інтенсивністю. Тому потреба в кормі знижується.

Взимку корм вноситься у ложа шаром товщиною 10–15 см через кожні 10–15 днів. Черв'яки поїдатимуть тільки 5-сантиметровий шар, розміщений знизу, тому що тільки він буде зігрітим до оптимальної температури. При подальшому внесенні корму черв'яки споживатимуть попередній добре прогрітий шар.

23.9. ВЕРМІКУЛЬТИВУВАННЯ НА ПРИСАДИБНИХ ДІЛЯНКАХ

Метод вермікультивування можна використати для переробки у компост (органічне добриво) органічних відходів, які накопичуються на присадибній ділянці (обрізаних гілок, рослинних решток, трави, кухонних відходів та ін.). Вермікомпостування можна проводити в купах або в ємностях (рис. 23.6).

При компостуванні у купах відходи складають шарами: знизу грубіший матеріал (гілки, дерев'яні рештки), а зверху дрібніші рослинні відходи, траву, листя та ін. Відходи зволожують і лишають для проходження гниття (ферментації). Через 1–1,5 міс., коли всередині купи закінчиться процес сильного розігріву маси і температура знизиться до 20 °С, її заселяють черв'яками. Для цього по всій поверхні купи роблять отвори, які заповнюють черв'яками (приблизно 100 екз. в кожний отвір). Щільність заселення рекомендується підтримувати на рівні 1000 екз./м^2. Для покращення годівлі черв'яків в компостну купу періодично додають кухонні відходи. Через 3–4 міс. відходи перетворюються на компост, в якому міститься близько

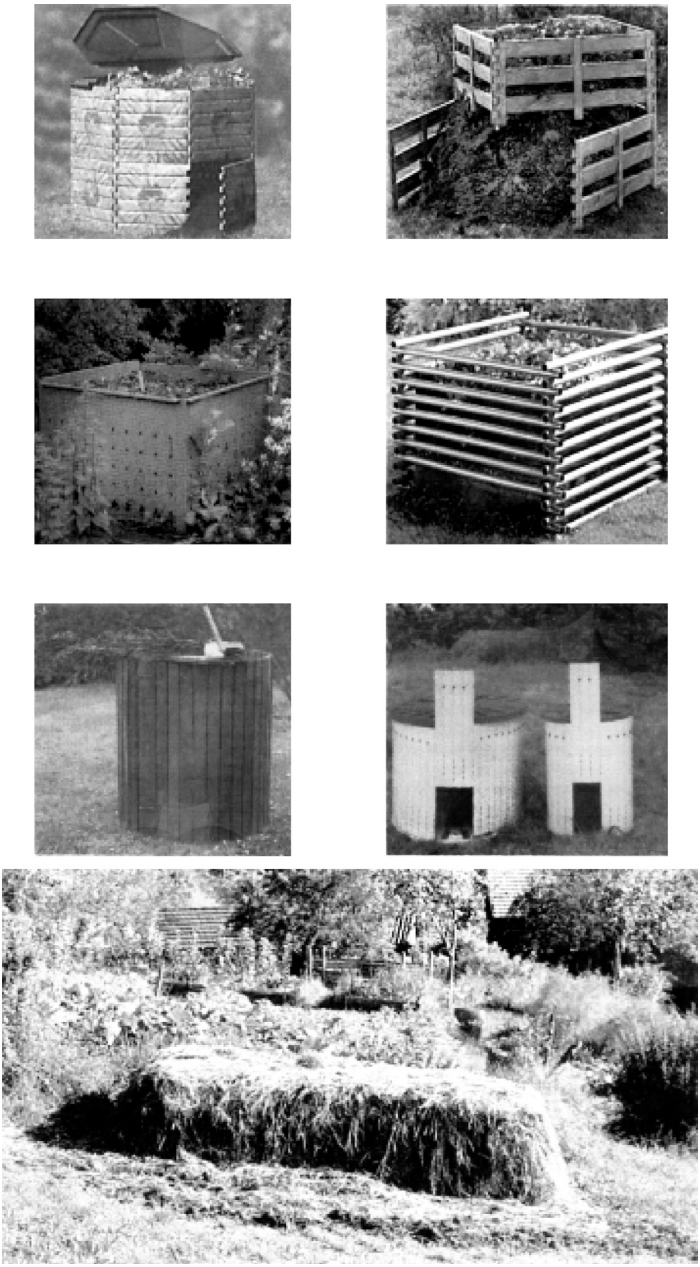


Рис. 23.6. ***Варіанти вермікомпостування на присадибних ділянках у Німеччині*** *(за Sulzberger R., 1998)*

15 % біогумусу. Для відокремлення черв'яків від компосту поряд з купою з черв'яками влаштовують нову купу зі свіжих відходів, куди черв'яки переповзають в пошуках нового корму.

Можна також влаштовувати так звані «мандрівні» вермікомпостні штабелі. При цьому на одному кінці штабеля час від часу закладають свіжі відходи, а на протилежному збирають готовий компост. У такому штабелі черв'яки поступово переповзають слідом за новим кормом.

Для розведення черв'яків можна використовувати також різні ємності з отворами для аерації. Їх розміщують на стелажах у місцях, захищених від прямих сонячних променів (на балконах, вікнах, горищах, гаражах, підвалах, під навісом, під деревами та ін.).

Зручними є дерев'яні ящики або коробки, лотки розміром 100х50х30 см або 40х70х16 см, дно і кришка яких мають отвори для забезпечення аерації і дренажу води при поливі. Ящикове вермікультивування потребує мінімальних капіталовкладень, мало часу і праці. Усі роботи може виконувати одна людина, витрачаючи годину на тиждень.

Основу субстрату, яким заповнюють ящики, складає ферментований гній (великої рогатої худоби, кроликів, коней), до якого можна додавати садову землю, подрібнену солому або інші рослинні рештки при їх ретельному перемішуванні. Співвідношення компонентів становить відповідно 1:1:1. Компост готують у спеціальних ящиках розміром 150х90х25 см або ямах.

Для заповнення ящиків необхідно 25–30 $м^3$ субстрату на 100 $м^2$. Після цього субстрат зволожують і заселяють черв'яками. Щільність заселення — 500 молодих особин або 200–300 коконів на ящик.

За відсутності органічних відходів черв'яків можна годувати подрібненим і зволоженим папером, картоном, газетами, дерев'яною тирсою (не хвойних дерев). Доброю добавкою є кухонні відходи, чай, кавова гуща, ромашка.

Свіжий корм в ящики вноситься 5-сантиметровим шаром на всю його поверхню раз на тиждень. Якщо ящики знаходяться в оптимальному за температурою місці, то через кожні 90 днів розділяють популяцію на дві частини у зимовий період і на 3 — в літній.

Вибірка черв'яків і коконів із ящиків (лотків, коробок та ін. ємностей) проводиться наступними методами. Ящик знімають

зі стелажа і перевертають над широким столом. Усі черв'яки при цьому зразу ж занурюються в глибину субстрату і збираються на поверхні стола під субстратом. Потім переглядають субстрат шар за шаром і з нього вибирають усі кокони, збирають черв'яків на дні купи. Великих черв'яків поміщають назад в ящик як маточне поголів'я, а молоді особини і кокони використовують для заселення інших ємностей, на продаж, молодняк — як наживку для рибної ловлі, в корм тваринам, для заселення саду. Цю операцію за оптимальних умов вермікультивування можна проводити раз на місяць. Ящикове вермікультивування набуло популярності у США.

Відділяти черв'яків від гумусу можна за допомогою сита із металевої сітки з отворами розміром близько 2 мм, крізь яке

Рис. 23.7. ***Відділення черв'яків від біогумусу в умовах присадибного господарства*** *(за Sulzberger R., 1998)*

просівається порошкоподібний гумус (рис. 23.7). На ситі лишається субстрат і черв'яки, які переносять в новий ящик.

Крім того, існує спосіб відокремлення черв'яків за допомогою «голодної дієти». Суть способу полягає в тому, що чергову годівлю відстрочують на 3–4 дні, а потім наносять на поверхню шар корму товщиною 5 см. Голодні черв'яки переповзають у цей шар, який і знімають. Цю процедуру повторюють 2–3 рази і знімають близько 97 % популяції. Корм можна ставити в корзинках, куди будуть переповзати черв'яки.

Є також інші способи вирощування черв'яків — в ямах і траншеях, які викопуються у землі.

23.10. ВЕРМІКУЛЬТУРА, ЇЇ СКЛАД ТА ВИКОРИСТАННЯ

При переробці черв'яками 1 т гною (у перерахунку на суху біомасу) отримується до 600 кг біогумусу з вмістом 25–40 % гумусових речовин, у яких близько 1 % азоту, фосфору і калію та всі мікроелементи, необхідні рослинам. Останні 400 кг органічних поживних речовин трансформуються в 100 кг повноцінного білка у вигляді біомаси живих черв'яків.

Біомаса черв'яків містить 17–23 % сухої речовини і в сухій речовині: протеїну 60–80 %, вуглеводів — 17, ліпідів — 6–9, мінеральних солей — 15, азотистих екстрактивних речовин — 7–16 %, багато ферментів, вітамінів, мікроелементів, а також майже всі амінокислоти, в тому числі й такі незамінні як лізин та метіонін (табл. 23.1).

Таблиця 23.1.

Порівняльна характеристика кормової цінності борошна різного походження

(за Ігоніним А.М., 1995)

Склад, %	*Борошно із черв'яків*	*М'ясне борошно*	*Рибне борошно*	*Борошно із сої*	*Сухі дріжджі*
Суха речовина	92,0	92,0	92,0	92,0	92,0
Жир	10,1	8,0	8,0	1,0	1,0
Білок	69,1	60,0	61,0	45,0	44,0
Зола	5,1	21,4	19,6	6,0	6,5

Біомаса черв'яків використовується у тваринництві, харчуванні людей і фармакології.

Використання черв'ячної біомаси у тваринництві. Білок черв'ячної біомаси має амінокислотний склад, аналогічний м'ясокістковому та рибному борошну, що дозволяє використовувати його як джерело повноцінного білка для збалансування раціонів сільськогосподарських тварин та у харчуванні людей (табл. 23.2).

Таблиця 23.2.

Порівняльний амінокислотний склад білків різного походження
(за Хоміним Ю. А., 1989)

Склад білків, %	*Борошно із черв'яків*	*Рибне борошно*	*М'ясне борошно*	*Казеїн*	*Білок сої*
Аспарагін	12,07	12,33	11,95	7,19	7,45
Глутамін	17,76	21,48	22,69	22,41	9,71
Серин	8,53	6,61	6,21	6,90	9,13
Гліцин	13,94	8,75	9,33	4,48	7,17
Гістідін	4,23	2,92	4,07	2,91	2,78
Треонін*	8,11	3,76	7,22	6,27	4,37
Аланін	9,83	10,27	10,66	4,96	7,53
Пролін	11,11	6,88	8,36	14,36	5,63
Тирозин	3,96	3,34	3,35	3,83	1,29
Валін*	6,81	7,34	7,40	7,59	5,39
Метіонін*	4,47	3,92	3,35	2,83	–
Ізолейцин*	3,92	5,51	5,97	4,83	5,58
Лейцин*	8,74	11,56	12,35	10,77	7,51
Фенілаланін*	2,88	4,80	5,73	4,74	1,28
Лізин*	9,11	10,83	10,74	4,94	6,38
Триптофан*	8,57	8,76	6,71	–	–
Аргінін	7,98	6,27	6,90	–	6,31

*– незамінні амінокислоти

У багатьох країнах розробляються програми, в яких передбачено поповнення білкових ресурсів для тваринництва в основному за рахунок землеробства — вирощування сільськогосподарських культур. Але за продуктивністю з 1 га землі жодна культура не може порівнятись з вирощуванням дощових черв'яків. Так, з 1 га найкращих земель можна одержати протеїну: кукурудзи — 390 кг, пшениці — 350, конюшини — 1000 кг, а з 1 га площі, заселеної вермікультурою, — 40 тис. кг білкової муки на рік.

Система харчотравлення тварин еволюційно адаптована до споживання дощових черв'яків. Норма споживання повноцінного білка повинна становити 10 % від загальної його кількості і повністю задовольняється при додаванні в корм 1 г черв'яків на 1 кг живої маси на добу.

Черв'ячна біомаса використовується як білкова домішка до раціонів великої рогатої худоби, свиней, птиці, ставкової та акваріумної риби як у сирому, так і вареному вигляді, а також у вигляді борошна в кількостях, які задовольнили б потребу в білку. Для цього черв'яків миють, висушують і подрібнюють.

Використання черв'яків у харчуванні людей. Проблема нестачі білка для людей — одна з найбільш гострих на Землі. Її допоможе певною мірою вирішити використання черв'яків у раціоні харчування людей. Протягом тисячоліть деякі негроїдні африканські племена використовують для харчування різновидність дощового черв'яка розміром 7–8 м. Китайці теж використовують дощових черв'яків у своїй традиційній кухні.

Дослідженнями встановлено, що за своїми поживними якостями м'ясо черв'яків наближене до телятини. Але використання їх у харчуванні людей має соціально-психологічну проблему. З метою впливу на смаки людей і формування громадської думки у наш час у місті Помона (США) щорічно проводяться гастрономічні конкурси продуктів, приготованих на основі дощових черв'яків. Дощові черв'яки, які використовуються у раціоні людей, мають бути вирощені на спеціальному субстраті, що не містить патолого-анатомічних відходів, трупів тварин та ін.

З додаванням дощових черв'яків готують паштет «Вормбергер», страву керрі з горохом, омлети, краби, фарширований перець, печиво та ін.

У штаті Каліфорнія є спеціальний магазин, в якому продаються вирощені для харчових цілей дощові черв'яки вартістю 25 доларів за фунт.

Використання вермікультури у фармакології. Дощові черв'яки використовуються у китайській медицині близько двох тисячоліть. Нині в Китаї на основі нової технології виготовлена антивірусна і антипухлинна сироватка F 76. Екстракти з біомаси черв'яків використовуються при виготовленні мазей для лікування лишаю, екземи і варікозної язви нижніх кінцівок.

Біомаса черв'яків використовується у косметології при виготовленні кремів, шампуней, лосьйонів.

Збагачення ґрунту черв'яками. Дощові черв'яки відіграють винятково важливу роль у формуванні ґрунту і створенні сприятливих умов для розвитку рослин. Вони проривають у ґрунті численні канали і галереї (ходи), які утворюють розгалужену дренажну і вентиляційну системи. Аерація і дренаж — важливі фактори родючості ґрунтів. Ходами дощова вода швидко проникає у ґрунт разом з розчиненими в ній копролітами дощових черв'яків. Наявність ходів сприяє процесу розгалуження коріння без великих енергетичних затрат і проникнення їх у більш глибокі шари ґрунту. В орних ґрунтах кількість ходів дощових черв'яків може перевищувати 1 км на 1 м^2. Якби ходи черв'яків зімкнулись по всій глибині, то поверхня ґрунту опустилася б на 2 см *(Повхан М.Ф. та ін., 1994)*.

Ходи черв'яків ідуть у ґрунті у різних напрямах. Стінки їх просочені слизовими виділеннями черв'яків, що надає їм великої міцності. Змінюється хімічний склад ґрунту, а біля копролітів енергійно розвивається корисна мікрофлора.

Заселення ґрунту дощовими черв'яками проводиться наступним чином. Ґрунт попередньо зорують або скопують на глибину 0–35 см і по всій площі розкидають органічний субстрат, який забезпечить харчування черв'яків протягом 6 місяців. Потім поливають площу так, щоб вона добре промочилася, але не перетворилася на багно і заселяють черв'яками з розрахунку 50 особин на 1 м^2. Це бажано робити рано вранці, щоб з появою сонця вони одразу заглибились у землю. Нагадаємо, що перш ніж проводити звичайну культивацію, необхідно дати ґрунту відпочити протягом 13 місяців.

23.11. БІОГУМУС, ИОГО СКЛАД І ВИКОРИСТАННЯ

Біотехнологічний процес одержання біогумусу грунтується на здатності черв'яків використовувати органічні рештки, трансформувати їх у кишечному каналі і виділяти у вигляді копролітів (екскрементів).

У процесі перетравлення органічних відходів у кишечнику черв'яків формуються гумусові речовини. Вони відрізняються за хімічним складом від гумусу, який утворюється у ґрунті за участю тільки мікрофлори, тому що в кишечнику черв'яків відбуваються процеси полімеризації продуктів розпаду органічних речовин і формуються молекули гумінових кислот, які утворюють комплексні сполуки з мінеральними компонентами, що довго зберігаються у вигляді стійких утворень. Тільки черв'яки, на відміну від інших біологічних об'єктів ґрунту, мають таку специфічну особливість, як здатність до меліорування і оструктурування ґрунтів. Перероблений черв'яками грунт, кількість якого за добу дорівнює масі їхнього тіла, вони перетворюють у гранули – копроліти. Концентрація гумусових речовин у копролітах черв'яків у 4–8 разів більша, ніж у гнойовій біомасі. Копроліти – це щільні чорно-коричневі палички без запаху, які не злежуються. Копроліти складають основу речовини, що називається біогумусом, а їх гранульована (комкова) форма надає йому розсипчастого вигляду, що дуже важливо для структурування ґрунту.

Біогумус, або вермікомпост — це органічне добриво, одержане в результаті розкладу гетеротрофними організмами органічних речовин. Основою його є копроліти черв'яків. Крім цього, в його формуванні беруть участь мікрофлора і мікрофауна, які входять до складу біоценозу компостного бурта.

Склад і властивості біогумусу залежать від складу вихідного субстрату і технології компостування (вермікультивування). У біогумусі акумульована велика кількість макро- і мікроелементів, є ростові речовини, вітаміни, антибіотики, амінокислоти і корисна мікрофлора. Він гідрофільний, має високу водостійкість, вологоємність, механічну міцність, відсутнє насіння бур'янів. Біогумус може утримувати до 70 % води і в 15–20 разів ефективніший за будь-яке органічне добриво.

У середньому біогумус має такий склад: % — суха органічна речовина — 40–60 %; гумус — 10–12; N — 0,9–3,0; P — 1,3–2,5;

K — 1,2–2,5; Ca — 4,5–8; Mg — 0,5–2,3; Fe — 0,5–2,5%; мг/кг — Cu — 3,5–5,1мг/кг ; Mn — 60–80; Zn — 28–35 мг/кг та pH — 6,8–7,2.

Поживні елементи в біогумусі знаходяться в доступній для рослин органічній формі, він має зернисту структуру, стійку до розмивання водою, повільно розчиняється у воді, що забезпечує його пролонговану дію.

Особливу цінність біогумусу надає наявність в ньому гумінових кислот, уміст яких коливається від 5,6 до 17,6 % на суху речовину. Ціни на біогумус, наприклад, в Італії встановлюють за вмістом гумінових кислот, до складу яких входять C, O, H, N та P, S, Si, Al та ін., що є складовими гумусу. Гумус визначає родючість ґрунтів. До його складу входять три основних групи сполук:

1) речовини вихідних органічних решток (білки, вуглеводи, лігнін та ін.);
2) проміжні продукти перетворення органічних решток — амінокислоти, моноцукри та ін.;
3) гумусні речовини, які складають до 85–90 % маси гумусу і визначають його властивості.

