

Львівський національний університет ветеринарної медицини  
та біотехнологій імені С.З. Гжицького

Факультет харчових технологій та біотехнологій

Кафедра біотехнологій та радіології

## КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

на здобуття освітнього ступеня бакалавра

на тему: «Дослідження продуктивності штаму *Escherihia coli* за вмісту в середовищах різних джерел амінного нітрогену»

Виконала: студентка 4 курсу,  
групи 2, спеціальності

162 «Біотехнології та біоінженерія»

Попач І.А.

Керівник: к.с.-г.наук, с.н.с., доцентка  
кафедри біотехнології та радіології  
Сварчевська О.З.

Рецензент: к.с.-г. наук, доцент кафедри  
технології виробництва і переробки  
продукції дрібних тварин Періг Д.П.

Робота заслухана на засіданні кафедри біотехнології та радіології і  
рекомендована до захисту в ЕК, протокол №25 від 01.06:2023 р.

Завідувач кафедри біотехнології та радіології,  
професор, доктор с.-г. наук

Буцяк В.І.

Львів – 2023

ЗАТВЕРДЖЕНО  
Наказ Міністерства освіти і науки,  
молоді та спорту України  
29 березня 2012 року № 384  
Форма № Н-9.01

Львівський національний університет ветеринарної медицини та  
біотехнологій імені С.З. Гжицького  
Інститут, факультет, відділення факультет харчових технологій та біотехнологій  
Кафедра, циклова комісія кафедра біотехнології та радіології  
Освітньо-кваліфікаційний рівень бакалавр  
Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

ЗАТВЕРДЖУЮ  
завідувач кафедри, голова циклової  
комісії Буцяк В.І.  
"06" 02 2023 року

## ЗАВДАННЯ НА БАКАЛАВРСЬКУ КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧУ

### Попач Ірині Анатоліївни

1. Тема бакалаврської роботи "Дослідження продуктивності штаму *Escherihia coli* за вмісту в середовищах різних джерел амінного нітрогену".  
Керівник бакалаврської роботи Сварчевська Оксана Зіновіївна, к.с.-г.н., с.н.с.

затверджені наказом вищого навчального закладу від 06.01.2023 року №31-4

2. Строк подання бакалаврської роботи 10.05.2023 року.

3. Вихідні дані до бакалаврської роботи.

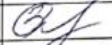







Вихідні матеріали до виконання роботи: штам, *Escherihia coli*, аміний нітроген, поживне середовище, морфологія, продуктивність, оптична густина, культивування, БІС-ТРІС буфер, кукурудзяний екстракт, треонін.

4. Зміст бакалаврської роботи (перелік питань, які потрібно розробити) вступ, огляд літератури, умови та методика проведення досліджень, результати досліджень, висновки, список використаної літератури.

5. Перелік графічного матеріалу (з точним зазначенням обов'язкових креслень) графіки, діаграми, рисунки, технологічні схеми, технологічні лінії)  
Рисунки: будова амінокислоти треоніну; культура клітин штаму *E. coli* ТРН 212 у 212 після розморожування; культура клітин штаму *E. coli* ТРН 212 у поживному середовищі А; культура клітин штаму *E. coli* ТРН 212 після росту впродовж 1 доби на ферментаційному середовищі з: а) аутолізатом дріжджів, б) екстрактом дріжджів; культура клітин штаму *E.coli* ТРН 212 після росту впродовж 1 доби на ферментаційному середовищі з: а) ультрафільтрованим

екстрактом дріжджів, б) дріжджовим пептоном; культура клітин штаму *E. coli* ТРН 212 після росту впродовж 1 доби на ферментаційному середовищі з: а) м'ясним пептоном, б) казеїновим триптоном; культура клітин штаму *E. coli* ТРН 212 після росту впродовж 1 доби на ферментаційному середовищі з кукурудзяним екстрактом; продуктивність штаму *E. coli* ТРН 212 за культивування на середовищах з різними джерелами амінного нітрогену.

6. Консультанти розділів бакалаврської роботи

Розділ	Консультант ПІБ, посада	Підпис, дата	
		Завдання видав	Завдання прийняв
1. Літературний огляд	доц. Сварчевська О.З.		
2. Методика експерименту та основні методи досліджень	доц. Сварчевська О.З.		
3. Експериментальна частина	доц. Сварчевська О.З.		
4. Висновки	доц. Сварчевська О.З.		

7. Дата видачі завдання 06.02.2023 року


**КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН**

№ з/п	Назва етапів бакалаврської роботи	Термін виконання	Примітка
1.	Літературний огляд.		35%
	I атестація:	10.04.23р.	35%
2.	Методика експерименту та основні методи досліджень.		20%
3.	Експериментальна частина.		40%
	II атестація:	20.04.23р.	55%
4.	Висновки		5%
	III атестація:	2.05.23р.	10%
	Допущено до захисту.	10.05.23р.	100%

Здобувач

 Попач І.А.

Керівник бакалаврської роботи

 Сварчевська О.З.

## ЗМІСТ

	стор.
АНОТАЦІЯ.....	3
ВСТУП.....	5
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	6
1.1. Фізіологічні та біохімічні особливості бактерії виду <i>Escherihia coli</i> .....	6
1.2. Застосування мікроорганізмів у біотехнологічних процесах.....	7
1.2.1. Первинні метаболіти та їх виробництво.....	7
1.2.2. Одержання амінокислот шляхом мікробного синтезу.....	10
1.2.3. Характеристика треоніну та його роль в організмі.....	15
РОЗДІЛ 2. УМОВИ ТА МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	23
2.1. Вибір об'єкту дослідження.....	23
2.2. Приготування поживних середовищ.....	24
2.3. Методика оживлення замороженої культури штаму <i>E. coli</i> та засівання посівних колб.....	29
2.4. Методика дослідження впливу на продуктивність штаму <i>E.coli</i> різних джерел амінного нітрогену.....	29
2.5. Статистична обробка результатів досліджень.....	32
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	33
3.1. Вивчення морфології штаму <i>E. coli</i> ТРН 212.....	33
3.2. Продуктивність штаму <i>E. coli</i> ТРН 212 за різних джерел амінного нітрогену в середовищі.....	34
3.3. Кількісне оцінювання одержаних даних.....	38
ВИСНОВКИ.....	45
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	46

## АНОТАЦІЯ

Кваліфікаційна робота складається з вступу, 3 розділів і 10 підрозділів, висновків, списку використаної літератури. Вона містить 12 таблиць, 8 рисунків, 53 джерела використаної літератури. Загальний обсяг роботи — 51 сторінка.

**Ключові слова:** штам, *Escherichia coli*, аміний нітроген, поживне середовище, морфологія, продуктивність, оптична густина, культивування, БІС-ТРІС буфер, кукурудзяний екстракт, треонін.

**Актуальність теми.** Амінокислоти є невід’ємним компонентом у живленні людини та тварин. Треонін — незамінна амінокислота, яка не синтезується в організмі. Його вводять у раціони для тварин і птиці як добавку, що сприяє росту скелетної мускулатури, синтезу травних ензимів та імунних протеїнів, гліцерину, а також отриманню енергії через цикл трикарбонових кислот [1]. На даний час основний шлях одержання амінокислот у промисловому масштабі — біотехнологічне виробництво. За останні десятиліття обсяг вироблених за допомогою мікробіологічного синтезу амінокислот склав більше півтора мільйони тон. Основні амінокислоти, які одержані за допомогою процесів ферментації та використовуються в якості корисних добавок — L-лізин, L-треонін, L-триптофан і L-глутамінова кислота. У виробництві L-лізину та L-глутамінової кислоти використовуються мікроорганізми *Corynebacterium glutamicum*, а при отриманні L-треоніну — *Escherichia coli* [1, 2].

Актуальність теми полягає у тому, що на основі великого кола джерел планується дослідити морфо-фізіологічні особливості штаму бактерії *Escherichia coli*. У ході проведених досліджень буде виявлено вплив різних джерел амінного нітрогену на функціональну активність штаму *E. coli* ТРН 212 та визначено найвідповідніше джерело амінного нітрогену для підвищення продуктивності даного штаму.

**Мета і завдання дослідження.** Мета роботи — вивчення морфології та функціональної активності штаму *E. coli* ТРН 212.

*Для досягнення мети сформульовано наступні завдання:*

1. Визначити морфо-фізіологічні характеристики штаму *E. coli* ТРН 212.
2. Встановити та проаналізувати продуктивні якості штаму *E. coli* ТРН 212 за вмісту в середовищі наступних джерел амінного нітрогену:
  - екстракту дріжджів;
  - аутолізу дріжджів;
  - ультрафільтрованого екстракту дріжджів;
  - дріжджового пептону;
  - м'ясного пептону;
  - казеїнового триптонну;
  - екстракту кукурудзи.
3. Порівняти морфологічні особливості клітин *E. coli* ТРН 212 у ферментаційних середовищах з різними джерелами амінного нітрогену.

**Об'єкт дослідження.** Штам *E. coli* ТРН 212.

**Предмет дослідження.** Продуктивність штаму *E. coli* ТРН 212 у середовищах, які містять різні джерела амінного нітрогену.

**Методи дослідження.** Мікробіологічні (приготування поживних середовищ, оживлення кріокультури штаму і засівання посівних колб), біохімічні (визначення оптичної густини, рН, сухих речовин, залишкової глюкози, треоніну), статистичні.

**Практичне значення одержаних результатів.** Виявлено велику кількість компонентів середовищ, як джерел амінного нітрогену. Проведено аналіз функціональної активності штаму *E. coli* ТРН 212 за застосування цих компонентів.



## ВСТУП

Серед сполук, які одержують біотехнологічним методом, амінокислоти займають перше місце за обсягом виробництва та друге за собівартістю, поступаючись при цьому лише антибіотикам [3, 4]. З кожним роком амінокислоти все більше застосовуються в якості харчових і кормових добавок, сировини для фармацевтичної та косметичної промисловості [5–7].

З усіх можливих способів виробництва амінокислот перевага надається мікробіологічному синтезу. Його очевидною перевагою є те, що мікроорганізми-продуценти утворюють тільки активні L-форми амінокислот. У той час, як за хімічного синтезу утворюється суміш L- та D- стереоізомерних форм. Одержання D-форм не бажане, тому що вони не засвоюються організмом людини та тварин. Окрім цього, більшість D-форм амінокислот є токсичними. Виключення становить метіонін, у якого обидві форми є активними та засвоюються організмом [8].

Для мікробіологічного синтезу амінокислот застосовують різноманітні штами мікроорганізмів. Більшість диких штамів здатні продукувати амінокислоти у зовнішнє середовище лише у мікрокількостях. У зв'язку з цим, генетиками розробляються та створюються мутантні штами, які здатні синтезувати амінокислоти у великих кількостях. Так, для одержання ефективніших штамів-продуцентів застосовують методи генетичної інженерії, які дозволяють збільшити кількість генів біосинтезу шляхом їх клонування на плазмідах. Це в свою чергу призводить до збільшення кількості ензимів, які відповідають за синтез амінокислот, внаслідок чого підвищується вихід продуценту [9, 10].

Підвищити продуктивність штамів можна за рахунок оптимізації умов ферментації та підбору найвідповіднішого складу поживних середовищ, які використовуватимуться для культивування мікроорганізмів.

## РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

### 1.1. Фізіологічні та біохімічні особливості бактерії виду *Escherichia coli*

*Escherichia coli* (кишкова паличка) — грам-позитивна паличкоподібна бактерія. Вперше вона була описана у 1885 році німецьким педіатром і бактеріологом Теодором Ешеріхом [11]. У теплокровних тварин найбільше локалізована у каудальній частині кишківника. Більшість штамів *E. coli* є нешкідливими, проте окремі серотипи можуть викликати важкі харчові отруєння в людини та тварин [12, 13]. Непатогенні штами є частиною нормальної мікрофлори кишківника. Організм отримує користь від *Escherichia coli*. Зокрема, вона приймає участь у біосинтезі вітаміну К, а також запобігає розвитку патогенної мікрофлори у кишківнику [14–16].

