

ПОМАГАЛО

ЗА ПОДГОТОВКА ЗА ДЪРЖАВЕН ИЗПИТ

за студентите от специалност
ФАРМАЦЕВТИЧНИ БИОТЕХНОЛОГИИ



УНИВЕРСИТЕТСКО ИЗДАТЕЛСТВО „ПАИСИЙ ХИЛЕНДАРСКИ“

ПОМАГАЛЮ

за подготовка за държавен изпит
по БИОТЕХНОЛОГИИ
за студентите от специалност
„Фармацевтични биотехнологии“

Настоящото учебно помагало е предназначено за подготовка на студентите от специалност „Фармацевтични биотехнологии“ за държавния изпит. То е синхронизирано с конспекта за държавния изпит на специалността и покрива учебното съдържание по всички въпроси от изпитната програма. Обемът на отделните въпроси е съобразен с продължителността на държавния изпит и включва базовата информация, която студентите трябва да представят за успешното му полагане. В написването на настоящото учебно помагало са включени преподаватели от всички катедри на Биологическия факултет, които участват в обучението на студентите от професионално направление 5.11 Биотехнологии. Авторите нямат претенциите помагалото да бъде единствения възможен и достатъчен източник на информация за подготовка на студентите. Всеки, който проявява интерес и има амбицията за отлично представяне, може да допълни съдържанието на въпросите, като за целта е посочена и подходяща литература.

Авторският колектив изразява надежда, че помагалото ще улесни студентите при подготовката и ще повиши резултатите от представянето им на държавния изпит.

От авторите

Авторски колектив (авторите са подредени по академични длъжности и азбучен ред на собственото име):

проф. д-р Велизар Гочев (обща редакция и структуриране на помагалото, въпроси № 24, 25, 26, 27, 28, 29 и 31)

проф. д-р Иванка Димитрова - Дюлгерова (въпроси № 14, 15 и 16)

проф. д-р Пламен Стоянов (въпроси № 11, 12 и 13)

проф. д-р Соня Костадинова (въпроси № 1, 6, 7 и 8)

доц. д-р Елена Апостолова - Кузева (въпроси № 3)

доц. д-р Ивелин Моллов (въпрос № 17)

доц. д.с.н. Самир Наимов (въпроси № 18, 19, 20 и 21)

доц. дн Тихомир Въчев (въпроси № 4)

доц. д-р Тонка Василева (въпроси № 10 и 32)

доц. д-р Теодора Попова (въпроси № 5)

гл. ас. д-р Веселин Биволарски (въпроси № 9 и 33)

гл. ас. д-р Яна Христова-Иванова (въпроси № 22, 23 и 30)

© Авторски колектив, 2026

© Университетско издателство „Паисий Хилендарски“, 2026

e-ISBN 978-619-281-167-9

КОНСПЕКТ ЗА ДЪРЖАВЕН ИЗПИТ
СПЕЦИАЛНОСТ
„ФАРМАЦЕВТИЧНИ БИОТЕХНОЛОГИИ“
ЗА ПРИДОБИВАНЕ НА ОБРАЗОВАТЕЛНО-КВАЛИФИКАЦИОННА СТЕПЕН
„БАКАЛАВЪР“
ПРОФЕСИОНАЛНА КВАЛИФИКАЦИЯ
„БИОТЕХНОЛОГ ВЪВ ФАРМАЦЕВТИЧНИ ПРОИЗВОДСТВА“

1. Организация на прокариотната клетка. Клетъчна стена, цитоплазмена мембрана, цитоплазма и включения, капсула, флагелуми. Бактериални ендоспори.
2. Клетъчна сигнализация. Типове междуклетъчна сигнализация. *In vitro* култивиране на стволкови клетки. Хибридомни технологии. Химерни антитела. CAR-T клетъчна терапия. Приложение.
3. Генетичен материал и ДНК репликация. Нуклеинови киселини – първична и вторична структура на ДНК и РНК, денатурация и ренатурация. Репликация на ДНК – репликон, ДНК полимерази, основни етапи. Особености при прокариоти и еукариоти.
4. Реализация на генетичната информация. Транскрипция – транскрипционна единица, РНК полимерази, основни етапи. Транслация – генетичен код, рибозоми, основни етапи. Особености при прокариоти и еукариоти.
5. Мутационна изменчивост. Хромозомни мутации.
6. Ферментации. Алкохолна, млечнокисела, мравченокисела, маслено-кисела, пропионово-кисела, ацетатна. Представители, биохимизъм, приложение.
7. Метаболизъм на алифатни въглеводороди. C1 метаболизъм – метилотрофи. Енергетичен и анаболитен метаболизъм.
8. Хемолитотрофен метаболизъм. Основни физиологични групи хемолитотрофи. Фиксация на CO₂ – цикъл на Калвин; редуктивен цикъл на трикарбоновите киселини.
9. Метаболизъм на въглехидрати. Гликолитичен обменен път. Цикъл на лимонената киселина, глиоксалатен цикъл и пентозо-фосфатен цикъл. Биосинтеза на гликоген. Регулация на въглехидратния метаболизъм.
10. Катаболизъм на белтъци и α-аминокиселини. Дезаминиране, трансаминиране, декарбоксилране. Разграждане на въглеродния скелет. Орнитинов цикъл.
11. Растителни тъкани. Видове отделителни структури при висшите растения.
12. Микроводорасли и висши спорови растения с потенциал за биотехнологично и фармацевтично приложение.
13. Таксономично разнообразие и биотехнологично приложение на голосеменните растения във фармацията и медицината.
14. Фенолни съединения – обща характеристика и класификация. Растителни субстанции, съдържащи прости феноли, кумарини, флавоноиди и танини. Лекарствени препарати.
15. Етерични масла – обща характеристика, методи за получаване, приложение и класификация. Растителни субстанции и етерични масла, съдържащи предимно монотерпени, сесквитерпени, сесквитерпенови лактони и фенилпропаноиди. Лекарствени препарати.
16. Алкалоиди – обща характеристика и класификация. Растителни субстанции, съдържащи алкалоиди с азот в страничната верига, тропанови алкалоиди, изохинолинови и индолни алкалоиди (винка, катарантус, ергоалкалоиди). Лекарствени продукти.

17. Закономерности на влиянието на факторите на средата върху живите организми.
18. Вектори за молекулярни клониране – плазмидни и фагови вектори, космиди. Клониране в плазмидни вектори, скрининг и селекция за рекомбинанти – инсертна инактивация, синьобяла селекция.
19. Получаване на индивидуални ДНК клонове – геномни и кДНК библиотеки. Получаване на клонове посредством PCR. Подходи за скрининг геномни и кДНК библиотеки.
20. Стандартизирани системи за клониране на гени – асемблиране по Гибсън, Golden Gate и Golden Bridge. Получаване на рекомбинантни белтъци в бактерии и дрожди. Подходи за пречистване на рекомбинантни белтъци.
21. Методи за скрининг на белтъчни библиотеки – phage display, cell surface display. Подходи за насочена еволюция на белтъци – in vitro рекомбинация, ДНК shuffling, Error prone PCR.
22. Морфологична, физиологична и технологична характеристика на промишлените микробни продуценти на биопродукти. Методи за съхранение на промишлените продуценти на биопродукти.
23. Хранителни изисквания на микробните продуценти на биопродукти. Видове хранителни среди, използвани в биотехнологията. Технологична характеристика на основни суровини, използвани за подготовка на хранителни среди в биотехнологичната промишленост.
24. Култивиране на микроорганизмите в промишлени условия – кинетични и технологични особености на периодичното култивиране. Фактори, влияещи върху развитието на продуцентите и биосинтеза на целеви продукти.
25. Биореактори. Биореактори за дълбочинно аеробно култивиране на микроорганизми.
26. Процеси и апарати за разделяне на хетерогенни системи. Класификация на хетерогенните системи. Принципи и технологично оборудване за осъществяване процесите утаяване и филтрация.
27. Процеси и апарати за изолиране и пречистване на биопродукти. Методи и апарати за екстракция. Йонообменни процеси и съоръжения.
28. Обща характеристика и класификация на витамините. Източници за изолиране. Структура, свойства, биотехнологично производство и приложение на витамини С, В12, В2.
29. Обща характеристика и класификация на антибиотиците. Структура, свойства и биотехнологично производство на β -лактамни антибиотици.
30. Структура, свойства и биотехнологично производство на тетрациклинови и аминогликозидни антибиотици.
31. Структура, свойства и биотехнологично производство на макролидни антибиотици.
32. Стратегии за разработване на лекарства. Фактори, ограничаващи молекулните маси на лекарствените вещества и целеви молекули на лекарствата. Метаболизъм на лекарствените вещества – реакции от фаза I и фаза II. Терапевтични и токсични ефекти на лекарствата.
33. Получаване, изолиране и пречистване на ензими. Основна биотехнологична схема за производство на ензими. Основна схема за получаване на ензими от растителни източници. Критерии за чистота на ензимните препарати в зависимост от тяхното приложение.

СЪДЪРЖАНИЕ

1. Организация на прокариотната клетка. Бактериална клетъчна стена. Цитоплазмена мембрана и вътреклетъчни мембранни системи. Бактериална цитоплазма. Включения. Нуклеоид. Капсула и слизести слоеве. Фимбрии, пили, флагелуми. Бактериални ендоспори.....	7
2. Клетъчна сигнализация. Типове междуклетъчна сигнализация. <i>In vitro</i> култивиране на стволони клетки. Хибридомни технологии. Химерни антители. CAR-T клетъчна терапия. Приложение.....	13
3. Генетичен материал и ДНК репликация. Нуклеинови киселини – първична и вторична структура на ДНК и РНК, денатурация и ренатурация. Репликация на ДНК – репликон, ДНК полимерази, основни етапи. Особенности при прокариоти и еукариоти.....	18
4. Реализация на генетичната информация. Транскрипция – транскрипционна единица. РНК полимерази, основни етапи, транскрипционни фактори. Особенности при прокариоти и еукариоти. Транслация – основни етапи, транслационни фактори.....	23
5. Мутационна изменчивост. Хромозомни мутации.....	29
6. Ферментации. Алкохолна, млечнокисела, мравченокисела, маслено кисела, пропионо-вокисела, ацетатна. Представители, биохимизъм, приложение.....	35
7. Метаболизъм на алифатни въглеродороди. С ₁ метаболизъм – метилотрофи. Енергетичен и анаболитен метаболизъм.....	40
8. Хемолитотрофен метаболизъм. Основни физиологични групи хемолитотрофи. Фиксация на СО ₂ – цикъл на калвин; редукиривен цикъл на трикарбоновите киселини.....	46
9. Метаболизъм на въглехидрати. Гликолитичен обменен път. Цикъл на лимонената киселина, глиоксалатен цикъл и пентозо-фосфатен цикъл. Биосинтеза на олиго- и полизахариди. Регулация на въглехидратния метаболизъм.....	54
10. Катаболизъм на белтъци и α-аминокиселини. Дезаминиране, трансаминиране, декарбоксилиране. Разграждане на въглеродния скелет. Орнитинов цикъл.....	61
11. Растителни тъкани. Видове отделителни структури при висшите растения.....	67
12. Микроводорасли и висши спорови растения с потенциал за биотехнологично и фармацевтично приложение.....	70
13. Таксономично разнообразие и биотехнологично приложение на голосеменните растения във фармацията и медицината.....	74
14. Фенолни съединения – обща характеристика и класификация. Растителни субстанции, съдържащи прости феноли, кумарини, флавоноиди и танини. Лекарствени препарати.....	77
15. Етерични масла – обща характеристика, методи за получаване, приложение и класификация. Растителни субстанции и етерични масла, съдържащи предимно монотерпени, сесквитерпени, сесквитерпенови лактони и фенилпропаноиди. Лекарствени препарати.....	82
16. Алкалоиди – обща характеристика и класификация. Растителни субстанции, съдържащи алкалоиди с азот в страничната верига, тропанови алкалоиди, изохинолинови и индолни алкалоиди (винка, катарантус, ергоалкалоиди). Лекарствени продукти.....	86
17. Закономерности на влиянието на факторите на средата върху живите организми.....	90
18. Вектори за молекулярни клониране – плазмидни и фагови вектори, космиди. Клониране в плазмидни вектори, скрининг и селекция за рекомбинанти – инсертна инактивация, синьо-бяла селекция.....	94
19. Получаване на индивидуални ДНК клонове – геномни и кДНК библиотеки. Получаване на клонове посредством PCR. Подходи за скрининг геномни и кДНК библиотеки.....	97

20. Стандартизирани системи за клониране на гени – асемблиране по Гибсън, Golden Gate и Golden Bridge. Получаване на рекомбинантни белтъци в бактерии и дрожди.	
21. Подходи за пречистване на рекомбинантни белтъци	100
22. Методи за скрининг на белтъчни библиотеки – phage display, cell surface display. Подходи за насочена еволюция на белтъци – in vitro рекомбинация, ДНК shuffling, Error prone PCR.....	105
23. Морфологична, физиологична и технологична характеристика на промишлените микроорганизми. Изолиране на природни шам-продуценти и подходи за повишаване на продуктивността им. Методи за съхранение на индустриални микробни продуценти на биопродукти.....	108
24. Хранителни изисквания на микробните продуценти на биопродукти. Видове хранителни среди, използвани в биотехнологията. Технологична характеристика на основни суровини, използвани за подготовка на хранителни среди в биотехнологичната промишленост	114
25. Култивиране на микроорганизмите в промишлени условия – кинетични и технологични особености на периодически култивиране. Фактори, влияещи върху развитието на продуцентите и биосинтеза на целеви продукти.....	119
26. Биореактори за дълбочинно култивиране на микроорганизмите.....	124
27. Процеси и апарати за разделяне на хетерогенни системи. Класификация на хетерогенните системи. Принципи и технологично оборудване за осъществяване на процесите утаяване и филтрация	126
28. Процеси и апарати за изолиране и пречистване на биопродукти. Методи и апарати за екстракция. Йонообменни процеси и съоръжения.....	130
29. Обща характеристика и класификация на витамините. Източници за изолиране. Структура, свойства и биотехнологично производство на витамини С, В ₁₂ и В ₂	134
30. Обща характеристика и класификация на антибиотиците. Структура, свойства и биотехнологично производство на β -лактамни антибиотици	139
31. Структура, свойства и биотехнологично производство на тетрациклинови и аминогликозидни антибиотици	145
32. Структура, свойства и биотехнологично производство на макролидни антибиотици	149
33. Стратегии за разработване на лекарства. Фактори, ограничаващи молекулните маси на лекарствените вещества и целеви молекули на лекарствата. Метаболизъм на лекарствените вещества – реакции от фаза I и фаза II. Терапевтични и токсични ефекти на лекарствата.....	152
34. Получаване, изолиране и пречистване на ензими. Основна биотехнологична схема за производство на ензими. Основна схема за получаване на ензими от растителни източници. Критерии за чистота на ензимите в зависимост от тяхното приложение.....	158
35. Литература	163

1

ОРГАНИЗАЦИЯ НА ПРОКАРИОТНАТА КЛЕТКА. БАКТЕРИАЛНА КЛЕТЪЧНА СТЕНА. ЦИТОПЛАЗМЕНА МЕМБРАНА И ВЪТРЕКЛЕТЪЧНИ МЕМБРАННИ СИСТЕМИ. БАКТЕРИАЛНА ЦИТОПЛАЗМА. ВКЛЮЧЕНИЯ. НУКЛЕОИД. КАПСУЛА И СЛИЗЕСТИ СЛОЕВЕ. ФИМБРИИ, ПИЛИ, ФЛАГЕЛУМИ. БАКТЕРИАЛНИ ЕНДОСПОРИ

Растенията, животните и висшите протисти са **еукариоти**. Бактериите и цианобактериите са **прокариоти**. Основните характеристики на прокариотната клетка са следните: (1) Липсва морфологически обособено ядро, генетичният материал е локализиран в нуклеоид, който не е ограничен от ядрена мембрана; (2) Слаба компартментализация; липсват мембранни органели като митохондрии, хлоропласти, апарат на Голджи, ендоплазматичен ретикулум; (3) Клетъчната мембрана не съдържа стероли, като холестерол; (4) Рибозомите са 70S, с 30S и 50S субединици; (5) Прокариотната клетка е хаплоидна; дели се чрез проста фузия.

Прокариотите се разделят на две големи таксономични групи – Еубактерии и Архебактерии. **Еубактериите** (същински бактерии) съдържат пептидогликан (мурейн) в клетъчната си стена. Основен компонент на муреина е мурамовата киселина. Клетъчните стени на някои **архебактерии** съдържат псевдомуреин, в който липсва мурамова киселина. В прокариотната клетка са установени редица структури: клетъчна стена, цитоплазмена мембрана, цитоплазма, рибозоми, нуклеоид, капсула и слизести слоеве, фимбрии, пили, флагелуми, ендоспори.

Клетъчна стена

Всички прокариотни клетки с изключение на родове *Mycoplasma* и *Thermoplasma* (архебактерии без клетъчна стена) притежават стена. Клетъчната стена е един от най-съществените компоненти на прокариотната клетка по няколко причини: (1) стената е здрава, придава форма на клетката и я предпазва от осмотичен лизис; (2) клетъчната стена участва в патогенезата при редица патогенни бактерии; (3) стената защитава клетката от токсични субстанции; (4) стената е място за действие на някои антибиотици.

През 1884 г. Кристиан Грам разработва оцветителен метод, по който бактериите се разделят на две групи. Грам-положителните бактерии (Грам⁺) се оцветяват в синьо-виолетово, а Грам-отрицателните (Грам⁻) в розово-червено. Оцветяването по Грам корелира със съществени структурни особености на бактериите и е важен таксономичен признак. Грам⁺ и Грам⁻ бактерии се различават помежду си, преди всичко по устройството на клетъчните стени.

Основен компонент на клетъчната стена е хетерополимерът **пептидогликан** (мурейн). Пептидогликанът се състои от полизахариден скелет и странична верига съдържаща D- и L-аминокиселини. Скелетът на веригите е съставен от редуващи се остатъци на N-ацетилглюкозамин и N-ацетилмурамова киселина, свързани с β -1,4-гликозидни връзки. N-ацетилмурамова киселина представлява N-ацетилглюкозаминлактат. С карбоксилната група на лактилния остатък на N-ацетилмурамовата киселина е свързана къса пептидна верига, включваща аминокиселините L-аланин, D-глутаминова киселина, *meso*-диаминопимелинова киселина (*meso*-DAP) и D-аланин. При повечето Грам⁺ бактерии, *meso*-DAP е заместена от L-лизин. Три от аминокиселините (D-глутаминова киселина, *meso*-DAP и D-аланин) не се срещат в природните белтъци.

Страничните вериги на пептидогликана са свързани чрез пептидни връзки, които варират. Диаминокиселините (*meso*-DAP и L-лизин) изпълняват важна роля в междумолекулното свързване, тъй като образуват пептидни връзки и с двете си аминокиселини. При Грам⁻ бактерии карбоксилната група на терминалния D-аланин е свързана директно с аминокиселината на *meso*-DAP. Грам⁺ бактерии осъществяват напречното свързване чрез пептиден мост, съставен от 1 до 5 аминокиселинни остатъка (най-често пентаглицинов мост). В резултат на напречното свързване, пептидогликанът добива структурата на мрежа, която здрава и поддържа формата на клетката. Мурамовата киселина, D-аминокиселините и *meso*-DAP не се синтезират от бозайниците.

Клетъчна стена при Грам-положителни бактерии. Грам⁺ бактерии са обвити от плътна, хомогенна клетъчна стена съставена предимно от многослоен пептидогликан с дебелина 20 – 80 nm. Стената съдържа също голямо количество **тейхоеви киселини** – полимери на глицерол или рибитол, свързани с фосфатни групи. Към глицероловите или рибитоловите групи се присъеди-

няват аминокиселини (най-често аланин) или захари (глюкоза). Тейхоевите киселини се свързват с пептидогликана или с липидите на цитоплазмената мембрана; този случай се наричат липотейхоеви киселини. Тейхоевите киселини са отрицателно заредени и концентрират метални йони около молекулите си; достигат до повърхността на пептидогликана и придават на клетъчната стена отрицателен заряд. Тези молекули са от значение и за поддържане структурата на клетъчната стена.

Клетъчна стена при Грам-отрицателни бактерии. Грам-отрицателната клетъчна стена има комплексна структура. Тя включва тънък (1 – 3 nm) пептидогликан, съставен от 1 или 2 слоя, обкръжен от **външна мембрана**. Пространството между цитоплазмената и външната мембрана се нарича периплазмено пространство (периплазма). Пептидогликанът при Грам⁻ бактерии се намира в периплазменото пространство. Размерите на периплазмата варират при различните Грам⁻ бактерии, най-често от 30 до 70 nm. Периплазмата съдържа редица протеини – предимно хидролитични ензими (**екзоензими**) и транспортни белтъци. Само при някои Грам⁺ бактерии се установява подобна тясна цепнатина между цитоплазмената мембрана и пептидогликана, поради което за периплазма се говори предимно при Грам⁻ бактерии.