За останні 20–25 років спостерігається скорочення кількості гумусу в ґрунті. Значна частина орних земель втратила від 15 до 40 % цієї речовини *(Городній М.М. та ін., 1996)*. Широке використання мінеральних добрив, пестицидів, хімічної меліорації ґрунтів призвело, поряд з підвищенням врожайності на початковому етапі, до багатьох проблем – втрати гумусу, деструкції і перетворення ґрунту в індиферентну масу, нездатну всмоктувати й утримувати воду та схильну до водної і вітрової ерозії. Перенасичення ґрунту різними хімічними речовинами стерилізує його, знищуючи біологічні об'єкти, які утворюють складну екологічну систему.

Результати досліджень показали, що позитивний вплив біогумусу на врожайність сільськогосподарських культур визначається тим, що він містить необхідні для рослин поживні елементи у добре збалансованій і легкозасвоюваній рухомій формі. Він має оптимальну для ґрунту величину pH (6,8–7,2), а також містить велику кількість бактеріальної флори, яка може відновити мертві ґрунти. В 1 г біогумусу міститься до 2000 млрд. колоній порівняно зі 150–350 млн в гноєві, який вважається найкращим натуральним органічним добривом.

Біогумус містить велику кількість біологічно активних речовин (1 $м^3$ біогумусу прирівнюється до 70 тис. $м^2$ ґрунту).

Дощові черв'яки, споживаючи разом з ґрунтом велику кількість рослинних решток, мікроорганізмів, грибів, водоростей, перетравлюють їх і виділяють з копролітами велику кількість кишкової мікрофлори, яка володіє антибіотичними властивостями, запобігає розвитку патогенної мікрофлори та процесів гниття.

Біогумус після вибірки черв'яків має вологість 70–82 %. Якщо він використовується у тому ж господарстві, то його можна не піддавати технологічній обробці.

Для реалізації біогумус підсушують до 50–60 % вологості й просівають на ситах з отворами різного діаметра. У країнах Заходу гумус розділяють на 3 фракції за величиною гранул (частинок): найдрібніша — гранули до 0,1 мм; дрібна — 0,3–0,7; крупна — понад 0,7 мм.

Найдрібніша фракція, або гумусова мука, при внесенні в ґрунт одразу ж розчиняється і засвоюється рослинами. Її використовують для «лікування» рослин і одержання швидкого ефекту. Дрібну фракцію використовують для підживлення городніх, парникових і оранжерейних культур (овочі, квіти). Третя фракція використовується у рослинництві та садівництві. В Україні біогумус теж розділяється на три фракції, але вони значно крупніші: найдрібніша фракція — гранули до 1 мм, дрібна — до 2, а крупна — до 3 мм.

Упаковують біогумус у поліетиленові мішки або пакети, що забезпечує збереження вологості на рівні 50 %.

В Італії з біогумусу одержують рідке добриво, яке містить 10 % сухої речовини і має вигляд пастоподібної маси.

Оптимальними дозами є 3–3,5 т чистого біогумусу або 4–5 т неочищеного (із залишками субстрату) на 1 га площі. Але це умовні дози, тому що біогумусом неможливо «переудобрити» ґрунт. Доза встановлюється виходячи з економічної доцільності. Максимальна доза — 4 т/га. За поживністю 1 т біогумусу рівноцінна 60–70 т гною.

Як показує закордонний досвід, біогумус «омолоджує» ґрунти. Навіть виснажені, холодні та «мертві» ґрунти відроджуються після систематичного внесення біогумусу протягом 4-х років з розрахунку 3 т/га.

Технологія переробки гною й інших органовмісних відходів за допомогою дощових черв'яків дає можливість через використання біогумусу реанімувати ґрунт, підвищити його родючість, стійкість до водної і вітрової ерозії. Крім цього, це практично єдиний метод рекультивації «стерилізованих» і «отруєних» засобами хімізації ґрунтів.

Існує міжнародний стандарт на біогумус, згідно з яким біогумус повинен мати (%): вологість 30–40; органічна речовина — 20–30; водорозчинні солі — 0,5; залишковий азот — 1; P — 1,5; K — 1; Mg — 1; Ca — 4; pH — 6,5–7,5.

Контрольні питання

1. Якого розповсюдження набула біотехнологія вермікультивування і чому?
2. Яку біотехнологічну продукцію можна отримати в результаті утилізації відходів методом вермікультивування?
3. Які біологічні особливості має біологічний об'єкт – дощові черв'яки і, зокрема, червоний каліфорнійський гібрид?
4. Якими способами можна вирощувати черв'яків?
5. Що таке ложе?
6. Що є кормом для черв'яків і як його потрібно підготувати?
7. Яким вимогам має відповідати субстрат (відходи), щоб одержати якісний корм?
8. Які процеси відбуваються при ферментації субстрату і в яких режимах вона проходить?
9. Яким вимогам має відповідати субстрат, готовий до споживання черв'яками і що є показником його готовності?
10. Які особливості підготовки гнойової біомаси як корму для черв'яків?
11. Як формуються ложа?
12. За якими показниками визначається якість базового субстрату?
13. Якими методами визначаються якісні показники корму?

14. Як і коли заселяються ложа черв'яками?
15. Які необхідно створювати умови утримання черв'яків у ложах?
16. За якими показниками оцінюється фізіологічний стан популяції черв'яків?
17. Що таке розділення лож? Яким чином розділюються ложа?
18. Які існують технологічні прийоми вибірки черв'яків?
19. Які особливості вермікультивування взимку?
20. Як проводиться вермікультивування на присадибних ділянках?
21. Яка щільність заселення черв'яками субстрату при промисловому вермікультивуванні та на присадибних ділянках?
22. Який хімічний склад біомаси черв'яків?
23. Як використовується черв'ячна біомаса у тваринництві?
24. Які інші аспекти використання черв'ячної біомаси?
25. Як і для чого проводиться заселення ґрунту дощовими черв'яками?
26. Що таке біогумус і який його хімічний склад?
27. Від чого залежить склад і властивості біогумусу?
28. Чим визначається позитивний вплив біогумусу на родючість грунтів?
29. На які фракції розділяють біогумус у країнах Заходу і в Україні?
30. В яких дозах застосовується біогумус і чим це дозування зумовлено?

Розділ 24.

БІОТЕХНОЛОГІЯ ОТРИМАННЯ БІОМАСИ ОДНОКЛІТИННОЇ ВОДОРОСТІ СПІРУЛІНИ

Спіруліна є представником синьо-зелених водоростей, які широко розповсюджені в природі. Вона належить до найдавніших рослин на Землі, її вік – понад 500 мільйонів років. Світовий досвід свідчить, що спіруліну доцільно розмножувати для накопичення біомаси з наступним її використанням як харчового продукту і кормової добавки для тварин і птиці та сировини для фармацевтичної промисловості. За врожайністю і виходом білка спіруліна випереджає пшеницю, кукурудзу та сою (табл. 24.1).

Таблиця 24.1.

Порівняльна оцінка урожайності спіруліни з іншими культурами
(за Альбер Сассон, 1987)

Культури	*Вихід, т/га/рік*	
	Суха маса	*Неочищений білок*
Пшениця	4	0,5
Кукурудза	7	1
Соєві боби	6	2,4
Спіруліна	50	35

Перші повідомлення про використання спіруліни у харчуванні людей з'явилися ще в 1521 р. у Мексиці. Нею харчувались стародавні єгипетські жреці і фараони. Високорозвинені цивілізації майя і ацтеків використовували її в їжу. І сьогодні біомаса спіруліни використовується як традиційний продукт харчування місцевих жителів Мексики, Східної Африки, деяких країн Центральної Америки та Індії.

Тепер спіруліну вирощують і використовують більш ніж в 60 країнах світу. Річне виробництво її у 1995 році становило:

Мексика – 133 тис. кг сухої маси, США – 118 тис. кг, Таїланд – 110 тис. кг, Японія – 140 тис. кг, Тайвань – 43 тис. кг, Індія і Китай – по 110 тис. кг.

У природі спіруліна росте у прісних, солоних та лужних водоймищах. У дуже лужних водах (pH до 11) озера Текскоко (Мексика) та ставках, які оточують озеро Чад, спіруліна дуже швидко розмножується і росте як монокультура. Ріст спіруліни продовжується до тоді, доки поверхня водоймища не стане настільки щільною, що перестає пропускати світло, яке необхідне для її росту.

Під час експерименту, проведеного в 1967 р. Французьким інститутом нафти спільно з мексиканською компанією «Соса Текскоко», з поверхні озера Текскоко площею 900 га одержували подвоєння біомаси спіруліни уже через 3-4 дні. В 1982 р. виробництво муки зі спіруліни цієї компанії становило до 1000 т вартістю 15 млн доларів. Головними імпортерами мексиканської муки зі спіруліни є Японія, США і країни Європи. Компанія випускає свою продукцію у вигляді муки, таблеток і капсул, які продаються лише у дієтичних магазинах. Мука з біомаси спіруліни використовується для виробництва галет і кондитерських виробів з високим вмістом білка.

В Індії спіруліну збирають у прісних ставках та висохлих водоймищах і використовують у їжу. В Ізраїлі спіруліну вирощують на болотах площею до 12000 м^2 (фірма «Хіллз кур продакшн лтд.», Хайфа). В 1982 р. фірма виробляла 50 т муки, яка згодовувалась тваринам і додавалась до харчових продуктів людей.

В Італії збудована фабрика, де спіруліна вирощується в закритій системі, яка складається з поліетиленових труб, які є сонячними колекторами, що дозволяє продовжити продуктивний сезон. Експерименти у Флоренції показали, що час розмноження спіруліни у ставках і озерах триває з червня по вересень, а в трубах – з квітня до середини листопада.

В Україні промислове виробництво спіруліни для фармакологічної промисловості освоєно фірмою «Спіруліна ЛТД» (м. Миколаїв). З цією метою проведено переобладнання тепличного комбінату під технологію вирощування мікроводорості. Фірмою проводились організація і фінансування наукових досліджень щодо вивчення біологічних властивостей, розробки нових технологій вирощування та використання спіруліни у гуманній медицині і харчуванні.

В Інституті кормів УААН (м. Вінниця) був узагальнений досвід виробництва спіруліни та використання біомаси в харчових і кормових цілях *(Кир'яченко С.П., Прокопенко Л.С., 1995),* а в АТ «Русь» Золотоніського району Черкаської області була розроблена установка для промислового культивування спіруліни у штучних умовах на мінеральних поживних середовищах відкритим способом у лотках для використання біомаси у годівлі сільськогосподарських тварин *(Кир'яченко С.П., 1994, 1997).*

Багатолоткові системи нарощування біомаси мікроводоростей широко використовуються у практиці. Великий внесок в удосконалення технології та обладнання було зроблено групою вчених Кишинівського університету *(Рудик В.Ф. та інші, 1991).*

Спіруліну вирощують також на стічних водах з метою трансформації залишкових органічних і мінеральних речовин та на рідкій фракції збродженого гною (після БГУ). Деякі дослідники вважають за можливе використовувати спіруліну для очищення стічних вод від вмісту важких металів (ртуть, мідь, марганець, залізо, цинк).

24.1. ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА СПІРУЛІНИ

На відміну від вищих рослин середовищем для існування синьо-зеленої спіралевидної одноклітинної водорості спіруліни є вода, і тому вона має іншу анатомічну будову. Спіруліна належить до прокаріотів і має низький рівень клітинної диференціації. Характерною ознакою є відсутність організованого ядра, ядерець, апарату Гольджі та інших органел. Основною ознакою спіруліни є здатність фіксувати в аеробних умовах вуглекислоту та азотовмісні сполуки.

Фотосинтез у водорості проходить у видимій частині спектру (400–700 нм) і залежить від накопичення енергії. Трансформація енергії фотонів у органічну речовину проходить за участю хлорофілу, біліпротеїнів (фікоціанін і фікоеритрин) та каротиноїдів.

Запасні речовини у спіруліни відкладаються у вигляді фікоціанінових гранул, аргініну і аспарагінової кислоти. Водорості цього класу не мають хлоропластів. Їх фотосинтезуючі ламели (тилакоїди) вільно розміщені в цитоплазмі по периферії. Клітинна стінка чотирирядна, основним компонентом якої є пепти-

доглюкан (муреїн). Розмір спіруліни приблизно у 100 разів більший, ніж хлорели та сценодесмуса, і становить 500 мкм.

У природі зустрічаються різноманітні штами Spirulina: S. platensis, S. fenneri, S. massartil, S. maxima тощо. Але найбільш розповсюдженими є S. platensis та S. maxima, які найбільш придатні для культивування в штучних умовах. В біотехнології найбільш широко використовується Spirulina platensis.

Дослідженнями доведено, що на інтенсивність росту спіруліни та швидкість нагромадження біомаси впливає інтенсивність освітлення та температура середовища, причому спостерігається чітка пряма кореляційна залежність. Оптимальним для спіруліни є температурний режим у межах 30–42 °С.

24.2. СКЛАД ЖИВИЛЬНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ВИРОЩУВАННЯ СПІРУЛІНИ

Спіруліна – вибаглива фітотрофна ціанобактерія і для свого росту вимагає збалансованого живильного середовища, до складу якого мають обов'язково входити такі біогенні елементи, як вуглець, азот, фосфор, сірка, магній, натрій, калій, залізо. Особливе значення має концентрація азоту в середовищі.

Вуглець. На відміну від наземних рослин, яким доступна лише атмосферна сполука CO_2, водорості можуть використовувати H_2CO_3 (вуглецеву кислоту) та її іони – бікарбонат (HCO_3^-) і карбонат (CO_3^{2-}). Це залежить від показника pH, солоності води, парціального тиску CO_2 в атмосфері і температури середовища. У кислих розчинах домінує оксид вуглецю (CO_2), але його вплив різко зменшується при значенні pH 7-9, коли домінує бікарбонат (HCO_3^-), а в більш лужному середовищі важливу роль починає відігравати аніон CO_3^{2-}.

Поряд з вуглецем для синтезу органічної речовини водорості використовують водень, кисень, фосфор та азот.

Азот. Спіруліна може асимілювати азот за рахунок його трьох форм: газоподібний, у вигляді неорганічних сполук та азот біополімерів. Здатність фіксувати газоподібний азот виявлено лише у прокаріот, до яких належить і спіруліна. З мінеральних сполук використовуються іони нітрату (NO_3^-), нітриту (NO_2^-) і амонію (NH_4^+).

Фосфор необхідний клітинам спіруліни для синтезу нуклеїнових кислот, фосфоліпідів і складних ефірів фосфорної кислоти. Єдиним природним джерелом неорганічного фосфору для спіруліни є ортофосфати. Синьо-зелені водорості здатні накопичувати надлишок фосфору у вигляді гранул.

У водоростей, які ростуть в умовах повного забезпечення, співвідношення трьох основних біогенних елементів C:N:P дорівнює 106:16:1. Це співвідношення відоме як закономірність Редфілда (Redfield et al., 1963). Але популяції водоростей можуть розвиватися і при співвідношенні N:P від 5:1 до 15:1.

Потреба спіруліни у мінеральних речовинах задовольняється за рахунок солей макро- та мікроелементів. Для вирощування спіруліни у штучних умовах використовуються стандартні живильні середовища Тамія, Заррука або Громова. Середовище Тамія базується на сполуках магнію та калію, середовище Громова містить переважно сполуки натрію та магнію, тоді як в середовищі Заррука, яке використовується найчастіше, міститься значна кількість бікарбонату натрію (16,8 г/л), що створює pH на рівні 9,5.

Типи живлення спіруліни. Обмінні процеси водорості забезпечуються за рахунок трьох типів живлення: автотрофного, гетеротрофного та міксотрофного.

В умовах інтенсивного освітлення та оптимального теплового режиму у спіруліни переважає автотрофне живлення. При цьому фотосинтетичні процеси відбуваються з використанням мінеральних елементів та вуглекислоти (CO_2) і здійснюються безпосередньо з живильного середовища.

В умовах гетеротрофного живлення частина енергії може надходити за рахунок асиміляції та окислення вуглеводів та інших органічних сполук. Ці процеси проходять переважно у темряві. Третій тип живлення поєднує в собі як автотрофні, так і гетеротрофні процеси обміну.

Промислова технологія нарощування біомаси спіруліни орієнтується на автотрофний тип живлення, тобто культура вирощується на мінеральному середовищі. Коли до живильного середовища додають промислові відходи спиртового, цукрового й інших виробництв, культивування буде проходити в умовах гетеротрофного живлення. Замість вуглекислоти буде використано вуглець органічних сполук – цукрів, спиртів та органіч-

них кислот. Гетеротрофне живлення може відбуватися за умов чергування освітлення та темряви.

24.3. ХІМІЧНИЙ СКЛАД І ПОЖИВНА ЦІННІСТЬ БІОМАСИ СПІРУЛІНИ

Біомаса спіруліни у середньому містить 17–18 % сухої речовини.

До складу біомаси спіруліни входять усі групи поживних речовин – білки, вуглеводи, жироподібні речовини та мінеральні сполуки.

Хімічний склад біомаси може істотно змінюватися залежно від умов культивування (склад живильного середовища, освітлення, температура, pH середовища). Шляхом зміни складу середовища, температурного режиму та режиму освітлення можна отримати біомасу спіруліни з різним співвідношенням білків, вуглеводів, жиру. Коливання концентрації білка може становити від 9 до 70 %, безазотистих екстрактивних речовин – від 6 до 38 % та жироподібних речовин – від 4 до 85,6 %.

Наприклад, біомаса спіруліни, вирощена в природних умовах у прісних ставках та водоймищах (Індія), містить 50–55 % протеїну з вмістом 44–45 % білка, а в лужних озерах (Мексика, Східна Африка) – вміст білка сягає 65 %.

Особливе значення має кількість азоту в живильному середовищі. Було випробувано 80 спеціальних середовищ для культивування спіруліни *(Piorreck M. and al., 1984)*. Встановлено, що у водоростей зі зростанням рівня азотного живлення спостерігалося збільшення інтенсивності нарощування біомаси та підвищення вмісту в ній протеїну (з 8 до 54 %).

В умовах достатнього забезпечення світлом, теплом і добре збалансованим за елементами живлення середовищем спіруліна синтезує органічну речовину з високим вмістом протеїну – до 90 %, з яких на білок припадає 60–70 % (табл. 24.2).

Білки спіруліни займають проміжне положення між білками тваринного та рослинного походження, що пояснюється низькою концентрацією лізину в протеїні спіруліни (табл. 24.3).

Суха речовина біомаси спіруліни має високий вміст вітамінів (табл. 24.4), чим і пояснюється її біологічний вплив на організм

Таблиця 24.2.

Хімічний склад біомаси спіруліни, % на суху речовину
(за Кир'яченко С.П., 1994)

Поживні речовини	*Вміст, %*	*Мінеральні речовини*	*Вміст, %*
Сирий протеїн	87–91	Зола	6–8
Білок	60–70	Кальцій	0,08–0,12
Небілкові азотисті сполуки	21–27	Фосфор	0,7–0,9
БЕР	8–10		
Жироподібні речовини	5–6		
Клітковина	1–2		

Таблиця 24.3.