Кишкова паличка не завжди міститься лише у шлунково-кишковому тракті, деякий час вона здатна виживати у навколишньому середовищі. Ця здатність робить її важливим індикатором для дослідження зразків на наявність фекальних забруднень. Дані бактерії легко вирощувати в умовах лабораторії, тому вони відіграють важливу роль у генетичних дослідженнях. Кишкова паличка є найбільш вивченою з прокаріотичних мікроорганізмів, а також вона є важливим об'єктом для мікробіології та біотехнології [11, 17]. За останні роки були одержані вичерпні дані про її фізіологію, біохімію, генетику, загальну та молекулярну біологію. Біля витоків сучасної біотехнології знаходиться робота Г. Бойера та С. Н. Коена на *E. coli*, з використанням плазмід і ендонуклеаз рестрикції для створення рекомбінантної ДНК [13]. Удосконалення методів одержання сферопластів *E. coli* та їх трансфекції дозволило досягти досить високої ефективності трансформації молекулами ДНК різноманітних фагів.

Завдяки здатності розмножуватися простим поділом на поживних середовищах з вмістом лише йонів калію, натрію, кальцію, магнію, хлору, амонію, сульфатів, фосфатів, джерел карбону (глюкоза), мікроелементів *E. coli*



стала об'єктом наукових досліджень [18–20]. За культивування її на збагачених рідких поживних середовищах, до складу яких входять мікроелементи, вітаміни, амінокислоти, солі та джерела карбону, час генерації, тобто час між формуванням і наступним поділом бактерії, у логарифмічній фазі росту за температури 37 °С становить близько 21 хвилини [21].

Кишкова паличка — мікроорганізм, здатністю якого є культивування як за анаеробних (без доступу кисню), так і за аеробних (за присутності кисню) умов. Однак, з метою оптимального продукування рекомбінантних протеїнів її звичайно вирощують за аеробних умов [18].

У випадку, коли метою вирощування бактерій в умовах лабораторії є синтез і виділення певного протеїну, тоді проводять вирощування культури *E. coli* у колбах на складних рідких поживних середовищах. Щоб забезпечити достатню аерацію культурального середовища та підтримати потрібний температурний режим колби поміщують на водяну баню, у кімнату для термостатування або на шейкер і безперервно струшують. Така аерація є достатньою для розмноження клітин, проте вона не завжди достатня для синтезу певного протеїну [22].

## **1.2. Застосування мікроорганізмів у біотехнологічних процесах**

### **1.2.1. Первинні метаболіти та їх виробництво**

Первинні метаболіти — невеликі молекули, які входять до складу всіх живих клітин. Вони є будівельними блоками для макромолекул, проміжними продуктами метаболізму, деякі з них перетворюються у коферменти. Для промисловості найважливішими є вітаміни, амінокислоти, органічні кислоти, нуклеотиди та розчинники. З метою підвищення активності та продукування первинних метаболітів організми, які використовуються для їх отримання, піддаються різноманітним фізіологічним і генетичним мутаціям [23–27].

Амінокислоти — біологічно активні речовини, з яких у природі побудовані усі рослинні та тваринні протеїни. Вони представляють величезний

практичний інтерес. Традиційно амінокислоти застосовуються у якості харчових і кормових добавок, а також фармацевтичних та медичних препаратів [6, 7, 28, 29].

Ринок амінокислот становить понад 6 млрд. доларів США та кожного року збільшується на 5–15 % (табл. 1.1). Світове виробництво амінокислот становить 3 млн. тон у рік [30].

Таблиця 1.1

**Виробництво амінокислот у світі [30]**

Амінокислота	Процес отримання	Тон / рік	Ринок, дол.
L-Alanine	ензимний	500	-
L-Arginine	ферментативний	1200	150 млн.
L-Aspartic acid	ензимний	10000	43 млн.
L-Cysteine	ензимний	3000	4,6 млн.
L-Glutamic acid	ферментативний	1600000	1,5 млрд.
L-Glutamine	ферментативний	1300	-
Glycine	хімічний	20000	-
L-Histidine	ферментативний	400	-
L-Isoleucine	ферментативний	400	-
L-Leucine	ферментативний	500	-
L-Lysine-HCl	ферментативний	850000	1,5 млрд.
DL-Methionine	хімічний	400000	2,3 млрд.
L-Phenylalanine	ферментативний	12650	198 млн.
L-Proline	ферментативний	350	-
L-Serine	ферментативний	300	-
L-Threonine	ферментативний	70000	270 млн.
L-Tryptophan	ензимний	3000	150 млн.
L-Tyrosine	ферментативний	165	50 млн.
L-Valine	ферментативний	500	-

У галузі виробництва амінокислот широко використовуються методи рекомбінантної ДНК. Було сконструйовано мікробні штами з плазмідами, які несуть амінокислотні біосинтетичні оперони. На даний час технологія рекомбінантної ДНК використовується для покращення показників продуктивності штамів [9, 31, 32]. У результаті цього методи генетичної інженерії вплинули на наступні показники:

- амплікацію гену, який кодує перший ензим після точки розгалуження;
- амплікацію гену, що відповідає за кодування обмеження швидкості ферментативного шляху;
- клонування гену, який кодує ензим з більшим або меншим регулюванням зворотного зв'язку;
- введення гену, що кодує ензим з енергетичними або функціональними перевагами в якості заміни нормального ензиму [4].

*Таблиця 1.2*

### Титри ферментацій амінокислот [33]

Амінокислота	Титр (г / л)
1	2
<u>L-Alanine</u>	75
<u>L-Arginine</u>	96
<u>L-Glutamic acid</u>	85
<u>L-Histidine</u>	42
<u>L-Isoleucine</u>	40
<u>L-Leucine</u>	34
<u>L-Lysine-HCl</u>	180
<u>L-Phenylalanine</u>	51
<u>L-Proline</u>	100
<u>L-Serine</u>	65

Продовження табл. 1.2

<u>L-Threonine</u>	100
<u>L-Tryptophan</u>	58
<u>L-Tyrosine</u>	26
<u>L-Valine</u>	99

Зменшення використання мутацій дозволило покращити екскрецію амінокислот і знизити внутрішньоклітинний контроль зворотного зв'язку. Ці зміни особливо є важливими у виробництві треоніну та триптофану. В результаті фізіологічних і генетичних змін вдалось одержати покращені штами мікроорганізмів, які здатні синтезувати вищі концентрації амінокислот (табл. 1.2) [33].

### 1.2.2. Одержання амінокислот шляхом мікробного синтезу

Найперспективнішим та економічно найвигіднішим шляхом отримання амінокислот є мікробний синтез. На сьогоднішній час більш, як 70 % усіх високоочищених препаратів амінокислот, які виробляються промисловістю, одержують саме цим способом. Головною перевагою мікробного синтезу, порівняно з методами хімічного синтезу, є можливість отримання L-форм амінокислот на основі відновлюваної сировини [2, 34–37].

При виробництві амінокислот у останні роки все ширше використовується біотрансформація їх попередників, особливо за допомогою імобілізованих ензимів, попередньо отриманих хімічним шляхом. Промислове виробництво амінокислот стало можливим після виявлення здатності у деяких мікроорганізмів виділяти у культуральне середовище значну кількість будь якої амінокислоти. Окрім цього, також було відмічено, що більшість з декількох тисяч проаналізованих диких штамів мікроорганізмів продукували амінокислоти у зовнішнє середовище, але у незначній кількості [10]. Однак, не було встановлено ніякого взаємозв'язку між таксономічним положенням

мікроорганізмів і їх здатністю продукувати ту чи іншу амінокислоту. Зокрема, серед можливих продуцентів глутамату відмічено мікроорганізми, з яких по 30% становлять стрептоміцети та дріжджі, 20 і 10 % відповідно бактерії та мікроскопічні гриби. Тільки один з обстежених штамів мікроорганізмів був здатний до надсинтезу глутамінової кислоти — *Corynebacterium glutamicum*. Саме цей штам використовувався за організації у 1956 році в Японії першого у світі великомасштабного виробництва глутамату із застосуванням мікробіологічних методів.

Перспективні для виробництва амінокислот штамми-продуценти постійно покращуються за допомогою селекції мутантів із зміненою генетичною програмою та регуляторними властивостями. Найпоширенішими об'єктами селекції є мікроорганізми-продуценти, які відносяться до родів *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Arthrobacter*, *Micrococcus* [9, 13, 38, 39].

Розробка технологічної схеми одержання окремої амінокислоти повністю основана на знанні шляхів і механізмів регуляції інтенсивності біосинтезу певної амінокислоти. Методом строго контрольованих змін складу та умов середовища досягають необхідного дисбалансу метаболізму, що забезпечує надсинтез цільового продукту [10]. Характерною особливістю процесів отримання амінокислот мікробіологічними методами, так само як і інших біотехнологічних виробництв, є абсолютне використання побічних продуктів, які перетворюють їх основну масу в безвідходні та екологічно чисті технології. Зокрема, осад мікроорганізмів-продуцентів і промивну воду, що містять такі цінні компоненти, як протеїни, залишки вітамінів, амінокислот, мікроелементів і мінеральних солей, висушують та використовують у якості кормових препаратів [6, 40].

Штами, модифіковані на генетичному рівні, які володіють здатністю до надсинтезу амінокислот, використовуються в якості продуцентів амінокислот. Так, найкращими продуцентами амінокислот вважаються ауксотрофні мутанти, тобто мікроорганізми, які позбавлені цілої низки ензимних систем. Внаслідок цього вони досить вимогливі до складу поживного середовища, яке повинно

містити велику кількість факторів росту. Тому в якості мікроорганізмів-продуцентів амінокислот використовуються грам-позитивні безспорові бактерії родів *Micrococcus*, *Corynebacterium* і *Brevibacterium* [10, 34].

Продукування амінокислот відбувається всередині бактеріальної клітини у вигляді вільних амінокислот, які потім виділяються в оточуюче середовище. Найбільше накопичення амінокислот відбувається у середині експоненціальної фази росту. Таємницею більшості виробничих процесів із застосуванням мікроорганізмів є зміна умов середовища, за рахунок чого й досягається синтез надлишкової кількості бажаного продукту. Необхідний дисбаланс метаболізму отримують методом емпіричної зміни наступних чинників: рН середовища, вмісту субстрату, концентрації продукту або шляхом встановлення у середовищі критичних рівнів вмісту речовин (органічних добавок, йонів мікроелементів) [31, 37].

За умови переведення біопроектів утворення амінокислот на комерційну основу було розроблено нові методи бажаних змін метаболізму в мікроорганізмів-продуцентів, налаштованих на збільшення виходу проміжних продуктів, утворення яких в інших умовах знаходиться під строгим метаболічним контролем.

З метою синтезу амінокислот бактерії почали застосовувати ще з початку 50-х років минулого століття. При цьому штами мікроорганізмів постійно покращували методами генетичної інженерії, виділяючи ауксотрофні та мутанти з модифікованими регуляторними властивостями. Для забезпечення утворення амінокислот у великих кількостях, у будь-якому випадку необхідно змінити систему регуляції обміну речовин. У зв'язку з цим, необхідно або стимулювати споживання субстрату на деяких шляхах біосинтезу і виділення амінокислот у середовище, або пригнітити побічні реакції та процеси деградації амінокислот [9, 31].

Мікроорганізми, які застосовують у промисловому виробництві амінокислот, поділяють на декілька видів: дикі штами, регуляторні мутанти, ауксотрофні мутанти та ауксотрофні регуляторні мутанти [13]. Промислові

штами, звісно, несуть певну кількість мутацій, що зачіпають механізми регуляції цільової амінокислоти та її попередників. За участі диких штамів мікроорганізмів виробництво таких амінокислот, як L-аланін, L-глутамінова кислота, L-пролін і L-валін базується на використанні властивих цим мікроорганізмам особливостей метаболізму або на стимуляції утворення амінокислот у відповідь на зміну умов зовнішнього середовища [9].

Здатність синтезувати амінокислоти властива бактеріям багатьох родів. Зокрема, мікроорганізми родів *Brevibacterium* і *Corynebacterium*, які вирощували на етанолі, оцтовій кислоті або карбоновмісній сировині за наявності необхідної кількості біотину в поживному середовищі здатні синтезувати до 85 г / л глутамінової кислоти [22, 41]. Необхідною умовою для накопичення цієї амінокислоти вважається повне або часткове пригнічення активності ензиму  $\alpha$ -кетоглутаратдегідрогенази. За додавання поверхнево-активних речовин, жирних кислот і  $\beta$ -лактамних антибіотиків синтез продукту збільшується. Якщо змінити умови процесу ферментації середовища, у ході якого синтезується L-глутамінова кислота, то тоді він може переключитися на синтез L-проліну або L-глутаміну. За високого вмісту в середовищі йонів амонію та біотину складаються сприятливі умови для синтезу L-проліну. А за високого рівня йонів цинку й амонію у слабо кислому середовищі збільшується синтез L-глутаміну [14].