Външната мембрана на стената е съставена от белтъци, липиди и липополизахариди. Липополизахаридите са най-съществените компоненти на външната мембрана и са съставени от три части: липид А, сърцевинен полизахарид и О-странична верига. Липополизахаридът (LPS) е проучен детайлно при род *Salmonella*. Липид А се състои от два фосфорилирани остатъка на глюкозамин, естерифицирани с дълговерижни мастни киселини. Сърцевинният полизахарид е прикрепен към липид А. При *Salmonella* е изграден от 10 захарни остатъци, повечето със специфична структура. Сърцевинният полизахарид съдържа заредени захари и фосфатни групи и допринася за отрицателния заряд на бактериалната повърхност. О-страничната верига или **О антигенът** е къса, повтаряща се последователност от захарни остатъци, някои от които са специфични.

Липополизахаридът предпазва патогенните Грам⁻ бактерии от имунната защита на гостоприемника. О-страничната верига се нарича **О антиген**, защото предизвиква имуен отговор. Много Грам⁻ бактерии са в състояние бързо да променят състава на странични вериги, като по този начин преодоляват защитните механизми на гостоприемника. Липид А често е токсичен; в резултат на това LPS може действа като **ендотоксин**. Външната мембрана има по-голяма пропускливост от цитоплазмената, поради наличието на поринови канали, съставени от три молекули, наречени порини. През каналите преминават молекули с размери 600 – 700 Da.

Цитоплазмена мембрана

Цитоплазмената мембрана е най-динамичната структура в прокариотната клетка. Тя е определяща за контакта на клетката с обкръжаващата я среда. Мембраната е **селективна полупропусклива бариера**, която регулира както постъпването на вещества в клетката, така и извеждането им от клетката в средата. Бактериалната мембрана позволява свободно движение на вода и незаредени молекули с маса около 100 Da. По-големи молекули и заредени субстанции се придвижват само с участие на специални мембранни транспортни процеси и **транспортни системи**. Прокариотите са лишени от вътреклетъчни органели, поради което в мембраната са локализирани редица важни метаболитни процеси: **аеробно дишане, фотосинтеза и синтез на АТФ**. Освен транспортни протеини, медиращи постъпването на вещества в клетката прокариотната мембрана съдържа **рецепторни молекули – сензорни протеини**, които определят концентрацията на молекулите в средата и изпращат сигнали в цитоплазмата. Чрез тях, клетката може да установи и отговори на химични сигнали от обкръжаващата я среда. Мембраната съдържа **ензими**, участващи в синтеза клетъчната стена, формирането на септа в дялящи се клетки, мембранный синтез, репликацията на ДНК, фиксацията на CO₂ и окислението на амоняк.

Бактериалните мембрани са съставени от около 40% фосфолипиди и 60% белтъци. Фосфолипидите са амфипатични молекули с полярни, хидрофилни глицеролови „глави“, свързани чрез естерни връзки с две неполярни, хидрофобни мастнокиселинни „опашки“. Тези свойства на липидите им позволяват да формират бислой в мембраната, в който са диспергирани различни структурни и ензимни протеини, които изпълняват повечето мембранни функции. Бактериалните мембрани се различават от клетъчните мембрани на еукариотите по това, че съдържат **наситени** или **мононенаситени** мастни киселини и нормално **не съдържат стероли**, като холестерол. Ре-

дица бактериални мембрани, обаче съдържат пентациклични стерол-подобни молекули наречени **хопаноиди**, които стабилизират мембраната.

Мембраните при архебактериите са различни, което е свързано с адаптирането им към екстремални местообитания. Мембраните формират бислой, но липидите са наситени, разклонени, повтарящи се изопреноидни субединици, свързани с глицерола чрез етерни връзки.

Независимо, че прокариотите нямат мембранни органели, като митохондрии и хлоропласти, някои бактерии притежават **вътреклетъчни мембранни структури**. Често цитоплазматичната мембрана образува **вгъвания**, които заемат голяма част от вътреклетъчното пространство при фототрофните и нитрифициращите бактерии. При нитрифициращите бактерии (*Nitrobacter*, *Nitrococcus*) вътрешните мембранни структури осигуряват по-голяма повърхност във връзка с интензивното дишане. Мембранните системи при фототрофните бактерии съдържат пигменти, поглъщащи светлина (бактериохлорофил и каротеноиди), а също компоненти на фотосинтетичната електрон-транспортна верига и фосфорилиращата система.

Друга мембранна структура при бактериите е **мезозомата**. Мезозомите са инвагинации на цитоплазматичната мембрана под формата на везикули, тубули или ламели. Въпреки, че мезозомите се свързват с различни функции (напр. координация на репликацията на ДНК, формиране на септа при деленето на клетката) много бактериолози смятат, че те са артефакти, получени по време на химическата фиксация на бактериите за електронна микроскопия.

Цитоплазма и включения

Цитоплазмата е съдържанието на клетката, ограничено от цитоплазматичната мембрана. Цитоплазматичната фракция, която има хомогена консистенция и съдържа растворими РНК, ензими, продукти и субстрати на метаболитни реакции се нарича **цитозол**. Друга част от цитоплазмата е представена от структурни елементи: рибозоми, нуклеоид и включения. Включенията в цитоплазмата са органични и неорганични, и най-често са резервни вещества. Някои от включенията нямат собствена мембрана и лежат в цитоплазматичния матрикс, напр. гликоген, цианофицин. Други включения имат обвивка, която е еднослойна и може да се състои само от протеини или да бъде мембранна структура, съставена от протеини и фосфолипиди. Включения с мембрана са поли- β -хидроксибутират, карбоксизоми, газови вакуоли.

Органичните включения обикновено са резервен източник на въглерод и енергия. **Гликогенът** е разклонен полимер на глюкозата. Глюкозните остатъци са свързани в дълги вериги с α -1,4-връзки; в местата на разклоненията, връзките са α -1,6. Гликогенът е диспергиран равномерно цитоплазматичния матрикс под формата на малки гранули и може да се наблюдава само с електронен микроскоп. Гликогенът, наричан още животинска скорбяла, се синтезира от *Escherichia coli*, *Salmonella* и други ентеробактерии, някои видове *Bacillus*, дрожди.

Поли- β -хидроксибутиратът е полиестер, разтворим в хлороформ, съставен от приблизително 60 остатъка на β -хидроксимаслена киселина, свързани с естерни връзки.

Полихидроксибутиратът се натрупва във включения, които могат да достигнат до 80% от сухата маса на клетката. Наричат се суданофилни, т.к. се оцветяват с багрилото суданово черно и могат да се наблюдават със светлинен микроскоп. Поли- β -хидроксимаслена киселина синтезират видове на род *Pseudomonas*, *Bacillus megaterium*, анаеробни фототрофни бактерии.

Гликогенът и поли- β -хидроксибутиратът са двете основни съединения, които бактериите използват като резервни източници на въглерод и енергия. Обикновено, бактериите синтезират само гликоген или поли- β -хидроксибутират, но някои пурпурни серни бактерии образуват и двете.

Скорбяла като резервен източник на въглерод и енергия, образуват бактериите от род *Neisseria* и *Acetobacter pasteurianum*. **Гранулеза** (скорбялоподобно вещество) се съдържа в голямо количество в клетките на видове от род *Clostridium*. **Мастни вещества** под формата на липидни капки образуват и използват като резервен източник на въглерод и енергия, много бактерии, дрожди и други гъби. Микобактериите могат да съдържат до 40% восъци.

Цианофицинови гранули образуват цианобактерите. Състоят се от полипептид, изграден от аминокиселините аргинин и аспартат в еквивалентни количества. Цианофициновите гранули служат като резервен азотен източник, който цианобактериите използват при недостиг в средата.

Газови вакуоли (аерозоми) са установени при бактерии, обитаващи водна среда (цианобактерии, фототрофни бактерии, *Thiothrix*, *Halobacterium*). Представяват агрегати от газови

везикули. Стената на везикулите се състои от протеинови субединици, свързани така, че образуват твърд затворен цилиндър, който е кух и непромокаем за вода, но свободно пропуска атмосферните газове. Чрез газовите вакуоли бактериите „плуват“ близо или на повърхността на водоема и могат да променят разположението си в зависимост от наличието на субстрати, кислород, светлина.

Карбоксисоми съдържат клетките на някои автотрофни бактерии (нитрифициращи, фототрофни бактерии, цианобактерии). Имат форма на многостенник с диаметър 90–100 nm, обвит с еднослойна белтъчна обвивка. Карбоксисомите съдържат ензима рибулозо-1,5-дифосфаткарбоксилаза, който е ключов за фиксацията на CO₂ в цикъла на Калвин.

Неорганичните включения са два основни типа: полифосфатни и серни гранули. Много бактерии съхраняват фосфати като **полифосфатни** или **волутинови** гранули. Полифосфатните естери служат като фосфатно депо и източник на енергия. Полифосфатните гранули се наричат още „**метахроматинови**“ т.к. проявяват свойството метахромазия – оцветяване в цвят, различен от този обогрящия разтвор. Полифосфати образуват някои млечнокисели бактерии (*Lactobacillus bulgaricus*), *Corynebacterium diphtheriae*, дрожди и др.

Серни гранули образуват редица фототрофни бактерии (пурпурни и зелени серни бактерии), които използват H₂S като електронен донор в процеса фотосинтеза. Сярата, получена при окислението на H₂S се натрупва в периплазмата или в специални цитоплазмени гранули. При отсъствие на H₂S, натрупаната в клетката сяра се окислява до сулфат.

Нуклеоид. Генетичният материал на прокариотите е представен от молекула (молекули) ДНК, разположена в компактна структура, локализирана в ограничен участък на цитоплазмата, без собствена ядрена мембрана (за разлика от еукариотите). ДНК молекулата включва няколко хиляди гена, разположени линейно и се нарича **хромозома**. В химично отношение хромозомата се състои от около 60% ДНК, 30% РНК и 10% белтъци. Обикновено прокариотите съдържат една двуверижна пръстеновидна ДНК, но някои бактерии съдържат линейна ДНК хромозома, а други, като *Vibrio cholerae* и *Borrelia burgdorferi* (съответно причинителите на холера и лаймска болест), имат повече от една хромозома. Нуклеоидът е компактно образование. Стабилизираща роля в организацията му изпълняват специфични белтъци, които участват в „опаковането“ на ДНК.

Рибозомите са структурите, в които се извършва белтъчният синтез. Прокариотните рибозоми имат коефициент на седиментация 70S. Те са съставени от две субединици – 30S и 50S. По размери и някои други особености бактериалните рибозоми са сходни с рибозомите на митохондриите и хлоропластите. Малката субединица (30S) съдържа 16S рРНК и в повечето случаи по една молекула от 21 вида белтъци. Голямата субединица (50S) се състои от два типа рРНК (23S и 5S) и около 35 молекули различни белтъци, представени в едно копие. Бактериалната клетка съдържа от 5000 до 50000 рибозоми.

Капсула и слизест слой

Върху клетъчната стена на много бактерии се отлагат слоеве с високо водно съдържание. **Капсулата** е добре организиран слой, който е тясно свързан с клетката и не се отмива лесно. **Слизестият слой** е дифузна зона от неорганизиран материал, който лесно се отделя.

Капсулата и слизестите слоеве обикновено се състоят от **полизахариди** и/или **пептиди**. **Капсулните полизахариди** освен глюкоза съдържат аминокиселини, рамноза, уронови киселини, 2-кето-3-дезоксигалактонова киселина и органични киселини, като пирогроздена и оцетна. Полизахаридни капсули са установени при *Streptococcus mutans*, *S. salivarius*, *Xanthomonas*, *Corynebacterium*. При *Bacillus anthracis* капсулата е белтъчна и се състои от поли-D-глутаминова киселина.

Редица компоненти на капсулата се отделят в средата под формата на **слуз**. Обилно образуване на слуз се наблюдава при култивиране на среди, съдържащи захароза. Хетероферментативната млечнокисела бактерия *Leuconostoc mesenteroides* бързо превръща разтвор, съдържащ тръстикова захар в декстран (слуз). Това превръщане протича извън клетката и се катализира от извънклетъчна хексозилтрансфераза–декстранзахараза. Декстранът се състои от остатъци на α-D-глюкоза, свързани с 1,6 връзки, т.е. 1,6-α-глюкан.

Капсулата не е необходима за бактериалния растеж и репродукция, но дава известно преимущество. (1) Придава на някои патогенни микроорганизми резистентност към фагоцитоза. Например, *Bacillus anthracis* „избягва“ поглъщане от фагоцитите, т. к. лизозомните ензими на

фагоцитите не могат да инициират хидролиза на поли-D-глутаминовата капсула. (2) Капсулата е с високо водно съдържание и предпазва клетката от изсушаване. (3) Капсулата изключва бактериофаги и повечето хидрофобни токсични материали, като детергенти. (4) Капсулата и слизестите слоеве често медираат прикрепяне на клетките към твърди повърхности във водна среда или повърхността на тъканите на гостоприемника. (5) Капсулни материали (например декстран) се синтезират при усвояване на захари и представляват резерви на въглехидрати за метаболизма.

Фимбрии, пили, флагелуми

Фимбриите и **пилите** са фини, къси израстъци на повърхността на прокариотната клетка, които нямат отношение към подвижността и са по-тънки от флагелумите. Клетката може да бъде покрита с до 1000 **фимбрии**, видими само с електронен микроскоп. Фимбриите са характерни предимно за Грам-отрицателни бактерии; най-често участват в прикрепянето на бактериите към повърхности, субстрати или други клетки. **Пилите** (F или sex пили) са подобни израстъци; от 1 до 10 на клетка. Пилите са детерминирани от половия фактор (F плазмид) или други конюгативни плаزمиди и са необходими за бактериалната конюгация. Някои бактериални вируси се прикрепят специфично към рецептори върху пили и стартират репродуктивния си цикъл

Повечето бактерии се придвижват с **флагелуми**. Броят и разположението на флагелумите имат таксономично значение. Разграничават се 4 типа клетки: монотрихи, лофотрихи, амфитрихи, перитрихи.

Бактериалният флагелум е съставен от три части – филament (нишка), базално тяло и кука, свързваща нишката с базалното тяло. **Нишката** е кух, ригиден цилиндър, изграден от субединици на белтъка флагелин. **Куката** е съставена от различни протеинови субединици. **Базалното тяло** е най-сложната част от флагелума. При *E. coli* и повечето Грам⁻ бактерии, е съставено от четири пръстена, свързани с централна ос. Най-външните L- и P пръстени се свързват съответно с липополизахаридния и пептидогликановия слой. Вътрешният M пръстен контактува с плазмената мембрана, а S пръстенът е разположен над него. Грам⁺ бактерии имат само два пръстена – вътрешен, свързан с цитоплазмената мембрана и външен, свързан с пептидогликана. Флагелумите се движат в резултат на взаимодействието между S- и M пръстените. Оста на базалното тяло се разполага между куката и края на M пръстена, който свободно се върти в цитоплазмената мембрана, а S пръстенът е прикрепен и е неподвижен. Потокът от протони между двата пръстена или между базалното тяло и обкръжаващите го мембранни белтъци генерира протондвижеща сила, която задвижва флагелумите. P- и L пръстените при Грам⁻ действат като опора на въртящата се ос.

Бактериални ендоспори

Редица Грам⁺ бактерии могат да формират специални резистентни, инертни структури, наречени **ендоспори**. Ендоспорите се развиват във вегетативните клетки на бактерии от родове *Bacillus*, *Clostridium*, *Sporosarcina*. Спорите са високо-резистентни към стресови фактори на средата, като топлина, ултравиолетови лъчи, химични дезинфектанти и изсушаване и са начин за преживяване на условия на средата с критична влажност и хранителни вещества. Ендоспорите често преживяват обработка при 100°C в продължение на 30 – 60 min.

Спорите могат да се разполагат централно, субтерминално или терминално в майчината клетка (спорангиум). Понякога спорите са с по-голям диаметър и причиняват издуване на спорангиума. Структурата на спората е комплексна. Спорите често са обкръжени от тънка обвивка, наречена **екзоспориум**. **Обвивката на спората** (екзина), която лежи под екзоспориума е съставена от няколко протеинови слоя; тя е непрониклива и отговорна за резистентността към химични вещества. **Кортексът**, който може да заеме повече от половината от обема на спората, се разполага под обвивката. Той се състои от пептидогликан, който е с по-малко напречни връзки отколкото във вегетативната клетка. **Стената на спората** (интина) е навътре от кортексът и обкръжава протопласта или сърцевината. Сърцевината на спората съдържа нормални клетъчни структури, като рибозоми и нуклеоид. Повече от 15% от сухото вещество на спората представлява дипиколинова киселина, свързана с калциеви йони. Калциевият дипиколинат стабилизира спорите нуклеинови киселини. Дехидратацията на протопласта също е от значение за термо-

резистентността. В процеса на спорообразуване водата се отстранява осмотично от протопласта, което го защитава от температурно и радиационно повреждане.

Спорогенезата (спорулацията) нормално започва при спиране на растежа, вследствие изчерпване на хранителните вещества. Тя е комплексен процес и може да бъде разделен на 7 етапа. (I) – формира се аксиален филамен от ядрен материал; (II) – цитоплазмената мембрана се вгъва навътре, затваря част от ДНК и формира септа; (III) – мембраната продължава да расте и поглъща незрялата спора, като по този начин я обвива във втора мембрана; (IV) – образува се кортексът между двете мембрани; натрупват се калциеви йони и дипиколинова киселина; (V) – около кортексът се формира протеиновата обвивка; (VI) – формира се зрялата спора: завършва синтеза на споровата обвивка; увеличава се терморезистентността и пречупването; (VII) – литични ензими разрушават спорангиума и спорите се освобождават. Процесът на спорулация при *Bacillus megaterium* продължава около 10 часа.

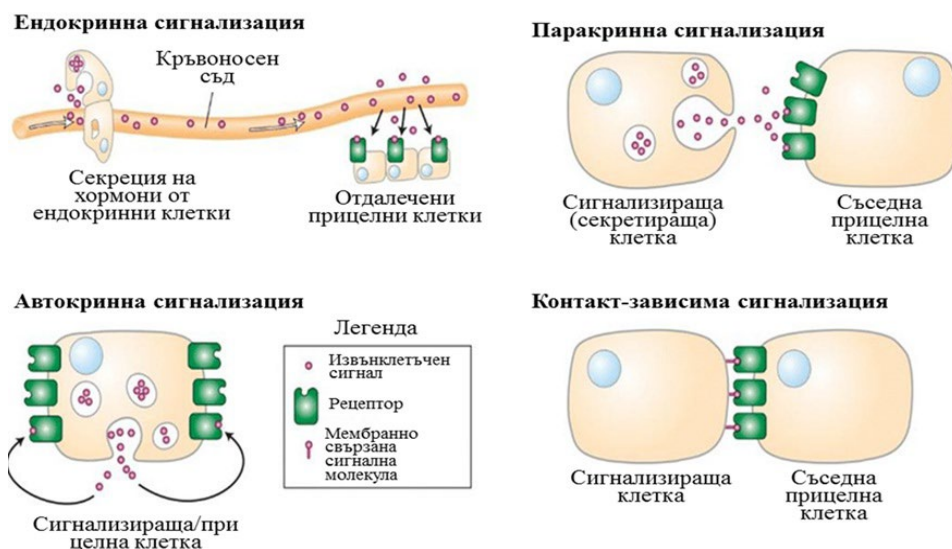
Трансформацията на спящите спори във вегетативни клетки също е комплексен процес и протича в 3 етапа: (1) активация, (2) герминация (покълване), (3) прорастване.

Клетъчна сигнализация може да се осъществи в резултат на директен контакт между клетки или под влияние на секретирани сигнални молекули. Съществуват различни видове сигнални молекули, които осигуряват комуникацията между клетките на многоклетъчните организми. В структурно отношение, сигналните молекули, функциониращи в животински и растителни организми, варират значително – от прости газове (като азотен оксид) до липиди (ейкозаноиди, стероидни хормони) и протеини (цитокени, растежни фактори). Сигналните молекули се различават по начина на взаимодействие с прицелните клетки (клетки, способни да разпознаят и реагират на конкретния сигнал). Някои сигнални молекули преминават през плазмалемата и се свързват с вътреклетъчни рецептори, разположени в цитоплазмата или ядрото, а други сигнални молекули се свързват към рецептори на клетъчната повърхност.

Различните типове междуклетъчна сигнализация (фиг. 1) се дефинират в зависимост от начина на предаване на сигнала и разстоянието между клетките, които участват в процеса:

- *Ендокринна сигнализация* – осъществява се с помощта на сигнални молекули (хормони), които се секретират от клетки в ендокринните жлези и се пренасят чрез циркулацията до отдалечени прицелни клетки. Например, стероидният хормон естроген, синтезиран и секретиран от клетки на яйчниците, има съществена роля в развитието и поддържането на функциите на женската полова система, както и във формирането на вторичните полови белези.
- *Паракринна сигнализация* – сигналните молекули действат локално, върху съседни прицелни клетки. Пример за такъв тип сигнализация са невротрансмитерите, които пренасят сигнали в областта на синапса между две нервни клетки, както и сигнализацията чрез цитокини между някои типове клетки на имунната система.
- *Автокринна сигнализация* – при нея се повлиява клетката, която секретира сигналните молекули. Характерен пример за автокринна сигнализация е реакцията на Т-лимфоцити спрямо антигени, навлезли в организма. В резултат на стимулацията от антиген някои видове Т-лимфоцити синтезират цитокин, който се свързва към рецептори на повърхността им и активира пролиферацията на клетката, секретирала сигналната молекула. Патологичен тип автокринна сигнализация се наблюдава при туморни клетки, продуциращи растежен фактор, спрямо който самите те реагират. Този процес активира клетъчна пролиферация.
- *Контакт-зависима сигнализация* – за реализирането ѝ е необходимо осъществяване на директен контакт между двете клетки (контакт между сигнална молекула и рецептор, локализиращи в цитоплазмената мембрана или чрез междуклетъчни контакти). Такъв тип сигнализация е характерна за някои клетки на имунната система, а също може да се осъществява чрез цепнатовидни контакти.