Амінокислотний склад протеїну спіруліни порівнянно з протеїнами інших мікроорганізмів *(за Кир'яченко С.П., 1997)*

Амінокислоти	*"Ідеальний протеїн"*	*Міститься в протеїні, %*			
		спіруліни	*хлорели*	*дріжджів*	*інфузорій рубця ВРХ*
Лізин	7,0	5,15	7,20	6,8	10,2
Лейцин	7,0	8,96	8,88	6,3	7,8
Валін	4,9	7,68	6,44	5,5	4,8
Треонін	4,2	5,63	5,04	5,0	5,2
Ізолейцин	3,8	5,78	3,73	5,2	6,3
Фенілаланін	3,8	5,20	5,29	4,3	5,3
Тирозин	2,9	4,64	3,10	4,2	4,4
Гістидин	2,3	1,50	1,60	1,7	1,8
Метіонін	1,9	2,54	1,59	1,8	2,1
Цистин	1,6	0,90	0,70	0,9	1,3
Триптофан	1,0	1,53	1,59	1,3	1,4

Таблиця 24.4.

Вміст вітамінів у сухій речовині спіруліни та хлорели, мг/кг
(за Кир'яченко С.П., 1994)

Вітаміни	*Спіруліна*	*Хлорела*	*Вітаміни*	*Спіруліна*	*Хлорела*
Каротиноїди	2200	1900	Холінхлорид	3500	3000
Бета-каротин	1700	1000	Філохінон	12	10
Рибофлавін (B_2)	30	25–40	Піридоксин (B_6)	4	9
Токоферол (Е)	190	140	Кобаламін (B_{12})	1,6	0,09
Ніацин (РР)	168	120	Інозитол	350	30
Тіамін (B_1)	55	15	Ергостерин	300	500

Таблиця 24.5.

Жирокислотний склад «сирого» жиру спіруліни
(за Кир'яченко С.П., 1997)

Жирні кислоти	*Довжина радикалу вуглецю*	*Міститься в 1 кг сухої речовини*
Пальмітинова	C_{16}	16–20 г
Пальмітиноолеїнова	C_{16}	1,5–2,0 г
Лінолева	C_{18}	12–14 г
Олеїнова	C_{18}	2–3 г
Гамма-лінолева	C_{18}	11–14 г
Інші жирні кислоти	–	700–7000 мг
Лауринова	C_{12}	200 мг
Міристинова	C_{14}	600 мг
Гектадієнова	C_{17}	120 мг
Стеаринова	C_{18}	150 мг
Дельта-ліноленова	C_{18}	300 мг

як молодих, так і плідних тварин. Особливо слід відзначити наявність у спіруліни таких вітамінів, як токоферол, ергостерин, інозитол і кобаламін, роль яких дуже важлива у процесах відтворення. Окрім цього, більшість з названих вітамінів не виробляються в Україні і мають ввозитися з-за кордону.

Вміст сирого жиру та його жирокислотний склад у біомасі спіруліни залежать від багатьох факторів, і в першу чергу – від кількості азоту в живильному середовищі. При низькому рівні азоту в середовищі водорості синтезують більше ліпідів, ніж білка. До складу ліпідів спіруліни входять такі ненасичені жирні кислоти, як лінолева і ліноленова, на частку яких може припадати понад 50 % від загальної суми жирних кислот (табл. 24.5). Відомо, що вони за біологічною роллю належать до незамінних, тобто в організмі людини та тварини вони не синтезуються з попередників.

До складу сухої речовини спіруліни входять усі біогенні макро- та мікроелементи і вміст їх залежить від наявності цих елементів у живильному середовищі. При культивуванні спіруліни у морській воді або в солоних озерах в біомасі міститься йод. При штучному вирощуванні спіруліни, збільшуючи вміст йоду у стандартних живильних середовищах, можна досягти значного підвищення кількості мікроелементу в біомасі.

Присутність у середовищі для культивування селеніту натрію сприяє збагаченню спіруліни (S.platensis) селеном у зв'язаній з органічними сполуками формі – з білками, пептидами і поліпептидами *(Зарецька Є.С. та ін., 2003)*. Саме такі форми порівняно з неорганічними солями мають найбільшу біодоступність і ступінь утримання в організмі. Суттєвим є також значно менша токсичність органічних форм селену порівняно з селеніт- і селенат-аніонами. Автори дійшли висновку, що спіруліна є перспективним об'єктом для біотехнологічного одержання нових харчових форм селену. Встановлено, що нестача селену є фактором ризику розвитку онкологічних захворювань, а також призводить до підвищення вірулентності хвороботворних вірусів.

Лабільність мінерального складу спіруліни дає можливість одержувати біомасу з необхідною концентрацією біогенних елементів.

За даними Кир'яченко С.П. (1994, 1997), біомаса спіруліни має наступний мінеральний склад (табл. 24.6).

Таблиця 24.6.

Вміст макро- та мікроелементів у сухій біомасі спіруліни

Макроелементи	*Міститься, г/кг сухої біомаси*	*Мікроелементи*	*Міститься, мг/кг сухої біомаси*
Калій	12–15	Залізо	500–600
Фосфор	7–9	Марганець	150–200
Хлор	3–4	Мідь	100–120
Магній	1,2–1,8	Цинк	30–40
Кальцій	0,8–1,2	Молібден	10–20
Сірка	0,6–0,8	Кобальт	0,3–0,5
Натрій	0,3–0,4	Йод	0,2–0,3

24.4.ВИКОРИСТАННЯ БІОМАСИ СПІРУЛІНИ

Зважаючи на важливість використання біомаси спіруліни у харчуванні людей, у різних країнах були проведені численні досліди на лабораторних тваринах з вивчення її харчових властивостей та токсикологічні дослідження з метою встановлення мутагенного впливу. Доведено, що тварини, у раціонах яких весь білок був представлений білком спіруліни, мали нормальний ріст і серед них не спостерігалось жодних аномалій і патологій. Дослідження на вагітних тваринах показали відсутність тератогенних властивостей та фітотоксичності спіруліни.

Біомаса спіруліни застосовується у годівлі тварин як домішка до раціонів птиці, свиней та риб. Позитивний вплив на м'ясну і яєчну продуктивність курей відмічено китайськими дослідниками при введенні сухої біомаси спіруліни в дозі 5 % від маси раціону. В дослідах Росса й ін. *(Ross E., Domini W. and al., 1990)* півникам породи легорн включали до раціону суху масу спіруліни у кількості 5, 10, 15 і 20 % до маси раціону. Встановлено сповільнення інтенсивності росту птиці на раціонах, які містили 10–20 % спіруліни, тоді як 5 % давало позитивний результат.

Введення спіруліни в раціон курей забезпечувало більш інтенсивне забарвлення яєчного жовтка пігментами спіруліни, що дозволило уникнути використання дорогих хімічно синтезованих сполук *(Альбер Сассон, 1987)*.

В Україні в Інституті кормів УААН та в умовах промислового свинокомплексу АТ «Русь» Золотоніського району Черкаської області були проведені досліди щодо з'ясування ефективності використання біомаси спіруліни свиням *(Кир'яченко С.П., Прокопенко Л.С., 1994, 1997)*.

Установлено, що введення в раціони відлучених у місячному віці поросят пастоподібної біомаси спіруліни в кількості 1–2 г на голову на добу підвищує середньодобові прирости живої маси на 8–50 % залежно від пори року. Спостереження показали, що при згодовуванні поросятам спіруліни повністю вдалося запобігти виникненню шлунково-кишкових захворювань, стимулювалось прискорення активації ферментативних процесів у шлунку і кишечнику, збуджувався апетит поросят до поїдання кормів, в першу чергу рослинних. Як наслідок, краще збереження поголів'я молодняка на 10–14 %. Згодовування пасти спіруліни супоросним та підсисним свиноматкам у дозі від 2 до 20 г на голову на добу сприяє підвищенню їх резистентності та стійкості до стресів.

Автори вважають, що біологічна доцільність виробництва біомаси спіруліни на корм сільськогосподарським тваринам обумовлена позитивним впливом спіруліни на загальну та протеїнову поживність раціонів, покращенням процесів обміну речовин та підвищенням резистентності тварин.

Одним із напрямів використання біомаси спіруліни є застосування її в аквакультурі: каротиноїди та фікоціаніни впливають на яскравість забарвлення лосося, форелі та ракоподібних, підвищуючи насиченість забарвлення спини та боків. Жирні кислоти з довгим ланцюгом позитивно впливають на продуктивність риби *(Borowtzka L. J. and al., 1990)*.

Згодовування біомаси спіруліни смугастим щукам в кількості 5–10 % від загальної маси раціону вплинуло на забарвлення шкіри – спина риб стала веселково-зеленувато-сірою, а тулуб з характерною жовтою смужкою. Риби, які отримували замість спіруліни морожену рибу, мали тьмяне забарвлення.

В Японії при годівлі спіруліною декоративного коропа він набуває дуже гарного кольору завдяки пігментам ціанобактерії.

Аналізуючи харчові та кормові властивості спіруліни, дослідники виділили декілька факторів, які надають їй переваги

над іншими кормами рослинного походження: це вміст білка в сухій речовині, амінокислотний склад білка, концентрація ненасичених жирних кислот у складі ліпідів біомаси та вітамінний склад.

Поряд з використанням біомаси спіруліни як кормового засобу та харчової добавки вона застосовується як сировина для отримання синьо-зелених пігментів – антоціаніну, фікоціаніну. В Японії синій барвник застосовується для забарвлення жувальних гумок, безалкогольних напоїв тощо. Фруктові соки, забарвлені фікоціаніном у зелений колір, не втрачають його навіть в умовах зберігання протягом року.

Встановлено, що в умовах культивування спіруліни в різних середовищах продукти життєдіяльності цієї водорості згубно діють на деякі види бактерій. Наприклад, якщо вводили в культуру спіруліни бациллус субтіліс і стафілококус ауреус, вони зникали уже через 24 години, а розвиток дріжджів сповільнювався і клітини не виявляли здатності до брунькування.

Спіруліна використовується також у гуманній медицині як профілактичний та лікувальний засіб.

24.5. ТЕХНОЛОГІЯ ВИРОЩУВАННЯ СПІРУЛІНИ ДЛЯ ВИКОРИСТАННЯ В ГОДІВЛІ ТВАРИН

В Україні в 1989–1990 рр. в умовах радгоспу «Росія» була розроблена установка для промислового культивування S. platensis для використання в годівлі тварин (рис. 24.1).

До складу комплекту обладнання входять багатоповерхові секційні батареї неглибоких ванн або лотків, обладнаних системою активного перемішування середовища. В них протягом восьмидобового робочого циклу підтримується життєдіяльність спіруліни. Лотки мають робочу поверхню площею 3,5 м^2 з загальним об'ємом 600 л, а в робочому стані кількість рідини в лотках становить 400–500 л. При цій кількості глибина культивованого шару становить 15–17 см.

Під час культивування спіруліни використовували мінеральне середовище Заррука (табл. 24.7).

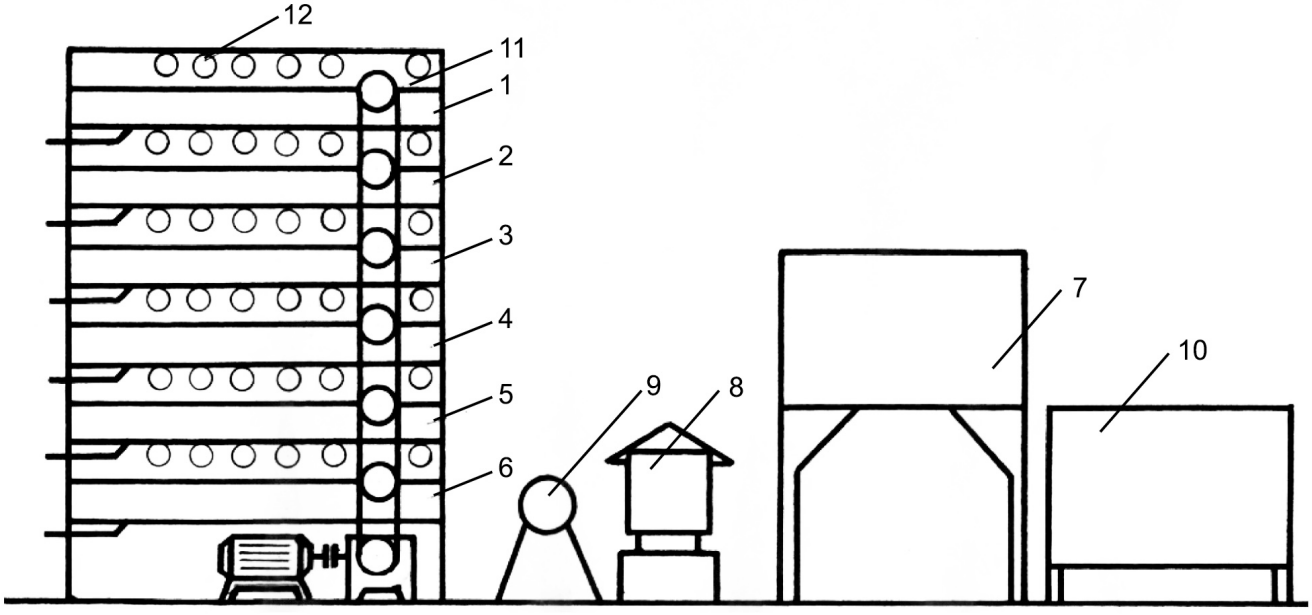


Рис. 24.1. ***Схема установки для вирощування спіруліни (за Кир'яченко С.П., 1994):***
1....6 — багатоярусна батарея лотків для розмноження та накопичення біомаси спіруліни; 7 — ємність для маточної культури та тимчасового зберігання готового продукту перед сепаруванням; 8 — сепаратор; 9 — помпа; 10 — ємність для приготування та зберігання запасу живильного середовища; 11 — привід системи управління перемішуванням суспензії в лотках; 12 — система освітлення.

Таблиця 24.7.

Склад середовища Заррука, г/л

$NaHCO_2$ .....(гідрокарбонат натрію).....	16,8
$NaNO_3$.....(нітрат натрію).....	2,5
K_2SO_4.....(калій сірчанокислий).....	1,0
NaCl.....(натрій хлористий).....	1,0
$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$.....(калій кислий фосфорнокислий двозамінний триводний).....	0,5
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$.....(магній сірчанокислий 7-водний).....	0,2
$CaCl_2 \cdot 6H_2O$.....(кальцій хлористий 6-водний).....	0,04

Це забезпечує таку концентрацію основних макроелементів (мг на 1 л середовища):

натрію..... 5723	фосфору.....63
азоту.. 412	магнію.. 20
калію.. 620	хлору... 13
сірки.. 210	кальцію.....7

Для інтенсифікації обмінних процесів до середовища необхідно включати також і солі біогенних мікроелементів. Максимальна початкова концентрація мікроелементів у середовищі для спіруліни не повинна перевищувати наступних величин (мг/л): за залізом ... 50, марганцем ... 5, бором... 3, цинком ... 2, міддю ... 1, молібденом ... 1, кобальтом ... 0,01.

Але, як показують дослідження, в технологічному процесі культивування спіруліни дуже важливу роль відіграє вуглець. Спіруліна пристосована для життєдіяльності в лужному середовищі і асимілює вуглець саме з мінеральних сполук.

У лотки з мінеральним середовищем вноситься маточна культура в кількості 100–200 г в кожний лоток. За оптимальних умов (температура 34–36 °С) за 8–10-добовий цикл нарощування вона збільшується в 5–10 разів, а абсолютно суха біомаса – на 600 % порівняно з початковою масою.

На початку культивування при pH 9,4 частка вільно розчиненого CO_2 в середовищі не перевищує 0,02 % від загальної його кількості. Це може сповільнити синтетичні процеси, а тому

на початкових фазах розвитку культури доцільно барботувати середовище повітряно-вуглекислотною сумішкою, що змінює співвідношення між карбонатами і бікарбонатами. Як відомо, під час культивування спіруліни в бікарбонатному середовищі буде споживатися іон $-HCO_3$, а натрій як метаболіт обміну накопичується в середовищі, викликаючи процес зміни показника pH в лужний бік. На думку деяких авторів, для барботування середовища можна використовувати діоксид вуглецю біогазу.

Культивування водорості проводиться в умовах штучного освітлення за допомогою люмінесцентних ламп ЛБ потужністю 40 Вт кожна. Лампи розміщуються групами по 12 штук над кожною ванною.

Весь процес нарощування біомаси спіруліни, який триває 8 діб, умовно можна поділити на чотири фази по 2 доби на кожну.

Перша фаза – адаптації. Спостереження показали, що після внесення маточної культури в свіже середовище відбувається гальмування швидкості розмноження спіруліни. Умовно цю фазу можна назвати фазою адаптації та відновлення синтетичної активності. Невисока початкова концентрація клітин і слабка їх фотосинтетична активність не потребує високої освітленості, тому вмикаються тільки по 3 лампи над кожною ванною, які забезпечують освітленість відкритої поверхні в 1100 люксів.

Друга фаза розвитку культури спіруліни розпочинається через 40–48 годин і є початком активного фотосинтезу з виділенням кисню. Кількість клітин зростає і це вимагає підвищення інтенсивності освітлення поверхні ванн. Протягом другої фази освітлення забезпечується 6-ма лампами ЛБ, що збільшує освітленість до 2000 люксів.

Третя фаза пов'язана з виходом за активністю нарощування культури на біологічне плато. У цей період відбувається сепарація клітин на важкі, з вищою питомою вагою від живильного середовища, та легкі клітини, які мають високу фотосинтетичну активність. Ці клітини локалізуються в поверхневому шарі лотків за рахунок вивільнення в процесі фотосинтезу бульбашок кисню, які підтримують їх плавучість і поновлюються за рахунок інтенсивного споживання вуглецю. Ця фаза теж потребує активного освітлення для підтримання синтетичних процесів на високому рівні. У цей період на освітлен-

ня поверхні працює 9 люмінесцентних ламп, які створюють загальну освітленість на рівні 3000–3200 люксів.

Четверта фаза технологічного процесу пов'язана з початком старіння культури. Під дією активних фотосинтетичних процесів значна кількість необхідних для життєдіяльності речовин використана на синтетичні процеси. А в самому середовищі накопичується значна кількість метаболітів, які розпочинають гальмувати процеси фотосинтезу та створюють відповідну напругу в обміні. Для підвищення активного фотосинтезу виникає необхідність додаткового введення свіжого живильного середовища та підвищення інтенсивності освітлення. У цей час використовуються усі 12 ламп, що забезпечує освітленість на рівні 4200 люксів.

Інтенсифікувати процеси фотосинтезу у спіруліни під час культивування її в багатоповерхових ваннах можна за допомогою активного перемішування суспензії. Це створює умови, за яких частина променів буде поглинатися фотоактивними центрами багатьох клітин, котрі розміщуються в різних рідинних шарах і безліч разів будуть підніматися до поверхні рідини. Перемішування проводиться за допомогою мішалок в 23 оберти за хвилину.

Примусове циркулювання рідини забезпечує піднімання з осаду клітин, які мають більші розміри, і створює умови для кращого їх живлення, розчинення мінеральних солей та виведення метаболітів з безпосередньої зони життєдіяльності окремих клітин. Створює також приблизно рівний температурний режим для всіх клітин, які знаходяться в одному лотку.

На думку авторів, запропонована ними конструкція є ефективнішою в порівнянні із закритими циркуляційними системами, розробленими американською фірмою «Літтл» та деякими японськими фірмами, або закритими глибинними системами інших фірм.