Як відомо, ауксотрофні мутанти не здатні до утворення інгібіторів метаболічного шляху. Вони діють за принципом негативного зворотного зв'язку, оскільки в них відсутня певна ключова ферментативна реакція. Тому за культивування мутантних штамів на поживному середовищі з мінімальним вмістом необхідного поживного складника, вони здатні утворювати надлишкову кількість речовини-попередника [42].

Окрім цього, ауксотрофні мутанти застосовуються у випадках, коли необхідно одержати сполуки, які є кінцевими продуктами розгалужених ланцюгів метаболічних реакцій. Зокрема, L-аспартат є спільним попередником для L-ізолейцину, L-лізину, L-метіоніну та L-треоніну [10]. У процесі



утворення вказаних амінокислот перша реакція каталізується аспартаткіназою, активність якої може пригнічуватись за механізмом негативного зворотного зв'язку за сумісного впливу L-треоніну та L-лізину. В ауксотрофних за метіоніном, треоніном або гомосерином мутантів виявлено значне зменшення внутрішньоклітинного вмісту L-треоніну. Це у свою чергу перешкожає блокуванню аспартаткінази та дозволяє клітинам накопичувати L-лізин [43].

Ауксотрофні мутанти володіють здатністю накопичувати кінцеві продукти нерозгалужених шляхів біосинтезу. В таких випадках доводиться проводити відбір мутантів з частково порушеною регуляцією біосинтезу, завдяки чому можна досягнути підвищення виходу кінцевого продукту. Такі мутанти називають регуляторними. Відбір їх проводять за стійкістю до аналогів амінокислот або серед ревертантів ауксотрофів. Застосування аналогів амінокислот базується на їхній подібності до природних амінокислот. Однак, вони пригнічують ріст бактерій, але цей вплив можна зменшити шляхом додавання відповідної амінокислоти. Отже, аналоги амінокислот виступають у ролі штучних, що діють за принципом негативного зворотного зв'язку, інгібіторів ензимів, які забезпечують біосинтез природних амінокислот і одночасно пригнічують процес включення їх у протеїни. Появу мутантів, які проявляють стійкість до таких потужних інгібіторів, можна пояснити тим, що у них регуляторні ензими відповідного шляху обміну перестають бути чутливими до аналогів. З метою підвищення виходу продукту можливо використати одночасно ауксотрофію та дефекти регуляції [42]. До прикладу, в бактерій *B. flavum* і *C. glutamicum* не виявлено надпродукції L-треоніну. Це пояснюється тим, що у них не відбувається одночасного пригнічення аспартаткінази за механізмом негативного зворотного зв'язку L-лізином і L-треоніном, а L-треонін пригнічує гомосериндегідрогеназу. Стійкий до аналогу треоніну мутант у надлишку синтезує треонін у зв'язку з тим, що його ензими, які пригнічуються даною амінокислотою, є десенсибілізованими. Ензими, які приймають участь у синтезі треоніну (кіназа, гомосериндегідрогеназа), також

блокуються L-метіоніном. Тому ауксотрофні за метіоніном мікроорганізми ще інтенсивніше синтезують L-треонін [44].

Саме завдяки генетичній інженерії вдалось одержати регуляторні мутанти. Генетична інженерія — найважливіший прогресивний спосіб зміни генетичної програми організму з метою створення високопродуктивних штамів промислових мікроорганізмів. Її успіхи позитивно впливають на промислову біотехнологію [3]. Прикладом цього є створення штаму *Escherichia coli* для одержання треоніну. Внаслідок застосування методів генетичної інженерії змінили не лише регуляторні властивості ензиму аспартаткінази, а й поживні потреби штаму. За введення у геном *E. coli* нового гену стало можливим використання бактерією в якості джерела карбону цукрози, яка є основним дисахаридом такої промислової сировини, як бурякова меляса [19]. Завдяки даним маніпуляціям разом з ампліфікацією плазмід, які містили оперон треоніну, вдалось досягти суттєвого зростання продуктивності штаму та отримати L-треонін у кількості 100 г / л культурального середовища за 40 год. ферментації [35].

### 1.2.3. Характеристика треоніну та його роль в організмі

Треонін — незамінна моноамінокарбонова ( $\alpha$ -аміно- $\beta$ -оксимасляна, 2-аміно-3-гідроксибутанова) амінокислота [8]. Структурна формула треоніну представлена на рис. 1.1 [45].

Треонін був відкритий у 1935 році американським біохіміком Вільямом Каммінгом Роузом під час дослідження на щурах [46]. А вперше виділений він був з гусячого пір'я. Ця амінокислота сприяє нормальному росту організму та є необхідною для підтримання роботи імунної системи. Поряд з іншими амінокислотами вона приймає участь в утворенні природних протеїнів.

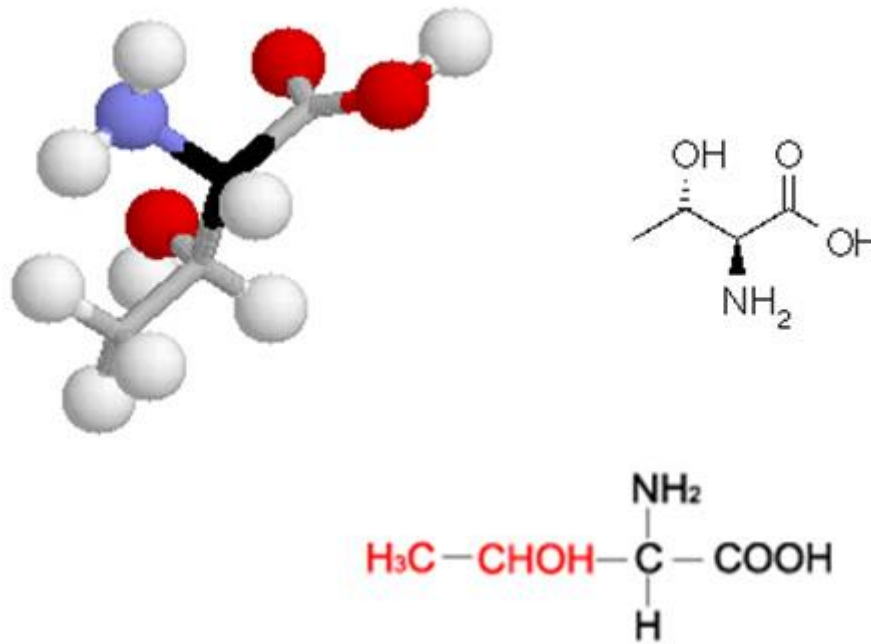


Рис. 1.1. Будова амінокислоти треоніну

Для людини та тварин треонін є незамінною амінокислотою. Добова потреба в цій амінокислоті для дорослої людини становить 0,5 г, а для дітей — приблизно 3 г. Джерелами треоніну є молочні та м'ясні продукти, яйця, риба, різноманітні крупи, гриби. Менше його міститься у бобових, насінні та горіхах (табл. 1.3) [47].

Окрім цього, слід зазначити, що вміст треоніну в готовому продукті відрізняється від його вмісту в сирому. До прикладу, вміст треоніну при смаженні м'яса збільшується приблизно на 10-15 %, а при запіканні або тушкуванні він навпаки зменшується на стільки ж відсотків.

В організмі треонін досить легко засвоюється. Однак, для кращого його засвоєння необхідні вітаміни групи В, зокрема  $\text{B}_3$  та  $\text{B}_6$ . Окрім цього, важливе значення має вміст в організмі магнію, оскільки від цього мікроелементу залежить правильність засвоєння треоніну.

Таблиця 1.3

## Вміст треоніну в окремих продуктах

Продукти, 100 г	Вміст треоніну, мг	Кількість продукту, г	Кількість готового блюда, г
Соя	1,39	36	79,2
Квасоля	0,98	51,0	112,2
Сочевиця	0,96	52,0	114,4
Сир твердий	0,95	52,6	52,6
Курка	0,89	56,0	64,4
Соняшникове насіння	0,89	56,0	67,2
Яловичина	0,80	62,1	71,4
Кунжут	0,77	65,0	78,0
Арахіс	0,74	67,5	81,0
Свинина	0,65	78,0	78,0
Сир кисломолочний	0,65	78,0	78,0
Волоський горіх	0,59	85,0	102,0
Фундук	0,57	87,7	105,0
Гречка	0,51	98,0	313,6
Пшоно	0,40	125,0	400,0
Овес	0,33	151,0	181,0
Манна крупа	0,32	156,0	500,0
Горошок зелений	0,15	333,0	400,0
Вершки	0,13	384,0	384,0
Молоко, кефір	0,11	454,0	454,0
Білий рис	0,10	500,0	600,0
Картопля	0,10	500,0	600,0

Дефіцит в організмі людини треоніну проявляється наступними симптомами: затримкою росту та розвитку, порушенням сконцентрованості уваги, м'язовою слабкістю, втратою м'язової маси, депресією, психічними

розладами. Крім цього, нестача треоніну впливає на стан зубів, нігтів, шкіри та волосся. Проте, за умови повноцінного та збалансованого харчування можна уникнути дефіциту амінокислоти. Тренін також приймає участь в утворенні еластину та колагену, стимулює ріст тканин, сприяє обміну енергії в міоцитах. Володіючи глікогенними властивостями, він бере участь в утворенні антитіл та імуноглобулінів [48].

Надлишок в організмі треоніну призводить до накопичення сечової кислоти. При цьому, накопичення великої кількості сечової кислоти несприятливо позначається на загальному стані організму, спричиняючи розлади певних систем і органів, зокрема печінки та нирок, а також підвищує кислотність.

Треонін виконує структурну функцію, входячи до складу практично усіх протеїнів організму людини. У тому числі він є складовою частиною пепсину— ензиму який приймає участь у перетравлюванні протеїнів у шлунково-кишковому тракті, а також входить до складу протеїну сполучної тканини — фібрину. Більшість природних протеїнів містить від 2 до 6 % треоніну [47]. Він також входить до складу емалі зубів. Недостатнє споживання треоніну призводить до руйнування структури зубів, що є причиною утворення карієсу.

Треонін відіграє ключову роль у нормальному функціонуванні сполучної тканини, перетворюючись в організмі на серин і гліцин, які у свою чергу використовуються для побудови таких сполучнотканинних протеїнів, як еластин і колаген. Як відомо, колаген у організмі зустрічається скрізь: у м'язових фасціях (плівках, які структурують м'язові волокна), сухожиллях, зв'язках. Усюди він є зануреним у матрикс з глікопротеїдів, що мають вигляд в'язкого желе, яке надає пружності та еластичності тканинам [49]. Отже, треонін приймає опосередковану участь у синтезі еластину та колагену, які необхідні для зміцнення м'язів і судин.

У дитячому віці потреба у треоніні значно більша (у 10-12 разів), ніж у дорослому. Це пояснюється інтенсивнішим ростом у дітей. Під час інтенсивного росту м'язів, кісток, судин, зв'язок необхідно, щоб на конвеєр, що

виробляє протеїни сполучної тканини, надходили будівельні амінокислоти, якими є треонін і синтезовані з нього серин та гліцин. Недостатня кількість даних амінокислот в організмі дітей призводить до таких порушень, як м'язова дистрофія, сколіоз, слабкість серцевого м'язу, плоскостопість, карієс, короткозорість [48].

Поряд з аспарагіноювою кислотою та метіоніном, треонін допомагає у розщепленні ліпідів і жирних кислот у печінці. Він входить до складу багатьох ензимів, які утилізують ліпіди. Дефіцит у харчових продуктах треоніну сприяє розвитку жирової дистрофії [1].

Окрім цього, треонін виконує антиоксидантну, травну, нейромедіаторну та імуностимулювальну функції. З'єднуючись за рахунок ОН-групи з токсичними речовинами, він дезактивує їх і виводить з організму.

Як відомо, треонін входить до складу травного ензиму пепсину, який бере участь у розщепленні протеїнів у ШКТ. Також він допомагає у разі непереносимості деяких харчових продуктів, зокрема пшеничного глютену.

