

*T. umblicata* розкривається на пелюсткоподібні лопаті, плазмодій має жовту пігментацію, а спори орнаментовані згрупованими бородавочками.

Двогенна молекулярна філогенія досліджуваного міксоміцета, побудована нами на основі часткових послідовностей генів 18S рДНК і та еукаріотичного фактору елонгації EF1 $\alpha$ , показала, що новий таксон утворює окрему гілку, базальну до клади, яка об'єднує родини Didymiaceae і Physaraceae. У альтернативній філогенії, основаній на повних послідовностях 18S рДНК світло- і темно-спорових міксоміцетів, новий таксон утворив одну з базальних клад Physarales. Генетична відстань від нового таксону до інших видів, виміряна *p*-відстанню між послідовностями 18S рДНК, коливається від 29,6% до 79,2%, що значно перевищує типове для темноспорових міксоміцетів значення видового баркод-гепу (0,9%). Ці дані, разом з вищеописаними морфологічними особливостями, привели нас до висновку, що досліджуваний матеріал представляє новий вид із ще не описаного роду. Новий таксон одержав назву *Tasmaniomyxa umblicata* ad int.

Наше дослідження продемонструвало як ефективність молекулярних маркерів для молекулярного баркодингу нових таксонів, так і їхню обмежену здатність визначати глибокі філогенетичні зв'язки між ними. Для видів, що мають значні генетичні дистанції від відомих таксонів, побудова надійної філогенії на основі декількох відносно коротких (600–800 bp) фрагментів ДНК часто є неможливою. Очікується, що нові методи дослідження, засновані на технологіях секвенування нового покоління, допоможуть вирішити цю методологічну проблему.

## БІОТЕХНОЛОГІЧНЕ ОДЕРЖАННЯ ВІТАМІНУ С ІЗ ВИКОРИСТАННЯМ РЕКОМБІНАНТНИХ ШТАМІВ

В.В. Лазоренко, К.С. Гербич, А.В. Манжелій

Національний технічний університет «ХПІ»  
[lazorenko.vladislava@gmail.com](mailto:lazorenko.vladislava@gmail.com)

Вітамін С в організмі не синтезується і не відкладається в запас, що зумовило широке використання його препаратів для стимуляції та регуляції фізіологічних процесів, профілактики та лікування низки захворювань при гіпо- та авітамінозах, підвищення загальної стійкості організму до екзогенних та ендогенних несприятливих факторів. Тому пошук нових технологій виробництва цього вітаміну є актуальним.

Вітамін С – це водорозчинний вітамін, який відноситься до незамінних поживних речовин, є антиоксидантом та важливим коферментом багатьох біохімічних процесів в організмі людини. Має формулу C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>6</sub>.

Синтез аскорбінової кислоти (вітаміну С) є багатоступеневим процесом, у якому лише одна стадія представлена біотрансформацією. Це стадія трансформації *D*-сорбіту в *L*-сорбозу за участю ацетатних бактерій. Для отримання *L*-сорбози використовують глибинну ферментацію, коли культуру продуцента *Gluconobacter oxydans* вирощують у ферментерах періодичного режиму з мішалкою та барботером (для посилення аерації) та культивуванні продуцента протягом 20–40 годин з результатом по виходу *L*-сорбозу до 98 % вихідної кількості у середовищі. Зазвичай досягнення такого високого виходу цільового продукту в живильне середовище вносять кукурудзяний або дріжджовий екстракт у кількості близько 20 %. Після ферментації *L*-сорбозу виділяють з культуральної рідини. Перехід від періодичного культивування продуцента *Gluconobacter oxydans* до безперервного в апараті колонкового типу збільшує швидкість утворення *L*-сорбози в 17 разів.

Ферментацію *Gluconobacter oxydans* проводять на середовищах, що містять *D*-сорбіт у кількості 20% при інтенсивній аерації 8-10 л/год. Вихід *L*-сорбози може досягти 98% за 1-2

доби. Досягши культуурою *log*-фази можна додатково внести в середу *D*-сорбіт до концентрації 25%.