24.6. ВИРОЩУВАННЯ СПІРУЛІНИ ДЛЯ ВИКОРИСТАННЯ У ФАРМАЦЕВТИЧНІЙ ПРОМИСЛОВОСТІ

Там, де це можливо за екологічних і кліматичних умов, спіруліну вирощують у відкритих водоймищах. Перевагою цього методу є можливість використання природних енергетичних ресурсів. Основні недоліки таких установок: труднощі підтримання чистих культур, необхідність використання системи утеплення за несприятливих умов. Установки відкритого типу використовуються в Болгарії, Італії, Мексиці, Ізраїлі, Чилі, Бразилії, Таїланді, Індії, Китаї, США (Каліфорнія), Середній Азії, Казахстані.

У регіонах з помірним кліматом перевагу надають культивуванню водорості в умовах закритого ґрунту (площинний метод). Японія спіруліну вирощує у теплицях на площі 10 тис. га, Італія – 2,5 тис. га, Франція – 3 тис. га, Україна –12 га, Молдова – 1 га.

Процес вирощування здійснюється у спеціальних фітосинтезуючих блоках. Розміщені на закритому ґрунті у теплиці (рис. 24.2) фітоблоки заповнюються поживним середовищем чітко визначеного складу, що повторює склад води озера Чад. У фірмі «Спіруліна ЛТД» при цьому використовується найчистіша артезіанська вода. Оптимальними умовами для вирощування спіруліни площинним методом є освітленість 4–6 кЛк на м^2 і температура поживного середовища 26–28 ^{e}С.

Морфологічний стан культури залежить від співвідношення спіральних форм до ниткових. Стійка перевага тієї чи іншої форми свідчить про адаптацію культури до даних умов вирощування. Дрібне введення в середовище азоту і вуглецю у вигляді бікарбонату амонію збільшує кількість спіральних форм в культурі *(Берестов В.А., 1999)*.

За відсутності теплиць використовуються фітореактори, які установлюються у будь-яких пристосованих приміщеннях. Запропоновані різні конструкції фітобіореакторів: вертикальні, горизонтальні, поліетиленові та скляні трубчасті.

В Україні для вирощування спіруліни використовуються вертикальні установки етажеркового типу. Терасно-каскадна

установка для культивування мікроводоростей з раціональним використанням природного і штучного освітлення розроблена фахівцями Інституту ботаніки НАН України *(Берестов В.А., 1999)*.

В Інституті гідробіології НАН України створені закриті трубчасті системи для масового культивування спіруліни загальним об'ємом майже 10000 кг гідромаси, накопичений досвід експлуатації і оптимізовані умови її одержання. Розроблені технології зневоднення біомаси, консервування і подальшої переробки. Спільно з Інститутом харчування МОЗ України проведена медико-біологічна оцінка одержаної біомаси, розроблені й апробовані на практиці низка технологій харчового і фармацевтичного використання препаратів, одержаних на основі водоростей *(Берестов В.А., 1999)*.

Перевага установок закритого типу перед відкритими полягає у можливості підтримки чистоти культури, наявності автоматизації, створенні умов, які б перешкоджали забрудненню

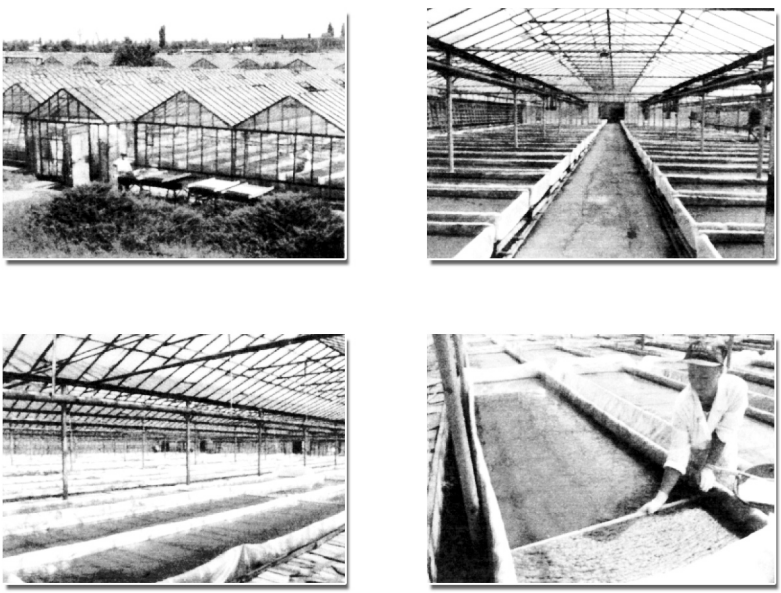


Рис. 24.2. ***Загальний вигляд технології вирощування епіруліни у фірмі «Спіруліна ЛТД» м. Миколаїв***
(за Берестовим В. А., 1999)

суспензії та забезпеченні високої продуктивності штамів водоростей, що культивуються.

Україна стала 61-ю державою світу, яка культивує спіруліну. В Росії вирощують спіруліну у невеликій кількості у Московському університеті (МДУ), а в промисловому масштабі – в м. Сочі (ТОВ «Агро-Вікторія»). Усі вони реалізують вітамінний продукт під назвою «СПЛАТ». Одна таблетка містить 0,25 г чистої спіруліни і майже 0,25 г добавок, які покращують її смак і розчинність. Серед країн СНД Україна має найбільші досягнення щодо опанування технології вирощування синьо-зелених водоростей та вивчення їх лікувальних і профілактичних властивостей при багатьох захворюваннях людей.

Численними дослідженнями було встановлено, що біомаса спіруліни містить абсолютно усі речовини, необхідні людині для нормальної життєдіяльності. Спіруліна є універсальним біопротектором і біокоректором системної дії, який забезпечує усунення більш ніж 300 «поломок» у нашому організмі на різних стадіях *(Берестов В.А., 1999)*.

У клітинній стінці S.platensis містяться альгінати – унікальні біосумісні поліаніонні (кислі) поліцукри, які мають властивість звільнювати організм людини і тварин від радіонуклідів (стронцію, цезію) і важких металів (свинцю, кадмію тощо).

В колишньому Радянському Союзі препарат зі спіруліни мав назву «Продукт № 001А», а його склад і характеристики були засекречені.

Контрольні питання

1. Загальна характеристика спіруліни. Що є характерною ознакою цієї водорості?
2. Які перспективи вирощування та використання біомаси спіруліни?
3. Які біогенні елементи повинні обов'язково входити до складу живильного середовища для вирощування спіруліни?
4. Які типи живлення характерні для спіруліни?
5. Від чого залежить хімічний склад і поживна цінність спіруліни?
6. На які біогенні елементи багата спіруліна?
7. На якому поживному середовищі культивується спіруліна у штучних умовах?
8. Які аспекти і перспективи використання спіруліни?
9. Ким і коли в Україні було розроблено біотехнологію вирощування спіруліни для використання у годівлі сільськогосподарських тварин?

ОСНОВНА ЛІТЕРАТУРА

1. *Артамонов В.И.* Биотехнология — агропромышленному комплексу. — М.: Наука, 1989. — 160с.
2. *Бейли Дж., Оллис Д.* Основы биохимической инженерии: Пер. с англ.: В 2 ч. — М.: Мир, 1989. — Ч. 1 — 692 с.; Ч. 2 — 590 с.
3. *Берестов В.А.* Спирулина — наше здоровье и долголетие. — Николаев: МПКФ „Спирулина ЛТД», 1999. — 28с.
4. Биоконверсия в управлении агроэкосистемами / *Городний Н.М., Тивончук С.А., Бэрри Э.С., Быкин А.В.* — К.: УкрИНТЭИ, 1996. — 232с.
5. Биология клетки в культуре / *Никольский Н.Н., Вахтин Ю.Б., Игнатова Т.Н.* и др. — Л.: Наука, 1984. — 270 с.
6. Биотехнология / Под редакцией Баева А.А. — М.: Наука, 1984. — 309 с.
7. Биотехнология: Учебн. пособие для вузов. В 8 кн. / Под ред. Егорова Н.С., Самуилова В.Д. — М.: Высш. шк., 1987–1988.

– Кн. 1: Проблемы и перспективы / Егоров Н.С., Олексин А.В., Самуилов В.Д. — М.: Высш. шк., 1987. — 159 с.
– Кн. 2: Современные методы создания промышленных штаммов микроорганизмов / Дебабов В.Г., Лившиц В.А. — М.: Высш. шк., 1988. — 208 с.
– Кн. 3: Клеточная инженерия / Бутенко Р.Г., Гусев М.В., Киркин А.Ф. и др. — М.: Высш. шк., 1987. — 127с.
– Кн. 4: Автоматизация биотехнологических исследований / Зудин Д.В., Кантере В.М., Угодчиков Г.А. — М.: Высш. шк., 1988. — 112 с.
– Кн. 5: Производство белковых веществ / Быков В.А., Манаков М.Н., Панаримов В.И. и др. — М.: Высш. шк., 1987. — 142 с.
– Кн. 6: Микробиологическое производство биологических активних веществ и препаратов / Быков В.А., Крылов И.А., Манаков М.Н. и др. — М.: Высш. шк., 1987. — 143 с.
– Кн. 7: Иммобилизованные ферменты / Березин И.В., Клечко Н.Л., Левашов А.В. и др. — М.: Высш. шк., 1987. — 159 с.
– Кн.8: Инженерная ензимология / Березин И.В., Клесов А.А., Швядас В.К. и др. — М.: Высш. шк., 1987. — 143 с.

8. Біопалива (технології, машини і обладнання) / Дубровін В., Корчемний М., Масло І. та ін. — К.: ЦТІ «Енергетика і електрифікація», 2004. — 256 с.
9. Вермикультура: производство и использование / Повхан М.Ф., Мельник И.А., Андриенко В.А. и др. — К.: УкрИНТЭИ, 1994. — 128 с.
10. *Герасименко В.Г.* Биотехнология: Учебн. пособие. — К.: Высш. шк., 1989. – 343 с.
11. *Герасименко В.Г.* Біотехнологічний словник. — К.: Вища шк., 1991. — 167 с.
12. *Герасименко В.Г., Герасименко М.О.* Біотехнологія у тваринництві // у підручнику «Генетика сільськогосподарських тварин». — К.: «Урожай», 1996. — С. 188–233.
13. *Девис Р., Ботстайн Д., Рот Дж.* Методы генетической инженерии. Генетика бактерий. — М.: Мир, 1984. — 176 с.
14. *Елинов Н.П.* Основы биотехнологии. — Санкт-Петербург: Наука, 1995. – 600 с.
15. Иммобилизованные клетки / Рыбальский Н.Г., Чаплина И.Г. — М.: ВНИИПИ, 1990. — 108 с.
16. Инженерная энзимология (иммобилизованные ферменты и другие биологически активные вещества) / Скородумова О.В., Рыбальский Н.Г. — М.: ВНИИПИ, 1990. — 87 с.
17. Клонирование ДНК. Методы: Пер. с англ. / Под ред. Гловера Д. — М.: Мир, 1988. – 538 с.
18. *Коротяев А.И., Лищенко Н.Н.* Молекулярная биология и медицина. — М.: Медицина, 1987. – 288 с.
19. *Маниатис Т., Фрич З., Сэмбрук Дж.* Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. — М.: Мир, 1984. – 48 с.
20. Належна виробнича практика (GMP) та належна дистриб'юторська практика (GDP) ветеринарних препаратів / За ред. Головка А.М. , Вербицького П.І. — К.: Реферат, 2003. — 96 с.
21. *Ніколайчук В.І., Горбатенко І.Ю.* Генетична інженерія. — Ужгород, 1999. – 101 с.
22. *Сассон Альбер.* Биотехнология: свершения и надежды. — М.: Мир. 1987. – 441 с.
23. Kompost und Wurmhumus / Sulzberger, Robert. — Zurich: BLV, 1998. — 128 с.

РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. *Актуганов Г.Э., Мелентьев А.И., Широков А.В.* Коллоидный хитозан как афинный адсорбент для очистки хитозаназы штамма Bacillus sp. 739 //Биотехнология. — 2003. — № 6. — С. 3–9.
2. Биотехнология в современном мире: польза и риски /Под редакцией Блюма Я.Б. //Цитология и генетика. — 2002.– № 1. — С. 59–80.
3. *Гелетуха Г., Кобзарь С.* Впровадження біогазових установок у сільському господарстві України //Пропозиція. — 2001. — № 11. — С. 26–27.
4. *Жарникова И.В.* Структурированный керамический носитель с магнитным материалом для иммобилизации антител // Биотехнология. — 2004. — № 1. — С. 71–76.
5. *Зарецкая Е.С., Глюшинский И.В., Зорин С.Н. и др.* Количественная оценка содержания органической формы микроэлемента селена в составе биомассы одноклеточной синезеленой водоросли Spirulina platensis //Биотехнология. — 2003. — № 4. — С. 75–82.
6. *Йенс Бо Гольм-Нільсен, Теодоріта Аль Сеаді.* Огляд сучасного стану виробництва біогазу в Європі //Пропозиція. — 2002. — № 11. — С.80–82.
7. *Кир'яченко С.П., Прокопенко Л.С.* Використання біомаси Spirulina platensis на кормові та харчові цілі /огляд зарубіжної літератури/. — Черкаси: ЧеркасМТЦНТЕІ, 1995. — 44с.
8. *Левчук Ю.М.* Вклад Нобелевских лауреатов в биохимию и молекулярную биологию. //Український біохімічний журнал. — 2003. –т. 75, № 5. — С. 128–150.
9. *Коваленко Г.А., Комова О.В., Симаков А.В. и др.* Углеродсодержащие макроструктурированные керамические носители для адсорбционной иммобилизации ферментов и микроорганизмов. II. Биокаталитические свойства адсорбированной глюкоамилазы //Биотехнология. — 2002. — № 5. — С. 81–93.
10. *Коваленко Г.А., Сухинин С.В., Симаков А.В. и др.* Роторно-инерционный биореактор для гетерогенных биокаталитических процессов. I. Ферментный гидролиз крахмала // Биотехнология. — 2004. –№ 1. — С. 83–90.

11. Хитин и хитозан: Получение, свойства и применение / Под ред. Скрябина Г.К., Вихоревой Г.А., Варламова В.П. — М.: Наука, 2002. — 368с.
12. *Шагинурова Г.Э., Сироткин А.С., Емельянов В.М. и др.* Получение и культивирование гранул аэробных микроорганизмов в отъемно-долевом процессе очистки сточных вод. // Биотехнология. — 2003. — № 3. — С. 80–89.
13. *Ясенецький В., Клименко В.* Світові тенденції розвитку біогазових установок / Пропозиція. — 2001. — № 12. — С. 92–95.

СЛОВНИК ТЕРМІНІВ

А

АЕРАЦІЯ — насичення органічних відходів і субстрату з вермікультурою атмосферним повітрям і виведення із них шкідливих газів.

АЕРОБ — організм, життєдіяльність якого можлива за наявності кисню та його використанні в процесі метаболізму.

АЕРОБНІ УМОВИ — умови попередньої підготовки органічних відходів і вермікомпостування, які потребують вільного доступу кисню в органічний матеріал.

АЗОТИСТІ ОСНОВИ — хімічні сполуки, які входять до складу нуклеотидів нуклеїнових кислот і є похідними органічних, азотовмісних гетероциклічних сполук – пурину і піримідину.

АКТИВАЦІЯ АМІНОКИСЛОТ — реакція приєднання амінокислоти до своєї транспортної РНК перед процесом трансляції.

АКТИВНИЙ ЦЕНТР (АЦ) — ділянки поверхні *ферменту*, де здійснюється взаємодія з молекулою *субстрату* і перетворення останнього в продукти реакції.

АМІНОКИСЛОТИ — азотовмісні органічні сполуки, молекули яких містять карбоксильну (–COOH) й

амінну ($-NH_2$) групи, що мають здатність реагувати між собою з утворенням *ковалентного* пептидного

$$(-\,NH-\overset{\overset{O}{\|}}{C}-)$$ *зв'язку*

АМІНОКИСЛОТНА ПОСЛІДОВНІСТЬ характеристика первинної структури білка; являє собою порядок чергування у ньому амінокислотних залишків.

АМПЛІФІКАЦІЯ процес збільшення копій гена.

АНАБІОЗ ВЕРМІКУЛЬТУРИ стан вермікультури, що характеризується значним сповільненням процесів життєдіяльності.

АНАЕРОБ організм, який може жити в умовах без кисню.

АНАЛІЗ РЕСТРИКЦІЙНИЙ визначення структури *ДНК* шляхом розщеплення цієї молекули *ферментами рестриктазами*.

АНТИБІОТИКИ специфічні продукти життєдіяльності мікроорганізмів, які мають протимікробну дію.

АНТИГЕН молекула, яка здатна при введенні до організму хребетних ініціювати імунну реакцію утворення *антитіл,* що взаємодіють з речовиною, яка зумовила утворення антитіла.

АНТИГЕННА ДЕТЕРМІНАНТА (ЕПІТОП) олігопептидна чи олігоцукридна ділянка білкової або поліцукрової молекули, що має здатність ініціювати синтез специфічних *антитіл*.

АНТИКОДОН ділянка транспортної РНК, яка складається із трьох залишків нуклеотидів.

АНТИСИРОВАТКА сироватка, отримана від тварини в результаті її гіперімунізації антигенним матеріалом, і така, що містить гетерогенну суміш *антитіл,* кожен тип яких синтезовано різними клонами *В-лімфоцитів.*

АНТИТІЛА моноклональні (антитіла одного епітопу) однорідні за хімічним складом, структурою і специфічністю *антитіла,* синтез яких здійснюється в клонованих *гібридних клітинах (гібридомах).* Вони продукуються потомками однієї-єдиної клітини.

АНТИТІЛО білкова молекула, що належить до *імуноглобулінів,* синтезована клітинами імунної системи хребетних у відповідь на введення *антигена* і здатна до специфічної взаємодії з ним.

АСЦИТНА ПУХЛИНА злоякісна пухлина черевної порожнини у мишей у вигляді клітин, які знаходяться в зависі у внутрішньочеревній рідині.

АУКСОТРОФ клітина, що з якихось причин (найчастіше в результаті мутацій) втратила здатність синтезувати потрібні для її росту речовини *(амінокислоти,* вітаміни тощо).

Б

БАКТЕРІОФАГ (фаг) — вірус бактерій; як правило, містить тільки ДНК або РНК, які оточені білковою оболонкою. Бактеріофаг λ широко використовують як *вектор* при *конструюванні рекомбінантних ДНК.*

БЕЗІНТРОННИЙ СТРУКТУРНИЙ ГЕН — ген, який не має інтронів.

БЕЗТИМУСНІ МИШІ — миші, які не мають тимуса і тому позбавлені усіх імунологічних функцій, що залежать від Т-лімфоцитів, зокрема, нездатні до відторгнення трансплантатів.

БІЛОК-РЕПРЕСОР — здатен зв'язуватись із оператором на ДНК або РНК, запобігаючи відповідно транскрипції або трансляції.

БІОГАЗ — енергоносій, який являє собою суміш газів, що складається з метану (60–70 %), діоксиду вуглецю (30–40 %), невеликої кількості сірководню, а також домішок водню, аміаку, оксидів азоту. Головним компонентом біогазу є метан.