Треонін є джерелом для утворення гальмівного медіатора  $\gamma$ -аміномасляної кислоти. Будучи попередником даного нейромедіатора, він застосовується під час комплексного лікування депресії та інших захворювань нервової системи [50]. Застосування треоніну сприяє покращенню пам'яті, підвищенню концентрації уваги, підняттю настрою, збільшенню працездатності. Також він є попередником іншого нейромедіатора — гліцину. Тому добавки треоніну є корисними у лікуванні розсіяного та бічного аміотрофічного склерозів. Окрім цього, його застосовують у комплексному лікуванні алкоголізму та наркоманії, оскільки він знижує потяг до речовин, які викликають залежність.

Імуностимулювальна функція треоніну полягає в тому, що він бере участь у синтезі антитіл та імуноглобулінів, які захищають організм від різноманітних інфекцій [48].

У сільському господарстві треонін застосовують у годівлі тварин, так як він сприяє росту скелетної мускулатури, інтенсифікації синтезу імунних

протеїнів, гліцерину, травних ензимів, одержанню енергії через цикл Кребса. Особливо багаті на треонін травні ензими, слиз і клітини слизової шлунково-кишкового епітелію та деякі імунні протеїни. Проведеними дослідженнями було встановлено, що незначна нестача треоніну набагато сильніше впливає на синтез імуноглобулінів в організмі, ніж на ріст [51].

Треонін відіграє певну роль у регуляції засвоєння корму, оскільки він є одним з декількох можливих попередників гліцину — замінної амінокислоти, яка синтезується в організмі тварин. У свиней та птиці ключовими ензимами обміну треоніну є відповідно треоніндегідрогеназа і треонінальдолаза. Однак, зважаючи на те, що ці обидва ензими каталізують незворотні реакції, тому гліцин не може бути метаболічним джерелом треоніну. Окиснюючись у циклі трикарбонних кислот, куди він вводиться у вигляді пірвіноградної кислоти, карбоний скелет треоніну може слугувати джерелом енергії. Зважаючи на це, дефіцит у раціоні тварин треоніну призводить до зменшення споживання ними корму, зниження їх вгодованості, порушення діяльності ШКТ і розвитку м'язової тканини, виснаження організму [52].

Так як треонін — незамінна амінокислота, яка не синтезується в організмі, то його потреба повинна бути забезпечена за рахунок надходження з кормами та кормовими добавками. Проте, багато видів зернових культур (ячмінь, пшениця, сорго) та інших компонентів раціонів містять недостатню кількість треоніну. Крім цього, перетравність його в організмі, особливо у свиней, є досить низькою. Тому, завдяки додаванню до раціону свиней чистих амінокислот можливо зменшити вміст протеїну в кормах і покращити його використання без зниження темпів росту тварин [53]. Загальновизнано, що якщо за мету поставлено досягти максимального вмісту в тушах протеїну і мінімального вмісту жиру, то потреба в амінокислотах виявляється більшою, ніж коли завданням є досягнення максимальної швидкості або ефективності росту. Однак, у деяких випадках було відмічено тенденцію до підвищення жирності в свиней, які отримували корми зі зниженим вмістом протеїну та добавками амінокислот.



У птахівництві велика увага приділяється завданню щодо зниження рівня протеїну в раціонах за рахунок введення концентрованих амінокислот. Це дає змогу забезпечити оптимальний розвиток ремонтного молодняка і максимальну яєчну продуктивність курей-несучок, а також максимальні прирости живої ваги та конверсію корму в бройлерів. Як відомо, першою лімітуючою амінокислотою у раціонах птиці є метіонін, а другою — лізин. Уведення у корми для курей-несучок і бройлерів, які вже містять лізин та метіонін, треоніну також має хороший ефект, особливо на початкових стадіях росту [51, 53].

З метою компенсації нестачі застосовують кормовий треонін, який синтезований шляхом ферментації в умовах промислового виробництва. Синтезований таким чином L-треонін у чистому вигляді представляє собою кристалічний білий порошок, вміст активної речовини в якому становить не менше, ніж 98,5 % (табл. 1.4). Даний препарат містить незначну кількість летких речовин і пилу. Додають його до преміксів, комбікормів, заміників молока та мінеральних кормів [6].

Таблиця 1.4

#### Фізико-хімічні показники кормового L-треоніну

Показник	Норма
Зовнішній вигляд	98,5
Масова частка речовини, %, не менше	0,5
Втрати при сушінні, %, не менше	0,5
Вміст золи, %, не менше	119,1
Молекулярна маса	650
Розмір часточок, кг / м <sup>3</sup>	
20-50 %	менше 63
45-80 %	63-150
3-10 %	більше 150
pH 5 % водного розчину	5,1-5,6

Ефективним є застосування добавки кормового треоніну в птахівництві та свинарстві, а також при вирощуванні молодняку великої рогатої худоби. За рахунок додавання до раціонів тварин і птиці чистих амінокислот, у тому числі треоніну, можна знизити кількість протеїну в кормах, покращити їх використання, при збереженні високих середньодобових приростів. При цьому, кількість добавки залежить від вмісту амінокислот у кормі, виду та віку тварин і птиці. Ефективна кількість треоніну в раціонах у середньому становить: для свиноматок — 0,1-1,5, для відгодівельних свиней — 0,2-1,5, для поросят — 0,5-2, для курей-несучок, індичок, курчат-бройлерів — 0,1-1 кг / т, у заміниках цільного молока для телят — 0,5-3 кг / т [53].

## РОЗДІЛ 2. УМОВИ ТА МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ ДОСЛІДЖЕНЬ

### 2.1. Вибір об'єкту дослідження

В якості об'єкту дослідження використовували штам *Escherichia coli* ТРН 212.

Даний штам володіє наступними характеристиками:

- Культуральні та морфологічні особливості штаму з зазначенням середовища: за формою клітин це товсті короткі палички, довжиною приблизно 1,9-2,1 мкм, діаметром приблизно 0,8-1,0 мкм; можливий поліморфізм; не утворюють спор; у препараті розташовуються хаотично; на лізогенному середовищі утворює колонії приплюснutoї форми з нерівними краями, на мінімальному середовищі утворює колонії з лізисним ефектом.

- Галузь застосування штаму: є продуцентом амінокислот.

- Продукти, які синтезує штам: незамінна амінокислота (треонін).

- Активність штаму (продуктивність, інші продуктивні показники – 9-11 г/ л за ферментування у середовищі ФС у пробірках через 1 добу росту; близько 90-100 г/ л за ферментування в середовищі з кукурудзяним екстрактом у ферментері за 40 год.

- Спосіб визначення активності штаму із зазначенням методу: високоефективна рідинна хроматографія.

- Спосіб, умови та склад середовищ для тривалого зберігання штаму: ліофілізація, рідке лізогенне середовище з 15 %-вим гліцерином.

- Відомості про безпечність використання штаму:

1. Штам не є трансгенний та не містить генів інших організмів, перенесених генів резистентності, генетичних змін, які пов'язані зі застосуванням генно-технічних методик.

2. Штам не є фітопатогенний, не зоопатогенний та не становить небезпеку за будь якими іншими причинами.

- Оптимальне значення рН для росту штаму – 6,8-7,3 одиниць.

- Оптимальна температура для росту штаму – 32,5-36,5 °С.
- Термін зберігання штаму – близько п'яти років у ліофільно висушеному вигляді.

## 2.2. Приготування поживних середовищ

*Склад та приготування поживного середовища А для вирощування інокуляту в колбах (г / л):*

- екстракт дріжджів (35 г),
- глюкоза (3 г),
- фосфорнокислий калій одно заміщений (2,5 г),
- хлорид натрію (2,52 г),
- вода (до 1 л).

40 %-вим розчином натрію гідроокису доводять рН середовища до 7-7,3. Переливають середовище у скляну банку (колбу), об'ємом 1000 мл, закривають кришкою (корком) та подвійним ковпачком з обгорткового паперу, обмотують шнурком і автоклавують за температури 114-118 °С та тиску 0,080 МПа впродовж 29-31 хв. Після стерилізування колбу з середовищем охолоджують і проводять контроль його якості та стерильності.

Контроль якості середовища проводять за наступними показниками: рН середовища, оптична густина середовища, вміст у середовищі сухих речовин, глюкози та нітрогену.

Контроль стерильності середовища проводять за допомогою посіву на чашки Петрі з агаризованим лізогенним середовищем з біотином та глюкозою.

Якщо середовище відповідає всім нормам стерильності та якості, тоді його переміщують до холодильника і використовують для вирощування інокуляту. Термін придатності такого середовища становить не більше одного місяця з дати приготування.

*Склад і приготування ферментаційного середовища для контролю продуктивності посівного матеріалу та клону (г/л):*

- сухий ауто лізат дріжджів (2 г),
- глюкоза (40 г),
- амонію сульфат (10 г),
- феруму сульфат 7-водний (0,02 г),
- фосфорнокислий калій одно заміщений (2 г),
- хлорид натрію (0,6 г),
- мангану сульфат 5-водний (0,02 г),
- вуглекислий кальцій (20 г),
- магнію сульфат 7-водний (0,40 г),
- вода (до 1 л).

40 %-вим розчином натрію гідроокису доводять рН середовища до 7,1 та перемішують. Доливають очищену воду до 820 мл, знову перемішують. Переливають середовище в скляну банку, об'ємом 1000 мл, закривають кришкою та подвійним ковпаком з обгорткового паперу, перев'язують шпагатом. Після цього проводять автоклавування за тиску 0,08 МПа і температури 119-123 °С упродовж 19-21 хв.

Окремо стерилізують:

- 50 %-вий розчин глюкози за тиску 0,08 МПа, температури 119-123 °С впродовж 19-21 хв;
- 20 г вуглекислого Са за тиску 0,08 МПа, температури 119-123 °С упродовж 19-21 хв;
- 0,5 %-вий розчин сірчаноокислого Mg 7-водного за тиску 0,08 МПа, температури 119-123 °С впродовж 19-21 хв.

Ферментаційні середовища з екстрактом дріжджів, ультра фільтрованим екстрактом дріжджів, м'ясним пептоном, дріжджовим пептоном і казеїновим триптоном готують за тією самою методикою, що й ферментаційне середовище з ауто лізатом дріжджів.

*Склад та приготування ферментаційного середовища з кукурудзяним екстрактом для контролю посівного матеріалу і продуктивності клону (г /л):*

- сухий кукурудзяний екстракт (10 г) або рідкий кукурудзяний екстракт (20 г),
- глюкоза (40 г),
- фосфат калію 1-заміщений (2 г),
- амонію сульфат (10 г),
- мангану сульфат 5-водний (0,02 г),
- магнію сульфат 7-водний (0,4 г),
- феруму сульфат 7-водний (0,02 г),
- хлорид натрію (0,6 г),
- БІС-ТРІС буфер (50 г),
- вода (до 1 л).

Розчиняють усі солі. Після чого зважують на вагах наважку 49,9-50,1 г БІС-ТРІС буферу та переносять у мірну склянку, рН середовища доводять 20%-вим розчином хлоридної кислоти до 7,2. Далі доводять об'єм розчину до 840 мл очищеною водою та перемішують. Переливають середовище у скляну банку чи колбу, об'ємом 1000 мл, закривають кришкою та подвійним ковпаком, зробленим з обгорткового паперу. Перев'язавши шнурком, автоклавують за тиску 0,08 МПа та температури 119-123 °С упродовж 19-21 хв.

Окремо стерилізують:

- 50 %-вий розчин глюкози за температури 119-123 °С та тиску 0,08 МПа впродовж 19-21 хв;
- 0,5 %-вий розчин сульфату магнію 7-водного за температури 119-123 °С і тиску 0,08 МПа впродовж 19-21 хв.

Готують 50 %-вий розчин глюкози. Переносять його у колбу, об'ємом 1000 мл, закривають кришкою та 2 ковпаками, зробленими з обгорткового паперу, які фіксують шнурком. Далі розчин стерилізують автоклавуванням, остиджують і додають у середовище ферментування.

Одночасно готують 0,2 %-ві розчини мангану сульфату 5-водного та феруму сульфату 7-водного, які розчиняють у 1,8 %-вому розчині цитрату.

Даний розчин можна зберігати впродовж місяця у холодильнику за температури 4-8 °С.