Много сигнални молекули (напр. невротрансмитери, пептидни хормони, растежни фактори, дори липидни сигнални молекули като ейкозаноидите /левкотриени, тромбосани, липоксини и простагландини/) се свързват с рецептори на повърхността на прицелни клетки. Рецепторите предават сигнала, иницииран от свързването на съответния му лиганд, по специфичен механизъм. Например, някои рецептори за невротрансмитери представляват лиганд-зависими йонни канали, които директно контролират транспорта на йони през клетъчната мембрана. Други клетъчно повърхностни рецептори (включително тези за пептидни хормони и растежни фактори) действат като регулират активността на вътреклетъчни ензими, които предават сигнала от рецептора към вътреклетъчни молекули чрез серия от последователни реакции – процес, означаван като *сигнална трансдукция*. Така, свързването на сигнална молекула към рецептор на повърхността на клетката предизвиква серия от вътреклетъчни реакции, чийто краен резултат е изменение на генната експресия или клетъчния метаболизъм. Примери за такива механизми на клетъчна сигнализация са MAP киназните сигнални пътища, JAK-STAT и PI3K/Akt пътя.



Фигура 1. Типове междуклетъчна сигнализация

Един от основните MAP киназни сигнални пътища в клетки на бозайници се иницира от свързването на растежен фактор към рецептор с тирозин киназна активност. В резултат на това настъпва димеризация и автофосфорилиране на цитоплазмените домейни на рецептора, осигуряващо формиране на свързващи области за гуанин нуклеотид обмянащ фактор (GEF). Свързването на GEF предизвиква активиране на малкия ГТФ-свързващ протеин Ras, който от своя страна активира протеин киназата Raf. Raf фосфорилира и активира протеин киназата MEK, която активира MAP (митоген-активиран протеин) киназата ERK. ERK фосфорилира голям брой ядрени и цитоплазмени прицелни протеини, индуцирайки специфичен клетъчен отговор (напр., клетъчна пролиферация, диференциация или др.).

JAK-STAT сигналният път се активира от цитокини и хормони. Свързването на тези сигнални молекули със съответните им рецептори активира Janus кинази (JAK), нековалентно свързани към рецепторните цитоплазмени домейни. В резултат на това JAK фосфорилират транскрипционния фактор STAT (Signal Transducers and Activators of Transcription). Фосфорилираните STAT протеини димеризират и мигрират в ядрото, където регулират генната експресия. Този сигнален път има важна роля за регулиране на вродения и придобит имунен отговор, както и за хематопоезата.

PI3K/Akt сигналният път има ключова роля при регулирането на метаболизма, растежа и оцеляването на клетките. Иницира се от свързване на сигнална молекула към рецептор с тирозин киназна активност. Активираният в резултат на това рецептор взаимодейства с фосфоинозитид 3-киназа (PI3K), която фосфорилира и преобразува фосфатидилинозитол 4,5-бифосфат (PIP2) до фосфатидилинозитол 3,4,5-трифосфат (PIP3). Към PIP3 се свързва Akt (протеин киназа B). Впоследствие Akt бива активирана чрез фосфорилиране от две други протеин кинази (PDK1, mTORC2), които също свързват PIP3. Akt фосфорилира редица клетъчни протеини (проапоптотични протеини, транслационни и транскрипционни фактори, други кинази), индуцирайки специфичен отговор на клетката спрямо получения сигнал.

Като *стволови* се определят недиференцирани клетки с висок потенциал за делене, способни да самообновяват популацията си и да се диференцират до различни типове клетки. В зависимост от периода от индивидуалното развитие, през който са получени, стволовите клетки се класифицират като ембрионални (ЕСК), фетални (ФСК), стволови клетки от новородено и стволови клетки от възрастен организъм. Основни типове стволови клетки (СК) с висок потенциал за диференциация, които могат да бъдат изолирани от развиващ се плод, новородено или възрастен организъм, са хематопоеичните (ХСК) и мезенхимните (МСК). В началото на XXI век от диференцирани клетки на възрастен организъм след репрограмизиране в *in vitro* култура чрез индуциране на експресията на транскрипционните фактори Oct4, Sox2, Klf4 и c-Myc, бяха получени индуцирани плурипотентни стволови клетки (иПСК). Тези клетки имат фенотип, подобен на ЕСК и са способни да се диференцират до всички типове клетки, произхождащи от трите зародишни

пласта (ендодерма, екзодерма, мезодерма). Индуцираните ПСК осигуряват нова перспектива за персонализирана медицина, тъй като могат да се получат от клетки на пациента, а след размножаване и диференциация *in vitro* култура, могат да бъдат трансплантирани обратно на пациента без риск от реакция на имунната система.

Общите аспекти на *in vitro* културата на СК включват поддържане на стерилност, осигуряване на оптимални физикохимични параметри (рН, температура, осмоларитет, газов баланс) и състав на хранителната среда. Стандартно, за човешки СК оптималната температура за култивиране е 37°C, но е установено, че малко по-ниски температури (30 – 35°C) по време на култивиране допринасят за редуциране на спонтанната диференциация *in vitro* на ЕСК и иПСК. Оптималното рН за *in vitro* култивиране на СК е 7,2 – 7,4. Повишаването на рН може да предизвика диференциация на СК. От друга страна, клетъчната виталност и пролиферация се понижават, когато рН на средата е по-ниско от оптималното. Поради това е важно да се контролира и поддържа рН на хранителната среда в подходящ диапазон. За тази цел предпочитано е буферизиране с натриев бикарбонат и CO₂ – концентрацията на бикарбонат в хранителната среда трябва да е в равновесие с CO₂ в газовата фаза на културата (23 mM бикарбонат/5% CO₂) за поддържане на оптимално рН. Газовата фаза на *in vitro* културите от СК обикновено съдържа кислород в концентрация, сходна с атмосферната – около 20%. Въпреки това, в статични култури с ограничена дифузия и наличност на кислород, съдържанието му в хранителната среда може да намалее с течение на времето, което е отчетено, че би могло да предотврати спонтанната диференциация на ЕСК и да подобри способността за самообновяване на клетките. При култивирането на СК осмоларитетът обикновено се поддържа в диапазона 290 – 320 mOsm/L, подобно на физиологичните условия, за да се осигурят клетъчната жизнеспособност и правилна функция.

Съставът на хранителната среда и повърхността, върху която се развиват СК *in vitro*, са от централно значение за култивирането им. За ЕСК и иПСК са разработени безсерумни хранителни среди, съдържащи специфични добавки (напр., LIF (левкемия-инхибиращ фактор) за миши ЕСК; фибробластен растежен фактор-2 (FGF-2) и цитокини от суперфамилията на трансформацията растежен фактор-β (TGF-β) за човешки ЕСК), които поддържат плурипотентността на клетките и размножаването им в *in vitro* култура. За да се предотврати формирането на ембрионни телца, в които настъпва спонтанна диференциация до различни типове клетки, ЕСК и иПСК трябва да се залагат в култура върху подхранващ слой от митотично неактивни клетки (миши ембрионални фибробласти, STO клетъчна линия) или 3D матрикси (хидрогелове, съдържащи колаген и витронектин; Matrigel™, наподобяващ базалната ламина; ламинин 521 или 511). 3D матрикса, както и подхранващия клетъчен слой покриват културалния съд и благоприятстват адхезията и разстилането на СК. Заедно с това, клетките от подхранващия слой кондиционират хранителната среда, осигурявайки растежни фактори и редица други молекули, които спомагат за запазване на недиференцираното състояние и плурипотентността на ЕСК и иПСК, както и размножаването им.

Мезенхимните и хематопоетичните СК се култивират в стандартна хранителна среда (α-MEM или DMEM), допълнена с 10 до 20% фетален телешки серум, растежни фактори и цитокини. За клинични цели са разработени безсерумни хранителни среди, които не съдържат съставки от животински произход. За стимулиране пролиферацията и поддържане на потенциала за диференциация на културите от МСК към хранителната среда се добавят растежни фактори като FGF-2, епидермален растежен фактор (EGF) и тромбоцитен растежен фактор-BB (PDGF-BB). За поддържане на пролиферацията и потенциала за диференциация на ХСК *in vitro* към хранителната среда на културите се добавят фактор на стволовите клетки c-kit (SCF) и тромбопоетин (TPO) или SCF в комбинация с интерлевкини (IL) и гранулоцитен колониестимулиращ фактор (G-CSF) (например, SCF + IL-3, IL-6 и G-CSF).

Стволовите клетки намират широко приложение в тъканното инженерство, регенеративната медицина и биофармацията. Например, от МСК, заложили върху биосъвместим матрикс в среда с необходимите молекули, предизвикващи диференциация, могат да бъдат получени подходящи за трансплантация фрагменти от кожа, хрущялна или костна тъкан. ЕСК и иПСК се използват като *in vitro* модели за различни заболявания при човека. Например, постигнато е установяване на култури от кардиомиоцити, неврони, чернодробни и други типове клетки, специфични за дадено заболяване, които се използват за скрийнинг на нови терапевтични агенти. По този начин се намалява необходимостта от работа с животински моделни организми и се улеснява високоефективният анализ на действието на нови кандидат-лекарства. Освен това, от десе-

тилетия са установени клинични протоколи за трансплантация на ХСК от костен мозък или пъпна връв с цел лечение на левкемии и имунни нарушения. Очаква се в бъдеще приложенията на СК да нараснат в насока получаване в лабораторни условия на функционални органоиди и органи.

Техниката на клетъчно сливане и последваща селекция на получените хибридни клетки е известна като *хибридомна технология* и широко се използва за производство на моноклонални антитела. Получените по този начин хибридни клетки се означават като *хибридоми*. Често определението, което се среща в литературата за термина „хибридома“, е следното: хибридна клетка, получена при сливане на антияло-продуцираща В-клетка и миеломна клетка, която не синтезира антитела. Това определение обаче е с тесен смисъл, тъй като е валидно само в случаите, когато хибридомната технология се използва за получаване на моноклонални антитела. Днес, хибридоми могат да бъдат получени и от други типове специализирани клетки след сливане с туморна клетка. Например, широко прилагана методика в експерименталната практика е продукцията на Т-клетъчни хибридоми – хибридни клетки, получени в резултат на сливане на Т-лимфоцит и тимомна клетка, която не експресира Т-клетъчен рецептор.

Хибридомните технологии премахват естествените ограничения на преживяемостта на специализирани клетки в условия *in vitro* чрез сливането им с туморни клетки. От получените хибриди се подбират тези, които са запазили търсените особености на специализираната клетка (продукция на моноклонални антитела, експресия на специфични рецептори и др.) и са придобили способност да пролиферират неограничено в *in vitro* култура.

Основните етапи от методиката за получаване на хибридоми, продуциращи моноклонални антитела са следните:

1. Имунизирание на лабораторно животно с антиген, спрямо който е необходимо да се получат специфични моноклонални антитела.
2. Изолитране на В-лимфоцити и залагане на *in vitro* култура.
3. Провеждане на сливане между В-лимфоцити и миеломни клетки, които не произвеждат имуноглобулини.
4. Селекция на хибридите от интерес. Провежда се в селективна среда ХАТ (хипоксантин/аминоптерин/ тимидин), в която оцеляват само хибридните клетки, получени от сливане между В-лимфоцит и миеломна клетка. Аминоптеринът, съдържащ се в средата за селекция, блокира *de novo* синтезата на нуклеотиди. Поради това, миеломните клетки и хибридите миеломамиелома не преживяват в ХАТ среда, тъй като носят мутация в гена, кодиращ хипоксантин-гуанин фосфорибозил трансфераза и не са способни да осъществяват алтернативния път за синтез на нуклеотиди. Лимфоцитите и хибридите лимфоцит-лимфоцит се развиват нормално в ХАТ среда, синтезирайки нуклеотиди по алтернативния път, но тези клетки имат ограничен живот *in vitro*. Така, при етапа на селекция след около две седмици в културата преживяват единствено хибридите лимфоцит-миелома. Те пролиферират и формират клетъчни колонии в културалния съд
5. Скрининг: анализира се наличието на секретирани в хранителната среда антитела. Селектират се колонии с висока продукция на антитела, които разпознават антигена, използван за имунизация при стъпка 1.
6. Клонитране: избраните колонии се подлагат на клонитране, което осигурява получаване на хибридомна клетъчна линия, водеща началото си от една антияло-продуцираща клетка.
7. Скрининг, подбор на клонове от интерес и размножаване на селектираните клетки. Част от размножените клетки се замразяват, за да се установи резерв от получената хибридомна клетъчна линия.

Химерните антитела представляват рекомбинантни имуноглобулинови молекули, които съдържат вариабилни региони, кодирани от гени на гризач и човешки константни региони. По този начин се осъществява трансформиране на антитела от гризачи до структури, които наподобяват човешки антитела, без да се нарушават свойствата на молекулата (основно способността за разпознаване и свързване на антиген). Първото химерно антияло (ХА) – Abciximab, съдържа антиген-свързващ фрагмент, получен от мише моноклонално антияло, което инхибира тромбоцитната агрегация чрез свързване с гликопротеин IIb/IIIa рецептори. То се използва за инхибиране на тромбоцитната агрегация при заболявания на сърдечно-съдовата система. Първото ан-

титяло с приложение при пациенти с онкологични заболявания – Rituximab, представлява химерен анти-CD20 имуноглобулин. Химерните антитела са широко разпространени терапевтични агенти, а наименованието им завършва с наставка „-ximab“. Например, Rituximab и Cetuximab (антитяло, инхибиращо рецептора за епидермален растежен фактор) с антитуморно действие, както и противовъзпалителният агент Infliximab (анти-тумор некрозис фактор- α (TNF- α) ХА, прилагано при терапия на автоимунни заболявания като ревматоиден артрит, болест на Крон, псориазис). Нов клас ХА с терапевтичен потенциал са хуманизираните антитела, получени чрез въвеждане на нуклеотидни последователности, кодиращи части от антитяло на гризач (с по-малък размер в сравнение с класическите ХА), в последователност, кодираща човешки имуноглобулин. Наименованието им завършва с наставка „-zumab“. Първото ХА от този тип е Daclizumab (анти-IL-2 рецептор ХА, което свързва α -субединицата (CD25) на рецептора за IL-2), използвано за профилактика при реакции на отхвърляне на трансплантиран орган. Хуманизирането и получаването на ХА направи възможно клиничното приложение на нов клас биологични препарати, насочени срещу заболявания, за които все още няма разработено ефективно лечение (като туморни и автоимунни заболявания).

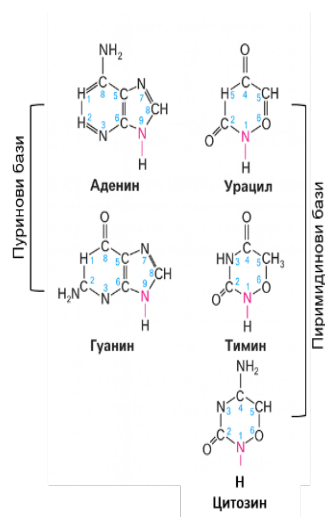
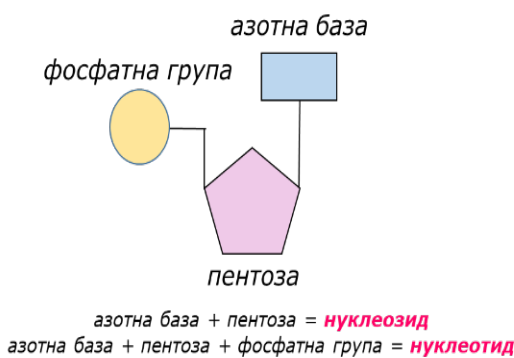
CAR-T клетъчната терапия е нов вид имунотерапия, при която Т-лимфоцити, изолирани от пациент, се подлагат на генетична модификация в *in vitro* култура, което индуцира експресия на химерен антигенен рецептор (CAR) на повърхността на клетките. CAR осигурява както механизъм за активация на Т-клетката, така и сигнал за оцеляване и пролиферация. Процедурата по осъществяване на CAR-T клетъчната терапия включва осъществяване на левкафереза и изолиране на Т-лимфоцити в *in vitro* култура, последвано от въвеждане в клетките на ген, кодиращ CAR. Получените модифицирани Т-лимфоцити се размножават в лабораторни условия, след което се въвеждат в тялото на пациента.

CAR съдържа следните основни участъци: *ектодомейн/антиген-свързваща извънклетъчна част* (рекомбинантен едноверижен вариабилен фрагмент (scFv) от моноклонално антитяло, който специфично разпознава и свързва туморен антиген; scFv включва участък от лека и от тежка имуноглобулинова верига); *свързващ сегмент (hinge)*, след който се разполага *трансмембранен домейн*; и *вътреклетъчен домейн* (включва активиращ (CD3 ζ) Т-лимфоцита участък или активиращ (CD3 ζ) и костимулаторен участък). CAR осигурява на Т-клетката нова специфичност – да разпознава характерен туморен антиген и да реагира спрямо него.

CAR-T клетките се класифицират въз основа на структурата на вътреклетъчния домейн на експресирания химерен рецептор. CAR от първо поколение имат вътреклетъчен домейн, произведен на CD3 ζ веригата, взаимодействаща с Т-клетъчния рецептор. Клетките, експресирани този тип химерен рецептор зависят от екзогенното производство на цитокини и показва неэффективна активация. CAR от второ поколение осигуряват по-добра пролиферативна активност и цитотоксичен потенциал на клетките, които ги експресират, тъй като притежават комплексен ендодомейн със CD3 ζ участък и костимулаторен участък. CAR от трето поколение съдържат два костимулаторни домейна (CD28, 4-1BB, или ICOS и/или OX40). CAR от четвърто поколение съдържат трети тип участък в ендодомейна, индуциращ продукция на специфичен цитокин. Т-лимфоцити с CAR от четвърто поколение са известни още като „TRUCKs“ – Т-клетки, способни да предизвикат цитокин-медирано елиминиране на туморни клетки чрез освобождаване на цитокини в туморната микросреда. CAR от пето поколение съдържат ендодомейн, който включва както CD3 ζ и костимулаторен участък, така и област, осигуряваща сигнализация, характерна за IL-2 рецептора. Тази сигнализация поддържа активността на CAR-T клетките и насърчава образуването на Т-клетки на имунологичната памет, но също така активира и стимулира по-мощен имуноен отговор спрямо туморни антигени.

Няколко типа CAR-T клетъчни терапии се прилагат успешно за хематологични злокачествени заболявания – Kymriah (CD19-специфичен CAR), прилаган за терапия на рефракторна остра лимфобластна левкемия и дифузен В-клетъчен лимфом; Yescarta (анти-CD19 CAR), прилаган за терапия на рефракторен дифузен В-клетъчен неходжкинов лимфом; Abecma (анти-BCMA CAR), прилаган за терапия на рецидивиращ и рефракторен множествен миелом и др. Приложението на CAR-T терапията при солидни тумори обаче се сблъсква с трудности – липса на уникални тумор-специфични антигени, ограничена инфилтрация на CAR Т-клетките и др., което налага идентифициране на нови туморни маркери, подобрене на CAR структурите, както и използване на алтернативен тип клетки-носители на CAR ($\gamma\delta$ -Т-клетки, НК-клетки и др.).

Нуклеиновите киселини представляват последователности от химически свързани субединици, чиято основна роля е съхранението, предаването и експресията на генетичната информация. Съществуват два основни типа нуклеинови киселини – дезоксирибонуклеинова киселина (ДНК) и рибонуклеинова киселина (РНК), всяка от които притежава специфични структурни характеристики и биологични функции. Нуклеиновите киселини са изградени от нуклеотидни единици, като всеки нуклеотид се състои от три компонента: азотна база, монозахарид (пентоза) и фосфатна група. Азотните бази се класифицират в две категории – пурины и пиримидини. Пурините включват аденин (А) и гуанин (Г) и са изградени от слети пет- и шестчленен пръстен. Пиримидините – цитозин (С), тимин (Т) и урацил (У) – съдържат един шестчленен пръстен. В ДНК се срещат аденин, гуанин, цитозин и тимин, докато РНК съдържа аденин, гуанин, цитозин и урацил, който замества тимина. Монозахаридът е петвъглеродна захар с циклична структура. При ДНК това е 2-дезоксирибоза, която притежава хидроксилни групи (–ОН) на първата, третата и петата позиция на пръстена, но има водороден атом (–Н) на втората позиция, вместо хидроксилна група. При РНК, монозахаридът е рибоза, който съдържа хидроксилна група на втора позиция. Тази разлика изглежда минимална, но тя има съществени последици за стабилността и функциите на молекулите. Липсата на хидроксилна група на втората позиция при ДНК я прави по-устойчива на хидролиза, което обуславя ролята ѝ като молекула за дълготрайно съхранение на генетичната информация. Фосфатната група е третият компонент на нуклеотида и съдържа фосфорен атом, свързан с кислородни атоми. При нуклеотидите фосфатната група е свързана към петата позиция на захарта чрез фосфоестерна връзка. Азотната база и монозахаридът са свързани посредством N-глюкозидна връзка, като аденинът и гуанинът се свързват чрез азотния атом в позиция 9 на пуриновия пръстен, а цитозинът, тиминът и урацилът – чрез азотния атом в позиция 1 на пиримидиновия пръстен. В резултат на това свързване се образува нуклеозид. При добавяне на фосфатна група към петата позиция на захарта се формира нуклеотид.