БІОГАЗОВА УСТАНОВКА (БГУ) — комплект устаткування, що включає ємність для нагромадження і зберігання гною, ферментер (реактор, бродильна камера, метантенк), резервуар, для збирання і зберігання біогазу (газгольдер або газозбірник) і використовується для виробництва *біогазу* із застосуванням анаеробної ферментації *біомаси* гною або *субстрату* іншого походження. Біогазова

установка включає також обладнання для нагрівання і перемішування, систему трубопроводів, помпи і газові компресори, центрифужні пристрої, контрольно-вимірювальну апаратуру і засоби автоматизації.

БІОГУМУС органічне високоефективне добриво, отримане при вермікультивуванні органічних відходів.

БІОДЕГРАДАЦІЯ процес розкладання матеріалів на більш прості, звичайно хімічні складові під дією живих організмів (наприклад, мінералізація органічних відходів).

БІОКОНВЕНСІЯ трансформація речовин із однієї форми в іншу біологічними агентами (живими організмами або ферментами).

БІОЛОГІЧНІ ПРЕПАРАТИ (БІОПРЕПАРАТИ) засоби біологічного походження, які використовується для діагностики і профілактики інфекційних та інвазійних хвороб, лікування тварин і підвищення їх продуктивності.

БІОМАСА органічні речовини, які утворюються в процесі фотосинтезу в результаті вловлювання рослинною клітиною за допомогою хлорофілу сонячної енергії і наступного перетворення її в енергію хімічних зв'язків синтезованих вуглеводовмісних сполук.

БІОСИНТЕЗ утворення складних сполук із більш простих за допомогою ферментів.

БІОЦЕНОЗ сукупність тварин, рослин, грибів та мікроорганізмів, які спільно населяють ділянку суші або водойми (інакше, сукупність усіх живих організмів), взаємопов'язаних у ланцюгу харчування і які впливають один на одного.

БІСЕКСУАЛЬНІСТЬ наявність у виду двох статей – чоловічої і жіночої.

БУРТУВАННЯ складання органічних відходів у бурти для ферментації.

В

ВАКЦИНА препарат, виготовлений з ослабленого або убитого інфекційного агента чи його окремих компонентів, які містять *антигенні детермінанти,* здатні індукувати стан несприйнятливості (імунітету) до даної інфекції в особин, яким зроблено щеплення.

ВЕКТОР молекула ДНК, що має здатність до автономної реплікації в клітині-хазяїні, в яку можна ввести додатковий *фрагмент* чужорідної ДНК і надалі забезпечити його реплікацію (наприклад, як вектор можна використати *плазміду або бактеріофаг).*

ВЕКТОР ДЛЯ КЛОНУВАННЯ будь-яка плазміда або фаг, у котрі може бути вбудована чужорідна ДНК з метою клонування.

ВЕРМІКУЛЬТУРА компостні черв'яки в органічному субстраті.

ВЕРМІКУЛЬТИВУВАННЯ штучне розведення компостних черв'яків.

ВИБІРКА ВЕРМІКУЛЬТУРИ технологічний процес, скерований на відділення вермікультури від вермікомпосту.

ВІДПАЛ процес відновлення нативної структури денатурованої молекули ДНК підтриманням температури, дещо нижчої за $T_{пл}$.

ВІРІОН позаклітинна форма вірусної частки.

ВІРУСИ інфекційні агенти неклітинної природи, які характеризуються внутрішньоклітинним паразитизмом, дуже малими розмірами, простотою хімічного складу і структурної організації.

ВОДНЕВИЙ ЗВ'ЯЗОК слабка електростатична взаємодія між електронегативним атомом і атомом водню, який з'єднаний *ковалентним зв'язком* з іншим електронегативним атомом.

Г

ГЕН ділянка хромосоми (молекули *ДНК), яка* кодує структуру одного або кількох поліпептидних ланцюгів, чи молекул РНК, або ж певну регуляторну функцію.

ГЕН регуляторний ген, продукт якого бере участь у регуляції експресії іншого гена.

ГЕН структурний ген, який кодує РНК і *білки* (ділянки *ДНК,* що містять регуляторні нуклеотидні послідовності, під цей термін не підпадають).

ГЕНЕТИЧНА ІНЖЕНЕРІЯ (ГЕННА ІНЖЕНЕРІЯ) розділ *молекулярної біології,* що ґрунтується на розробці біотехнологічних прийомів спрямованого синтезу (конструювання) нових поєднань *генів (рекомбінантних молекул ДНК)*, що не існують у природі.

ГЕНЕТИЧНА КАРТА схема, яка характеризує відносне розміщення *структурних генів* і регуляторних елементів у хромосомі.

ГЕНЕТИЧНИЙ КОД правила переведення послідовності нуклеотидів полінуклеотидної структури в амінокислотну послідовність *білка*.

ГЕНЕТИЧНИЙ МАРКЕР *ген*, наявність або відсутність якого у *геномі* визначається виявом або елімінацією відповідних функцій чи речовин (стійкість проти пестицидів, антибіотиків, наявність *опінів* тощо).

ГЕНЕТИЧНИЙ ПОТЕНЦІАЛ комплекс спадкових ознак, які знаходяться в певних комбінаціях та забезпечують максимальний рівень розвитку і продуктивності тварин.

ГЕНОМ сукупність усіх *генів* або хромосом організму.

ГЕНОТИП успадковані властивості організму.

ГЕТЕРОКАРІОН багатоядерна клітина, яка містить ядра не менше як двох різних типів.

ГІБРИД нащадок схрещування між двома генетично неідентичними організмами (гібридизація).

ГІБРИД СОМАТИЧНИХ КЛІТИН гібридна клітина, яка утворена у результаті клітинної гібридизації – експериментального злиття генетично диференційованих соматичних клітин різних видів.

ГІБРИДИЗАЦІЯ схрещування організмів, *геноми* яких відрізняються за обсягом і змістом спадкової інформації.

ГІБРИДИЗАЦІЯ молекулярна утворення комплексів між ланцюгами нуклеїнових кислот при взаємодії комплементарних азотистих основ.

ГІБРИДИЗАЦІЯ соматичних клітин злиття двох типів нестатевих клітин, у тому числі й таких, що належать до різних видів, і утворення *гетерокаріону* (комбінованої клітини з двома ядрами).

ГІБРИДОМА гібридна клітина, отримана в результаті злиття нормальних диференційованих клітин (нормальних *В-лімфоцитів*, що секретують один певний вид антитіл) з пухлинними мієломними клітинами.

ГІДРОФІЛІЯ висока спорідненість молекул або їх функціональних груп (карбоксильних, гідроксильних, аміногруп) з водою, що забезпечує їх добру розчинність.

ГІПЕРІМУНІЗАЦІЯ імунізація тварин відповідними вакцинами, токсинами або живими мікробами у великих дозах для отримання специфічних бактеріальних або антитоксичних сироваток.

ГІПОТЕЗА КОЛИВАНЬ здатність третьої азотистої основи, розміщеної з боку 5′-кінця *антикодона*

(тРНК), змінювати своє положення в просторі, тоді як дві перші основи, розміщені біля 3′-кінця антикодона, фіксовані більш жорстко. Зміна просторової орієнтації азотистої основи, розміщеної на 5′-кінці антикодона, супроводжується виникненням взаємодій між парами основ, що не відповідають класичним (A – T, G – C, A –U).

ГІПОФІЗАРНА КАРЛИКОВІСТЬ захворювання, пов'язане з нестачею соматропіну (гормону росту).

ГІСТОНИ білки, що утворюють в комплексі з ДНК нуклеосоми – структурні одиниці хроматину в ядрах еукаріот.

ГОРМОНИ біологічно активні речовини, що виробляються в організмі спеціалізованими клітинами або органами (залозами внутрішньої секреції) і здійснюють цілеспрямований вплив на діяльність інших органів і тканин.

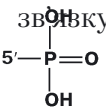
Д

ДЕНАТУРАЦІЯ процес порушення нативної конформації біологічних макромолекул у результаті розриву деяких зв'язків.

ДИСУЛЬФІДНИЙ МІСТОК *ковалентний* – S – S – зв'язок, який утворюється в результаті відщеплення водню від двох реакційноздатних SH-груп, що належать двом молекулам *амінокислоти* цистеїну.

ДНК-ЛІГАЗА фермент, який „зшиває" полінуклеотиди

шляхом утворення фосфодиефірного зв'язку між кінцевим залишком



одного полінуклеотида і кінцевим залишком 3′-OH іншого полінуклеотида, в результаті чого утворюється єдиний полінуклеотид більшого розміру.

ДНК рекомбінантна *макромолекула*, утворена під час з'єднання генів у новій комбінації.

ДНК рекомбінантна реплікація процес, у результаті якого кожна гібридна молекула відтворює нащадків ідентичних їй дочірніх молекул.

ДНК сателітна багаторазово повторювані нетрансльовані ділянки у *клітинах еукаріот*.

ДНК-ТЕХНОЛОГІЯ новий розділ молекулярної генетики. Включає методи і клонування ДНК, ідентифікацію генів, методи секвенування і синтезу олігонуклеотидів, направленого мутагенезу ДНК, оптимізацію експресії синтезованих молекул ДНК, технологію рекомбінантної ДНК і введення рекомбінантної ДНК у живі клітини.

ДНК химерна штучно створена гібридна молекула ДНК, що не має аналогів у природі.

Е

ЕЛЕКТРОФОРЕЗ техніка розділення молекул, яка базується на їх різній рухливості в електрично-

му полі.

ЕКЗОН ділянка структурного *гена еукаріот*. У процесі *сплайсингу* розділені *інтронами екзони* об'єднуються у зрілу іРНК.

ЕКСПЛАНТ будь-який фрагмент різних органів вищих рослин, добутий для вирощування в умовах *культури тканин*.

ЕКСПРЕСІЯ ГЕНА процес реалізації генетичної інформації, зосередженої в *ДНК,* через *транскрипцію* і *трансляцію*.

ЕНДОНУКЛЕАЗА фермент, який гідролізує внутрішні фосфодиефірні зв'язки в нуклеотиді.

З

ЗАБРУДНЕННЯ НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА надходження в природне середовище різних твердих і газоподібних речовин або видів енергії (тепла, звуку, радіоактивності) в кількостях, які перевищують допустимий рівень.

ЗВОРОТНА ТРАНСКРИПТАЗА (РЕВЕРТАЗА) *фермент* (кодований РНК-вмісними пухлинорідними *ретровірусами),* який являє собою ДНК-полімеразу і за допомогою якого ланцюги вірусної РНК транскрибуються в комплементарні їм ланцюги ДНК.

І

ІММОБІЛІЗАЦІЯ фіксація низькомолекулярних сполук, макромолекул, клітинних органел або клітин на певному носії.

ІММОБІЛІЗОВАНИЙ ФЕРМЕНТ (лат. immobilis – нерухомий) – *фермент,* приєднаний тим чи іншим способом (фізичним або хімічним) до інертної, звичайно нерозчинної підкладки, або носія.

ІММОБІЛІЗОВАНИЙ ФЕРМЕНТ мікрооточення це молекули й іони, що перебувають дуже близько біля іммобілізованого ферменту і впливають на його активність.

ІМУННА ВІДПОВІДЬ реакція взаємодії *антигена* з рецепторами клітин – імуноцитів – спрямована проти цього антигена.

ІМУНОГЕННІСТЬ здатність індукувати в організмі біосинтез *антитіл.*

ІМУНОГЛОБУЛІН *білок (антитіло),* синтез якого індукований дією на організм хребетної тварини певним *антигеном.*

ІМУНОГЛОБУЛІНИ складні білки, що специфічно поєднуються з чужорідними речовинами – антигенами.

ІМУНОФЕРМЕНТНИЙ АНАЛІЗ (ІФА) процес утворення кон'югату відомого *антитіла* і *ферменту* та наступного приєднання отриманої комплексної сполуки до антигена.

ІНГІБІТОР хімічна сполука, взаємодія якої з *ферментами* супроводжується блокуванням якогось етапу біохімічного перетворення.

ІНТЕРФЕРОНИ *білки,* які синтезуються клітинами хре-

бетних у відповідь на вірусну інфекцію і забезпечують неспецифічний противірусний імунітет.

ІНІЦІЮЮЧИЙ КОДОН кодон АУГ у складі мРНК, що кодує метіонін (формілметіонін), з якого починається (ініціюється) синтез багатьох (можливо усіх) поліпептидних ланцюгів у прокаріот.

ІНТРОН послідовність ДНК, що виключає кодування послідовності гена.

ІНТРОНИ полінуклеотидні вставки некодуючих послідовностей довжиною від 10 до 1000 і більше пар азотистих основ, що перебувають усередині *структурного гена* і при *транскрипції* останнього входять до складу *гяРНК*.

ІОННА СИЛА РОЗЧИНУ напівсума концентрацій усіх іонів, які є у розчині, помножена на квадрат їхнього заряду. При дослідженні клітин використовують розчини, іонна сила яких становить 0,15 (оптимальна фізіологічна

К

іонна сила).

КАЛОРІЯ кількість тепла, потрібна для підвищення температури 1г води з 14,5 до 15,5 °С (1 кал=4,1868 Дж).

КАРІОПЛАСТ (див. *Мініклітини)* – ядро, оточене вузенькою облямівкою цитоплазми і плазматичною мембраною.

КАРІОТИП набір хромосом, що є характерним для виду, особини або клітини.

КВАНТ найменша одиниця світлової енергії.

КІЛОБАЗА (Kb) довжина молекули ДНК, яка відповідає 1000 нуклеотидним залишкам.

КЛАСТЕРИ ГЕНІВ групи *генів* з близькими функціями, розміщені в певних ділянках хромосоми, інколи у вигляді повторень.

КЛІТИНА найпростіша структурна і функціональна одиниця живого організму, здатна до самовідтворення.

КЛІТИНИ ауксотрофні (див. *Ауксотроф)* – мутанти, які потребують, на відміну від нормальних (прототрофних) клітин додаткових факторів *поживного середовища* у зв'язку з втратою здатності їх синтезувати.

КЛІТИНИ еукаріот (еукаріотична клітина) клітини тварин, рослини які на відміну від прокаріот містять ядро з мембраною і хромосомами.

КЛІТИНИ іммобілізовані клітини, включені до складу тих або інших органічних носіїв або закріплені на поверхні носія.

КЛІТИНИ ПЛАЗМАТИЧНІ утворюються внаслідок диференціації В-лімфоцитів.

КЛІТИНИ СЕНСИБІЛІЗОВАНІ клітини, які імунологічно активовані в результаті контакту з антигеном.

КЛІТИНИ СОМАТИЧНІ клітини тіла (соми) особини, які не беруть участі в статевому процесі й містять диплоїдне число хромосом.

КЛІТИННА ІНЖЕНЕРІЯ метод конструювання, спрямований на добування нової генетичної інформації за допомогою *гібридизації* і реконструкції клітин, що є у культурі.

КЛІТИННА ПОПУЛЯЦІЯ група однорідних за певним показником клітин (в культурі або в тканинах).

КЛІТИННЕ ДІЛЕННЯ форма розмноження (подвоєння) клітин, яке перебігає у вигляді перешнуровування (у бактерій) або мітозу.

КЛІТИННІ ФАКТОРИ ІМУНІТЕТУ сукупність клітинних елементів тканин, які беруть участь у захопленні й розщепленні антигена. До них належать клітини ретикулоендотеліальної системи (макрофаги, купферовські клітини печінки, нейтрофіли, моноцити тощо).

КЛОН це популяція клітин організмів, які містять один і той самий матеріал генетично однорідних клітин чи організмів, добутих із тієї самої клітини чи організму-попередника нестатевим шляхом, і тому є точними копіями цього спільного предка.

КЛОНУВАННЯ набір методів і прийомів, які застосовують для виділення і розмноження нестатевим шляхом генетично однорідних фрагментів ДНК, клітин або організмів, що є точними копіями цього спільного предка.

КЛОНУВАННЯ ДНК фрагмент або ціла одноланцюгова молекула ДНК, виділена із геному будь якого організму, вбудована в геном плазміди (вектора у вигляді вставки, введена в клітину-господаря, де відбувається її багаторазова реплікація, яка призводить до накопичення клонованих ДНК.

КОВАЛЕНТНИЙ ЗВ'ЯЗОК хімічна взаємодія між атомами в молекулі, яка виникає в результаті об'єднання електронів, що належать одному чи кільком атомам.

КОД набір правил перекладу інформації з одного алфавіту або мови на іншу.

КОДОН група із трьох суміжних нуклеотидів у молекулі мРНК, яка кодує одну із амінокислот, або яка помічає кінець синтезу білка (термінуючий сигнал).

КОДОН-АНТИКОДОНОВА ВЗАЄМОДІЯ (див. Гіпотеза коливань).

КОКОН закупорена з обох сторін муфта, яка містить зародки і білкові речовини (в коконах може розвиватися від 2 до 20 зародків).

КОМПЛЕМЕНТАРНА ДНК, кДНК ДНК, синтезована на матричній РНК (вірусній або клітинній) з використанням спеціального ферменту – зворотної транскриптази.

КОМПЛЕМЕНТАРНІСТЬ властивість нуклеотидів утворювати парні комплекси при взаємодії ланцюгів нуклеїнових кислот. При цьому

азотисті основи нуклеїнових кислот утворюють пари: аденін-тимін (або урацил); гуанін-цитидин (А-Т і Г-Ц).

КОМПОСТ органічні відходи, які пройшли процеси бродіння.

КОНКУРЕНТНЕ ІНГІБУВАННЯ інгібування ферментної активності, яке долається підвищенням концентрації *субстрату*.

КОНТАКТНЕ ГАЛЬМУВАННЯ (ТОПОІНГІБУВАННЯ) припинення розмноження клітин при зіткненні з іншими клітинами, наприклад при утворенні суцільного моношару *клітин у культурі*.

КОН'ЮГАТИ сполуки, які складаються із двох або декількох різних молекул, зв'язаних ковалентно.

КОПРОЛІТИ (ЕКСКРЕМЕНТИ ЧЕРВ'ЯКІВ) утворюються в кишечнику дощових черв'яків за рахунок склеювання органічних і мінеральних часточок, чому сприяють виділені мікроорганізмами слиз і тверді речовини.

КОРЕКЦІЯ виправлення помилок при реплікації, транскрипції або трансляції шляхом перевірки окремих мономерів після їх включення в ланцюг РНК, ДНК або білка.

КОСМІДА вектор, до складу якого входять COS-ділянка *ДНК фага* λ, що є місцем замикання лінійної структури і перетворення її в кільцеву.

3′-КІНЕЦЬ кінець полінуклеотиду, на якому розміщений нуклеотид з вільною ОН-групою у третьому вуглецевому атомі рибози або дезоксирибози.

5′-КІНЕЦЬ кінець полінуклеотиду, на якому розміщений нуклеотид з вільною ОН-групою п'ятого атома вуглецю рибози або дезоксирибози; з 5′-кінця починається синтез полінуклеотидних ланцюгів у процесах реплікації, транскрипції і репарації.

КУЛЬТУРА КЛІТИН (суспензійна культура) – вирощування окремих клітин та невеликих їх груп у суспендованому стані в рідкому середовищі та при застосуванні апаратури, що забезпечує їх аерацію та перемішування.

КУЛЬТУРА ТКАНИН метод збереження життєздатності тканин або цілих органів (культура органу), чи окремих клітин (культура клітин) поза організмом in vitro.