Після стерилізування колби з середовищем, 0,5 %-вим розчином сульфату магнію 7-водного та 50 %-вим розчином глюкози охолоджують. У ламінарному боксі усі складники середовища з'єднують за стерильних умов, після чого проводять контроль стерильності та якості отриманих середовищ.

Контроль якості поживного середовища здійснюють за наступними показниками: вмістом у них нітрогену, глюкози та сухої речовини, рН і ОГ середовища. Контроль стерильності поживного середовища проводять за допомогою посіву на чашки Петрі з агаризованим лізогенним середовищем, яке містить глюкозу та біотин.

Якщо дотримано всіх норм стерильності та якості, то середовище переносять у холодильник і застосовують для перевірки продуктивності інокуляту. Термін придатності середовища – один місяць.

*Склад і приготування агаризованого лізогенного середовища з глюкозою та біотином (г / л):*

- екстракт дріжджів (5,0 г),
- глюкоза (5,0 г),
- пептон (10,0 г),
- агар (15,0 г),
- натрію хлорид (10,0 г),
- вода (до 1000 мл), рН 7-7,1.

Усі компоненти середовища, за винятком глюкози, стерилізують разом.

Готують 50 %-вий розчин глюкози. Переносять його до колби, об'ємом 25 мл, щільно закривають кришкою та стерилізують автоклавуванням упродовж 29-31 хв за тиску 0,05 МПа і температури 114-118 °С. На колбу наклеюють етикетку або маркером роблять надпис, вказуючи назву вмістимого, його концентрацію та дату приготування. Зберігають розчин за температури 4-8 °С у холодильнику впродовж місяця.



Для приготування 1000 мл агаризованого поживного середовища потрібно розчинити в 700 мл очищеної води 9,9-10,1 г натрію хлориду, 9,9-10,1 г пептону і 4,9-5,1 г екстракту дріжджів. Розчин перемішують за допомогою магнітної мішалки та доводять його рН до 7-7,2 40 %-вим розчином натрію гідроксиду. Після цього до середовища додають 14,9-15,1 г агару та доводять водою об'єм до 1000 мл. Середовище переливають в банку, щільно закривши кришкою та двома ковпаками з обгорткового паперу, які фіксують шпагатом. Далі проводять автоклавування впродовж 29-31 хв. за температури 114-118 °С і тиску 0,08 МПа. Банку після стерилізації охолоджують до температури 68-72 °С. У ламінарному боксі стерильною піпеткою до середовища додають стерильний 50 %-вий розчин глюкози в кількості 10 мл. Пізніше у стерильних умовах у ламінарному боксі агаризоване середовище розливають по 20-30 мл у стерильні чашки Петрі. Чекають поки середовище застигне, після чого чашки Петрі ставлять до термостату, де зберігають за температурного режиму 31-33 °С. Перед використанням чашки Петрі з агаром потрібно витримати протягом двох діб.

*Склад та приготування агаризованого поживного середовища Лурія (г/л):*

- екстракт дріжджів (5,0 г),
- агар (15,0-20,0 г),
- пептон (15,0 г),
- натрію хлорид (5,0 г),
- вода (до 1000 мл), рН 7-7,2.

Усі складові для приготування середовища перемішують за допомогою магнітної мішалки. Доливають очищену воду до 1000 мл. 40 %-вим розчином натрію гідроксиду доводять рН розчину до 7-7,2 та знову перемішують. Колбу закривають кришкою та двома ковпаками, зробленими з обгорткового паперу, обмотують шнурком і стерилізують в автоклаві впродовж 29-31 хв за температури 114-118 °С та тиску 0,08 МПа. Потім колбу охолоджують до температури 68-72 °С. Агаризоване середовище за стерильних умов у ламінарній шафі розливають по 20-30 мл у стерильні чашки Петрі. Після

застигання середовища чашки Петрі ставлять у термостат, де витримують за температури 31-33 °C протягом двох діб перед тим, як використовувати.

### **2.3. Методика оживлення замороженої культури штаму *E. coli* та засівання посівних колб**

Кріопробірку з вмістом 2,0 мл замороженої культури дістають з біоморозильної камери, де вона зберігалась за температури -80 °C. Розморозжують її впродовж 25-35 хв за температури 20-23 °C, при цьому періодично струшуючи.

У ламінарі в стерильні колби Ерленмеєра, об'ємом 1000 мл, за допомогою стерильного мірного циліндра наливають по 75,0 мл стерильного поживного середовища А.

Засівання на поживне середовище А культури проводять з розрахунку одна кріопробірка на 150,0 мл середовища. Засівання культури у даному випадку проводять наступним чином: відбирають дозатором 0,85 мл культури з кріопробірки та переносять її до колби з вмістом 75,0 мл середовища А. Засівання проводять у двох колбах.

Далі колби з середовищем А і культурою клітин ставлять на шейкер та проводять процес вирощування інокуляту при 320 об./ хв. протягом шести год. за температури 37 °C. Після шестигодинного росту інокуляту колби забирають з шейкеру та проводять висів на стерильність. Також здійснюють відбір проб для вимірювання рН та оптичної густини і засівання інокуляту на середовище ферментації для перевірки продуктивності.

### **2.4. Методика дослідження впливу на продуктивність штаму *E. coli* різних джерел амінного нітрогену**

Дослідження впливу на продуктивність штаму *E. coli* різних джерел амінного нітрогену проводили у колбах і воно включало наступні етапи:

1. Підготування та стерилізація необхідного посуду і обладнання:

- скляні піпетки, об'ємом 10 і 25 мл,
- скляний циліндр, об'ємом 100 мл,
- колби Ерленмеєра, об'ємом 100, 250 і 1000 мл,
- автоматичний дозатор, об'ємом 100-1000 мкл,
- наконечники, об'ємом 100-1000 мкл.

2. Приготування та стерилізування поживних, агаризованих і ферментаційних середовищ, які необхідні для проведення досліду.

3. Наробка посівного матеріалу для проведення досліду.

Проводили відбір 23 мл інокуляту з колби Ерленмеєра, об'ємом 1000 мл, із заздалегідь вирощеним посівним матеріалом, стерильною скляною піпеткою. 20 мл інокуляту переносили до стерильної колби Ерленмеєра, об'ємом 1000 мл. 2 мл вносили у стерильну пробірку з кришкою, що закручується і вимірювали рН та оптичну густина.

У 20 колб Ерленмеєра, об'ємом 250 мл розливали по 15,0 мл різних ферментаційних середовищ, кожне з яких досліджували у трьох паралелях, і вносили по 1 мл посівного інокуляту. Підписані колби ставили на шейкер на одну добу при 320 об./хв., за температури 37 °С.

Загалом було досліджено сім ферментаційних середовищ з різними джерелами амінного нітрогену (табл. 2.1).

*Таблиця 2.1*

**Ферментаційні середовища та джерела амінного нітрогену**

Назва ферментаційного середовища (ФС)	Вміст амінного нітрогену (%)
1	2
ФС з автолізатом дріжджів	≥3,0 %
ФС з екстрактом дріжджів	>4,0 %

Продовження табл. 2.1

1	2
ФС з ультра фільтрованим екстрактом дріжджів	>5,0 %
ФС з дріжджовим пептоном	>4,0 %
ФС з м'ясним пептоном	≥3,0 %
ФС з казеїновим <u>триптоном</u>	≥2,5 %
ФС з кукурудзяним екстрактом та БІС-ТРИС буфером	≥2,0 %

Через добу росту інокуляту колби знімали з шейкеру й проводили посіви на стерильність на чашки Петрі з агаризованим середовищем Лурія з метою візуального контролю стерильності та відповідності морфологічних характеристик. Також для візуального контролю розмірів клітин продуценту робили мікроскопування за методом «живої краплі».

У всіх колбах вимірювали рН, ОГ, вміст сухої речовини, треоніну та залишкової глюкози.

Визначення показників рН проводили з використанням базового лабораторного рН-метра РВ-11 (Німеччина). Застосовували при цьому потенціометричний метод, що базується на вимірюванні ЕРС електродної системи.

Вимірювання оптичної густини здійснювали на спектрофотометрі «UNICO 2105» (США, 2008). При цьому застосовували спектрофотометричний метод вимірювання з метою визначення кількості клітин у середовищі (концентрації клітин).

Визначення вмісту сухих речовин проводили на аналізаторі вологості МА 150 Sartorius AG 1306-00089 (Німеччина). У вказаному приладі використовується метод визначення сухих речовин висушуванням інфрачервоними променями.

Вимірювання вмісту треоніну в культуральній рідині здійснювали методом ВЕРХ на хроматографі DionexUltiMate-3000 HPLC (США), який оснащений програмним забезпеченням Chromeleon 7.

Визначення залишкової глюкози у пробах проводили із застосуванням глюкозооксидазного методу за допомогою автоматичного аналізатора «ЕКСАН-ГМ» (Латвія). Принцип методу полягає у тому, що при окисненні глюкози глюкозооксидазою утворюється пероксид водню. У присутності пероксидази він окиснює о-діанізидин, перетворюючи його у забарвлену в синій колір сполуку.

## **2.5. Статистична обробка результатів досліджень**

Одержані у результаті досліджень дані обробляли методами варіаційної статистики. При цьому розраховували середнє арифметичне значення, похибку середнього арифметичного, стандартне відхилення, коефіцієнт варіації, похибку різниць. Результати експериментів представляли у вигляді середньоарифметичних значень з їхніми стандартними похибками. Вірогідність різниць між дослідними та контрольними пробами визначали використовуючи критерій Стьюдента.

## РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

### 3.1. Вивчення морфології штаму *E. coli* ТРН 212

Проводили дослідження з метою з'ясування морфологічних і фізіологічних особливостей штаму *E. coli* ТРН 212 на різних етапах його культивування. Було виявлено, що після розморожування культура клітин найбільше наближена до паспортних характеристик мікроорганізму. Зокрема, відмічається переважання бактерій однакового розміру: діаметр – приблизно 0,8-1 мкм, довжина – 1,9-2,1 мкм. Також присутні поліморфні форми. Проте наявність клітин, які діляться незначна або їх зовсім немає (рис. 3.1).

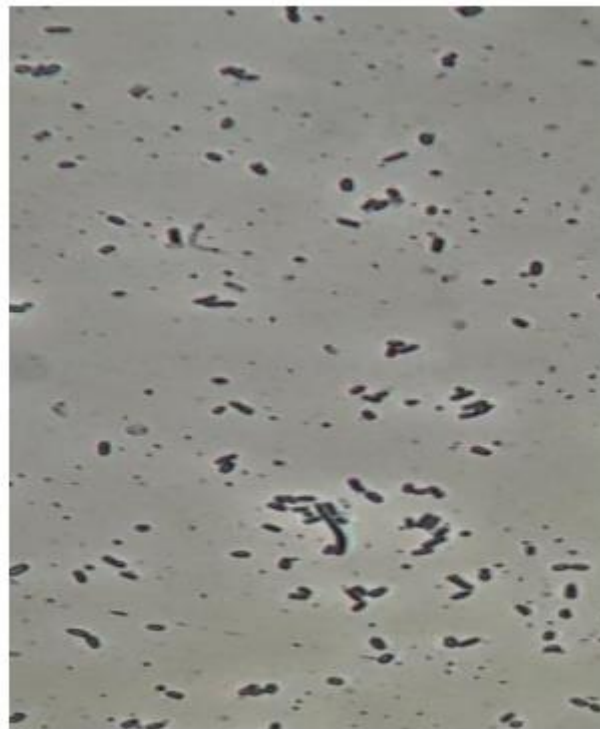


Рис. 3.1. Культура клітин штаму *E. coli* ТРН 212 після розморожування

Після шестигодинного росту в колбах з середовищем А спостерігається збільшення кількості клітин, які діляться у вигляді ланцюжка по дві клітини. Також виявлено появу поліморфних форм *E. coli* (рис. 3.2).