Нуклеотидите се свързват в полимерни вериги чрез образуване на фосфоестерни връзки. Тези връзки се установяват между 3'-хидроксилната група на един нуклеотид и 5'-фосфатната група на следващия нуклеотид. Получената полинуклеотидна верига притежава ясно изразена насоченост: единият ѝ край съ-

държа свободна 5'-фосфатна група (5'-край), а другият – свободна 3'-хидроксилна група (3'-край). По правило нуклеотидната последователност винаги се записва и анализира в посока от 5' към 3' край. Тази насоченост е от съществено значение за всички основни биологични процеси, включително репликация, транскрипция и трансляция.

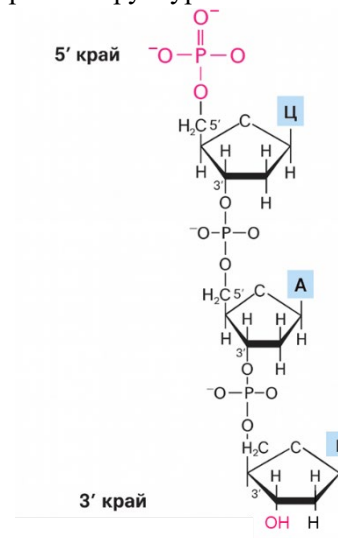
Скелетът на полинуклеотидната верига се състои от редуващи се захарни и фосфатни остатъци, образуващи регулярна и повтаряща се структура. Азотните бази излизат навън от този захарно-фосфатен скелет и участват в специфични взаимодействия.

Около N-глюкозидната връзка между азотната база и захарта съществува възможност за ротация, която се характеризира с торзионния ъгъл на тази връзка. В зависимост от стойността

на ъгъла нуклеотидът може да заема син- или анти-конформация. При син-конформацията пуриновият пръстен или кислородният атом на пиримидиновата база са разположени над пентозния пръстен, докато при анти-конформацията те са насочени в противоположна посока спрямо захарта. Анти-конформацията е преобладаваща в природните ДНК и РНК молекули, докато син-конформацията има значение при специфични структури, като например Z-ДНК.

Разбирането на вторичната структура на ДНК е резултат от поредица експериментални открития. През 50-те години на XX век, Ервин Чаргаф анализира нуклеотидния състав на различни ДНК молекули чрез хроматографски методи. Той установява, че количеството на адениновите остатъци е равно на това на тиминовите ($A = T$), а количеството на гуаниновите – на цитозиновите ($G \equiv C$), като съотношението между пурины и пиримидини винаги е 1:1. Това наблюдение, известно като правилото на Чаргаф, предполага специфична организация на азотните бази в ДНК молекулата.

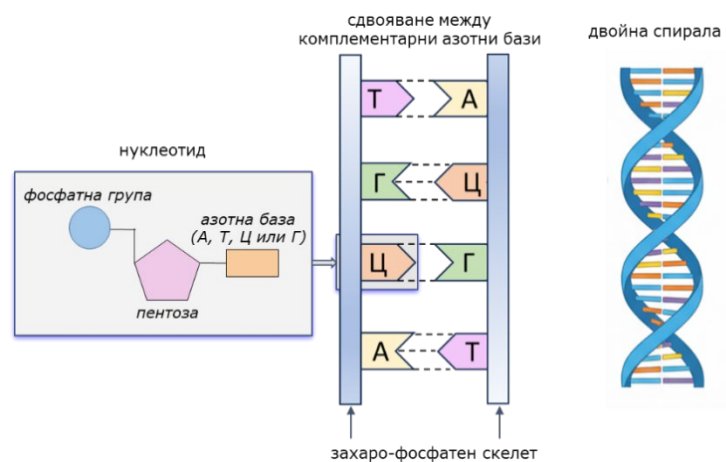
По същото време Розалинд Франклин и Морис Уилкинс провеждат рентгеноструктурни анализи на ДНК молекули. Получените дифракционни модели разкриват спираловидния характер на молекулата. Данните показват диаметър на ДНК от приблизително 2 nm, разстояние между последователни обороти на спиралата от около 3,4 nm и наличие на приблизително 10 нуклеотидни двойки на оборот. Тези параметри свидетелстват за регулярна и добре организирана спирална структура.



През 1953 г. Джеймс Уотсън и Франсис Крик предлагат модел на ДНК, който интегрира всички налични експериментални данни. Според този модел, ДНК е изградена от две полинуклеотидни вериги, усукани около една обща ос и образуващи дясновъртяща двойна спирала. Захаро-фосфатните им скелети са разположени по периферията на молекулата и формират външната ѝ повърхност, докато азотните бази са ориентирани към центъра и изграждат вътрешната сърцевина. Това подреждане позволява хидрофилният скелет да бъде максимално изложен на водната среда, а хидрофобните бази да бъдат защитени във вътрешността на структурата. Дясновъртящият характер на спиралата означава, че при наблюдение по оста на молекулата захаро-фосфатните вериги се завъртат по посока на часовниковата стрелка. По протежение на спиралата се оформят две надлъжни бразди – голяма и малка, които служат като места за специфично взаимодействие с регулаторни белтъци, разпознаващи определени ДНК последователности.

Двете полинуклеотидни вериги се свързват помежду си чрез специфично базово сдвояване. Аденинът от едната верига се свързва с тимин от другата, образувайки $A=T$ двойка, а гуанинът – с цитозин, образувайки $G \equiv C$ двойка. Това специфично сдвояване е в основата на комплементарността между веригите и обяснява правилото на Чаргаф. Свързването между комплементарните бази се осъществява чрез водородни връзки. $A=T$ двойката се стабилизира от две водородни връзки, докато $G \equiv C$ двойката се стабилизира от три, което допринася за по-високата стабилност на $G \equiv C$ богатите участъци.

Азотните бази в базовите двойки не лежат в една и съща равнина, а са леко отместени една спрямо друга, образувайки конфигурация, наподобяваща витло. Ъгълът на отместване е приблизително 12° при $A=T$ двойките и около 7° при $G \equiv C$ двойките.



Двете вериги в молекулата на ДНК са антипаралелни: едната е ориентирана от 5' към 3' край, а другата – от 3' към 5' край. Тази антипаралелност е критична за стабилността на молекулата и представлява ключов елемент от модела на Уотсън–Крик.

Вертикалните взаимодействия между съседни азотни бази, известни като стекинг-взаимодействия, възникват благодарение на малкото разстояние между базите, което попада в границите на Ван дер Ваалсовия радиус. Те включват диполни взаимодействия, Лондонови дисперсионни сили и хидрофобни ефекти. Стекинг-взаимодействията допринасят значително за стабилността на ДНК молекулата, често в същата степен, както и водородните връзки.

ДНК молекулата не съществува в един-единствен конформационен вид, а може да приема различни структурни форми в зависимост от условията на средата. В-конформацията е преобладаващата форма на ДНК молекулите при физиологични условия в живите клетки и във водни разтвори със съдържание на вода около 90%. В-ДНК съдържа приблизително 10 нуклеотидни двойки на оборот на спиралата, разстоянието между два последователни оборота е около 3,4 nm и се оформят две ясно изразени бразди – голяма и малка.

А-конформацията се наблюдава в разтвори с по-ниско водно съдържание (около 70%). А-ДНК е преобладаващата конформация при двойноверижни РНК молекули и при хибридни ДНК–РНК дуплекси. При тази форма азотните бази са наклонени спрямо централната ос на спиралата, което води до структура с около 11 нуклеотидни двойки на оборот и разстояние между оборотите от приблизително 2,55 nm.

Z-конформацията представлява лявовъртяща спирала, което е сравнително необичайно явление в живата клетка. Z-ДНК се среща в ограничени участъци при алтернативни пурин–пиримидинови последователности, при които пурините заемат син-конформация, а пиримидините – анти-конформация. Тази форма съдържа 12 нуклеотидни двойки на оборот и се характеризира с наличие на една централна бразда вместо две.

За разлика от ДНК, която обикновено е двойноверижна, РНК молекулите са предимно едностранни. Въпреки това РНК може да образува локални вторични структури чрез базово сдвояване между различни участъци на една и съща верига. Това се осъществява благодарение на наличието на палиндромни последователности, при които дадена нуклеотидна последователност е последвана от своята обратна комплементарна последователност. Когато такива палиндромни области са разположени близо една до друга, РНК молекулата може да се огъне и да образува базови двойки между комплементарните участъци. В резултат се формира структура, известна като фуркета (стъбло–бримка). Стъблото представлява двойноверижен участък, стабилизирани от водородни връзки и стекинг-взаимодействия между азотните бази, докато бримката се състои от сегмента между двата комплементарни региона. Способността на РНК да формира специфична вторична структура е от критично значение за нейните биологични функции. Много видове РНК, особено транспортните РНК, образуват характерни бримки и структурни елементи за правилното си функциониране.

Денатурацията е процес, при който водородните връзки между комплементарните вериги на ДНК се разкъсват и двете полинуклеотидни вериги се разделят. Този процес може да бъде индуциран от различни фактори, като висока температура, екстремни рН стойности, както и определени химични реагенти, които нарушават електростатичните взаимодействия. Денатурацията е съпроводена от значителни промени във физикохимичните свойства на молекулата. Един от най-характерните показатели е промяната в оптичната абсорбция. Азотните бази поглъщат ултравиолетова светлина с максимум при 260 nm. При нативната двойноверижна ДНК абсорбцията е приблизително с 40% по-ниска в сравнение със свободни нуклеотиди. Това явление, известно като хипохромен ефект, се дължи на подреденото разположение на азотните бази като монетни стълбчета в двойната спирала. След денатурация базите губят тази подредба и абсорбцията нараства – явление, известно като хиперхромен ефект. Денатурацията на ДНК не настъпва при една строго определена температура, а протича в определен температурен интервал. Температурата на топене (T_m) се дефинира като температурата, при която 50% от молекулите са денатурирани. Когато оптичната абсорбция се изобрази като функция от температурата се получава характерна S-образна крива, известна като крива на топене на ДНК. Температурата на топене зависи от няколко фактора, като най-значимият е нуклеотидният състав. Йонната сила на разтвора също оказва значително влияние, а присъствието на органични разтворители, като формамид може да понижи T_m и да позволи денатурация при по-ниски температури. При подходящи

условия денатурацията може да бъде обратим процес. Ренатурацията (реасоциацията) представлява повторното свързване на две комплементарни едноверижни полинуклеотидни вериги и възстановяване на двойната спирала. Хибридизацията е сходен процес, при който се свързват две комплементарни едноверижни молекули нуклеинови киселини – ДНК–ДНК, РНК–РНК или ДНК–РНК хибриди.

ДНК репликация

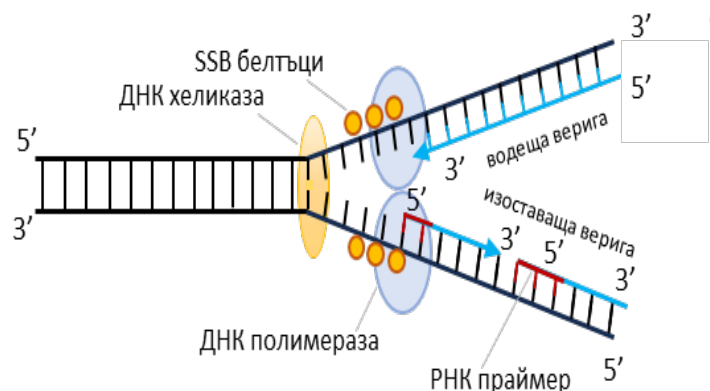
Процес, при който оригиналните (родителски) вериги на ДНК в двойната спирала се разделят и всяка от тях се копира, за да се получат две нови (дъщерни) двойно-верижни ДНК молекули. ДНК репликацията се извършва през S фазата на клетъчния цикъл. При клетъчното делене двете дъщерни клетки получават идентични копия на ДНК. Репликацията на ДНК може да се извърши изкуствено чрез лабораторна техника, наречена полимеразна верижна реакция (PCR – Polymerase Chain Reaction), която може да амплифицира прицелен ДНК фрагмент от генома. ДНК репликацията е процеса осигуряващ точното копиране на генетичния материал при всяко клетъчно делене. Основна характеристика на репликацията е нейния полуконсервативен характер. При този процес, двойната спирала на ДНК се разплита, разделяйки двете комплементарни вериги. Всяка от двете вериги служи, като шаблон или матрица за синтез на нова комплементарна верига. Резултатът е образуването на две нови ДНК молекули, всяка съставена от една майчина верига и една новосинтезирана верига. След приключване на репликацията, всяка дъщерна клетка получава един оригинален генетичен материал от родителската клетка и един новосинтезиран. Процесът осигурява непрекъснатост на генетичната информация от поколение на поколение. Репликон е геномна единица, в която се извършва единичен акт на репликация. Бактериалната хромозома представлява единичен репликон, докато еукариотната хромозома се състои от множество репликони. Репликацията на ДНК се иницира в място наречено начало на репликацията – секвенция богата на А=Т двойки (*OriC* сайт при *E.coli*). Там се иницират репликационни вилки, които се движат двупосочно по молекулата на ДНК. Репликацията спира в участък наречен край на репликацията. Процеса репликация се състои от три етапа: Инициация – включва разпознаване на репликационно начало от белтъчен комплекс, разделяне на двете вериги и временно стабилизиране на едноверижното им състояние, инициране в репликационната вилка на синтеза на дъщерните вериги; Елонгация – осъществява се от друг белтъчен комплекс – реплизома, който съществува само свързан със специфичната структура, която ДНК придобива в репликационната вилка. Реплизомата включва ДНК полимераза III и други ензими; Край на репликация – реакции на свързване или терминация, след които удвоените хромозоми се разделят.

В бактериалните и еукариотните клетки има няколко ДНК полимерази. Едни от тях участват в каталитичната реакция на репликацията, други имат помощна роля в репликацията, а трети извършват поправка на повредена ДНК. Всички бактериални и еукариотни ДНК полимерази споделят една и съща фундаментална 5'-3'-синтетична активност (катализират създаването на 5'-3' фосфодиестерна връзка между два нуклеотида). Синтезата на новата ДНК верига се извършва винаги в посока 5'-3'. Субстрати са 4^{те} нуклеотид трифосфати (НТФ). ДНК полимеразите притежават също и 3'-5'-екзонуклеазна активност, която се използва за да се изрежат неправилно сдвоени бази (proofreading активност). При прокариотните организми основната репликаза е ДНК полимераза III. ДНК полимераза III на *E. coli* е комплекс с димерна структура, притежаващ висока процесивност. Всеки мономер се състои от: комплекс, натоварващ скобата – 5 субединици, които използват енергията на АТФ хидролиза, за да свържат β скобата към дуплекса матрица:праймер; хомодимер на β субединицата (β скоба) – обхваща матричната верига, като скоба и след това присъединява каталитичната сърцевина; каталитична сърцевина – α субединица с ДНК полимеразна активност, ε субединица с ДНК екзонуклеазна активност, θ субединица, стимулираща ε субединицата; и димеризираща субединица, τ (таф) – свързва каталитичните субединици и поддържа димерната структура.

Тъй като двете комплементарни вериги са антипаралелни, този еднопосочен синтез създава специфичен проблем при репликация. Една от двете новосинтезиращи се вериги, известна като водеща, е ориентирана в посока, позволяваща непрекъснатата ѝ синтеза. Другата верига – изоставаща верига, е ориентирана в противоположна посока, което изисква специален механизъм за нейното синтезиране. Водещата верига на ДНК се синтезира непрекъснато в посока 5'-3'. Изос-

таващата верига на ДНК трябва да нараства в посока 3'-5' и се синтезира прекъснато под формата на 5'-3' фрагменти с дължина 1000 – 2000 нд (в еукариотни клетки са с дължина 100 – 200 нд) – фрагменти на Оказаки, които след това се свързват ковалентно.

При прокариоти, преди да стартира синтезата на ДНК, двете вериги в молекулата на ДНК трябва да се разделят в къс участък, разположен в непосредствена близост на *OriC*. Процеса изисква свързване на инициаторни белтъци към *OriC*. Следва присъединяване на хеликазите и на белтъци SSB (Single-Strand Binding), които пречат на разделените вериги да образуват дуплекс. Хеликазата разкъсва водородните връзки между базите на двете полинуклеотидни вериги и разплита двойната спирала. Тя не може да инициира разplitането – инициаторните белтъци първи разделят двете вериги в близост до *OriC* и тогава хеликазата се свързва към изоставащата верига. Жиразата е топоизомераза, която контролира суперспирализирането на ДНК. Редуцира торзионното напрежение, което възниква пред репликационната вилка в резултат на разplitането (изисква хидролиза на АТФ, като донор на енергия). ДНК полимеразата не може да започне сама синтез на нова верига, а се нуждае от свободен 3'-ОН край, към който да прибавя нуклеотиди. За целта се синтезира къса праймерна секвенция (най-често РНК) с дължина 10 – 12 нд, която предоставя свободен 3'-край на ДНК полимеразата. Праймазата е специална РНК полимераза, която синтезира тези праймери. Хеликазата, създаваща репликативната вилка е свързана с двете каталитични сърцевини на ДНК полимераза III, всяка от които се държи върху матрицата чрез β -скоба. Каталитичната сърцевина, която синтезира водещата верига, се движи непрекъснато. Другата каталитична сърцевина, която синтезира изоставащата верига, се дисоциира в края на новосинтезирания фрагмент на Оказаки и след това се реасоциира към праймер в едноверижната бримка, за да синтезира следващия фрагмент. ДНК полимераза III удължава праймера във фрагмент на Оказаки. Следващият фрагмент на Оказаки вече е синтезиран. ДНК полимераза I заменя РНК праймера с ДНК. Лигаза свързва два съседни фрагмента на Оказаки.



При еукариотните организми Репликоните имат дължина 40 – 100 кб и се активират в определено време и в определен ред през S фазата на еукариотния клетъчен цикъл, когато ДНК се реплицира. Всеки репликон се активира само веднъж през клетъчния цикъл. Репликативната вилка (ДНК полимеразата) се движи от началото на нейния репликон, докато срещне друга вилка (друга ДНК полимераза), движеща се срещу нея от съседния репликон (хиляди начала на репликацията).

Преди репликация, ядрото съдържа активни лицензиращи фактори. След репликация лицензиращите фактори в ядрото се инактивират, а лицензиращите фактори в цитоплазмата не могат да влязат в ядрото. По време на митозата, когато се разрушава ядрената мембрана и се образуват дъщерните ядра, лицензиращите фактори се свързват с техния ядрен материал. Лицензиращите фактори гарантират, че репликация ще се извърши само веднъж по време на клетъчния цикъл.

Реализация на генетичната информация

През 1958 г. Франсис Крик формулира централната догма, която описва потока на генетичната информация от ДНК към РНК и след това към протеините. ДНК съдържа наследствената информация, РНК служи като неин преносител, а рибозомите са мястото, където тази информация се превръща във функционален продукт. Процесът се нарича генна експресия и включва два основни етапа: транскрипция (синтез на РНК) и транслация (синтез на протеини). Централната догма описва потока на генетичната информация ДНК → РНК → протеин, но съвременната биология показва, че този процес е по-сложен и динамично регулиран. РНК има множество функции извън ролята си на посредник, като некодиращите РНК участват в регулацията на генната експресия. Откриването на обратната транскрипция доказва, че информацията може да се предава и от РНК към ДНК. Генната експресия се контролира и от епигенетични механизми и от самите протеини чрез обратни регулаторни връзки, което превръща централната догма от линеен модел в сложна регулаторна мрежа.

Транскрипция – транскрипционна единица

Транскрипцията е процесът, при който генетичната информация се преписва от ДНК в РНК и представлява първия етап от реализацията на генетичната информация в клетката. Тя се катализира от ензима ДНК-зависима РНК полимераза, който използва едната ДНК верига (матрична) като шаблон. Получената РНК молекула е комплементарна на матричната верига и почти идентична със смислената ДНК верига, като вместо тимин съдържа урацил. Информационната РНК пренася генетичните инструкции от ядрото до рибозомите, където се осъществява синтезът на белтъци. Процесът е строго регулиран и се активират само гените, необходими в дадения момент. Транскрипцията протича в три основни етапа. По време на инициацията РНК-полимеразата разпознава специфична ДНК последователност, наречена промотор, свързва се с нея и предизвиква локално разплитане на двойната спирала, като се образува транскрипционно мехурче. Този етап е решаващ, защото определя кои гени ще бъдат транскрибирани. Следва етапът на елонгация, при който РНК-полимеразата се придвижва по матричната ДНК в посока 3'→5' и синтезира комплементарна РНК в посока 5'→3', като последователно добавя рибонуклеотиди според принципа на комплементарност. Терминацията настъпва, когато ензимът достигне специална терминаторна последователност, в резултат на което РНК-полимеразата се отделя от ДНК, а новосинтезираната РНК молекула се освобождава.