КУТ НАХИЛУ ГРЯДИ розміщення гряди під кутом відносно поверхні ґрунту. Оптимальний кут нахилу дорівнює 3°.

Л

В-ЛІМФОЦИТИ малі лімфоцити, що розвиваються із стовбурних клітин печінки (в плода) і кісткового мозку (в дорослих особин), синтезують та секретують різні *імуноглобуліни*.

ЛИПКИЙ КІНЕЦЬ вільний одноланцюговий кінець дволанцюгової *ДНК,* комплементарний одно-

	ланцюговому кінцю, що належить цій самій або іншій молекулі ДНК.
ЛІГАЗА	*фермент,* який усуває розриви в молекулі ДНК утворенням *ковалентних зв'язків* між 5′- і 3′-кінцями.
ЛІДЕРНА (СИГНАЛЬНА) ПОСЛІДОВНІСТЬ	5′-кінцева послідовність поліпептидної структури, яка забезпечує проникнення екскретованої молекули крізь мембрану, а потім відщеплюється.
ЛІЗИС	розщеплення і руйнування клітин під дією ферментів, які містяться в лізосомах, або інших об'єктах.
ЛІЗОЦИМ	*білок,* який має ферментативну активність, що реалізується в результаті гідролітичного розщеплення поліцукридної структури клітинної стінки бактерій, що призводить до їх загибелі.
ЛІНКЕРНІ ДІЛЯНКИ	ділянки *ДНК,* розміщені між нуклеосомними частинками довжиною у середньому в 60 нуклеодитів.
ЛІНКЕР	синтетичний олігонуклеотид, що містить нуклеотидну послідовність, яка найчастіше використовується для розпізнавання відповідною *рестрикційною ендонуклеазою (рестриктазою).*
ЛІПОСОМИ	бішарові сферичні утворення, які здебільшого отримують при механічній дії на дисперсію фосфоліпідів.
ЛОКУС	місце локалізації *гена* в хромосомі.

ЛОЖЕ площа під вермікультурою розміром 2х1м (2м^2).

М

МАКРОМОЛЕКУЛИ великі молекули діаметром 3–300 нм (діаметр малих молекул становить 0,5–1,0 нм).

МАКРОФАГИ (ПОЛІБЛАСТИ) клітини мезенхімного походження, здатні до активного захоплення, поглинання і наступного гідролітичного розщеплення (перетравлення) бактерій, уламків клітин та інших чужорідних або токсичних для організму частинок.

МАТИ матеріал із соломи, очерету тощо, яким накривають гряди для регулювання теплового режиму, особливо в зимових умовах.

МАТРИЦЯ одноланцюгова ДНК, яка комплементарна ланцюгові РНК або ДНК, що синтезується; визначає послідовність нуклеотидів у ньому.

МАТРИЧНА РНК молекула РНК, яка має інформацію про послідовність амінокислот у білку, що реалізується.

МЕМБРАНА оболонка клітини, ядра або клітинної органели; простіша мембрана являє собою ліпідний шар товщиною близько 6–10 нм.

МЕТАБОЛІЗМ обмін речовин, який включає всю сукупність фізичних і хімічних процесів, що

відбуваються в організмі протягом життя і забезпечують його існування.

МЕТАНОВЕ БРОДІННЯ багатостадійний процес, у ході якого біополімери перетворюються в ацетат, форміат, метанол, метиламін, оксид і діоксид вуглецю, аміак, сірководень і водень.

МЕТАНОГЕНЕЗ процес, який відбувається в анаеробних умовах при утилізації *біомаси*. Супроводжується виробництвом *біогазу* за участю метангенеруючих бактерій (метаногенів).

МІЄЛОМА *пухлина* кісткового мозку людини, яка складається із *плазматичних клітин,* що перебувають у стадії проліферації.

МІКРОКЛІТИНИ структури, що складаються з якоїсь частини *геному* (в ідеальному випадку з однієї хромосоми) і певної кількості цитоплазми з плазматичною мембраною.

МІНІКЛІТИНИ (див. *Каріопласти).* Складаються з ядра, оточеного тонким шаром цитоплазми, та інтактної плазматичної мембрани.

МІТОЗ спосіб відтворення диплоїдних *еукаріотичних клітин* шляхом їхнього поділу.

МІХАЕЛІСА КОНСТАНТА кінетичний параметр ферментативної реакції, чисельно рівний концентрації субстрату, при якій швидкість реакції становить половину максимальної.

МОДИФІКАЦІЯ (від латинського modification) – зміна.

МОДИФІКАЦІЯ ДНК АБО РНК зміни нуклеотидів після їх попереднього включення в полінуклеотидний ланцюг.

МОЛЕКУЛЯРНА БІОЛОГІЯ галузь біологічної науки, яка вивчає процеси життєдіяльності й механізми функціонування організмів на рівні хімічної структури молекул і атомів, що входять до їхнього складу.

МОЛЕКУЛЯРНА ГЕНЕТИКА сфера знань про структурно-функціональну організацію генетичного апарату й механізми реалізації генетичної інформації на молекулярному рівні.

МОНІТОРИНГ ЕКОЛОГІЧНИЙ комплексна система спостереження і контролю за станом навколишнього середовища і його елементів (процесів у природі).

МУТАГЕНЕЗ штучне отримання мутацій за допомогою мутагенів.

МУТАГЕНИ фактори, які викликають мутації.

МУТАНТ організм, змінений у результаті мутації.

МУТАСИНТЕЗ синтез антибіотиків мутантами, в яких блоковано утворення певного фрагмента антибіотичної молекули, однак синтез відбувається при внесенні у середовище відповідного фрагмента або його аналогів.

МУТАЦІЇ зміни в генетичному матеріалі клітини шляхом перебудови ДНК ядер та органел, що передаються за спадковістю.

Н

НАНОМЕТР (нм) одиниця довжини (10^{-9} м), яку використовують для позначення атомних і молекулярних розмірів.

НЕКОНКУРЕНТНЕ ІНГІБУВАННЯ інгібування *ферментів*, яке не припиняється з підвищенням концентрації в середовищі *субстрату*.

НОНСЕНС-КОДОН кодон, який є сигналом закінчення синтезу поліпептидного ланцюга.

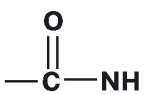
О

ОПЕРАТОР ділянка ДНК, при взаємодії якої з білком-репресором регулюється *експресія гена* або групи генів на рівні *транскрипції*.

ОПЕРОН одиниця генетичної експресії, до складу якої входять один або кілька зв'язаних між собою *структурних генів*, а також їхні промоторні, операторні та регуляторні ділянки, які контролюють *транскрипцію* оперона.

П

ПЕПТИДНИЙ ЗВ'ЯЗОК



різновидність амідного зв'язку, що утворюється між карбоксильною і λ-аміногрупою двох амінокислот із видаленням молекули H_2O.

ПІДГОДІВЛЯ додаткове внесення субстрату при умові повної переробки базового субстрату або попереднього шару підкормки з метою відновлення необхідної для вермікультури кількості поживних речовин.

ПЛАЗМАТИЧНІ КЛІТИНИ клітини, утворені при багаторазовому поділі В-клітин (процес диференціювання) як відповідь на зв'язування *антигена* рецепторами *В-лімфоцитів* і *Т-клітин*.

ПЛАЗМІДА гібридна (рекомбінантна) кільцева молекула, яка містить один або кілька фрагментів чужорідної *ДНК*.

ПЛАЗМІДА (ЕПІСОМА) невелика кільцева молекула *ДНК*, здатна до стабільного, не зв'язаного з хромосомами, існування і автономної *реплікації*.

ПОЛІПЕПТИД ланцюг амінокислотних залишків, які з'єднані пептидним зв'язком.

ПОПУЛЯЦІЯ сукупність особин одного виду, які відновлюються протягом значного періоду часу.

ПРОБА 50 ЧЕРВ'ЯКІВ визначення якості субстрату за допомогою 50 черв'яків, розміщених на його поверхні. Якщо протягом доби вони активні, то субстрат придатний до використання.

ПРОКАРІОТИ вірусні частинки, бактеріальні клітини, які на відміну від *еукаріот* не мають ядер.

ПРОМОТОР специфічна ділянка ДНК, яка виконує регуляторну функцію в результаті приєднання РНК-полімерази, що ініціює *транскрипцію* РНК.

ПРОФАГ — *ДНК бактеріофага*, вбудована в хромосому бактерії.

ПРОЦЕСИНГ — сукупність ферментативних реакцій, що каталізують перетворення первинних продуктів *транскрипції* і *трансляції* в функціонально повноцінні молекули.

Р

РЕЗИСТЕНТНІСТЬ ОРГАНІЗМУ — стійкість організму до дії фізичних, хімічних і біологічних агентів, які викликають патологічний стан.

РЕКОМБІНАНТНА ДНК — утворюється, коли ділянки ДНК одного чи різних організмів об'єднуються за допомогою відповідних ферментів.

РЕКОМБІНАНТНА РНК — штучно змінена молекула РНК, яка включає нові сполучення послідовностей нуклеотидів, для відтворення яких може бути використаний як вектор геном РНК-фага.

РЕКОМБІНАЦІЯ (КРОСИНГОВЕР) — явище, при якому гени однієї групи зчеплення утворюють нові комбінації з генами гомологічних груп зчеплення.

РЕКОНСТРУЮВАННЯ КЛІТИН — процес злиття нежиттєздатних *каріопластів* із життєздатними цитопластами і утворення життєздатних клітин.

РЕПАРАЦІЯ ДНК — відновлення початкової будови *ДНК* заповненням пошкоджених ділянок відповідними нуклеотидами.

РЕПЛІКАТОР ділянка *ДНК*, з якої розпочинається процес її *реплікації*.

РЕПЛІКАЦІЙНА ВИЛКА точка, в якій ланцюги батьківської дволанцюгової ДНК розходяться для того, щоб змогла відбутися реплікація.

РЕПЛІКАЦІЯ процес самовідтворення нуклеїнових кислот, які забезпечують точне відтворення генетичної інформації.

РЕПЛІКАЦІЯ ДНК біосинтез дочірніх ланцюгів *ДНК* на вихідній матриці, що забезпечує точне відтворення генетичної інформації.

РЕПЛІКОН ділянка *ДНК*, що містить регуляторні елементи, які забезпечують процес незалежної *реплікації*.

РЕПЛІКУЮЧА ДІЛЯНКА ділянка ДНК (реплікон), де проходить процес реплікації в певний момент часу.

РЕПРЕСІЯ пригнічення активності *гена*, яке найчастіше зумовлюється блокуванням *транскрипції*.

РЕПРЕСОР *білок*, здатний взаємодіяти з регуляторною послідовністю (*оператором*) *гена* і блокувати його *транскрипцію*.

РЕСТРИКЦІЙНІ ЕНДОНУКЛЕАЗИ (РЕСТРИКТАЗИ) *ферменти*, які розпізнають специфічні нуклеотидні послідовності, довжина яких звичайно 4–7 нуклеотидних пар, і спричиняють розщеплення обох ланцюгів *ДНК у сайтах*, що мають симетрію другого порядку відносно центру.

РЕСТРИКЦІЯ процес розчеплення чужорідної молекули ДНК під дією специфічних бактеріальних ферментів-рестриктаз.

РЕТРОВІРУСИ *РНК-вмісні віруси*, які кодують РНК-залежну ДНК-полімеразу.

РИХЛЕННЯ СУБСТРАТУ технологічний процес, направлений на покращення повітряного режиму в субстраті й умов життєдіяльності вермікультури.

РНК-ЗАТРАВКА (ПРАЙМЕР) короткий (довжина 10–60 нукдеотидів) фрагмент РНК, синтезований РНК-полімеразою на матриці батьківської дволанцюгової *ДНК*.

РНК-ПОЛІМЕРАЗИ ферменти, що синтезують РНК (мРНК, тРНК, рРНК і РНК інших класів) на матриці ДНК.

РНК-ПРАЙМАЗИ *ферменти*, за допомогою яких здійснюється синтез із певним інтервалом коротких (довжина орієнтовно 10 нуклеотидів) *РНК-затравок* на матриці ланцюга, що залишився.

гяРНК, АБО ГЕТЕРОГЕННА ЯДЕРНА РНК полінуклеотидна структура (первинний транскрипт), яка за розміром переважає зрілу іРНК у 10–20 разів і є її попередником.

мРНК інформаційна (матрична) РНК, яка є матрицею при синтезі білків на рибосомах.

рРНК рибосомна РНК – компонент рибосом, необхідний для підтримання їх структури та функціонування.

С

САЙТ найменша ділянка гена, що здатна незалежно від інших ділянок мутувати і рекомбінувати. Мінімальний розмір сайта – одна пара нуклеотидів (у вірусів один нуклеотид).

САЙТ ВБУДОВУВАННЯ (КЛОНУВАННЯ) специфічна ділянка векторної молекули ДНК, в яку може вбудовуватися фрагмент клонованої чужорідної ДНК. Сайт вбудовування – унікальний (єдиний) сайт рестрикції у векторі.

САЙТ-ДІЛЯНКА нуклеотидна або амінокислотна послідовність у *нуклеїновій кислоті* чи *білку*.

СЕКВЕНУВАННЯ визначення нуклеотидної послідовності ДНК і РНК.

СЕКТОР при промисловому вермікультивуванні ділянки вермікультури розбиваються на секції і сектори. Сектор об'єднує два паралельних ряди лож.

СЕЛЕКТИВНЕ СЕРЕДОВИЩЕ культуральне середовище, яке забезпечує, наприклад, ріст і розмноження гібридних та загибель вихідних батьківських клітин.

СЕНСИБІЛІЗАЦІЯ – набуття організмом специфічної підвищеної чутливості до того чи іншого впливу, зокрема до чужорідних речовин (частіше білкової природи) – алергена.

СЕРЕДОВИЩЕ сукупність зовнішніх умов, які впливають на організм, популяцію або на найбільш складні біотичні співтовариства.

СЕРЕДОВИЩЕ АНАЕРОБНЕ середовище позбавлене вільного кисню, до умов якого адаптовані лише анаероби.

СЕРЕДОВИЩЕ АНТРОПОГЕННЕ природне середовище, прямо або опосередковано змінене людською діяльністю. У середовище антропогенне входять відкриті родовища, магістральні канали, зони будівництва великих підприємств тощо.

СЕРЕДОВИЩЕ БІОТИЧНЕ сукупність живих організмів, які своєю життєдіяльністю впливають на інші організми.

СЕРЕДОВИЩЕ ГЕНЕТИЧНЕ сукупність усіх генів, які входять в даний геном, взаємодія яких впливає на ефект даного гена.

СЕРЕДОВИЩА ПОЖИВНІ субстрати, які використовують для культивування в штучних умовах мікроорганізмів та культур тканин.

СИНКАРІОН одноядерна гібридна клітина, що утворюється при злитті соматичних клітин.

СОМАТОТРОПІН (гормон росту) – один із найважливіших регуляторів соматичного росту організму.

СПЕЙСЕР ділянка ДНК, що не транскрибується, а довжина і нуклеотидна послідовність якої змінюються в широких межах.

СПІРАЛІЗАЦІЯ спіральне скручування хромонем хромосом, яке максимально виражено в метафазі мітозу і мейозу.

СПЛАЙСИНГ *процесинг* РНК, який являє собою посттрансляційний ферментативний процес видалення з первинного РНК-транскрипту *інтронів* і наступне з'єднання ділянок РНК (*екзонів*).

СУБСТРАТ речовина (S), молекула якої під час відповідної ферментативної реакції перетворюється в продукт (P).

СУБСТРАТ ДЛЯ ВЕРМІКУЛЬТУРИ основний компонент із органічних відходів, що виступає в ролі поживного середовища для вермікультури.

Т

ТКАНИНА система клітинних структур та їх похідних, які мають загальне походження, будову, функції і характеризуються взаємопов'язаними морфологічними властивостями. Становить морфологічну основу органа.

Т-ЛІМФОЦИТИ вид лейкоцитів, які виконують різні функції в ході імунної відповіді.

Т-ЛІМФОЦИТИ СЕНСИБІЛІЗОВАНІ Т-лімфоцити, які активовані в результаті контакту із специфічним антигеном або мітогеном.

ТРАНСГЕННИЙ ОРГАНІЗМ організм, геном якого (або геноми окремих його клітин чи тканин) включає чужорідний генетичний матеріал, внесений з використанням методів генної інженерії.

ТРАНСДУКЦІЯ перенесення генетичного матеріалу з однієї клітини в іншу за допомогою вірусного *вектора*.

ТРАНСЛОКАЗА фермент, який забезпечує переміщення молекули мРНК уздовж рибосоми в процесі транскрипції.

ТРАНСКРИПЦІЯ матричний синтез РНК на ДНК, який здійснюється ферментами РНК-полімеразами.

ТРАНСКРИПЦІЯ ЗВОРОТНЯ перенесення (переписування) генетичної інформації з РНК на ДНК.

ТРАНСКРИПЦІЯ РИБОСОМИ переміщення кодону уздовж мРНК після включення кожної нової амінокислоти в поліпептидний ланцюг.

ТРАНСКРИПЦІЯ СПОРІДНЕНА З ТРАНСЛЯЦІЄЮ властивий прокаріотичним клітинам механізм трансляції мРНК, синтез якої ще не закінчився.

ТРАНСКРИПЦІЯ IN VITRO штучна транскрипція у безклітинній системі з використанням очищеної молекули ДНК як матриці.

ТРАНСЛОКАЦІЯ структурні зміни хромосом, у ході яких хромосомний сегмент переміщується в інше місце тієї ж хромосоми, або переноситься в іншу хромосому, чи відбувається обмін двома сегментами між гомологічними або негомологічними хромосомами.

ТРАНСЛЯЦІЯ *синтез білка* на матриці іРНК, що відбувається в *рибосомах*.

ТРАНСПОЗАЗА фермент, який бере участь у початкових етапах транспозиції деяких мобільних генетичних елементів (МГЕ).

ТРАНСПОЗИЦІЯ переміщення *гена* або групи генів з одного місця *геному* в інше.

ТРАНСПОЗОН Тп (генетичний елемент, здатний переміщуватися) – фрагмент ДНК, що включає *ген* стійкості проти певної хімічної речовини.

ТРАНСФОРМАЦІЯ (лат. transformatio – перетворення) – зміни в *геномі* в результаті певної дії, що зумовлює зміни спадкових властивостей організму.

ТЕРМІНАЦІЯ комплекс біохімічних реакцій, в процесі яких вивільнюється щойно синтезований поліпептидний ланцюг і відбувається підготовка до синтезу нової білкової молекули.

ТЕРМІНУЮЧИЙ КОДОН кодон, який визначає закінчення (термінацію) синтезу поліпептидного ланцюга – УАА, УАГ, УГА.

Т-ХЕЛПЕРИ група субпопуляцій Т-лімфоцитів, які виконують основну функцію у впізнаванні чужорідного антигену в індуктивній фазі імунної відповіді.

ТОПОІЗОМЕРАЗИ *ферменти*, що беруть участь у процесі позитивного або негативного надскручування кілець дволанцюгової ДНК.

тРНК транспортна РНК (трансферазна), клас молекул РНК, що беруть участь у біосинтезі білка. Молекула тРНК містить ділянку, до якої приєднується специфічна амінокислота та антикодон, комплементарний кодону в мРНК.

У

УТИЛІЗАЦІЯ (від латинського utilis – корисний) – застосування з користю, наприклад відходів.