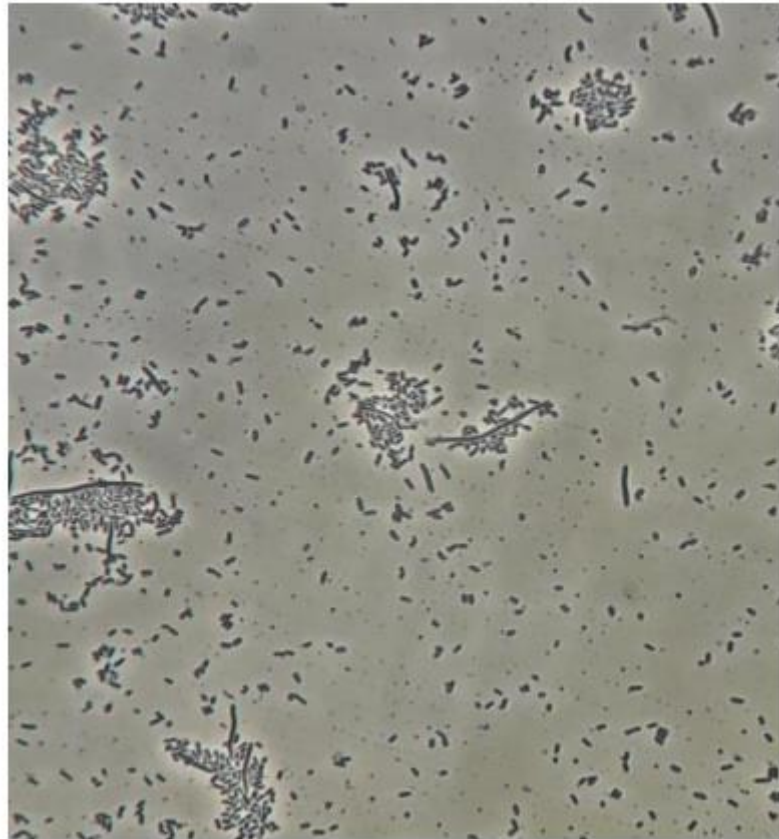


Рис. 3.2. Культура клітин штаму *E. coli* ТРН 212 у поживному середовищі А

Після культивування протягом доби у колбах Ерленмеєра з ферментаційними середовищами, спостерігали збільшення кількості поліморфних клітин, значне підвищення чисельності клітин у середовищі. Проте відмічено зниження кількості бактерій, які діляться, що очевидно пов'язано із процесами старіння клітин.

### **3.2. Продуктивність штаму *E. coli* ТРН 212 за різних джерел амінного нітрогену в середовищі**

У результаті проведених досліджень було виявлено, що культура клітин штаму *E. coli* ТРН 212 добре росла на всіх ферментаційних середовищах (табл. 3.1).



Таблиця 3.1

**Продуктивність штаму *E. coli* ТРН 212 за культивування у  
середовищах з різними джерелами амінного нітрогену,  $M \pm m$**

№ п.п.	Джерело амінного нітрогену	Години росту	pH	ОГ	Вміст треоніну, мг	Залишок ва глюкоза
1	Екстракт дріжджів	24	5,3±0,04	8,6±0,7	4,1±0,1	18,0±0,6
2	Ультрафільтрований екстракт дріжджів	24	7,2±0,1	17,6±1,3	8,4±0,2	0,3±0,03
3	Аутолізат дріжджів	24	5,3±0,03	10,0±0,7	5,4±0,2	16,7±0,8
4	М'ясний пептон	24	5,3±0,02	8,8±0,1	1,7±0,03	15,2±0,2
5	Дріжджовий пептон	24	5,3±0,02	10,1±0,1	3,3±0,1	18,2±0,5
6	Казеїновий триптон	24	5,3±0,02	9,9±0,2	1,9±0,1	14,7±0,2
7	KE+БІС-ТРИС буфер	24	6,3±0,04	22,4±1,4	11,4±0,2	0

Примітка: ОГ (оптична густина) – це міра непрозорості шару речовини для променів світла, вона є характеристикою ослаблення оптичного випромінювання у шарах різних речовин. Вимірювання ОГ застосовується для кількісного визначення концентрацій різних речовин у розчинах, суспензіях клітин та ін.

Проаналізувавши висіви на чашках Петрі з агаризованим середовищем Лурія, ми не виявили росту там сторонньої мікрофлори.

Під час проведення мікроскопічних досліджень у полі зору мікроскопу спостерігались достатньо великі клітини з чітко виділеним поліморфізмом, тобто клітини були різної форми та величини. За морфологічною



характеристикою клітини відповідали опису в паспорті штаму. А саме: це були товсті короткі палички з заокругленими кінцями, діаметром 0,8-1 мкм, довжиною 1,9-2,1 мкм, які не утворювали спор, не рухливі, з хаотичним розташуванням у мікропрепараті (рис. 3.3-3.6).

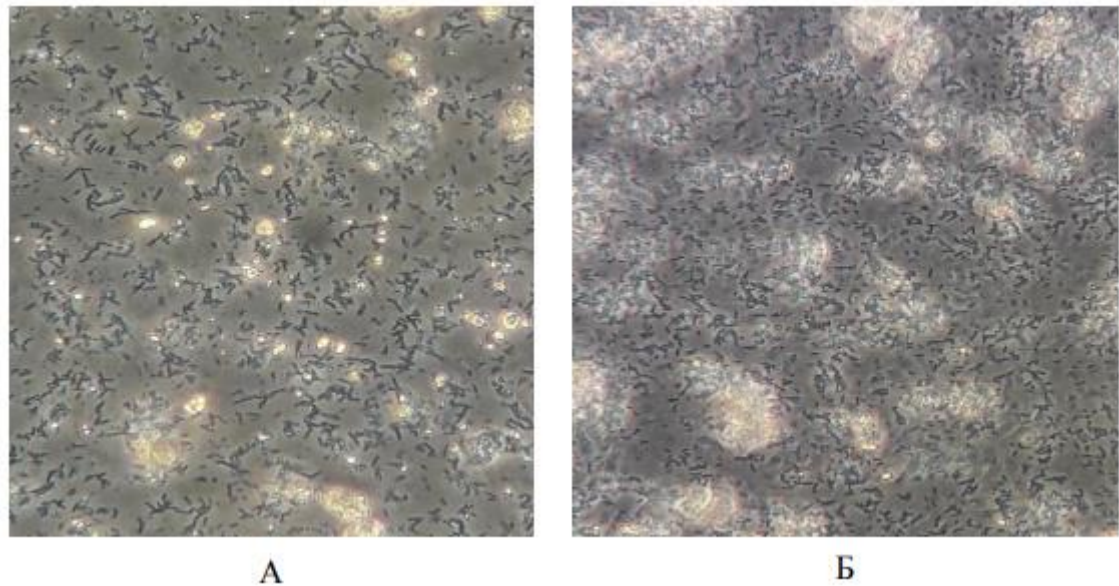


Рис. 3.3. Культура клітин штаму *E. coli* TRH 212 після росту впродовж 1 доби на ферментаційному середовищі з: а) аутолізатом дріжджів, б) екстрактом дріжджів

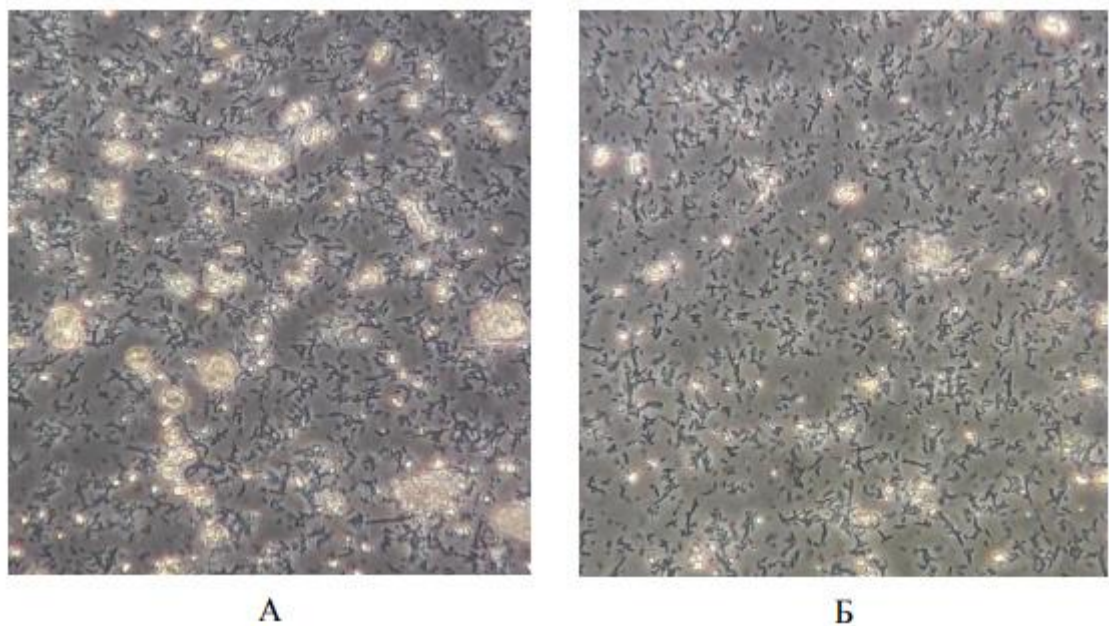


Рис. 3.4. Культура клітин штаму *E. coli* TRH 212 після росту впродовж 1 доби на ферментаційному середовищі з: а) ультрафільтрованим екстрактом дріжджів, б) дріжджовим пептоном

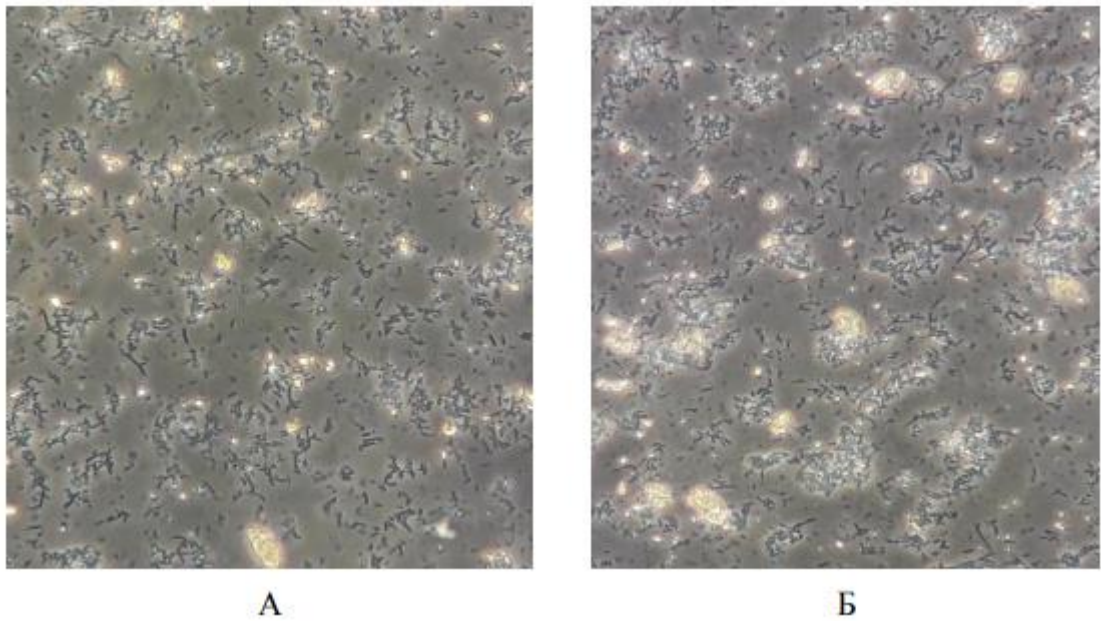


Рис. 3.5. Культура клітин штаму *E. coli* TRH 212 після росту впродовж 1 доби на ферментаційному середовищі з: а) м'ясним пептоном, б) казеїновим триптоном

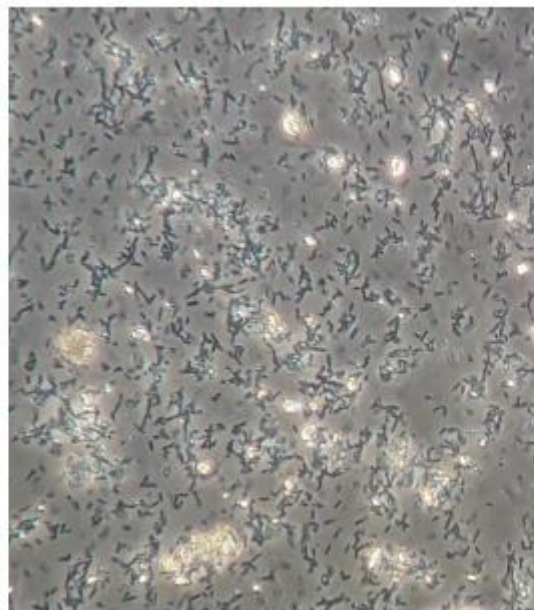


Рис. 3.6. Культура клітин штаму *E. coli* TRH 212 після росту впродовж 1 доби на ферментаційному середовищі з кукурудзяним екстрактом

Нами був виявлений чітко виражений поліморфізм у культурі клітин, що, можливо, пов'язано з особливостями складу ферментаційного середовища. Це, у свою чергу, вплинуло на схильність клітин бактерії до мутацій та появи довших або коротших клітин.