Транскрипционната единица представлява участък от ДНК, който съдържа цялата информация, необходима за синтеза на една РНК молекула. Тя включва промоторна област, РНК-кодираща последователност и терминатор. Мястото, от което започва транскрипцията, се нарича транскрипционно начало (TSS) и се означава с +1. Промоторът се разполага нагоре от това място, не се транскрибира, но има ключова регулаторна функция, тъй като служи за свързване на РНК-полимеразата и инициране на транскрипцията. Посоката на движение на РНК-полимеразата определя ориентацията на транскрипционната единица на „нагоре“ и „надолу“ спрямо TSS. Обикновено една транскрипционна единица кодира един ген и води до синтез на моноцистронна РНК, но в някои случаи може да обхваща няколко гена и да продуцира полицистронна РНК.

РНК полимерази

РНК полимеразите са ензими, които катализират синтеза на РНК по матрица от ДНК. При прокариотите и археите съществува един тип РНК полимераза, докато еукариотните клетки използват три основни РНК полимерази, а в растенията се срещат още две допълнителни. Митохондриите и пластидите разполагат със собствени, органел-специфични РНК полимерази. Основната активност на ензима е 5'→3' полимеразна активност, при която към нарастващата РНК ве-

рига се добавят рибонуклеотиди, използвайки ДНК като матрица. Субстратите на реакцията са нуклеозид трифосфатите АТР, ГТР, СТР и УТР, а последователността на РНК се определя от комплементарното съвояване на базите. Каталитичният механизъм е сходен с този на ДНК полимеразата и включва образуване на фосфодиестерна връзка с освобождаване на пирофосфат. Всяка новосинтезирана РНК започва с нуклеозид трифосфат, при който се запазва 5'-трифосфатната група.

РНК полимеразата при прокариоти

Бактериалната РНК полимеразата се състои от каталитично ядро, изградено от четири основни субединици – две α -субединици и по една β -, β' - и ω -субединица ($\alpha_2\beta\beta'\omega$). Тази основна форма на ензима се нарича сърцевинен или кор-ензим. За точното разпознаване и позициониране върху правилния промотор към кор-ензима се присъединява допълнителна субединица, наречена σ -фактор. Комплексът от кор-ензима и σ -фактора ($\alpha_2\beta\beta'\omega\sigma$) се означава като холоензим. Кор-ензимът е напълно способен да катализира синтеза на РНК, което показва, че σ -факторът не е необходим за самата каталитична активност. Въпреки това кор-ензимът притежава само неспецифичен афинитет към ДНК и може да се свързва хлабаво със случайни участъци, без да различава промоторни последователности. При такова свързване ДНК остава двойноверижна. За разлика от кор-ензима, σ -факторът разпознава специфични ДНК последователности – промоторите. Благодарение на него холоензимът се свързва стабилно с промотора и предизвиква локално разплитане на ДНК, което е необходимо за започване на транскрипцията. Правилният избор на промотор е критичен за процеса, тъй като синтезът на функционална РНК трябва да започне точно в началото на гена.

Еукариотни РНК полимеразы

В ядрото на еукариотната клетка функционират три консервативни РНК полимеразы – РНК полимеразата I, РНК полимеразата II и РНК полимеразата III, като всяка от тях транскрибира различен набор от гени. РНК полимеразата I е отговорна за транскрипцията на гените за рибозомна РНК – 18S, 5.8S и 28S рРНК, с изключение на гена за 5S рРНК. Гените за 18S, 5.8S и 28S рРНК обикновено са организирани в една транскрипционна единица, известна при растенията като 35S рибозомна ДНК (рДНК), а при животните – като 45S рДНК. Тази транскрипционна единица се транскрибира от РНК полимеразата I и дава начало на един общ прекурсор на рРНК, който впоследствие се процесира до трите зрели рРНК молекули. Генът за 5S рРНК е разположен извън 35S/45S рДНК единицата и се транскрибира от РНК полимеразата III. Синтезът на рибозомна РНК протича в ядрцето – специализирана структура в ядрото на еукариотните клетки, която служи като място за транскрипция, процесинг на рРНК и начални етапи на сглобяване на рибозомните субединици. РНК полимеразата II транскрибира всички протеин-кодиращи гени, както и множество гени за некодиращи РНК, включително микроРНК и малки ядрени РНК, участващи в процеса на сплайсинг. Тази полимеразата е изключително чувствителна към алфа-аманитин. РНК полимеразата III транскрибира повечето от малките клетъчни РНК, включително тРНК и 5S рРНК. Ядрените РНК полимеразы са големи мултисубединични комплекси. Всяка от еукариотните РНК полимеразы съдържа както уникални, така и споделени субединици. Уникалните субединици са от съществено значение за специфичните функции на всяка полимеразата, като определят типа РНК, който се транскрибира, и взаимодействието със съответните транскрипционни фактори. Те включват двете най-големи субединици, които са силно консервативни през еволюцията и формират каталитичното ядро на ензима. Споделените между трите РНК полимеразы субединици изпълняват както структурна роля, осигуряваща правилното сглобяване и стабилност на комплекса, така и функционална роля, тъй като участват във взаимодействия с регулаторни белтъци и транскрипционни фактори, което позволява гъвкава регулация на транскрипцията в отговор на различни клетъчни условия.

Особености при прокариоти и еукариоти

Регулацията на генната експресия при еукариотите се осъществява основно на нивото на транскрипцията и включва взаимодействие между транскрипционни фактори, регулаторни ДНК елементи и мултипротеинови комплекси. Транскрипционните фактори са белтъци, които се свър-

зват със специфични ДНК последователности и инициират или модулират транскрипцията, като главните транскрипционни фактори при еукариоти (TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIIE, TFIIF и TFIIH) са необходими за започване на транскрипцията, а други действат като активатори или репресори. Регулаторните ДНК елементи включват промотори, към които се свързва транскрипционната машина, както и енхансери и сайлънсери, които могат да усилят или потискат транскрипцията от разстояние и играят ключова роля в тъканно-специфичната експресия. Генната експресия се контролира от сложни регулаторни мрежи, в които множество фактори взаимодействат помежду си и с различни гени, за да осигурят координиран отговор на вътрешни и външни сигнали. При прокариотите транскрипцията и транслацията протичат едновременно в цитоплазмата, като иРНК не претърпява посттранскрипционна обработка. Пре-рРНК и пре-тРНК обаче се обработват до функционални молекули. При еукариотите транскрипцията се извършва в ядрото, а транслацията – в цитоплазмата. Протеин-кодиращите гени се транскрибират до пре-иРНК, която претърпява посттранскрипционна обработка и се превръща в зряла иРНК, транспортирана в цитоплазмата за синтез на белтъци.

Синтез на протеини – транслация

Протеиновият синтез, наричан още **транслация**, е процесът, при който информацията, записана в информационната РНК (иРНК), се използва за синтез на белтъчни молекули. По време на транслацията нуклеотидната последователност на иРНК се „превежда“ в аминокиселинна последователност с помощта на генетичния код. Процесът изисква съгласуваното действие на иРНК, транспортна РНК (тРНК) и рибозомна РНК (рРНК), както и участието на множество цитоплазмени белтъци и фактори. Транслацията може да се разглежда като **кулминационния етап на експресията на генетичната информация**, тъй като нейният краен резултат са белтъците – основните структурни и функционални компоненти на живите клетки.

Въведение в транслацията

Генетичният код представлява набор от правила, чрез които живите клетки превеждат информацията, кодирана в нуклеиновите киселини, в аминокиселинна последователност на белтъците. Той се състои от последователности от нуклеотиди, групирани в триплети, наречени кодони, като всеки кодон определя включването на определена аминокиселина по време на белтъчния синтез или сигнализира за начало или край на транслацията. Важна характеристика на генетичния код е колинеарността между нуклеотидната последователност на кодиращия участък на гена (респ. иРНК) и аминокиселинната последователност на съответния белтък. Това означава, че подредбата на кодоните в иРНК съответства линейно на подредбата на аминокиселините в полипептидната верига. В резултат дължината на кодиращата нуклеотидна последователност е пропорционална на дължината на синтезирания полипептид. По време на транслацията иРНК, синтезирана в процеса на транскрипция, служи като матрица, върху която рибозомите изграждат специфична аминокиселинна последователност чрез разчитане на генетичния код. Докато колинеарността е ясно изразена при прокариоти и много вируси, при еукариотите тя е по-сложно проявена. Еукариотните гени често съдържат интрони, които се отстраняват по време на процесинга на първичната транскриптна РНК, което нарушава директното съответствие между дължината на гена и дължината на крайния белтък. Въпреки това основният принцип на колинеарността остава фундаментален за разбирането на транслацията.

Основни етапи на транслацията

Инициация – етапът, при който малката и голямата рибозомна субединица се сглобяват върху иРНК във функционална рибозома. Разпознава се стартовият кодон (обикновено AUG) и се свързва инициаторната тРНК, натоварена с метионин. Инициацията е сравнително бавен и силно регулиран етап, който често определя скоростта на транслация на дадена иРНК. **Удължаване** – включва последователното присъединяване на аминокиселини към нарастващата полипептидна верига чрез образуване на пептидни връзки. Това е най-бързият етап на белтъчния синтез и протича с висока точност. **Прекратяване** – настъпва при достигане на стоп кодон в иРНК.

На този етап синтезираната полипептидна верига се освобождава от рибозомата, а рибозомните субединици се дисоциират от иРНК.

Инициация на транслацията

По време на инициацията на транслацията малката субединица на рибозомата се свързва с информационната РНК. Инициаторната транспортна РНК, носеща метионин, се позиционира директно в Р-мястото на малката субединица и разпознава стартовия кодон AUG. След стабилизирани на този инициационен комплекс към него се присъединява голямата рибозомна субединица, в резултат на което се формира функционално активна рибозома, готова за фазата на удължаване. Ключов въпрос при инициацията е как рибозомата разпознава правилния стартов кодон, от който да започне белтъчният синтез. Този избор не е случаен и се определя от регулаторни елементи, локализирани в 5'-нетранслирания регион (5'-НТР) на иРНК, които участват както в позиционирането на рибозомата, така и в контрола на ефективността и скоростта на транслацията. При прокариотите инициацията на транслацията се осъществява с участието на малката рибозомна субединица (30S), трите прокариотни фактори на инициация (IF-1, IF-2 и IF-3) и специализираната инициаторна тРНК, обозначавана като тРНК^{fMet}. В повечето прокариотни иРНК се открива специфична нуклеотидна последователност, която насочва рибозомата към началото на протеин-кодиращия регион. При *E. coli* тази последователност, обикновено с консенсус AGGAGG, е известна като област на Шайн–Далгарно. Тя е комплементарна на участък от 16S рРНК в състава на малката рибозомна субединица, което позволява образуването на водородни връзки и точно позициониране на стартовия кодон в Р-мястото на рибозомата. Инициаторната тРНК носи метионин, който след прикрепването към тРНК се формира, образувайки N-формилметионин (fMet). Поради това всяка полипептидна верига, синтезирана в *E. coli* и в повечето други прокариоти, започва с fMet. В последствие тази формирана аминокиселина често се отстранява или посттранслационно. За разлика от инициаторната тРНК, вътрешните кодони AUG в хода на удължаването се разпознават от различна тРНК, носеща неформиран метионин. Инициацията протича поетапно. Първоначално факторът IF-3 се свързва с 30S субединицата и предотвратява преждевременното ѝ асоцииране с 50S субединицата, като същевременно подпомага свързването на малката субединица с иРНК в областта на Шайн–Далгарно. IF-1 се асоциира с А-мястото на 30S субединицата и предотвратява преждевременното навлизане на аминоацил-тРНК. Паралелно с това IF-2, свързан с GTP, образува комплекс с инициаторната тРНК^{fMet} и я доставя до Р-мястото на малката субединица. След правилното разпознаване на стартовия кодон и стабилизирани на инициационния комплекс IF-3 контролира точността на сдвояването между антикодона на тРНК и кодона на иРНК. Последва присъединяване на голямата (50S) субединица, при което IF-2 катализира хидролизата на GTP до GDP. Освободената енергия води до дисоциация на инициращите фактори и до конформационни промени, които стабилизират напълно функционалната 70S рибозома, готова да навлезе във фазата на елонгация.

Удължаване на полипептидната верига

Удължаването на полипептидната верига представлява централния етап на протеиновия синтез, по време на който нарастващият полипептид се удължава с по една аминокиселина във всеки цикъл, в съответствие с последователността на кодоните в иРНК. Транслацията протича в посока от 5'- към 3'-края на иРНК, докато синтезиращият протеин нараства от N-края (със свободна аминоксидна група) към C-края (със свободна карбоксилна група). Във всеки цикъл на удължаване към C-края на полипептидната верига се добавя една аминокиселина. Елонгацията се осъществява с участието на фактори на удължаване (elongation factors, EF) и включва повтарящи се цикли, чийто брой се определя от дължината на кодиращата последователност на иРНК. Всеки цикъл се състои от три основни стъпки: навлизане на аминоацил-тРНК в А-мястото, образуване на пептидната връзка и транслокация на рибозомата по иРНК. В първия цикъл на удължаване Р-мястото на рибозомата е заето от инициаторната тРНК, натоварена с метионин, докато при всички следващи цикли там се намира пептидил-тРНК, носеща растящата полипептидна верига. Свободното А-място приема следващата аминоацил-тРНК, чийто антикодон образува комплементарни базови двойки с кодона в иРНК. При прокариотите аминоацил-тРНК се доставя до рибозомата от термоллабилния фактор на удължаване EF-Tu. Той образува троен комплекс с амино-

ацил-тРНК и GTP, който навлиза в А-мястото на рибозомата. Ако между кодона и антикодона се осъществи правилно сдвояване, рибозомата претърпява конформационна промяна, която активира GTP-азната активност на EF-Tu. Това води до хидролиза на GTP до GDP и неорганичен фосфат, последвана от отделяне на EF-Tu(GDP) от рибозомата и освобождаване на аминоксил-тРНК в А-мястото. EF-Tu играе ключова роля за поддържането на високата точност на трансляцията. Ако кодон-антикодонното разпознаване е неправилно, рибозомата не активира GTP-азната активност на EF-Tu, което увеличава вероятността некоректната аминоксил-тРНК да напусне рибозомата. Освен това, след отделянето на EF-Tu, настъпва процесът на акомодация – кратко забавяне в пълното навлизане на аминоксил-тРНК в каталитично активната позиция. Това представлява втора контролна точка, при която неправилно свързаните аминоксил-тРНК могат да бъдат отстранени, преди включването на неправилна аминокиселина в полипептидната верига. При еукариотите аналогичната функция се изпълнява от eEF1A, който образува троен комплекс аминоксил-тРНК/eEF1A(GTP). След правилно кодон-антикодонно разпознаване GTP се хидролизира и eEF1A се освобождава от рибозомата. След стабилизиране на аминоксил-тРНК в А-мястото свободната α -аминогрупа на новопостъпилата аминокиселина атакува естерната връзка, която свързва пептидил-тРНК в Р-мястото с растящия полипептид. В резултат С-краят на полипептидната верига се прехвърля върху аминокиселината в А-мястото и между тях се образува нова пептидна връзка. Така пептидът се удължава с една аминокиселина, в Р-мястото остава деацилирана тРНК, а в А-мястото вече се намира пептидил-тРНК. Катализата на пептидната връзка се осъществява от пептидил-трансферазната активност на рибозомата. Рибозомните белтъци не притежават каталитичен капацитет за тази реакция; вместо това тя се осъществява от рибозомната РНК на голямата субединица – 23S рРНК при прокариоти и 28S рРНК при еукариоти. По този начин рибозомата представлява най-големия известен естествен РНК катализатор (рибозим). Цикълът на удължаване завършва с транслокация – координираното придвижване на тРНК и иРНК през рибозомата. След пептидилния трансфер двете тРНК преминават през т.нар. хибридни състояния. Акцепторният край на деацилираната тРНК се измества към Е-мястото на голямата субединица, докато антикодонът ѝ остава в Р-мястото на малката субединица, формирайки Р/Е хибридно състояние. Едновременно с това пептидил-тРНК заема А-мястото в малката субединица и Р-мястото в голямата субединица (А/Р хибридно състояние). Смята се, че формирането на тези хибридни състояния предхожда придвижването на иРНК през малката субединица. По време на транслокацията контактите между кодоните на иРНК и антикодоните на тРНК се запазват, което гарантира съхраняване на рамката на четене. Комплексът иРНК–тРНК се измества с един кодон напред. Транслокацията се катализира от фактори на удължаване и изисква енергия от хидролиза на GTP. При прокариоти този процес се осъществява от EF-G(GTP), а при еукариоти – от неговия функционален хомолог eEF-2(GTP). След придвижването хибридните състояния се превръщат в класическите Е/Е и Р/Р състояния: деацилираната тРНК се намира в Е-мястото и напуска рибозомата, пептидил-тРНК заема Р-мястото, а А-мястото остава свободно за навлизане на следващата аминоксил-тРНК.

Прекратяване (терминиране) на трансляцията

Прекратяването на протеиновия синтез както в прокариотните, така и в еукариотните клетки настъпва, когато в А-мястото на рибозомата попадне един от трите стоп кодона на иРНК – UAA, UAG или UGA. За разлика от смислените кодони, стоп кодоните не се разпознават от тРНК, а от специализирани белтъци, наречени освобождаващи фактори (release factors, RF). Освобождаващите фактори се свързват с А-мястото на рибозомата и разпознават стоп кодона чрез структурна мимикрия на тРНК. Това взаимодействие активира пептидил-трансферазния център на рибозомата, който катализира хидролизата на естерната връзка между полипептидната верига и тРНК, разположена в Р-мястото. В резултат новосинтезираният полипептид се освобождава от рибозомата. Процесът на терминиране е енергийно зависим и включва хидролиза на GTP, която не е необходима за самото разкъсване на пептидил-тРНК връзката, а за ефективното действие и освобождаване на освобождаващите фактори, както и за последващата дисоциация на рибозомния комплекс. При прокариотите са идентифицирани три освобождаващи фактора. RF1 разпознава стоп кодоните UAA и UAG, RF2 разпознава стоп кодоните UAA и UGA, а RF3 е GTP-свързващ фактор, който не разпознава директно стоп кодони, а ускорява освобождаването на RF1 или RF2

от рибозомата след термирането. RF1 и RF2 осъществяват директното разпознаване на стоп кодоните и катализират освобождаването на полипептида, докато RF3 повишава ефективността и скоростта на процеса чрез GTP-зависим механизъм. При еукариотите термирането на трансляцията се осъществява от два освобождаващи фактора. eRF1 разпознава и трите стоп кодона (UAA, UAG и UGA), а eRF3 е GTP-свързващ белтък, който действа кооперативно с eRF1. eRF1 осъществява разпознаването на стоп кодона и активира хидролизата на пептидил-тРНК връзката, докато eRF3, чрез хидролиза на GTP, стабилизира комплекса и осигурява бързо и ефективно освобождаване на полипептидната верига. След освобождаването на полипептида следва разглобяване на трансляционния комплекс- рибозомните субединици се дисоциират, а иРНК и тРНК се освобождават и могат да бъдат използвани повторно в следващи цикли на трансляция.

Изменчивостта на живите организми създава огромното многообразие в природата. Причините за нея са различни. Когато се променят фенотипни белези без да е променен генотипа, тези изменения не се предават в потомството и съществуват само през живота на организма, в който са възникнали или докато са валидни условията, които са ги предизвикали (**фенотипна, модификационна изменчивост**). Когато измененията се дължат на промяна в генетичния апарат на клетката (гени, хромозоми), те се предават по наследство (**генотипна изменчивост**). Те могат да са в резултат от: независимо и случайно прекомбиниране на гени според законите на Мендел и кросинговърови рекомбинации, не се появяват нови алелни състояния на гените, а се прекомбинират съществуващите алели (**рекомбинативна изменчивост**); или поява на нови алелни състояния на даден ген или други промени в генотипа (**мутационна изменчивост**).