Ф

ФАКТОРИ ЕЛОНГАЦІЇ білки, які циклічно асоціюють з рибосомою відповідно з включенням кожної нової амінокислоти в поліпептидний ланцюг.

ФАКТОРИ ЗВІЛЬНЕННЯ (ТЕРМІНАЦІЇ) білкові фактори бактерій і еукаріот, які беруть участь в термінації трансляції на рибосомах.

ФАКТОРИ ІНІЦІАЦІЇ білкові молекули, які зв'язуються з малою (30S) субчастиною рибосоми і необхідні для здійснення ініціації білкового синтезу.

ФАКТОРИ Т білкові фактори елонгації трансляції, які забезпечують приєднання аміноацил-тРНК до рибосоми.

ФАКТОРИ ТРАНСКРИПЦІЇ допоміжні білки, які полегшують РНК-полімеразам проходження основних етапів транскрипції, а також забезпечують вибірковий характер транскрипції.

ФЕРМЕНТАЦІЯ ОРГАНІЧНИХ ВІДХОДІВ це технологічний процес попередньої підготовки органічних відходів із метою оптимізації кількісних показників субстрату, який проходить у декілька фаз.

ФЕРМЕНТИ біологічні каталізатори, більшість з яких є розчинними глобулярними білками.

ФЕРМЕНТИ РЕСТРИКЦІЇ впізнають певні короткі послідовності, як правило в неметильованій ДНК і розщеплюють її.

ФІЗІОЛОГІЧНЕ КАРТИРУВАННЯ визначення положення в хромосомі генів або фрагментів ДНК.

ФІЗІОЛОГІЧНИЙ ПОРІГ рівень значення факторів середовища, з межами яких починаються або завершуються обмін речовин та нормальна фізіологічна діяльність організмів.

ФОСФОРИЛЮВАННЯ включення в молекулу залишку ортофосфорної кислоти (H_2PO_3–), яке здійснюється ферментами групи трансфераз.

Х

ХРОМОСОМНИЙ НАБІР сукупність хромосом у ядрі нормальної гамети або зиготи.

Ц

ЦЕНТРАЛЬНА ДОГМА МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ основне положення теорії спадковості, згідно з яким потік генетичної інформації іде у напрямку: реплікація ДНК → транскрипція РНК → трансляція → білок. Після відкриття і детального дослідження явища зворотної транскрипції ця формула записується так: транскрипція → трансляція → реплікація ДНК →

РНК → білок → зворотна транскрипція. Таким чином, центральна догма молекулярної біології зводиться до того, що генетична інформація передається від нуклеїнових кислот до білка і ніколи не передається від білка до нуклеїнових кислот.

ЦЕНТРИФУГУВАННЯ В ГРАДІЄНТІ ЩІЛЬНОСТІ метод розділення макромолекул, який базується на тому, що у процесі центрифугування розчинів деяких речовин при досить високих швидкостях обертів ротора утворюється градієнт із щільності уздовж центифужних пробірок і в результаті відбувається одночасно седиментація та дифузія.

ЦЕНТРИФУГУВАННЯ В ГРАДІЄНТІ ЩІЛЬНОСТІ ЦУКРОЗИ метод розділення макромолекул на основі їх коефіцієнта седиментації: суміш, яка розділяється, наноситься на поверхню розчину з градієнтом концентрації сахарози, який знаходиться в центрифужних пробірках, і центрифугується при великих швидкостях обертів.

ЦИБРИДИ гібриди, які утворюються від злиття інтактних клітин однієї мутантної лінії з цитоплазмою енуклейованих клітин іншої клітинної лінії.

ЦИТОПЛАСТИ позбавлені ядра цитоплазматичні фрагменти, одержані при центрифугуванні заздалегідь оброблених *цитохалазином В* клітин. Отримані при цьому ядерні фрагменти називають каріопластами.

ЦИТОХАЛАЗИН В речовина, яка синтезується грибами.

Ч

ЧАСТКОВА ДЕНАТУРАЦІЯ — неповна денатурація подвійної спіралі ДНК при даній температурі.

ЧЕРВОНИЙ КАЛІФОРНІЙСЬКИЙ ГІБРИД — дощовий черв'як, що відрізняється від місцевих популяцій високими репродуктивними і продуктивними властивостями. Селекціонований у 50-х роках XX ст. у штаті Каліфорнія (США) на базі гнойового черв'яка.

Ш

ШТАМ — чиста культура мікроорганізмів, що належать до одного виду, добутих з різних джерел або одного джерела, але в різний час.

ШТУЧНІ МЕМБРАНИ — фосфоліпідні оболонки багатокомпонентного складу, створені поза організмом.

Щ

ЩІЛЬНІСТЬ ВЕРМІКУЛЬТУРИ — середня кількість особин на одиницю площі.

Я

ЯДЕРНА ОБОЛОНКА — ліпопротеїдна оболонка, яка відділяє вміст ядра від цитоплазми в еукаріотичній клітині.

ЯДЕРНИЙ ГЕН ген, який входить у склад ядерного геному.

ЯДЕРНИЙ ДИМОРФІЗМ наявність у клітині двох морфологічно різних ядер (макронуклеуса і мікронуклеуса).

ЯДРО органела еукаріотичної клітини, яка оточена мембраною і містить хромосоми.

ІМЕННИЙ ПОКАЖЧИК

А

Актуганов Г.Е. 193
Албертс Б. 47, 55, 57, 58, 61, 70
Аліханян С.І. 127
Алексєєв В.В. 491, 510
Анюліс Е. 249
Артамонов В.І. 293
Аттауллоханов 352

Б

Баадер В. 487
Бейлі Дж. 19
Березін І.В. 187, 207, 209, 217, 223, 225, 247
Березов Т.Т. 41
Берестов В А. 582–584
Берсон С.А. 264
Берг П. 16
Бикін А.В. 489
Биков В.А. 449, 473, 489
Блюм Я.Б. 12, 13
Бохінські Р. 29, 38, 51, 62–65

В

Валуєва Т.А. 249
Варламова В.П. 589
Веркерк А. 104
Вієстур У.Е. 488
Виков В.А. 473

Г

Гелетуха Г. 523, 525, 588
Герасименко В.Г. 587
Герасименко М.О. 587
Глеба Ю. 9, 12, 13
Горбатенко І.В. 319, 320
Гордон Д.В. 120
Городецький С.І. 123
Городній М.М. 541, 552, 562

Д

Дебабов В.Г. 329, 331
Девіс Р. 587
Дей П. 10, 12
Дибан А.П. 123
Діканская Е.М. 377
Дубровін В.О. 485, 486, 493, 511, 587
Дубровський В.С. 488

Е

Ейвін Б. 12
Ейвері О. 9, 10, 58

Є

Євич П. 485, 486
Єгоров А.М. 253, 298, 308, 424, 426, 433, 462, 465
Єлінов Н.П. 18, 20, 304, 340, 342, 383, 384
Єфімов В.А. 317

Ж

Жабоко Ф. 80
Жарникова І.В. 202, 203, 588
Жеребцов М.А. 279

З

Зарецка Е.С. 574
Зенгбуш П. 85, 94, 133

Зорін С.Н. 588

І

Іонгкінд І. 104
Іполітов К.Г. 472
Ігонін А.М. 557

Й

Йевері О. 9, 10
Йенс Бо Гольм-Нільсен 512, 588

К

Кабанова В.А. 352
Кацинський Б. 527
Кентлі М. 12, 13
Кир'яченко С.П. 457, 568, 572-576, 578, 586
Киркин А.Ф. 587
Клесов А.А. 282, 283, 289, 291, 586
Клименко В. 515, 517–521, 589
Кобзарь С. 523, 525, 527, 588
Коваленко Г.А. 276–280
Козлов Ю.І. 328
Комова О.В. 588
Корнбергом А. 52
Коровкін Б.Ф. 41
Корчемний М.О. 587
Кошель М. 472, 529–531
Крилов І.А. 586
Крік Ф. 9, 16, 39, 43, 51, 63–66
Крушневич Т. 526, 527

Л

Ларіонова Н.І. 242, 246
Лебединський О.П. 458
Левчук Ю.М. 588
Ледер Ф. 61
Ленінджер А. 65, 73–77
Лівшиц В.А. 329, 331
Лябушева О.А. 588
Лямін М.Я. 510
Льюкас Дж. 102

М

Мазо В.К. 588
Маркарова Е.Н. 254
Марконі В. 254
Малига П. 12
Маттеї Г. 61
Меняйлова І.І. 281
Мелентьєв А.І. 588
Мельник І.А. 552–557
Мельсон М. 51
Мецлер Д. 45
Морозова О.В. 373
Мосбаха К. 233

Н

Ніколайчук В.І. 319, 320, 587
Нікольський М.Н. 587
Ніренберг М. 61
Нельсон Дж. 181

О

Овчінніков Ю.А. 20, 95, 127, 160, 328, 355
Олексін А.В. 586
Олліс Д. 19

П

Палмітер Р.Д. 123

Папахаджопулос Д. 102
Пастер Л. 16
Петров Р.В. 347, 351–353, 357, 361, 363
Пісарєв С. 527
Повхан М.І. 560, 587
Полторак О.М. 198
Прокопенко Л.С. 568, 576

Р

Рекстейнер М. 102
Рінгерц Н. 90
Рибальський Н.Г. 184, 232, 236
Рот Дж. 587
Рудак В. 568
Рудик В.Ф. 568

С

Салганик Р.І. 249
Сассон Альбер 286, 297, 317, 566, 575
Свердлов Е.Д. 328, 332
Села М. 352
Севідж Р. 90
Сєров О.Л. 102, 103, 112, 113, 115, 120, 122
Сімаков А.В. 588
Сіроткін А.С. 589
Скородумова О.В. 184, 232, 587
Скрябіна К.Г. 193
Страйєр Л. 53, 54, 77, 146, 151
Сухінін С.В. 588

Т

Тихоненко Т.І. 348, 350, 351
Торчілін В.П. 242, 246

У

Уотсон Д. 9, 16, 39, 43, 51

Ф

Фогт Г. 196

Х

Хазін 444
Хаітов Р.М. 347, 352, 356, 357, 361
Хайтауер М. 101
Хонін Ю.А. 558
Хопвуд А. 144, 156, 157
Херші А.Д. 59

Ч

Чанг Т. 216, 244
Чаргафф Є. 39
Чапліна І.Г. 236
Чахмачова О.Г. 317
Чейз М. 59
Чухрай Є.С. 198

Ш

Шагінурова Г.І. 472, 473
Шіроков А.В. 588
Шибальська Є. 117
Шибальський В. 117
Штраубінгер Р. 102

Щ

Щетінін В.В. 249

Я

Ясенецький В. 515, 517, 520, 521

ПРЕДМЕТНИЙ ПОКАЖЧИК

А

Агар 84, 108, 185, 189, 215, 258
Агароза 21, 174, 185–190, 195, 212, 254
Агрегація 358, 360
Адгезія 88, 89, 232, 471, 473, 512, 530
Адсорбція ферментів на носіях 204
- вплив факторів 206
- іонної сили 206
- концентрації ферменту 207
- питомої поверхні носія 206
- пористості носія 206
- pH 206
- температури 207
Аерація 472, 548, 562
Аеробні мікроорганізми 470
Аеробні умови 470
Аеросил 198, 201–203
Аеротенки 471
Акрілекси 195
Активація носіїв 205
Активний мул 171
Активний цент (АЦ) 223
Алюмосилікати 199, 202
Альгінові кислоти і їх солі 185, 189, 191
Амінокислоти
- L і D-амінокислоти 404, 405
- розділення суміші 403–411
- виробництво з участю іммобілізованих ферментів 274–295
- надсинтез ауксотрофними мутантами 153
- незамінні 384, 402, 443, 447, 558
- синтез мікробіологічний 404
- синтез хімічний 355
6-амінопеніциланова кислота (6-АПК) 300, 302
7α-аміноцефалоспоринова кислота (7-АЦК) 301, 306
Ампліфікація 118, 171–175, 413
Анабіоз вермікультури 538, 551
Анаеробні мікроорганізми 11, 468, 476, 480
Анаеробні умови 234, 505
Аналітичні проточні реактори 259

Антибіотики 14, 137–139, 299–308, 367–480, 557
Антиген 92–95, 133–142, 164, 180, 240–249, 262–272, 334–339, 343–372
Антигенна детермінанта (епітоп) 349–657, 364–369
Антиідиотип (антитіло-2) 369
Антикодин 65, 66, 71, 74, 77
Антитіла (імуноглобуліни) 332–342
- моноклональні (а. м.) 333
- а. м. застосування 340
- а. м. одержання 334, 335
- поліклональні 333
Антитіла одного епітопу (моноклональні антитіла) 332–342
Аскорбінова кислота (вітамін С) 250, 383, 386, 387
Ауксотроф 153
Ауксотрофні мутанти 405, 413, 414

Б

Базовий субстрат 543, 546, 547
Бактерії 12–25, 130–141, 330–332, 483–495
Бактерії непатогенні 153, 166, 173, 233, 258, 274, 297, 303–308
Безлактозне молоко 290–292
Білки 311, 323–332, 349, 372, 398, 441–466
Білкова мука 441, 563, 567
Білковий продукт грибний 446
Білкові лікарські препарати 239–250
Біогаз 482–524
Біогазові установки (БГУ)
- конструкційні особливості 494
- принцип дії 492
- склад 491, 492
- техніко-технічнологічні рівні 486, 492
Біогель 189
Біогумус 561–564
- використання 563, 564
- склад 563, 564
Біоконверсія органічних відходів 22, 453, 467, 475, 476
Біологічна плівка 472, 474
Біологічне конструювання 10, 119–168, 351–368
Біологічне очищення стічних вод 473
Біологічні об'єкти 470
Біологічні системи утилізації 14, 22, 133, 137, 245, 453–500, 509–535, 545
Біологічні ставки 473, 474
- водоростеві 473

- рачкові 473
- рибоводні 473
Біологічно активні речовини 180, 203, 389, 415
Біолюмінесцентний аналіз 259–262
Біомаса
- гідробіонтів 490, 509, 511
- гнойова 443, 468, 475, 494, 542
- дріжджів 409, 429, 430, 442-446
- мікроводоростей 448
- мікроскопічних грибів 429
- рослинна 457, 458, 472
Біометаногенез 476
- етапи 476
- оптимізація 476
Біореактори 415, 434, 461, 480, 486, 492, 496, 514–524
- проточні 276
Біосенсори з іммобілізованими ферментами 261
Біосинтез РНК (транскрипція) 55, 60, 62, 78–81, 153–164
Біотенки (аеротенки) 471, 530
Біотехнологічна продукція 14, 95, 159–183
Біотехнологічне виробництво 19, 20, 349, 442
- виділення і очищення цільового продукта 407, 409, 433
- підготовка товарних форм продуктів 415, 432, 433
- стадії 433
- фасування і упаковування продуктів 390
Біотехнологічні процеси 9
Біотехнологія 9, 15
- завдання 17
- і ветеринарна медицина 14
- гуманна медицина 14, 439, 567,
- методи 21, 119, 183, 249–252, 271
- тваринництво 439
Біофільтри 472
Бісолярна установка 491
В-лімфоцити 94, 95, 336–339, 357–364
Бродильна камера (метантенк, реактор) 492, 491, 495, 521
Буртування 542

В

Ваандервальсова взаємодія 204
Вакцина 11, 12, 271, 347, 348, 354, 355, 370
- генноінженерна 367
- майбутнього 351, 352, 369

Вакцини антиідіотипічні 345, 346
Вектор 116–123, 129–154, 307–377, 411–413
Вермікомпост 536, 537, 541, 553–561
Вермікультивування 468, 535–541, 549–556
Вермікультура (біомаса черв'яків) 540, 549, 551, 553, 559
- використання 557
- склад 557
Вибірка вермікультури 550, 551, 555, 563
Виділення ферментів 16, 46, 52, 234, 397, 432–437
Відпал 143, 154, 174
Відстійник 469, 471, 472, 491, 517, 529
Відходи 286, 288, 407, 440, 443–463, 484, 489, 492, 494, 512–572
Вініловий полімер 241
Віріон 362
Віруси 12, 17–29, 44–149, 574
Вітаміни 14, 17, 21, 22, 172
Водневий зв'язок 204
Водорості 19, 429, 451-578
Водорості зелені протококові 447, 448
Вологість субстрату 546

Г

Газгольдер (газозбірник) 472, 497, 502–522
Гелі для іммобілізації 211
Гель-фільтрація 436
Генетично модифіковані (ГМ) культури 11, 13
Генна імунізація 375
Генноінженерні вакцини 367–374
Гібрид 22, 44, 89, 95, 410, 536, 537, 553
Гібридні клітини 91–107, 337–341
Гідантоїнази 295
Гідантоїни амінокислот 295
Гідролази 205, 412, 413, 431, 438, 477
Гідроліз рослинних відходів 454
Гідрофобна взаємодія 229, 263, 267
Гістони 46
Глибинний метод культивування 21, 300, 431–438
Гнойова біомаса 475–496, 542–561
Гряди (ложа) 537, 540, 541, 546– 548, 550–553
Гриби 18–21, 84, 89, 192, 193, 274–299, 413–470
- плісняві 297, 446–448, 459
Гумус 469, 535, 556-563

Д

Датчики мікрокалориметричні 255
ДЕАЕ-сефадекс 404, 408, 436
Дезінтеграція 434, 435
Дезоксирибонуклеїнова кислота (ДНК) 28
- ДНК комплементація 144
- ДНК-лігіза 53, 54
- ДНК рекомбінантна 127–168, 410, 430, 444, 453, 512
Декстрин 248, 275, 439
Денатурація 113, 172, 174, 175, 211, 230, 234, 240, 241, 423
Дифузні обмеження 222, 227, 228
ДНК-вакцини 370–372, 377
- вибір генів 373
- методи і шляхи введенн 373
- модуляція імунної відповіді 375
- структура 375
ДНК-технології 112, 170
- етапи 170–177
- застосування 170–177
Дріжджі 279, 285–292, 331, 332, 348, 349, 380, 382–387, 410–464
D-фенілгліцин 295

Е

Екзогенні ферменти 431, 435, 427-434
Екзони 39, 349
Екологічні аспекти біотехнології 9–22, 167, 202, 399, 466, 475, 476, 512, 515, 535, 582
Екосистема 22
Експресія генів 10, 12, 44, 62, 96, 101, 119–170, 251, 328, 349, 377
Екстракорпоральна перфузія 244
Екстракорпоральні апарати 243
Екстракція 388
Електроди ферментні 253, 255, 256
Електрофорез 128, 174, 314, 436
Ендонуклеази 330, 332
Енергетичний потенціал гною 476
Енергія 54, 68, 77, 391, 475, 479, 514
Ензакріли 195
Ензимологія 14, 178
Епітоп (антигенна детермінанта) 336–366
Еприн 453
Етанол 105, 258, 285, 286, 384, 388, 436–454, 530

Етиловий спирт 442
Еукаріоти 50–123, 147–166, 311–377
Ефектори 181

Ї

«Їжа майбутнього» 464

Ж

Желатин 194, 258, 274, 334

З

Заморожування 338, 435
Запліднення черв'яків 533, 535
Зворотна транскриптаза 154, 173, 312, 328
Зародок черв'яка 538
Зневоднення 415, 416, 507, 528, 583
Змиття клітин 214
Зонально-швидкісне центрифугування 436
Зооглей 471
Зшиваючі реагенти (зшивка) 11, 54, 157, 158, 164, 182, 185–242, 248, 266, 281, 312, 313, 318