### 3.3. Кількісне оцінювання одержаних даних

Розрахунок середньої арифметичної похибки для таблиці 3.2 проводили за формулою 3.1:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum(X-X_c)^2}{n}} \quad (3.1)$$

де,  $\sigma$  – середня арифметична похибка,

$X$  – досліджувані дані,

$X_c$  – середнє арифметичне досліджуваних даних,

$n$  – число повторюваності у вибірці.

Середнє арифметичне значення ( $X_c$ ) розраховували за формулою 3.2:

$$X_c = \frac{X_1+X_2+\dots+X_n}{n} \quad (3.2)$$

де,  $X_c$  – середнє арифметичне досліджуваних даних,

$X_1, X_2, X_n$  – досліджувані дані,

$n$  – число доданків величин.

Дані ферментаційного середовища з аутолізатом дріжджів слугували за контроль при обробці результатів. Їх співставляли з результатами, отриманими на ферментаційних середовищах з екстрактом дріжджів, ультрафільтрованим екстрактом дріжджів, м'ясним і дріжджовим пептоном, казеїновим триптоном та кукурудзяним екстрактом (див. табл. 3.2-3.7).

Таблиця 3.2

**Кількісна оцінка ферментаційних середовищ з екстрактом дріжджів і аутолізатом дріжджів за обробки даних різницевим методом**

Повторюваність	Ферментаційне середовище		d	d-d <sub>c</sub>	(d-d <sub>c</sub> ) <sup>2</sup>
	з ауто лізатом дріжджів	з екстрактом дріжджів			
1	5,33	4,09	-1,24	0,08	0,0064
2	5,37	4,27	-1,10	0,22	0,0484
3	5,60	3,99	-1,61	-0,29	0,0841
Середнє значення	5,43	4,12	-1,32		
Сума				0,01	0,1389
t <sub>1-2</sub>	-7,28				

Одержані відхилення підносимо до квадрату і сумуємо, а їхню суму використовуємо для обчислення похибки різниць за формулою 3.3:

$$S_d = \sqrt{\frac{\sum(d-d_{cp})^2}{n*(n-1)}} \quad (3.3)$$

де  $S_d$  – похибка різниць,

$\sum(d-d_c)^2$  – сума відхилень між різницею та середнім значенням різниць,

n – кількість повторюваності у вибірці.



Таблиця 3.3

**Кількісна оцінка ферментаційних середовищ з ультрафільтрованим екстрактом дріжджів і аутолізатом дріжджів за обробки результатів дослідження різницевою метою**

Повторюваність	Ферментаційне середовище		d	d-d <sub>c</sub>	(d-d <sub>c</sub> ) <sup>2</sup>
	з аутолізатом дріжджів	з ультрафільтрованим екстрактом дріжджів			
1	5,33	8,35	3,02	0,10	0,01
2	5,37	8,57	3,20	0,28	0,0784
3	5,60	8,13	2,53	-0,39	0,1521
Середнє значення	5,43	8,35	2,92		
Сума				-0,01	0,2405
t <sub>1-3</sub>	12,7				

Таблиця 3.4

**Кількісна оцінка ферментаційних середовищ з дріжджовим пептоном та аутолізатом дріжджів за обробки даних різницевою метою**

Повторюваність	Ферментаційне середовище		d	d-d <sub>c</sub>	(d-d <sub>c</sub> ) <sup>2</sup>
	з аутолізатом дріжджів	з дріжджовим пептоном			
1	5,33	3,31	-2,02	0,15	0,0225
2	5,37	3,19	-2,18	-0,01	0,0001
3	5,60	3,28	-2,32	-0,15	0,0225
Середнє значення	5,43	3,26	-2,17		
Сума				-0,01	0,0451
t <sub>1-4</sub>	-18,08				

Таблиця 3.5

**Кількісна оцінка ферментаційних середовищ з м'ясним пептоном та аутолізатом дріжджів за обробки результатів дослідів різницеvim методом**

Повторюваність	Ферментаційне середовище		d	d-d <sub>c</sub>	(d-d <sub>c</sub> ) <sup>2</sup>
	з аутолізатом дріжджів	з м'ясним пептоном			
1	5,33	1,67	-3,66	0,08	0,0064
2	5,37	1,72	-3,65	0,09	0,0081
3	5,60	1,69	-3,91	-0,17	0,0289
Середнє значення	5,43	1,69	-3,74		
Сума				0	0,0434
t <sub>1-5</sub>			-37,4		

Таблиця 3.6

**Кількісна оцінка ферментаційних середовищ з казеїновим триптоном та аутолізатом дріжджів за обробки даних різницеvim методом**

Повторюваність	Ферментаційне середовище		d	d-d <sub>c</sub>	(d-d <sub>c</sub> ) <sup>2</sup>
	з аутолізатом дріжджів	з казеїновим триптоном			
1	5,33	1,87	-3,46	0,11	0,0662
2	5,37	1,90	-3,47	0,10	0,01
3	5,60	1,82	-3,78	-0,21	0,0441
Середнє значення	5,43	1,86	-3,57		
Сума				0	0,0434
t <sub>1-6</sub>			-27,46		

Таблиця 3.7

**Кількісна оцінка ферментаційних середовищ з кукурудзяним екстрактом + БІС-ТРІС буфером та аутолізатом дріжджів за обробки результатів дослідів різницевим методом**

Повторюваність	Ферментаційне середовище		d	d-d <sub>c</sub>	(d-d <sub>c</sub> ) <sup>2</sup>
	з аутолізатом дріжджів	з кукурудзяним екстрактом + БІС-ТРІС			
1	5,33	11,27	5,94	-0,07	0,0049
2	5,37	11,63	6,26	0,25	0,0625
3	5,60	11,42	5,82	-0,19	0,0361
Середнє значення	5,43	11,44	6,01		
Сума				-0,01	0,1035
t <sub>1-7</sub>	35,35				

Порівнюємо фактично отримані критерії Стюдента з теоретичними (беремо з таблиці різних рівнів ймовірності) і робимо висновки. Якщо фактично отриманий критерій більший або дорівнює теоретичному значенню, тоді різниця між варіантами рахується істотною.

Так, проаналізувавши критерії Стюдента, можна зробити висновок, що у дослідів на ферментаційних середовищах з ультрафільтрованим екстрактом дріжджів та кукурудзяним екстрактом різниця була суттєвою. Тоді як у дослідів з використанням ферментаційних середовищ з екстрактом дріжджів, м'ясним, дріжджовим пептоном і казеїновим триптоном різниці не суттєві.

Відносну похибку дослідів обчислювали за формулою (3.4):

$$S_{X_{cp}} \% = \frac{100 \cdot l \cdot \sum S_d}{1,41 \cdot (l-1) \cdot \sum X_{cp}} \quad (3.4)$$

де,  $S_{X_c}$  – відносна похибка дослідів,

$l$  – кількість досліджуваних середовищ,

$\Sigma S_d$  – сума похибок різниць,

$\Sigma X_c$  – сума середніх значень треоніну.

Точність дослідів достатньо висока, оскільки значення відносної похибки становило 2,1 %.

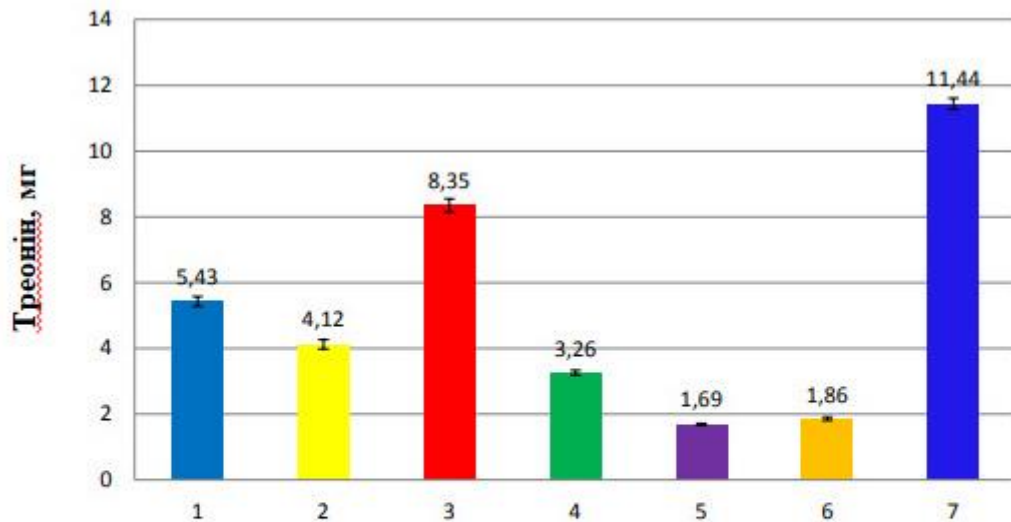
При аналізі результатів дослідів, представлених у таблиці 3.1, відмічено залежність продуктивності штаму від ОГ, рН середовища та концентрації залишкової глюкози. Так, висока оптична густина вказує на активніше розмноження клітин та відповідно зростання кількості утвореного треоніну. Разом з тим, продуктивність штаму *E. coli* залежить від значення рН середовища. Зокрема, чим показник рН ближчий до нейтрального, тим засвоєння глюкози бактеріями проходить активніше, а відповідно й інтенсивність біосинтезу треоніну зростає. Про продуктивність мікроорганізму також можна судити за рівнем залишкової глюкози. Виявлено, що продуктивність штаму зростає коли концентрація залишкової глюкози у кінці культивування більш наближена до нуля.

Найбільший показник утвореного треоніну спостерігався за умови культивування штаму *E. coli* на ферментаційному середовищі з кукурудзяним екстрактом і додаванням БІС-ТРІС буферу. Так, він становив 11,4 мг, що значно переважає значення даного показника, виявлене в інших середовищах.

Подібним до показника продуктивності штаму, отриманого на середовищі з кукурудзяним екстрактом і додаванням БІС-ТРІС буферу було значення, одержане за культивування на середовищі з ультра фільтрованим екстрактом дріжджів. Вихід треоніну в ньому дорівнював 8,4 мг.

Найнижчу продуктивність штаму виявлено за культивування на середовищі з казеїновим триптоном і середовищі з м'ясним пептоном, відповідно 1,9 та 1,7 мг.





**Джерела амінного нітрогену:**  
 1 – аутолізат дріжджів, 2 – екстракт дріжджів,  
 3 – ультрафільтрований екстракт дріжджів,  
 4 – дріжджовий пептон, 5 – м'ясний пептон,  
 6 – казеїновий триптон, 7 – кукурудзяний екстракт

Рис. 3.7. Продуктивність штаму *E. coli* TRH 212 за культивування на середовищах з різними джерелами амінного нітрогену

Одержані дані представлено на рисунку 3.7. На ньому показано залежність показників продуктивності штаму *E. coli* TRH 212 від умов культивування, зокрема від джерела амінного нітрогену в ферментаційному середовищі, яке використовували при культивуванні.

## ВИСНОВКИ

1. У результаті проведених досліджень було вивчено морфологію штаму *E. coli* ТРН 212. Зокрема виявлено, що вказаний штам ідентичний характеристикам паспорту: це товсті короткі палички, діаметром 0,8-1 мкм, довжиною 1,9-2,1 мкм, не рухливі, спор не утворюють, хаотично розташовані у біопрепараті, можуть бути поліморфні форми.

2. Досліджено продуктивність даного штаму за вмісту в середовищах різних джерел амінного нітрогену. При цьому встановлено, що найкраще для культивування штаму підходить середовище з кукурудзяним екстрактом та додаванням БІС-ТРІС буферу.