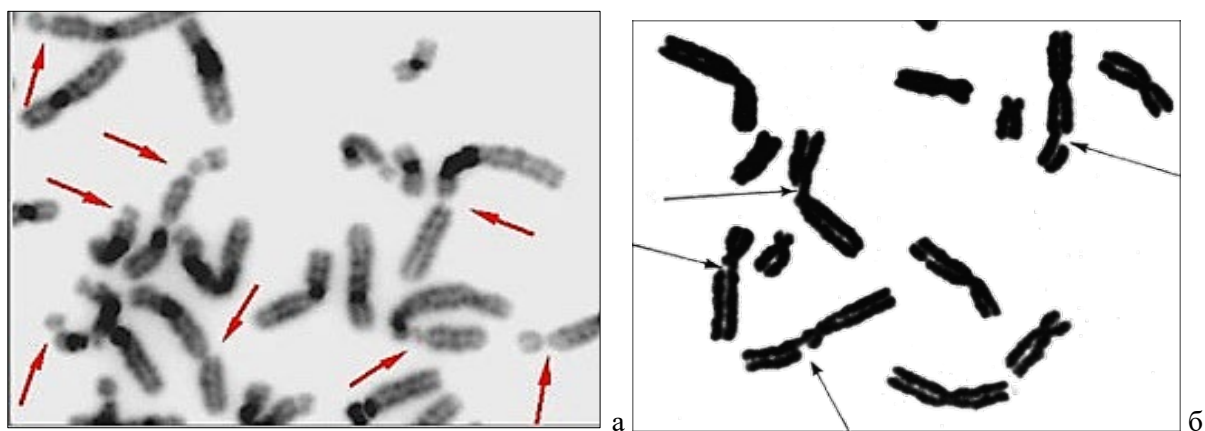
Терминът **мутация** е въведен през 1903 г. от Хуго де Фриз за обозначаване на скокообразно изменение на даден признак (“Мутационна теория за еволюцията на организмите”). Мутациите могат да засягат наследствения материал в ядрото на клетката (**кариогенни мутации**) или в цитоплазмени органели (**плазмогенни мутации** – **пластидни** или **митохондриални**, унаследяват се по майчина линия с цитоплазмата на яйцеклетката). Според засегнатия генетичен материал мутациите биват: **генни** (промяна в химичната структура на ДНК в рамките на ген), **хромозомни** (промяна в нормалната структура или брой на хромозомите) или **геномни** (промяна в генома като цяло).

Факторите, които провокират мутационни изменения (**мутагенни фактори**), според своята природа може да бъдат **химични** (иприт, формалдехид, етилметансулфонат, нитрозамини, ароматни въглеводородни съединения, пестициди, флавоноиди, фурани и др.), **физични** (йонизираща радиация, ултравиолетови лъчи, електромагнитно поле и др.) или **биологични мутагени** (вируси, бактериални токсини, стероидни хормони, автоимунни процеси и др.).

Хромозомните мутации са промени в броя (геномни мутации) или структурата на хромозомите в кариотипа. Те може да бъдат констатирани при наблюдение със светлинен микроскоп.

Структурните хромозомни мутации (**хромозомни аберации, хромозомни преустройства**) са резултат от разкъсвания (разриви) в хромозомата. Откъснатите **фрагменти** могат да бъдат **центрични** (ако имат центромер) или **ацентрични** (без центромер).

Ако разривът настъпи по време на интерфаза преди авторепликацията на ДНК, разкъсването ще засегне и двете хроматиди на хромозомата (**хромозомен тип разрив**, Фиг. 1а), а ако е в по-късен етап, той ще е само в едната хроматида, а другата хроматида на същата хромозома ще е цяла (**хроматиден тип разрив**, Фиг. 1б).



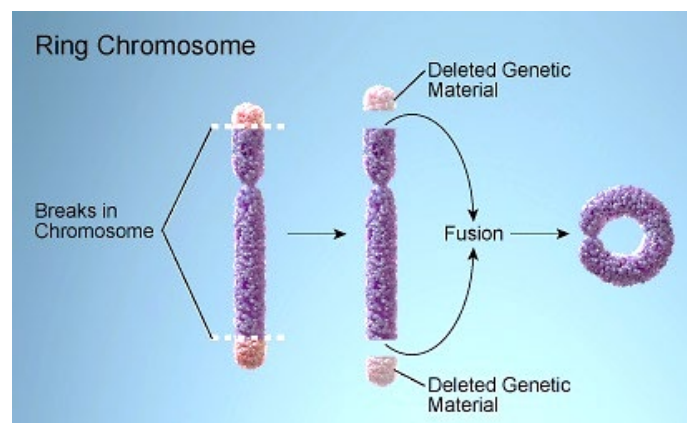
Фигура 1. Хромозомни (а) и хроматидни (б) разриви

След разкъсване на хромозомата следва процес на възстановяване на увредения участък (**репарация**). Мутации възникват при неправилно присъединяване на фрагмент към хромозомата, от която е произлязъл или към друга хромозома, или в резултат от отпадането му.

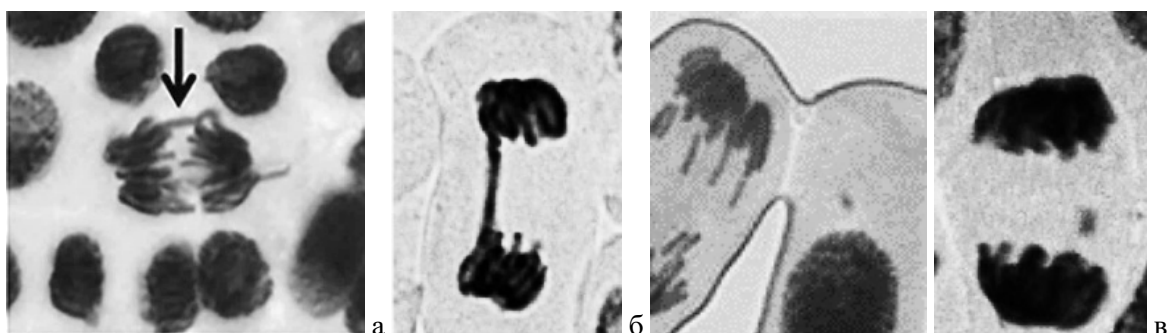
Поради факта, че всяка хромозома е еволюирала като балансирана система с определен състав, локация и ред на гените в нея, всяка промяна на структурата ѝ ще се отрази на свойствата на клетките и на организма. Обикновено хромозомните аберации са свързани с проява на наследствен фенотипен ефект.

Хромозомните аберации, засягащи структурата на една хромозома (**вътрехромозомни аберации**) могат да бъдат: отпадане на част от хромозомата (**дефишънс** или **делеция**), удвояване на участък от хромозомата (**дупликация**), завъртане на част от хромозомата (**инверсия**) или вмъкване на фрагмент в хромозома (**инсерция**).

Дефишънс и делеция. Отпадането на крайни (терминални) фрагменти от хромозомата (**дефишънс**) може да засегне едното хромозомно рамо (**единичен дефишънс**) или и двете рамене (**двоен дефишънс**). Поради отпадане на теломерите в аберираното хромозомно рамо може да се слепят хроматидите и да се формира хромозома с бримка (при единичен дефишънс), хромозома тип осморка или пръстеновидна хромозома (при двоен дефишънс, Фиг. 2). Откъснатите крайни фрагменти (и съответно гените в тях), отпадат през следващото клетъчно делене, защото нямат центромер и не може да се свържат за нишките на делителното вретено (първична загуба на гени), а слепените хроматиди на хромозомата формират анафазен/телофазен мост (Фиг. 3а,б). При неговото скъсване може да се откъснат допълнителни фрагменти (вторична загуба на гени).



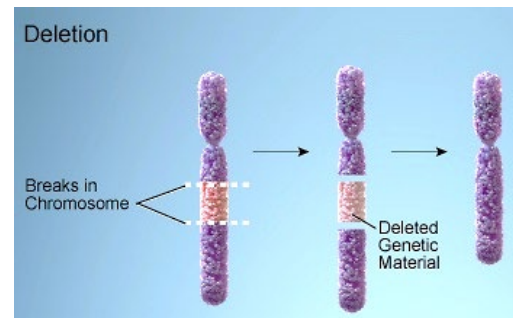
Фигура 2. Пръстеновидна хромозома след двоен дефишънс



Фигура 3. Анафазен (а) и телофазен мост (б), ацентрични фрагменти (в)

При отпадане на вътрешен фрагмент (**делеция**, Фиг. 4) се променя морфологичния тип на хромозомата. Например, ако делеция настъпи в равнораменна (метацентрична) хромозома, тя ще се превърне в разнораменна субметацентрична или субтелоцентрична в зависимост от дължината на отпадналия фрагмент. Ако фрагментът е ацентричен, това ще доведе до загуба на гени (Фиг. 3в).

Когато отпаднат малки по размери фрагменти (отделни хромомери или части от хромомери) този тип аберации се означават като **микродефишънси** или **микроделеции**. Обикновено те се запазват в хомозиготно състояние (когато аберацията е засегнала и двете хромозоми от хомоложната хромозомна двойка). Понякога се проявяват фенотипно, имитирайки генни мутации, но се отличават от тях по липсата на обратно мутиране (липсва реверсия към изходното състояние на гена). Обикновено мащабните дефишънси и делеции имат летален ефект в хомозиготно състояние и са жизнеспособни само в хетерозиготно състояние (когато едната хромозома от хомоложната хромозомна двойка е претърпяла аберацията, а другата е нормална). Определяните от тях мутации се проявяват като доминантни. Понякога в резултат от дефишънс или делеция отпада доминантен алел на ген и тогава при хетерозиготни индивиди фенотипно се проявява рецесивния алел на гена. Това явление се нарича **псевдоминиране**.



Фигура 4. Делеция

При човека делеция в късото рамо на 4-хромозома е причина за Синдром на Волф-Хиршхорн. Около 1/3 от случаите не преживяват периода на новороденото. Характерни са аномалии в развитието на редица органи и тежко умствено изоставане.

Синдромът на котешкото мяукане (дефишънс в късото рамо на 5-хромозома) най-често засяга женския пол. Поради недоразвитие на ларинкса и неговата мускулатура плачът на новороденото напомня котешко мяукане, което в по-късна възраст изчезва. Наблюдават се тежко умствено изоставане и физическо недоразвитие.

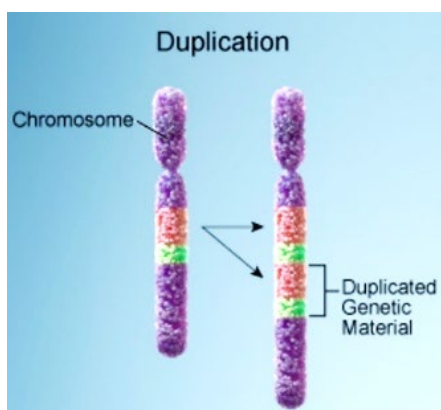
Делеция в дългото рамо на 18-хромозома води до микроцефалия, характерна форма на устата (“уста на шаран“), деформация на очите, умствена изостаналост, затруднения в говора и др.

Пръстеновидна хромозома 20 се характеризира с късно започващи и прогресиращи неврологични нарушения. До 10 – 11-годишна възраст децата се развиват нормално или леко забавено. Първи симптоми са епилептични припадъци към 5 – 6-та година. Обикновено се проявява деградация на интелекта и характера на индивида.

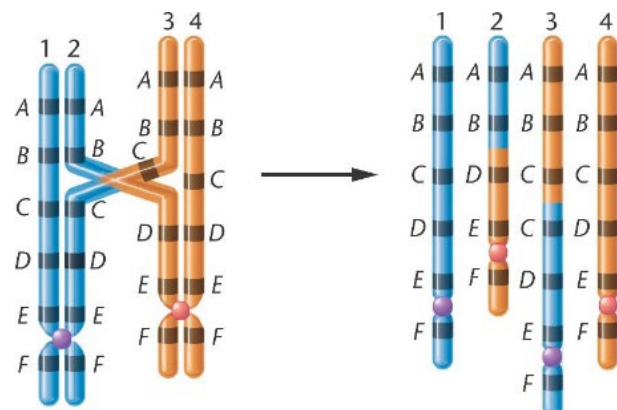
Пръстеновидна хромозома 21 се характеризира с изоставане в ръста и умственото развитие, големи ушни миди, малка уста, полови аномалии.

Децата с пръстеновидна хромозома 22 имат нормално физическо развитие, но тежко умствено изоставане, прогресиращо с възрастта. Характерни белези са големи бадемовидни очи, склучени вежди и топчест нос при малките деца.

Дупликация. Това са повтаряния (умножавания) на участъци от хромозомите и респективно на гените в тях. Дуплицираният регион може да обхваща един ген или да е по-мащабен и да включва няколко гена. Повторените участъци може да са разположени непосредствено до оригиналния регион в хромозомата (**последователни дупликации**, Фиг. 5) или да се намират в отдалечена позиция от него (**преместени дупликации**). Един от механизмите, които водят до възникване на дупликации е неравният кросинговър (Фиг. 6).



Фигура 5. Последователни дупликации



Фигура 6. Неравен кросинговър

В резултат от дупликация се променя функционирането на повторените гени и на гените в съседство с тях. Стъртевант нарича това явление „ефект от генната среда“, според него действието на даден ген зависи от това кои са съседните му гени, т.е. от генната среда, в която се намира. Хромозомата е стриктно подредена и балансирана система от линейно разположени гени, в която всеки ген заема точно определено място (генен локус), и всяка промяна в структурата на хромозомата може да се отрази на функционирането на гените в нея.

Инверсия. Това е физическо завъртане на хромозомен участък на 180° , предшествано от двойна фрагментация по дължината на хромозомата. В резултат се обръща редът на гените в този регион и се променя генната среда, което се отразява върху експресията на гените в зоната на инверсия и на тези в съседство. Центромерът на хромозомата може да е извън инверсията (**парацентрична инверсия**) или да е в абериралия регион (**перицентрична инверсия**) (Фиг. 7). В резултат от перицентрична инверсия може да се промени морфологичния тип на хромозомата, когато разрывите в двете рамена на хромозомата са на различно разстояние от центромера.

В хромозомата може да има един инвертирал сегмент (**проста инверсия**) или повече от един (**сложна инверсия**). При сложни инверсии засегнатите участъци може да са разположени един след друг (**последователни, тандемни инверсии**) или да се препокриват (**препокриващи се инверсии**, например един и същи сегмент от хромозомата да участва в две инверсии).

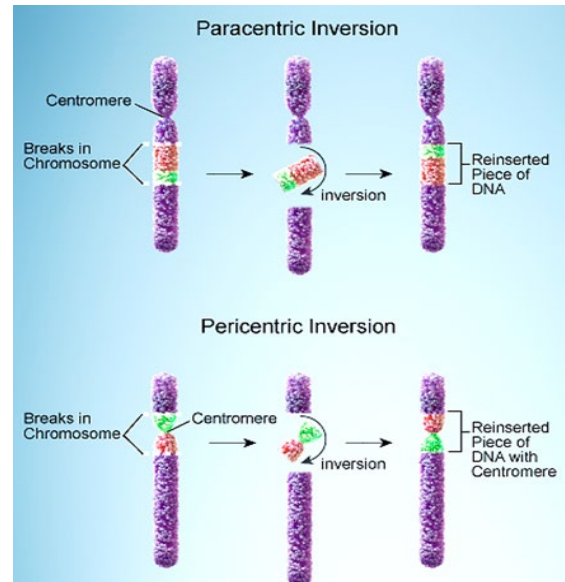
Обикновено инверсиите имат рецесивен летален ефект (хомозиготните по инверсии индивиди умират) и затова най-често се откриват в хетерозиготни индивиди.

При хетерозиготни по парацентрична инверсия индивиди, по време на мейозата, след протекъл кросинговъров обмен в зоната на инвертирания участък, се формират два аберантни типа хромозоми – ацентрична (без центромер) и дицентрична (с два центромера). През следващото клетъчно делене ацентричната хромозома не се свързва за нишките на делителното вретено и изостава в екваториалната зона на делещата се клетка през анафаза (първична загуба на генетичен материал). Дицентричната хромозома образува анафазен (телофазен) мост, който може да се скъса и да се откъснат допълнителни фрагменти (вторична загуба на гени). Формираните гамети най-често са нежизнеспособни.

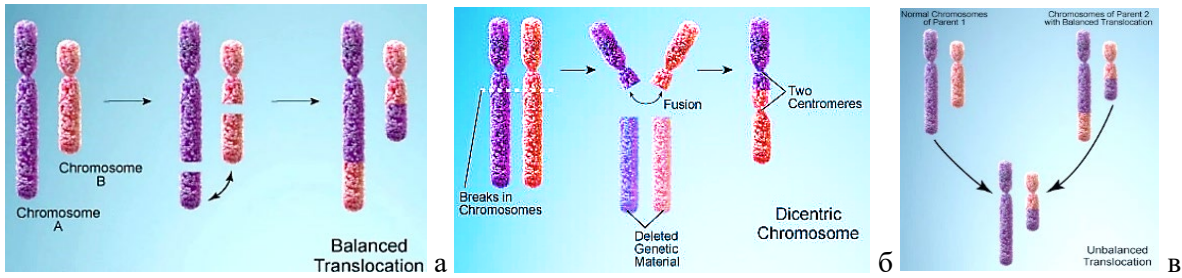
Инсерция. При този тип аберации става преместване на сегмент от едно място на друго място в хромозомата без да настъпва обръщане на 180° . Това води до ново съчетание на гените и може да промени първоначалните им свойства.

При **междухромозомните аберации** структурните промени засягат едновременно повече от една хромозоми. **Транслокация** е аберация с размяна на фрагменти между нехомоложни хромозоми, при което генетичният материал се преразпределя между тях, променят се генният състав и групите на скачване. Когато след размяната на участъци всяка хромозома има по един центромер, транслокацията е **симетрична (еуцентрична, Фиг. 8а)**, а когато възникват ацентрична и дицентрична хромозоми, транслокацията е **несиметрична (анеуцентрична, Фиг. 8б)**. Симетричните транслокации може да преминат през етапите на мейоза и митоза, и се предават в голям брой поколения, докато несиметричните транслокации имат летален изход.

Транслокацията е **реципрочна (балансирана, Фиг. 8а)**, когато при размяната всяка хромозома дава и приема участък или **небалансирана**, когато само едната хромозома има транслоциран фрагмент (Фиг. 8в). При **Робертсоновите транслокации** става сливане на хромозоми в центромерните региони (Фиг. 9). Обикновено този тип аберация засяга акроцентрични хромозоми.

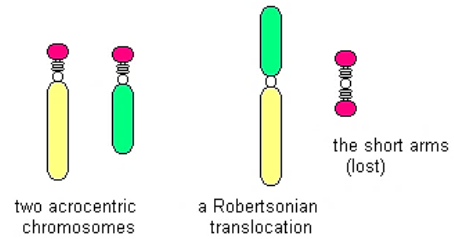


Фигура 7. Парацентрична и перицентрична инверсии

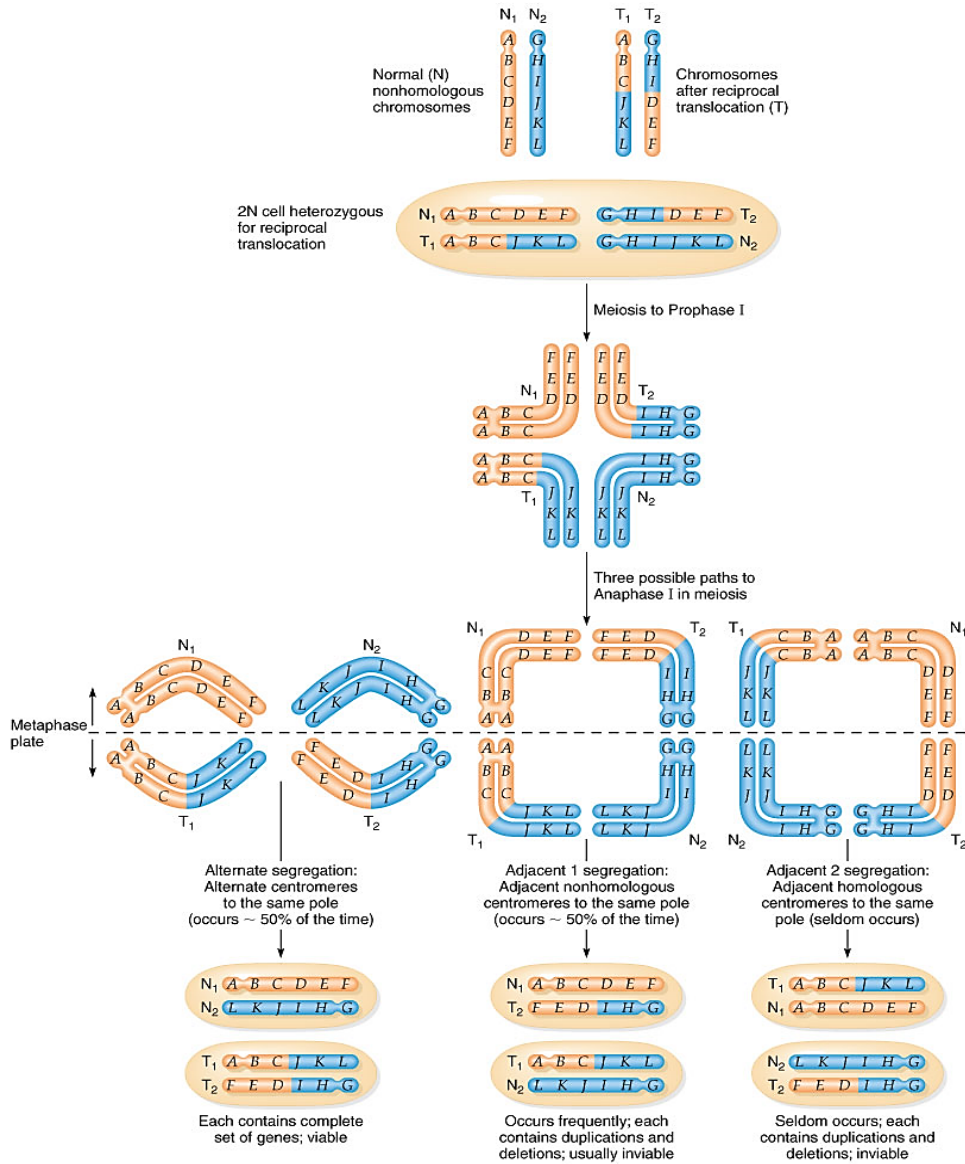


Фигура 8. Симетрична балансирана (а), несиметрична (б), небалансирана (в) транслокации

Транслокациите променят групите на скачване и това води до дисбаланс в генотипа. Обикновено хетерозиготните транслокации (едната хромозома от хомоложната двойка е транслоцирана, а другата е нормална) са жизнеспособни, а хомозиготните транслокации (двете хромозоми от хомоложната двойка са транслоцирани) често имат летален ефект.