В даний час широке використання біотехнологічних процесів дозволяє вдосконалювати синтез вітаміну С шляхом скорочення багатоетапних і дорогих хімічних стадій. Наприклад, синтез аскорбінової кислоти здійснюється енолізацією його найважливішого проміжного продукту – 2-кето-*L*-гулонової кислоти (2-KLG), яка у кислих умовах перетворюється на *L*-аскорбінову кислоту. Її, 2-KLG, одержують методом двостадійного мікробіологічного синтезу, що складається з окислення *D*-глюкози в 2,5-дикето-*D*-глюконову кислоту (2,5-DKG – редуктаза) під дією *Acetobacter*, *Gluconobacter* або мутантного штаму *Erwinia punctata*) та біотрансформації останньої під дією *Corynebacterium*, *Brevi* 2,5-DKG у 2-кето-*L*-гулонову кислоту. При використанні цих мікроорганізмів вихід цільового продукту становить близько 90% вихідної кількості глюкози.

Пропонований метод постійно удосконалюється за рахунок спільного культивування зазначених мікроорганізмів. Так, наприклад, запропонований спосіб, у якому спочатку штами культивували окремо на середовищі наступного складу: *D*-сорбіту – 2,0 %, дріжджовий екстракт – 0,3 %, яловичий екстракт – 0,3 %, кукурудзяний екстракт – 0,3 %, пептон – 1,0 %, сечовина – 0,1 %,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 0,1 %,  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,02 %,  $\text{CaCO}_3$  – 0,1 %; рН середовища до стерилізації 7,0-7,2. Поживне середовище стерилізують при 121 °С протягом 20 хвилин. Культивування проводять протягом 24 годин при постійному перемішуванні при 220 об/хв та температурі 30 °С. Отримані культури вносили ферментер в кількості 10 % (рівні обсяги).

Склад середовища для основного процесу ферментації: *D*-сорбіт – 8,0 %, кукурудзяний екстракт – 1,0 %, сечовина – 1,5 %,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 0,1 %,  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,01 %,  $\text{CaCO}_3$  – 0,6 %, піногасник – 0,1%; рН середовища до стерилізації 7,0. Поживне середовище стерилізували при 121 °С протягом 20 хвилин, культивування проводили при 30 °С та постійному перемішуванні при 180-700 об/хв протягом 96 годин (аерація до 1 л/хв). У процесі культивування значення рН підтримується постійному рівні (6,5–7,0) з допомогою  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Культивування проводять під контролем накопичення 2-кето-*L*-гулонової кислоти, яку визначали методом ВЕРХ. Вихід 2-KLG становив 76,8% від кількості *D*-сорбіту, що використовується.

Одним з перспективних напрямів може бути створення одного мікроорганізму, що синтезує всі ферменти необхідні перетворення *D*-глюкози в 2,5-DKG.

*Erwinia herbicola* здійснює перетворення *D*-глюкози на 2,5-DKG на кілька стадій, що каталізуються різними ферментами. Для перетворення 2,5-DKG на 2-KLG необхідна лише одна стадія.

Отже, найбільш простий спосіб створення одного мікроорганізму, здатного перетворювати *D*-глюкозу на 2-KLG, полягає у виділенні гена 2,5-DKG-редуктази *Corynebacterium sp.* та введення його в *Erwinia herbicola*. За допомогою генетичних маніпуляцій метаболічні реакції, що протікають у різних мікроорганізмах, вдалося здійснити в одному з них. Цей гібрид набув здатності синтезувати кінцевий продукт комбінованого метаболічного шляху. Такий організм можна використовувати як фабрику для виробництва 2-KLG, яка замінює перші три стадії в процесі одержання *L*-аскорбінової кислоти, що використовується в даний час. Одна із стадій процесу, а саме перетворення *D*-сорбітолу на *L*-сорбозу, здійснюється за участю бактерії *Acetobacter suboxydans*, яка синтезує фермент сорбітолдегідрогеназу. Інші стадії є суто хімічними реакціями.