3. Виявлено безпосередній зв'язок між продуктивністю штаму і рівнем амінного нітрогену та інших хімічних показників середовища культивування. Найвищу продуктивність штаму *E. coli* спостерігали за культивування на середовищі з кукурудзяним екстрактом з добавкою БІС-ТРІС буферу. Найнижча продуктивність відмічена за культивування штаму на ферментаційних середовищах, що містили казеїновий триптон і м'ясний пептон.

4. Змін структури клітин штаму *E. coli* ТРН 212 за умови культивування на різних середовищах не виявлено.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. [Keran A.](#), [Grayson I.](#) Amino Acids in Human and Animal Nutrition. In: [Zorn H.](#), [Czernak P.](#) (eds) *Biotechnology of Food and Feed Additives*. Springer, Berlin, Heidelberg. ABE, 2014. Vol. 143. P. 228.
2. [Debskov V.G.](#) The Threonine Story. In: *Microbial Production of L-Amino Acids*. Springer, Berlin, Heidelberg. ABE, 2002. Vol. 79. P.113–136.
3. [Пирог Т. П.](#), [Ігнатова О. А.](#) Загальна біотехнологія. Київ: НУХТ, 2009. 336 с.
4. [Leuchtenberger W.](#), [Huthmacher K.](#), [Drauz K.](#) Biotechnological production of amino acids and derivatives: Current status and prospects // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2005. Vol. 103. P. 1–8.
5. [Васильківська М. К.](#), [Пенчук Ю. М.](#) Сучасний стан та перспективи біотехнологічних методів виробництва амінокислот. *Ukrainian food journal*. 2012. № 2. С. 51–54.
6. [Дяченко Л.С.](#), [Бомко В.С.](#), [Сивик Т.Л.](#) Основи технології комбікормового виробництва: навч. посібник. Біла Церква, 2015. 306 с.
7. [Ivanov K.](#), [Stoimenova A.](#), [Obreshkova D.](#), [Sazo L.](#) Biotechnology in the production of pharmaceutical Industry ingredients: amino acids [Електронний ресурс] *Biotechnology&Biotechnology equipment*. 2013. Vol. 27, № 2. P. 3620–3626. <http://dx.doi.org/10.5504/BVEQ.2012.0134>
8. *Біологічна хімія* / за ред. проф. Л. М. Вороніної. Харків: Основа: Видавництво НФАН, 2000. 608 с.
9. [Підгорський В. С.](#), [Іупинська Г. О.](#), [Пирог Т. П.](#) Інтенсифікація технологій мікробного синтезу. Київ: Наук. думка, 2010. 328 с.
10. [Faria R.](#), [Thommel J.](#) *Microbial Production of L-Amino Acids / USA*: Springer Science & Business Media, 2003. Т. 79. 185 p.
11. [Vogt R. L.](#), [Dippold L.](#) *Escherichia coli* O157:H7 outbreak associated with consumption of ground beef // *Public Health Rep.* 2005. Vol. 114. P. 174–182.



12. Kijewski A., Witsø I. L., Iversen H., Rønning H. T., L'Abée-Lund T., Wasteson Y., Lindbäck T., Aspöholm M. Vitamin K Analogs Influence the Growth and Virulence Potential of Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2020. Vol. 86, N. 24. e00583-20. doi: 10.1128/AEM.00583-20.
13. Batt C. A., Robinson R. K. *Encyclopedia of Food Microbiology*, II edition. Academic Press, 2014. 3248 p.
14. Hudault S, Guignot J, Servin A. L. *Escherichia coli* strains colonising the gastrointestinal tract protect germfree mice against *Salmonella typhimurium* infection // *Microbiol.* 2001. Vol. 76. P. 47–55.
15. Kong M.K., Lee P.C. Metabolic engineering of menaquinone-8 pathway of *Escherichia coli* as a microbial platform for vitamin K production. *Biotechnol. Bioeng.* 2011. Vol. 108. P. 1997–2002.
16. Ren L., Peng C., Hu X., Han Y., Huang H. Microbial production of vitamin K<sub>2</sub>: Current status and future prospects. *Biotechnol. Adv.* 2020. Vol. 39. P. 107453.
17. Fang H., Li D., Kang J., Jiang P., Sun J., Zhang D. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for de novo biosynthesis of vitamin B<sub>12</sub>. *Nat. Commun.* 2018. Vol. 9. P. 4917.
18. Chen X., Zhou L., Tian K., Kumar A., Singh S., Prior B. A., Wang Z. Metabolic engineering of *Escherichia coli*: A sustainable industrial platform for bio-based chemical production. *Biotechnol. Adv.* 2013. Vol. 31. P. 1200–1223.
19. Gao Q., Chen H., Wang G., Yang W., Zhong X., Liu J., Huo X., Liu W., Huang J., Tao Y. et al. Highly Efficient Production of Menaquinone-7 from Glucose by Metabolically Engineered *Escherichia coli*. *ACS Synth. Biol.* 2021. Vol. 10. P. 756–765.
20. Yang D., Park S. Y., Park Y. S., Eun H., Lee S. Y. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for natural product biosynthesis. *Trends Biotechnol.* 2020. Vol. 38. P. 745–765.
21. Eggeling I, Preffeda W, Sahn A. *Basic biotechnology*. Cambridge: *Biochem.* 2002. 294 p.



22. Пирог Т. П. *Загальна мікробіологія*. Київ: НУХТ, 2004. 470 с.
23. Choi K. R., Jang W. D., Yang D., Cho J. S., Park D., Lee S. Y. Systems Metabolic Engineering Strategies: Integrating Systems and Synthetic Biology with Metabolic Engineering. *Trends Biotechnol.* 2019. Vol. 37. P. 817–837.
24. Liu Y., Ding X.-M., Xue Z.-L., Hu L.-X., Zhang N.-J., Wang Z., Yang J.-W., Cheng Q., Chen M.-H., Zhang Z.-Z. et al. The change of the state of cell membrane can enhance the synthesis of menaquinone in *Escherichia coli*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2017. Vol. 33. P. 52.
25. Presnell K. V., Alper H. S. Systems Metabolic Engineering Meets Machine Learning: A New Era for Data-Driven Metabolic Engineering. *Biotechnol. J.* 2019. Vol. 14. P. 1800416.
26. Seo S. O., Jin Y. S. Next-Generation Genetic and Fermentation Technologies for Safe and Sustainable Production of Food Ingredients: Colors and Flavorings. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 2022. Vol. 13.
27. Yu Q., Li Y., Wu B., Hu W., He M., Hu G. Novel mutagenesis and screening technologies for food microorganisms: Advances and prospects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2020. Vol. 104. P. 1517–1531.
28. *Фармацевтична хімія: підручник для студ. вищих фармацевт. навч. закладів і фармацевт. ф-тів вищих мед. навч. закладів III–IV рівнів акред. / за заг. ред. проф. Безуглого П. О. Вид. 3-тє, випр., доопрац. Вінниця: Нова Книга, 2017. 456 с.*
29. Pomatto A., Shetty K., Paliyath G., Levin R. E. Food biotechnology. Second Edition. USA: *Taylor Francis Inc.*, 2005. 189 p.
30. Burkovski A., Krämer R. Bacterial amino acid transport proteins: Occurrence, functions, and significance for biotechnological applications // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2002. Vol. 104. P. 265–274.
31. Xing H., He X., Li Y. et al. Optimization of culture conditions for enhanced lysine production using engineered *Escherichia coli* // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2014. Vol. 172, № 8. P. 3835–3843.



32. Sindelar G., Wendisch V. F. Improving lysine production by *Corynebacterium glutamicum* through DNA microarray-based identification of novel target genes // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2007. № 76. P. 677–689.
33. Krämer R. Production of amino acids: Physiological and genetic approaches // *Food Biotechnol.* 2004. Vol. 89. P. 7–46.
34. Hermann T. Industrial Production of amino acid by coryneform bacteria. *J. Biotechnol.* 2003. Vol. 104. P. 155–172.
35. Dong X., Quinn P. J., Wang X. Metabolic engineering of *Escherichia coli* and *Corynebacterium glutamicum* for the production of L-threonine // *Biotechnol. Advanc.* 2010. P. 1–13.
36. Yang H., Liao Y., Wang B. et al. J.Draft genome sequence of *Escherichia coli* XH001, a producer of L-threonine in industry // *Bacteriology.* 2011. Vol. 193, № 22. P. 6406–6407.
37. Lee H.-M. Improved L-Threonine production of *Escherichia coli* mutant by optimization of culture conditions / H.-M. Lee, H.-W. Lee, J.-H. Park // *J. Biosci. Bioengineering.* 2006. Vol. 101, № 2. P. 127–130.
38. Фурлат І. М. Отримання та характеристика препаратів поверхневих біополімерів клітинної стінки непатогенних коринєбактерій. Наукові записки НАУКМА. Біологія та екологія. 2014. Т. 158. С. 42–53.
39. Verté's A. A., Masuyuki I., Hidesaki Y. Manipulating *Corynebacteria*, from individual genes to chromosomes // *J. Appl. Environ. Microbiol.* 2005. Vol. 71, № 12. P. 7633–7642.
40. Alagawany M., Elnesr S. S., Farag M. R., Tivari R., Yatoo M. I., Karthik K., Michalak I., Dhama K. Nutritional significance of amino acids, vitamins and minerals as nutraceuticals in poultry production and health – a comprehensive review. *Vet Q.* 2021. Vol. 41, N. 1. P. 1–29. doi: 10.1080/01652176.2020.1857887.
41. Wittmann C., Kiefer P., Zelder O. Metabolic fluxes in *Corynebacterium glutamicum* during Lysine production with sucrose as carbon source // *Appl Environ Microbiol.* 2004. Vol. 70, № 12. P. 7277–7287.



42. Андріяш Г. С., Заболотна Г. М., Шульга С. М. Мутантні штами мікроорганізмів-продуцентів лізину та треоніну // *Biotchnol. Acta*. 2014. № 3. С. 95–101.
43. Андріяш Г. С., Заболотна Г. М., Шульга С. М. Ауксотрофність продуцентів лізину // *Біотехнологія*. 2012. № 1. С. 70–77.
44. Андріяш Г. С., Заболотна Г. М., Ткаченко А. Ф., Шульга А. Ф. Характеристика штаму *Brevibacterium flavum* IMB В-7446 та оптимізація біосинтезу треоніну // *Мікробіологія і біотехнологія*. 2015. № 2. С. 68–78.
45. Foulquier E., Ginestoux S., Ouaqu Z. et al. Formula of the 20 common amino acids. [Електронний журнал] Режим доступу до журн.: [http://www.imgt.org/IMGTeEducation/Aidememoire/\\_UK/aminoacids/formuleAA/](http://www.imgt.org/IMGTeEducation/Aidememoire/_UK/aminoacids/formuleAA/)
46. Simoni D. R., Hill R. L., Vaughan M. The Discovery of the Amino Acid Threonine: the Work of William C. Rose J. *Biol. Chem.* 2002. Vol. 277, № 37, I. 13. P. e25.
47. Guoуao W. *Amino Acids: Biochemistry and Nutrition*. USA: CRC Press, 2013. 503 p.
48. Гонський Я. І., Максимчук Т. П. Біохімія людини: підручник. Тернопіль: Укрмедкнига, 2001. 736 с.
49. Tesseraud S., Everaert N., Boussaïd-Om Ezzine S. et al. Manipulating tissue metabolism by amino acids // *World's Poultry Sci. J.* 2011. Vol. 67. P. 382–385.
50. Mirzaei H., Suarez J. A., Longo V. D. Protein and amino acid restriction, aging and disease: From yeast to humans. *Trends Endocrinol. Metab.* 2014. Vol. 25. P. 558–566.
51. Chen Y. P., Cheng Y. F.; Li X. H., Yang W. L., Wen C., Zhuang S., Zhou Y. M. Effects of threonine supplementation on the growth performance, immunity, oxidative status, intestinal integrity, and barrier function of broilers at the early age. *Poult. Sci.* 2017. Vol. 96. P. 405–413.

52. Wang W., Zeng X., Mao X., Wu G., Qiao S. Optimal dietary true ileal digestible threonine for supporting the mucosal barrier in small intestine of weanling pigs. *J. Nutr.* 2010. Vol. 140. P. 981–986.

53. Ніщенко М. П., Трокоз В. О., Карповський В. І. Фізіологічні аспекти використання амінокислот для підвищення продуктивності тварин: монографія. Київ: ДДП «Експодрук», 2015. 253 с.