Фигура 9. Робертсонова транслокация



Фигура 10. Поведение на хромозомите през мейоза при хетерозиготна транслокация

При хетерозиготни по транслокация индивиди през мейоза (зиготен, профазал) транслоцираните хромозоми конюгираат по специфичен начин. В четирите хромозоми има хомоложни генни участъци, които конюгираат помежду си и се формира кръстообразна структура (тетравалент, Фиг.10). През диакинез, при терминализация на хиазмите, хромозомите от тетравалента с еднаква вероятност образуват структура, подобна на пръстен или структура, подобна на числото 8. При пръстеновидната конфигурация на хромозомите, през следващата анафаза към всеки от полюсите на делителното вретено се придвижат по една нормална и една транслоцирана хромозоми. В резултат се образуват гамети, в чиито ядра едни гени са дублицирани, а други липсват. Такива гамети са нежизнеспособни или ако участват в оплождане не се формира жизнеспособна зигота (стерилни гамети).

При осморковидна конфигурация на хромозомите, през анафаза двете нормални хромозоми се придвижат към единния полюс на делителното вретено, а двете транслоцирани хромозоми – към другия полюс. В резултат всяка гамета има пълния набор гени и при оплождане се формира жизнеспособна зигота (фертилни гамети). Това е причината при хетерозиготни по транслокация индивиди да се наблюдава полустерилност (или понижена фертилност).

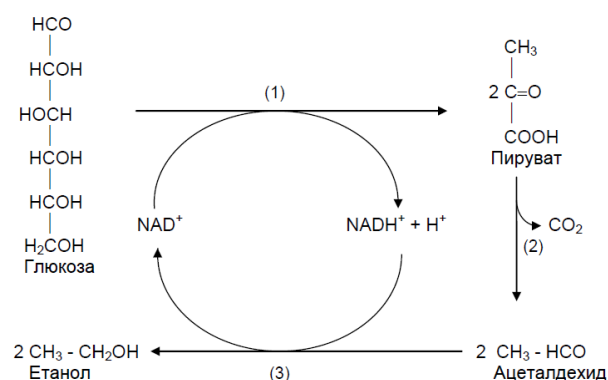
Хромозомните мутации нарушават генния баланс, което води до възникването на хромозомни болести. Най-голямо медицинско значение имат делециите. Обикновено в хомозиготно състояние делециите имат летален ефект или са свързани с развитието на тежки физически и психически увреждания.

Ферментациите са анаеробни процеси на разграждане на субстратите, при които АТР се синтезира само чрез фосфорилиране на ниво субстрат и акцептор на водорода, отделен при биологичното окисление на субстратите е органично съединение. Микроорганизмите, осъществяващи ферментации са факултативни или облигатни анаероби. Факултативните анаероби, като ентеробактериите, в присъствие на кислород превключват метаболизма си на дишане. Облигатните анаероби не могат да синтезират компоненти на дихателна верига, свързана с кислород. Много от тях не понасят присъствието му – строги анаероби.

Микроорганизмите осъществяват няколко вида ферментация; класифицирането им се прави на базата на получените крайни продукти.

Алкохолна ферментация

Редица гъби, някои бактерии, водорасли и протозои ферментират захарите до етанол и CO_2 в процес наречен алкохолна ферментация. Дрождите (*Saccharomyces*) разграждат глюкозата (и други захари) в гликолитичния обменен път.



като **ефект на Пастър**. Аерацията понижава консумацията на глюкоза и образуването на етанол; стимулира се растежа на дрождите. В ефекта на Пастър участват няколко регулаторни механизма. Един от тях се проявява на нивото на процесите на фосфорилиране. В основата му е **конкуренцията за ADP и P_i**. Окислението на глицералдехид-3-фосфата в гликолитичния път се нуждае от ADP и P_i. В аеробни условия дихателната верига и окислението на

Фиг. 1. Алкохолна ферментация при

- дрожди. (1) ензими на гликолитичния път;
(2) пируват декарбоксилаза;
(3) алкохол дехидрогеназа

глицералдехид-3-фосфата се конкурират за ADP.

Вторият регулаторен механизъм е **алостеричния контрол на активността на фосфофруктокиназата**. Този ензим алостерично се инхибира от АТР. В присъствие на АТР се увеличава сигмоидалността на кривата на насищане на ензима със субстрат. АМР действа като положителен ефектор и елиминира подтискащия ефект на АТР.

Освен глюкоза, дрождите могат да ферментират и пируват. Междинен продукт е ацеталдехид и това се доказва чрез прибавяне на NaHSO_3 . Той се свързва с ацеталдехида (образува се ацеталдехидсулфит), който не може да акцептира водорода от редуцирания NAD . Тази функция се поема от дихидроксиацетонфосфат, който се редуцира до глицерол-3-фосфат и дефосфорилира до глицерол. Тази модифицирана ферментация Нойберг нарича **втора форма** на алкохолната ферментация. Използва се за получаване на глицерол.

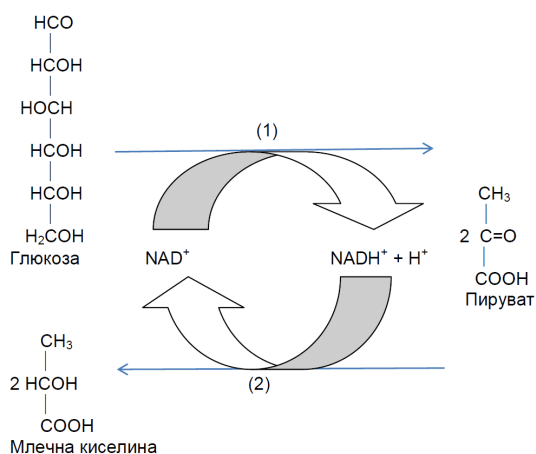
Прибавянето на NaHCO_3 или Na_2HPO_4 към ферментиращия разтвор също води до образуване на глицерол, тъй като ацеталдехида се превръща в етанол и ацетат в резултат на реакция дисмутация. Това е **третата форма** на алкохолната ферментация по Нойберг. Класическата алкохолна ферментация Нойберг нарича **първа форма**.

Съществуват няколко вида бактерии, които осъществяват алкохолна ферментация. *Zyotomonas mobilis* (изолиран от ферментиращия сок на мексиканския кактус *Agave mexicana*) и *Zyotomonas anaerobica* превръщат глюкозата в пируват по пътя на Ентнер-Дудороф. Тези бактерии съдържат ензима *пируват декарбоксилаза*. Продукти на ферментацията са етанол, CO_2 и не големи количества лактат. *Sarcina ventriculi* и *Ervinia amylovora* ферментират глюкозата до пируват по гликолитичния път. Пируватът се превръща в $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ и CO_2 с ензимите *пируват декарбоксилаза* и *алкохол дехидрогеназа*. *Sarcina ventriculi* образува като странични продукти ацетат и молекулен водород, а *E. amylovora* – лактат.

При бактериите сравнително рядко се среща ензимът *пируватдекарбоксилаза*. Много млечнокисели бактерии, ентеробактерии и *Clostridium spp.* образуват значителни количества етанол, но при тях отсъства пируват декарбоксилаза. Ацеталдехид се образува при редукия на ацетил- CoA в реакция, катализирана от *ацеталдехид дехидрогеназа*.

Млечнокисела ферментация

Млечната киселина (лактат) е широко разпространен краен продукт на ферментационните процеси, а няколко рода бактерии, наречени млечнокисели, продуцират млечна киселина в големи количества. Млечнокиселите бактерии от родове *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* се отнасят към **Група 3 – Грам-положителни бактерии с ниско съдържание на G+C**. Те са Грам-положителни; пръчковидни и кълбовидни; неспорообразуващи, предимно неподвижни. Аеротолерантни анаероби с ферментативен метаболизъм; не съдържат хемопротеини, като цитохроми и катализа. Всички млечнокисели бактерии се отличават с висока захаролитична активност и отсъствие на повечето анаболитни пътища, което обуславя голяма възискателност към хранителните субстрати.



Фиг. 2. Хомоферментативна млечнокисела ферментация

- (1) ензими на гликолитичния път;
(2) лактат дехидрогеназа

жащи N-ацетилглюкозамин, който се съдържа в човешката кърма (но не в кравето мляко).

Млечнокиселите бактерии осъществяват няколко вида ферментация.

1. Хомоферментативна млечнокисела ферментация – млечната киселина е преобладаващ продукт (повече от 90% от всички продукти). Глюкоза се превръща в гликолитичния път до пируват, който акцептира водорода от глицералдехид-3-фосфат дехидрогеназната реакция и се редуцира до млечна киселина с ензима *лактат дехидрогеназа* (Фиг. 2). От 1 mol глюкоза се получават 1.8 mol млечна киселина. Енергетичният баланс на ферментацията е 2 mol АТФ на 1 mol изразходвана глюкоза.

2. Хетероферментативна млечнокисела ферментация – получават се приблизително 50% млечна киселина и 50% други продукти. Хетероферментативните млечнокисели бактерии не притежават ензимите *алдолаза* и *триозофосфат изомераза*. Глюкозата се превръща в пентозофосфатния път до ксилулозо-5-фосфат, който в реакция, катализирана от *пентозофосфоке-*

толаза се разпада до глицералдехид-3-фосфат и ацетилфосфат. Глицералдехид-3-фосфатът се превръща в лактат, а ацетилфосфатът през ацетил-СоА и ацеталдехид в етанол. Други млечнокисели бактерии (*Lactobacillus brevis*) превръщат ацетилфосфата изцяло или частично в ацетат, при което макроергичната връзка се пренася върху ADP – синтезира се АТР. Излишъкът от водород се поема от глюкоза, която се редуцира до манитол. Балансът на хетероферментативната млечнокисела ферментация е 1 mol АТР на всеки mol изразходвана глюкоза.

Мравченокисела (смесена) ферментация при ентеробактерии

Представителите на разред *Enterobacteriales* се отнасят към **Група 2 – Протеобактерии, γ-Протеобактерии**. Те са Грам-отрицателни, неспорообразуващи пръчици; хемоорганотрофи. Факултативни анаероби. Условно-патогенни микроорганизми.

Род *Escherichia* – къси пръчици; неподвижни и подвижни; подвижните форми са перитрихи. *Escherichia coli* населява чревния тракт на животните и човек няколко часа след раждането и е нормален коменсиал. При определени условия може да предизвика заболявания – уринарни, интестинални инфекции, менингити, вътреболнични инфекции. Запазва известно време жизнеспособност и извън стомашно-чревния тракт, поради което лесно се изолира. Използва се като тест-микроорганизъм за установяване на фекалното замърсяване на питейна вода.

Род *Enterobacter* – подвижни пръчици (перитрихи), разпространени в почва, вода, интестиналният тракт на човек и животни. Ферментират захарите с отделяне на газ. Могат да причинят, макар и рядко менингити, сепсиси, раневи инфекции, вътреболнични инфекции.

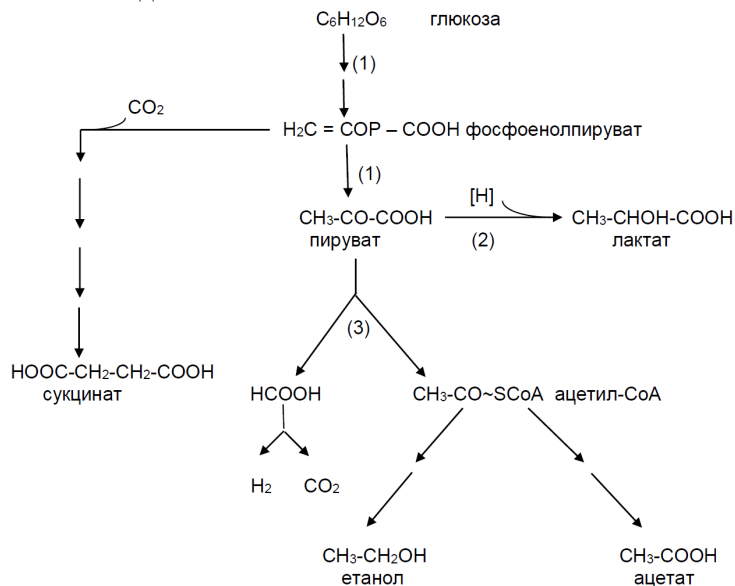
В отсъствие на кислород ентеробактериите осъществяват два вида смесена ферментация.

1. Родове *Escherichia, Salmonella, Shigella* ферментират захарите до млечна, оцетна, мравчена, янтърна киселини, неголеми количества C_2H_5OH , CO_2 и H_2 .

Глюкозата се разгражда по гликолитичния път. На ниво фосфоенолпируват (ФЕП) се отделя разклонението за синтез на янтърна киселина. Останалата част от ФЕП се превръща в пируват. Значителна част от него се редуцира до млечна киселина; бактериите от родове *Escherichia, Salmonella, Shigella* продуцират значителни количества млечна киселина. От пируват с ензимния комплекс *пируват:формиат лиаза* (ключов за ферментацията) се получава ацетил-СоА и мравчена киселина. Мравчената киселина е краен продукт, но част от нея се разпада до CO_2 . Ацетил-СоА се превръща в етанол и в оцетна киселина (Фиг. 3).

2. Родове *Enterobacter* и *Erwinia* за сметка на киселините образуват значителни количества C_2H_5OH , CO_2 и 2,3-бутандиол – **бутандиолова ферментация**.

Глюкозата се разгражда по гликолитичния път до пируват (няма разклонение на ниво ФЕП, т.к. не се получава сукцинат). Малка част от пирувата се редуцира до млечна киселина. От пируват, с ензима *пируват:формиат лиаза* се получават формиат и ацетил-СоА. Част от формиата се разпада до CO_2 и H_2 , а ацетил-СоА изцяло се превръща в етанол. От пирувата се получава 2,3-бутандиол – специфичен продукт, който дава име на ферментацията. Двата вида ферментация се разграничават чрез реакция с метилрот (MR) и реакция на Фогес-Проскауер (VP).



Фиг. 3. Смесена ферментация при *Escherichia, Salmonella, Shigella*.

(1) ензими на гликолитичния път; (2) лактат дехидрогеназа
(3) пируват:формиат лиаза

Маслено кисела ферментация

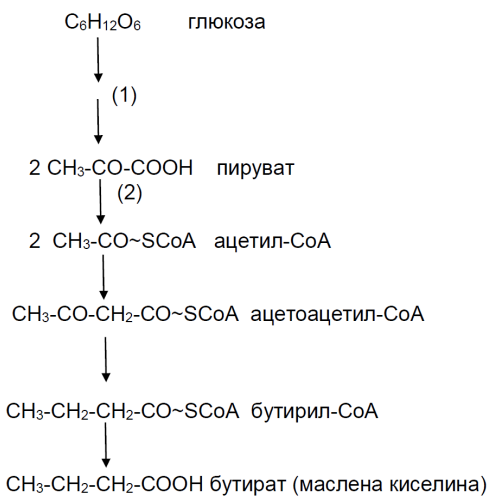
През 1861 г. Луи Пастър открива ферментацията на захари, при която се получава бутират. Осъществява се от облигатни анаероби, представители главно на 4 рода: *Clostridium*, *Butyrivibrio*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*.

Видовете *Clostridium* поглъщат захарите с фосфотрансферазна система; хексозите се разграждат до пируват в гликолитичния обменен път; пируватът се превръща в ацетил-СоА, СО₂ и Н₂ под действието на ензима *пируват:фередоксин оксидоредуктаза*, който е ключов за ферментацията. Двете молекули ацетил-СоА кондензират, при което се формира ацетоацетил-СоА, който постепенно се превръща в маслена киселина (Фиг. 4). Енергетичният баланс на ферментацията е 3 mol АТФ на 1 mol глюкоза.

Clostridium acetobutylicum ферментират глюкозата до бутират, бутанол и ацетон. Първоначално се образува бутират, но подкислението на средата активира ензими (като *ацетоацетат декарбоксилаза*), които катализират образуването на бутанол и ацетон. Процесите на синтез на различните продукти са свързани. Декарбоксилирането на част от ацетоацетата води до загуба на част от потенциалния акцептор на водорода от редуцирания NAD, който се прехвърля върху бутирил-СоА – образува се бутанол. В процеса се включва, след активиране, постъпващия от средата бутират. Някои щамове редуцират ацетона до 2-пропанол. Ако рН се поддържа на ниво

по-високо от 5.0, образуването на ацетон и бутанол силно се подтиква.

Род *Clostridium* се отнася към Група 3 – Грам-положителни бактерии с ниско съдържание на G+C. *Clostridium* са Грам-положителни; стари култури могат да се оцветят отрицателно по Грам. Изоларат се от почва, оборски тор, замърсени води, храносмилателния тракт на животни и човек. Повечето видове са подвижни перитрихи (срещат се и неподвижни). Образуват терморезистентни спори, които са кръгли или елипсоидни и променят формата на клетката. През определени етапи от развитието си клетките съдържат гранулеза (скорбялоподобно вещество), която се оцветява от йод в синьо. Натрупването на гранулеза се използва като таксономичен белег. *Clostridium* се отличават с изразен ферментативен тип метаболизъм. Анаероби с преходни форми – от строги анаероби (*C. pasteurianum*, *C. kluyveri*) до почти аеротолерантни (*C. histolyticum*, *C. acetobutylicum*). Не



Фиг. 4. Маслено кисела ферментация

(1) ензими на гликолитичния път;

(2) пируват:фередоксин оксидоредуктаза

съдържат хемопротеини (цитохроми и каталаза). Повечето видове са мезофилни (opt.t 30 – 37°C), но се срещат и термофилни, като *C. thermoaceticum*, *C. thermohydrosulfuricum*. *Clostridium* се различават силно по отношение на субстратите, които могат да ферментират. Захаролитичните видове разграждат предимно полизахариди, а пептолитичните – белтъци и аминокиселини. Оптимално рН за развитието е 6.5 – 7.2. Някои пептолитични *Clostridium* могат да причинят болести при раневи инфекции (газова гангрена и тетанус), а също така хранителни отравяния.

Пропионово кисела ферментация

Пропионово киселите бактерии обитават търбуха и чревния тракт на преживните животни, където превръщат млечната киселина, получена при различни ферментационни процеси в пропионова. Пропионова киселина образуват видовете *Propionibacterium*, *Selenomonas*, *Micromonospora* и *Clostridium propionicum*.

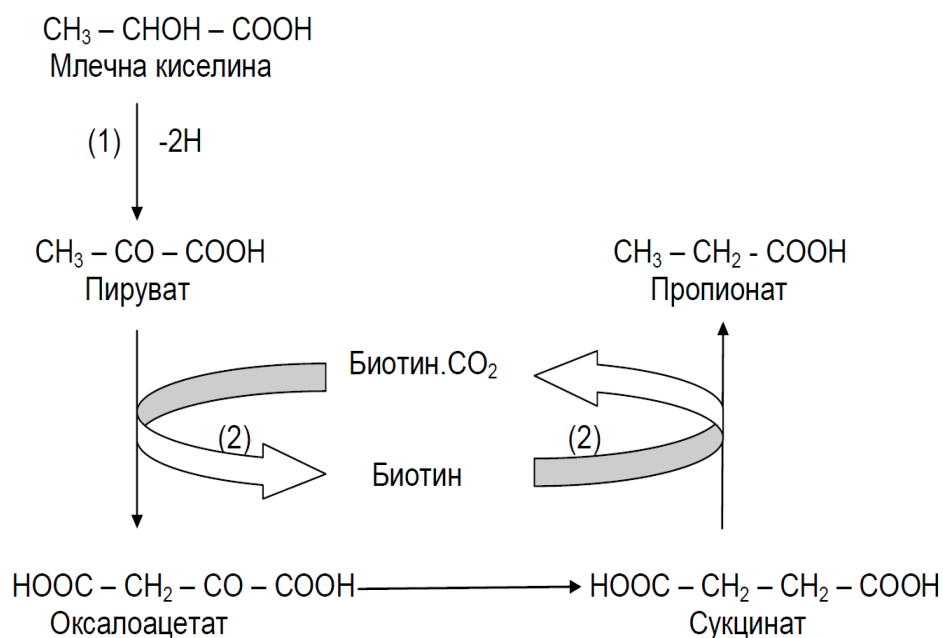
Род *Propionibacterium* се отнася към Група 4 – Грам-положителни бактерии с високо съдържание на G+C. Плеоморфни пръчици с размери 0.5 – 0.8 x 1.0 – 5.0 μm. Срещат се поединично, по двойки, в къси верижки, в Y или V образни конфигурации. Неспорообразуващи, неподвижни. При неблагоприятни условия формират бухалковидни форми. Не растат на твърди среди при достъп на въздух. Анаероби, но притежават вариабилна аеротолерантност. Притежа-

ват цитохроми и каталаза. Оптимална температура за развитие – 30 – 37°C. Хемоорганотрофи. Откриват се главно в сирене и млечни продукти и са част от нормалната микрофлора на човешката кожа. Ферментират глюкоза, захароза, лактоза, пентози, малат, глицерол, лактат с образуване на значителни количества пропионат. При ферментацията се получават също ацетат и неголеми количества CO₂.