І

Ідентифікація ферментних препаратів 438
Ідіоліти 296
Ідіотип 345
Ідіофаза 296, 297, 307
Ізоелектрофокусування 437
Іммобілізація 14, 253, 263, 266, 276, 280, 285, 287, 399, 416, 473, 530
- біологічно активних речовин (бар) 184, 241–247
- клітин (адгезія) 233–237
- ферментів 180–222
Іммобілізовані лікувальні препарати 235, 238
- аспекти застосування 235
- методи введення 239–241
- методи іммобілізації 25
- носії, вимоги 202, 237
- терапія іммобілізованими ферментами 244
Іммобілізовані ферменти 177
- класифікація 227
Імплантація 243, 245
Імунізація 339, 361, 370, 376, 377
Імунітет 323, 347, 352, 375, 376
Імуногенність 179, 193, 248, 319, 347, 368
Імуноглобуліни 92, 330, 337, 340, 378
Імуномодулятори 323
Імуносорбенти 95, 344
Імуноферментний аналіз (ІФА) 176, 272, 344
Імунохімічний аналіз 262–265

Інактивація 213–275, 287, 299, 388–402
Інгібітори 34, 93, 108, 134, 179, 206, 227, 230, 240, 244, 249, 252, 401, 423
Інгібування ферментів 268
Індексація ферментних препаратів 438
Індукція 79, 137, 324, 325, 370, 376, 377, 393, 400, 430
Інженерія генетична 127–168, 235–332, 345, 348, 368, 417, 430, 453, 457, 512
Інженерна ензимологія 14, 178
Ініціація 328, 330
- поліпептидного ланцюга 66–68
Інсулін 11, 17, 21, 59, 155, 157, 161, 164, 244, 262, 270, 272, 312–317, 330, 344
Інтерферони 11, 14, 17, 21, 95, 161, 163, 323, 324, 334
- α-інтерферон (лейкоцитарний) 325–332
- β-інтерферон (фібробластний) 325–332
- γ-інтерферон (імунний) 325–332
Інтрони 39, 56, 140, 153–164, 311, 312, 328
Іонний зв'язок 394

К

Капроліти 412, 413
Капрон 196, 235, 512
Карбоксиментилцелюлоза (КМЦ) 214
Каріопласт 97–101
Каротиноїди 380–383, 568
Кератин 193, 194, 375
Кислота аспарагінова 78, 229, 233, 246, 414
Кислота глютамінова 417
Кислота полімолочна 241, 245, 247
Кислота яблучна 287
Кислота: молочна, масляна, пропіонова 247, 253, 300, 478
Клітина реконструйована 14, 98–102
Клітини ауксотрофні 153
Клітини іммобілізовані 233–237
Клітинна інженерія 13, 22, 84, 119, 178
Клон 92-95, 107, 112, 148–150, 313, 337, 341, 342
Клонування 10, 87, 115, 123, 127, 145–166, 272, 313, 316, 318, 320, 327, 339, 341, 342, 375
Ковалентна (хімічна) іммобілізація 181, 194, 195, 200, 202, 203, 222, 229, 230

Кодон 61–77, 161, 316
Кодон-антикодонова взаємодія 60
Кокон (яйце) 537–540, 549, 555, 557
Колаген 193, 194, 215, 248–250, 258
Комплекс антиген-антитіло 262, 265, 336
Компост 461, 510, 534, 536, 547, 553, 555
Компостування 542, 553, 561
Кон'югація 131, 132, 137, 138
Константа швидкості мономолекулярної інактивації ферменту (Кін) 231
Конститутивні ферменти 79
Конструювання біологічне 178, 179, 394
Контактне гальмування (топоінгібування) 88, 89
Копроліти 537, 540, 560, 561, 563
Корм (субстрат) для вермікультури 419–486, 507–534
Кормовий концентрат лізину (ККЛ) 416
Крохмаль 274–282
Культивування 17, 19, 21, 84–91, 101, 112, 138, 296, 410, 413, 415, 417, 421, 429, 430, 438
Культивування продуцентів, методи 446–452, 455–459, 462–472, 484, 568–571, 574, 577, 579, 580, 581
- глибинний 431
- поверхневий 432
Культура клітин 85
Культура тканин 337

Л

Лактаза 288, 290–292, 431
Лактоза 79, 80, 254, 258, 259, 288–290, 292, 330, 431, 437
β-лактамне кільце 297, 299
β-лактамні антибіотики 299, 301, 302, 304
Лейкоцити 240, 324, 325–331
Лектини 88, 89, 115
Липкий кінець 143–147, 328, 330
Лігази 330
Лідерна (сигнальна) послідовність 72, 78, 157, 377
Лізин 46, 78, 163, 229, 265, 352, 353, 382, 384, 402, 439, 443, 445, 447, 448, 460
- етапи одержання 408–417
- препаративні форми 409
Лізосомні хвороби нагромадження 239, 240
Лікувальні препарати іммобілізовані 234–246

Лімфоцити 337, 338, 358–368, 375, 377
Лінія клітин 83, 93, 98
Лінкери 48, 144–147, 328
Ліофільне сушіння 441, 461
Ліпіди 85, 93, 102, 103, 184, 197–199, 218, 219, 342–345, 382–396, 400, 401, 448, 452, 457, 459, 460, 557, 574, 577
Ліпосоми 198
- макровезикулярні 198
- моноламелярні 198
- мультиламелярні 198
Ложе
- заселення черв'яками 540, 550
- зимові 551
- розділення 550
- формування 546

М

Макроміцети 460
Макромолекули 46, 48, 51, 53, 114, 129, 164, 171, 182, 266
Макрофаги 247, 375, 377
Маркери в імунохімічному аналізі 264
Маркери ферметні 264
Мати 552
Мембрани 84–123
Меприн 453
Метаболізм 17, 24, 60, 79, 81, 87, 93, 137, 321, 383, 391, 396–402
Метаболіти 422, 434, 438, 473
Металокомплексні сполуки 387
- конструювання 387–391
- функції 387
Метан 234, 258, 376, 384, 442, 451, 468, 477–485, 489, 506–509, 543, 544
Метанове бродіння 478, 480, 481, 483, 493, 496, 502, 505, 506
Метаногенез 477, 480, 483, 486, 492, 493, 495, 497, 512
Метанол 224, 384, 445, 451, 452, 453, 477, 479, 512
Метантенк 477–524, 528–530
Метіонін 62, 70–75, 316, 319, 380, 402–408, 414, 417, 442, 445–453, 460, 557
Метод імунофлуоресцентний 344
Метод розділення 403
Методи культивування продуцентів 415, 431, 432
Мієломні клітини 93
Мікробіологічна промисловість 449
«Мікробні гранули» (мікробні агрегати) 473
Мікробіологічна трансформація органічних сполук 445, 472–477

Мікробна клітина 85, 159, 161, 233, 287, 347, 375, 405, 434, 465, 481, 495
Мікроводорості 413, 447, 448, 455, 473, 490, 497, 511, 567, 583
Мікроводорость синьо-зелена (спіруліна) 447, 448, 455, 456, 457, 464, 509, 511, 566–584
Мікрокапсули 194, 206, 216–218, 243–246
Мікроорганізми 58, 293–302
- аутотрофіні 469
- мезофільні 486
- модифіковані 10, 11
- психрофільні 481
- термофільні 485
Мінералізація органічних відходів 470, 472
Міоглобін 58
Міозин 193
Місткість носія 203, 204
Міцели 199, 224, 248, 300, 382, 431, 432
Міцели обернені (спрямовані) 199, 224
Міцелій 432
Модифікація носія 205–214
Модифікація ферменту 214, 242
Молекулярна біологія 24, 18, 171
Молселект 186
Моноклональні антитіла 330, 337–345, 356
Моноцукри 454, 562
Мука соєва 381, 382, 430, 442, 448, 452
Мул активний 471, 472, 473
Мутаген 405, 414
Мутагенез 162, 171, 274, 300, 430
Мутанти 60, 101, 104, 108, 112, 117, 138, 147–149, 153, 167, 286, 307, 308, 332, 376, 377, 383, 405, 410, 413, 414, 417, 420, 435
Мутасинтез 307
Мутація 414

Н

Навколишнє середовище 468
- забруднення 467, 508, 512
Надсинтез L-амінокислот 274
Найлон-6 196, 205, 211
Нанометр (нм) 216
Напівпроникні оболонки (мембрани) 89–259, 314, 344, 358–392, 437
Наповнювач 406, 416, 437, 472, 500
Нова біотехнологія 9, 306
Нонсенс-кодон 613
Носії
- алюмосилікатні 199, 202

- білкові 193
- кремнеземні 201
- ліпідні 104
- поліакриламідні 195
- поліамідні 196
- полістирольні 195
- поліцукристі 104, 185, 191

Носії на основі
- вугілля і графітованої сажі 202
- ліпосом 102–104, 114–118, 197–199, 206
- металів і їх оксидів 203
- моношарів ліпідів 198
- поверхнево активних речовин 199
- полівінілового спирту 194, 196, 197, 242, 248
- пористої кераміки 199, 202

Н-парафіни (н-алкани) 450, 451
Нуклеїнові кислоти 29, 32, 35, 39, 49, 114, 171, 180, 307, 367, 396, 445, 446, 447, 477, 570
Нуклеотиди 28–81
Нуклеофільна група 52, 205, 226

О

Одноклітинні водорості 443, 447, 455
Окислення 229, 265, 386, 361, 392, 396, 456, 572
Оксидоредуктази 261, 385, 400
Оператор 27, 79, 84, 134, 161, 162, 312, 328
Оперон 75
Оптимальні умови вермікультивуванння 496
Органи-мішені 203, 308
Основні етапи відділення і очищення біотехнолочних продуктів 433
Оцукрення 275, 276
Очисні споруди 471
Очищення біологічне 473

П

Паприн 450
Пектинази 439
Пеніцилін 27, 104, 139, 254, 255, 258, 261, 297–307
Пеніцилінамідаза 302–307
Перетворення високомолекулярних субстратів 220, 245, 545
Перфузія екстракорпоральна 244
Пірогенні кремнеземи 201
Плазматичні клітини 341
Плазміда (епісома)
- гібридна 121, 131–150

Поверхневий метод 432

Поживне середовище 414, 430, 483
Позаорганізмовий шунт 241, 243
Поліакриламідний гель 235, 280, 303
Полівініловий спирт 198, 200, 246
Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) 171–176
- застосування 171–176
- цикли 174
Поліуретани 197
Поля зрошення і фільтрації 474
Популяція 139, 486
Популяція черв'яків 548
- оцінка стану 548, 549
Пористість носія 210
Порожнисті нитки 206, 217, 280, 287, 291, 295, 303, 404, 409
Посттрансляційні модифікації 349
Препроінсулін 155, 313
Проба 50-и черв'яків 545
Продукт 217, 269, 401–464, 472–542, 575–577, 584
Продуценти білків 442
Продуценти ферментів 293, 431–438
Проінсулін 314, 316
Прокаріоти 19, 22, 50, 55, 56, 61, 69–81, 139, 151, 158, 171, 331, 332, 383, 429, 479, 568, 569
Промисловий мікробіологічний синтез 449
Промислові ферментні препарати 367, 373, 425
Промотор 367, 373
Протеоліз 241, 248
Протопласт 115
Професим 249
Процель 249
Процесинг 56, 65, 77, 78, 153–164, 319, 349
Психрофіли 485
Пухлини 88, 89, 155, 245, 341

Р

Рацемат (рацемічна суміш) 403, 408–412
Рацемізація амінокислот 403
Реактори 245, 246, 253, 292
Реактори з іммобілізованими ферментами 254
Ревертаза 154, 173, 312, 328
Регенерація біокаталізаторів 412
Регуляція активності синтезу білка 78
Реєстраційні ендонуклеази (рестрикази) 128, 313, 316
Резистентність 108, 323
Рекомбінатні ДНК 14, 16, 53,

107, 116–132, 143–167, 310–334, 350, 365, 367, 410, 430, 444, 453, 512
Рекомбінація (кросинговер) 136
Реконструювання клітин 100, 101
Ренін 163, 293, 429
Репарація ДНК 53
Реплікатор 134
Реплікація ДНК 135, 138, 153, 164, 172
Реплікон 122
Репресія 138
Репресор 46
Рибосоми 55, 58, 66, 68, 69–76, 100, 161, 328
Рибофлавін (вітамін B_2) 381–384, 510
Рихлення вермікультури 548
РНК затравка (праймер) 173–176, 369
РНК-полімерази 54, 396
РНК-праймази 54
Рослинна біомаса (сировина) 458, 475
Роторно-інерційний біореактор 276, 278

С

Сайт(ділянка) 139
Секвенування 10, 170
Селективне середовище 113, 117
Селекція 170, 274, 300, 339, 340, 405, 430, 444, 536, 537
Селекція і клонування гібридом 344
Сепарація 380, 434, 435, 450, 567, 580
Середовище Заррука 456, 577
Середовище оточуюче 431
Середовище поживне 414
Силікагель 198, 199, 200, 215
Силохром 199–214, 254
Синкаріон 91, 96
Синтез білка 72
Сироватка молочна 443, 445
Сировина крохмалевмісна 459, 460
Сировина лігнінцелюлозовмісна 460
Сировина поновлюєма 458
Система GLP 23–25, 285
Система GMP 23, 25
Системи двохфазового типу 207, 437
Соіммобілізація 260
Солома 443, 458–548
Соматичні клітини 39, 50, 90–122, 170, 321
Соматотропін (гормон росту) 321, 330
Сорбція 191–254
Спейсер (зшивка, ножка) 158, 185, 221

Спіруліна 447–574
- склад живильного середовища 575–584
- склад і використання біомаси 469
- типи живлення 570
- характеристика 568
Сплайсинг 53, 56, 164, 349, 368
Стабільність ферменту 231
Стерилізація 16, 105, 294, 415, 432, 470, 507
Стічні води 251, 469–472, 513, 518
- аеробні процеси біохімічного очищення 470, 473
Стоки (стічні води) 473, 474
Субстрат 21, 542–546
Субстрат (корм) для черв'яків
- вимоги 542
- підготовка 547
- склад 542–548
Суперпродуцент 17, 307, 320
Сушіння 437, 457, 508
Схема біосинтезу лізину 437, 457, 508
Схема біосинтезу треоніну 415
Сценедесмус 447, 457

Т

Твердофазова ферментація 458, 460, 461, 463
Термінація 55, 68, 87, 161
Термофіли 485
Технології безвідходні 17, 22, 458
Технології промислові 22
Технологічна схема одержання мікробного білка 448
Технологія гібридомна 10, 92–95, 235, 266, 272, 337–346
Топоізомерази 46
Транскрипція 55, 60, 62, 78–162, 312–367
Трансляція 58, 66, 72–161, 330
Трансформація 12, 58, 95, 102–198, 302, 348–382, 406–476
Треонін 78, 229, 315, 407, 414, 416–422, 460
Триптофан 330, 380
- вдосконалення 408
- методи одержання 408
Триптофановий оперон 152, 410
Трофофаза 296, 307

У

Ультрафільтрація 437, 518
Установки біогазові (БГУ) 476, 486, 492–568

Ультрагелі 436
Утилізація 11, 14, 22, 133, 137
- методи 245, 453, 458, 467–545

Ф

Феномен надсинтезу L-амінокислот 274, 376, 377, 405, 413, 414
Ферменти іммобілізовані 14, 19, 174–435
- методи іммобілізації 206
Ферменти рестрикції 128
Ферментативний аналіз 258
Ферментація органічних відходів 454
Ферментер 21, 272, 300, 340, 341, 379, 414, 421, 448, 459–520
Фермент-маркер 271
Ферменти конститутивні 79, 431
Ферменти індуковані 79, 325, 333, 345
Ферменти 423
- біосинтез 429
- виділення і очищення 433
- глибинний метод 431
- концентрування 437
- поверхневий метод 432
- промислове отримання 438
Ферментні препарати 438
- активність 438
- амілолітичні 439
- ідентифікація і індексація 438
- пектолітичні 439
- промислові 438
- протеолітичні 439
- стандартизація 438
- целюлолітичні 439
Феромагнітні носії 203
Фільтрація 434, 435, 437
Фітобіореактор 582
Флотація 434
Фотосинтез 455, 475, 490, 509, 568, 580, 581
Фруктоза 279, 280–283
Фумараза 287
Функціональна геноміка 10

Ш

Шлам (тверда фракція гною) 490–525
Штами мікроорганізмів 430, 444
Штами-продуценти біологічно активних речовин (бар) 184, 405
«Штучні клітини» 243
«Штучна нирка» 245
Шунт позаорганізмовий 241, 243

Х

Хіміко-ферментативний синтез генів 155, 157, 311–332, 310, 383
Хімічна (ковалентна) іммобілізація 181, 192–259
Хітин 185, 192, 193
Хітозан 192, 193
Хлорела 447
Хлоропласти 12, 46, 70, 72, 568
Хлорофіл 394, 475, 568
Хроматографія 437

Ц

Целюлоза 185–286, 443
Центрифугування 97–111, 208, 434–436
Цефалоспорини 297–307
Цефемове ядро 301
Цибриди 104, 105
Цистеїн 221, 227, 229, 407, 460
Цитокін 373, 374
Цитоплазма 56, 70, 93–132
Цитопласти 97–105
Цитохалазин В 93–104
Ціанкобаламін (вітамін B_{12}) 375, 382, 383
Ціанобактерії 465, 569, 576
Цільовий продукт 20, 433
- виділення 434
- зневоднення 435
- концентрування 437
- очищення 437
- стабілізація 437

Ч

Червоний каліфорнійський гібрид 536
Чисті культури 451, 460

Я

Ядро 96–116, 219, 229, 301, 303
L - яблучна кислота 287

Навчальне видання

Герасименко Віктор Григорович
Герасименко Марія Олександрівна
Цвіліховський Микола Іванович
Коцюмбас Ігор Ярославович
Захаренко Микола Олександрович
Ображей Анатолій Федорович
Головко Анатолій Миколайович

БІОТЕХНОЛОГІЯ

Підручник

Затверджено Міністерством аграрної політики України як підручник для підготовки спеціалістів із спеціальностей «Біотехнологія виробництва і переробки продукції тваринництва» та «Ветеринарна медицина» в аграрних вищих навчальних 3-4 рівнів акредитації (лист від 5.07.2005 р. № 18-1-1-13/836)

З питань співпраці звертатися за адресою:
04116, м. Київ, вул. Маршала Рибалка, 10/8;
для листів: 04116, м. Київ, а/с 28
Тел./факс: (044) 206-47-29, 206-47-21, 481-28-77
E-mail: inkos@carrier.kiev.ua, inkos@ln.kiev.ua

Свідоцтво про внесення суб'єкта видавничої справи до державного реєстру видавців, виробників і розповсюджувачів видавничої продукції №2006 від 04.11.2004 р.

Підписано до друку 10.02.2006. Формат 60x90/16. Папір офсетний. Гарнітура PetersburgC. Друк офсетний Умов. друк. арк. 40,5. Обл.-вид. арк. 41,2. Наклад 1000. Зам.

Віддруковано