Род *Micromonospora*. Проактиномицети; отнасят се към **Група 4 – Грам-положителни бактерии с високо съдържание на G+C**. Притежава добре развит, разклонен, септиран субстратен мицел. Въздушен мицел липсва. Грам-положителни клетки. Стената съдържа *meso*-диаминопимелинова киселина и глицин. Аероби и микроаероби. Хемоорганотрофи. Чувствителни са към рН стойности под 6.0. Растат при температури 20–40°C. Обитават почва, води (морски и сладководни), седименти. Няколко вида се откриват в интестиналния тракт на термити и търбуха на овце.

Формирането на пропионата става по два пътя; превръщането на глюкозата се осъществява по гликолитичния обменен път.

1. Сукцинат-пропионатен път. Функционира при повечето пропионовокисели бактерии. Първоначално, пируватът се карбоксилира до оксалоацетат. В реакцията участва биотин, като преносител на CO₂; CO₂ се използва циклично. Оксалоацетатът се превръща в сукцинат. Сукцинатът се активира и декарбоксилира до пропионат (Фиг. 5).



Фиг. 5. Сукцинат-пропионатен път на пропионовокисела ферментация

(1) лактат дехидрогеназа;

(2) транскарбоксилаза

2. Акрилоил-СоА път. Функционира при *Clostridium propionicum*. Междинен продукт е акрилоил-СоА. Субстрат може да бъде L-, D- или DL-лактат, които претърпяват взаимни превръщания под действие на ензима *лактат рацемаза*. Част от млечната киселина се окислява до пируват, от който се получава ацетил-СоА, CO₂ и редуцират ферредоксин с ензима *пируват:ферредоксин оксидоредуктаза*. Ацетил-СоА се превръща в оцетна киселина. Останалата част от лактата се превръща в лактил-СоА, от който се получава акрилоил-СоА. Следва редукция до пропионил-СоА и освобождаване на пропионат. Донори на електрони са редуцирания флавопротеин и редуцирания ферредоксин, получени в другото разклонение на пътя. Крайни продукти в този път са пропионова и оцетна киселини и CO₂.

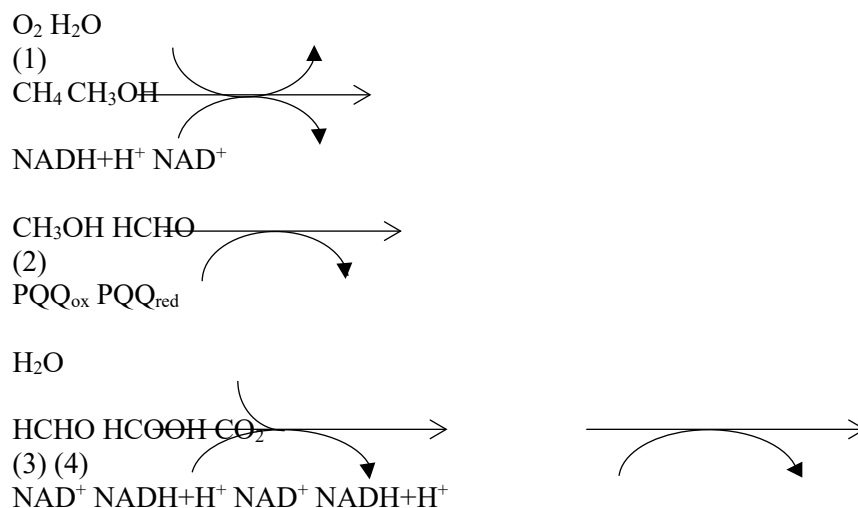
Метанът, метанолът и метиламините са естествено достъпни в големи количества. Някои бактерии и дрожди ги усвояват като единствен източник на въглерод и енергия. Тези организми се наричат **метилотрофи** и превръщат С₁ съединенията по специфични пътища. Много от тях не могат да усвояват т.нар. „сложни“ органични съединения, напр. захари.

Метилотрофите се отнасят към различни систематични групи – α-протеобактерии (*Methylobacterium*, *Methylocystis*, *Methylosinus*, *Hyphomicrobium*), β-протеобактерии (*Methylobacillus*, *Methylophilus*), γ-протеобактериите (*Methylobacter*, *Methylomonas*, *Methylococcus*). Биват облигатни и факултативни метилотрофи.

Облигатните метилотрофи (*Methylomonas methanica*, *Methylomonas methanooxidans*, *Methanococcus capsulatus*, *Methylosinus trichosporium*) се развиват само на среди с С₁-съединения – метан, метанол, метиламин и др. Не могат да използват т. нар. сложни органични съединения, поради наличието на специфични метаболитни пътища. Наричат се още **метанотрофи**. Метанотрофите са Грам-отрицателни и имат обширни вътреклетъчни мембранни структури (както и нитрифициращите бактерии), които се използват при класификацията им.

Факултативните метилотрофи (*Methylobacterium organophilum*, *Methylophilus spp.*, *Paracoccus denitrificans*, *Hyphomicrobium spp.*, *Methylotenera spp.*) използват за растежа си освен С₁ съединения и по-сложни органични съединения. Не могат да окисляват метан.

Окислението на метана до метанол се осъществява с ензима *метан монооксигеназа*, който използва NADH като коензим (Фиг. 1). Следва окисление на метанола до формалдехид, а електроните от окислението се насочват към електрон-транспортна система за синтез на АТФ. *Метанол дехидрогеназата* редуцира пиролохинолин хинон (PQQ). Пиролохинолин хинонът, с редокс потенциал $E_0 = +0.12 \text{ V}$ участва като коензим на ензимите *глюкоза дехидрогеназа* при *Pseudomonas putida* и *алкохол дехидрогеназа* при оцетнокиселите бактерии. Формалдехидът може да се асимилира в клетъчен материал или да се окисли до мравчена киселина с ензима *формалдехид дехидрогеназа*. В последния етап, с ензима *формиатдехидрогеназа* се регенерира редуцирания NAD (NADH) от първия етап на окислението.



Фиг. 1. Окисление на метан. (1) монооксигеназа; (2) метанол дехидрогеназа; (3) формалдехид дехидрогеназа; (4) формиат дехидрогеназа

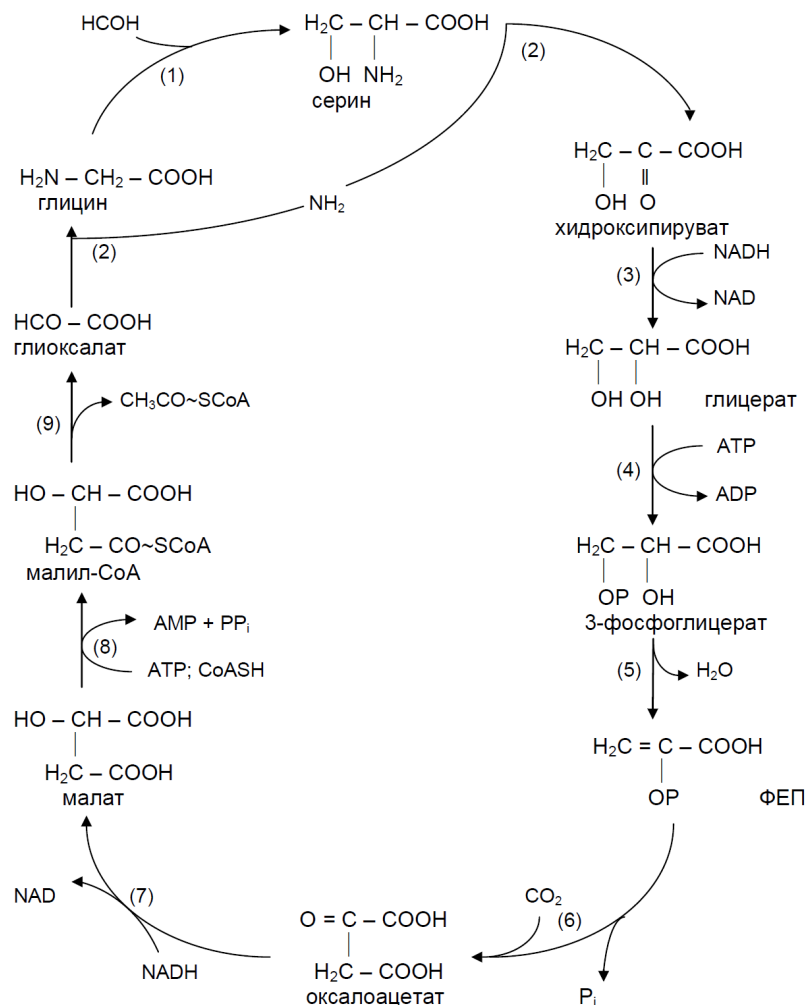
При култивиране на бактериите на среда с метан се натрупва повече биомаса, отколкото на среда с метанол, въпреки че, при окислението на последния се получават повече редуциращи еквиваленти и би следвало да се синтезира по-голямо количество АТФ. Вероятно, това несъответствие е свързано с по-високия разход на енергия при транспортирането на метанола в клетката.

Methylosinus trichosporium синтезира разтворима и мембранно-свързана *метан монооксигеназа*. Разтворимият ензим има ниска субстратна специфичност, може да окисли чрез **кометаболизъм** редица ксенобиотици като, трихлороетен, хлороформ, бензен, толуен, стирен, крезол, нафтаден, винилхлорид.

Анаболитният метаболизъм на метилотрофите се разграничава от енергийния на ниво формалдехид. Метилотрофите провеждат два пътя на фиксация на формалдехид.

1. Серин-изоцитрат лиазен път

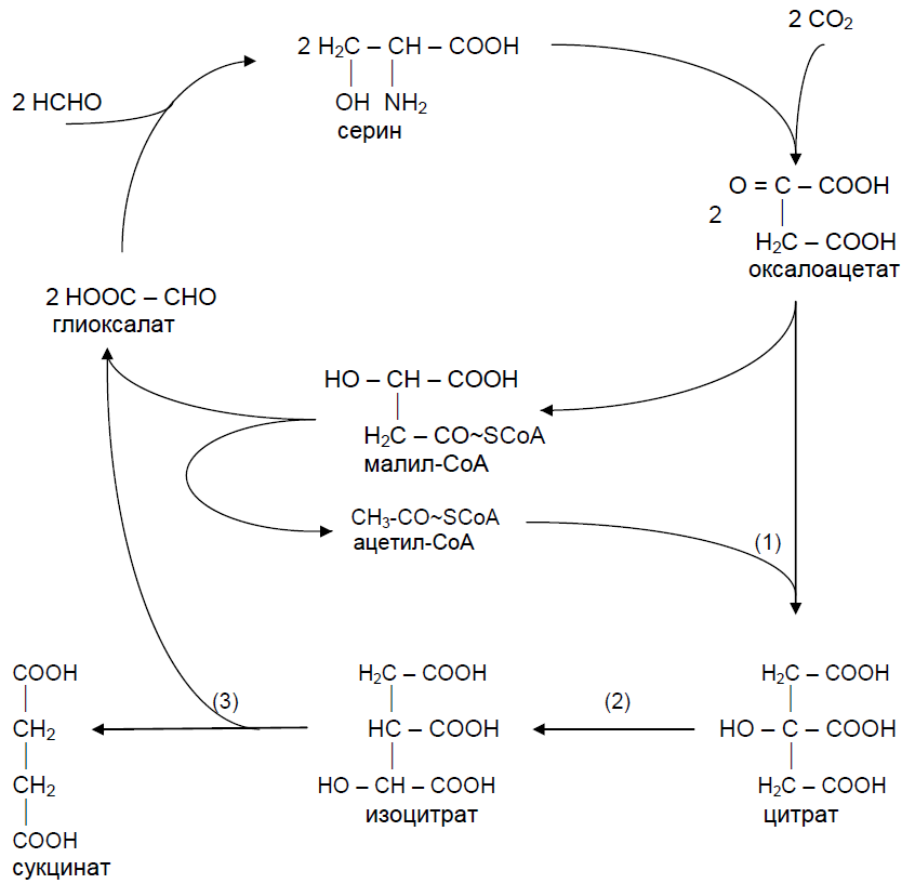
В **сериновия път** се образува ацетил-CoA от формалдехид и CO₂ (Фиг. 2). Акцептор на формалдехида е глицин, а серинът, който се образува под действието на ензима *хидроксиметиллаза* се превръща в съответната α-кетокиселина (хидроксипируват) в резултат на *трансаминазна* реакция. Хидроксипируватът през глицерат и 3-фосфоглицерат се превръща във фосфоенолпируват. Последният се карбоксилира до оксалоацетат (анаплеротична реакция). Следва редукция на оксалоацетата до малат, който се активира, превръщайки се в съответния CoA естер – малил-CoA. Последният се разпада до ацетил-CoA и глиоксалат, който в *трансаминазна реакция* регенерира акцепторната молекула на глицина. Ключови ензими в сериновия път са *малил-CoA* лиаза, *серин-глиоксалат трансаминаза* и *хидроксипируват редуктаза*.



Фиг. 2. Серинов път. (1) серинхидроксиметиллаза; (2) серин:глиоксалат трансаминаза; (3) хидроксипируват редуктаза; (4) глицераткиназа; (5) фосфоглицеромутаза + енолаза; (6) фосфоенолпируват карбоксилаза; (7) малат дехидрогеназа; (8) малаттиокиназа; (9) малил-CoA лиаза

Ацетил-CoA, образуван в сериновия път не е достатъчен за обезпечаване на нуждите на клетката от молекули-предшественици. Съчетаването на сериновия път с реакции, катализирани от ензимите *цитрат синтаза*, *cis-аконитаза* и *изоцитрат лиаза* води до пряко образуване на

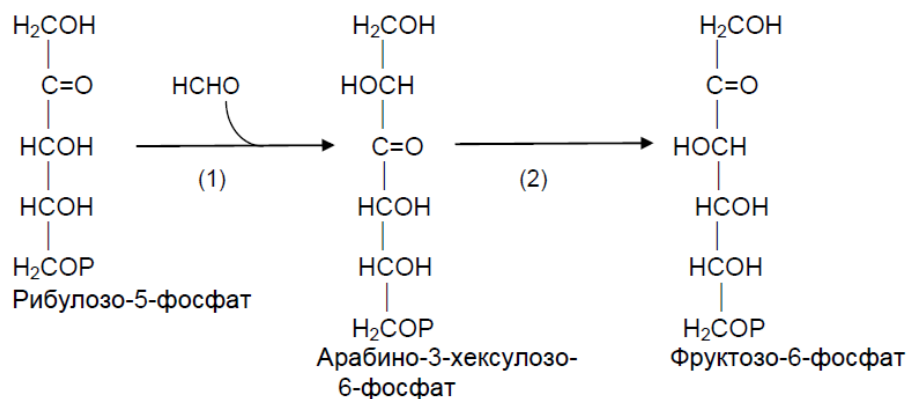
сукцинат от две молекули CO₂ и две молекули НСНО. Тази метаболитна последователност е известна като **серин-изоцитрат лиазен път** (Фиг. 3). Функционира при *Methylosinus*, *Methylocystis* и редица факултативни метилотрофи.



Фиг. 3. Серин-изоцитрат лиазен път. (1) цитратсинтаза; (2) cis-аконитаза; (3) изоцитрат лиаза

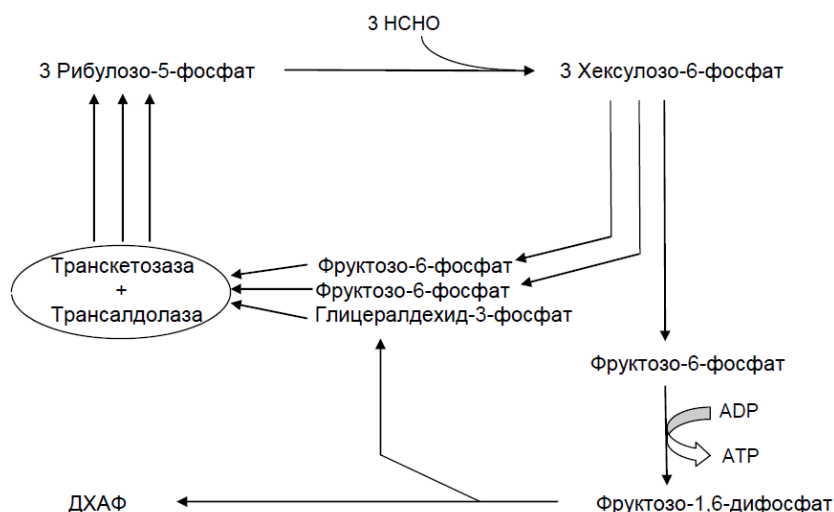
2. Рибулозомонофосфатен път

В този път НСНО кондензира с рибулозо-5-фосфат под действието на ензима *хексулозо-6-фосфат синтаза* и продукта изомеризира във *фруктозо-6-фосфат* (Фиг. 4).



Фиг. 4. Фиксация на формалдехид. (1) хексулозофосфат синтаза; (2) хексулозофосфат изомераза

Акцепторната молекула – рибулозо-5-фосфат се регенерира в *трансалдолазна* и *транскетолазна* реакции. Включването на три молекули НСНО в цикъла води до синтеза на молекула дихидроксиацетонфосфат (ДХАФ), който може да се използва за синтез на по-сложни органични съединения (Фиг. 5). Рибулозомонофосфатният цикъл функционира при представителите на родовете *Methylococcus* и *Methylomonas*.



Фиг. 5. Рибулозомонофосфатен път. ДХАФ – дихидроксиацетонфосфат

Облигатни метилотрофи

Род *Methylococcus*. Клетките са сферични, обикновено се срещат по двойки. Неподвижни, Грам-отрицателни. Използват CH_4 , CH_3OH , СНОН като единствени източници на въглерод и енергия. Не се нуждаят от органични растежни фактори.

Типов вид: *Methylococcus capsulatus*. Коки с диаметър $d = 1.0 \mu\text{m}$; развиват се при температура $30 - 50^\circ\text{C}$; оптимална температура 37°C ; Асимилират въглерод чрез рибулозомонофосфатния път. Синтезират рибулозодифосфат карбоксилаза, т.е. способни са да фиксират автотрофно CO_2 . Нитрогеназната активност е вариabilен признак.

Род *Methylomonas*. Прави, разклонени или извити пръчици с размери $0.5 - 1.0 \mu\text{m} \times 1.0 - 4.0 \mu\text{m}$; Грам-отрицателни. Източници на въглерод и енергия са CH_4 , CH_3OH , СНОН . Не се нуждаят от органични растежни фактори. Развиват се при температура $20 - 35^\circ\text{C}$.

Типов вид: *Methylomonas methanica*.

Факултативни метилотрофи

Род *Methylobacterium*. Пръчици с размери $0.8 - 1.0 \times 1.0 - 8.0 \mu\text{m}$; Грам-отрицателни или Грам-вариabilни. Клетките често съдържат суданофилни или волутинови гранули.

Повечето щамове растат бавно или не растат на хранителен агар. Способността за усвояване на CH_4 като единствен източник на въглерод и енергия се губи, ако щамовете не се поддържат на неорганична среда, в метанова атмосфера. Оптимална температура – $25 - 30^\circ\text{C}$.

Типов вид: *Methylobacterium organophilum*

Род *Methylophaga*. Използват C_1 съединения (метанол и метиламин) и фруктоза. Не растат на среда с метан. Изолират се от морски води.

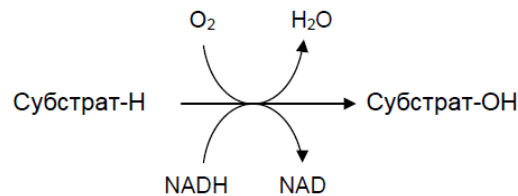
Типов вид: *Methylophaga marina*

Метаболизъм на алифатни въглеводороди, различни от метан

Неголям брой представители на *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Flavobacterium* окисляват **етан, пропан, бутан**.

С удължаване на веригата на въглеводородите нараства броя на видовете способни да ги усвояват – *Pseudomonas fluorescens*, *P. aeruginosa*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Mycobacterium smegmatis*, *Nocardia petroleophila*, *Candida lipolitica*, *Corynebacterium glutamicum*, *Arthrobacter simplex*, *Cephalosporium roseum*. Предвид неразтворимостта на тези съединения, посочените микроорганизми очевидно притежават ефективна система за транспорт. Част от тази система са гликолипидите, локализиращи на външната страна на клетъчната стена, които формират микроемулсия от въглеводороди, преминаваща през клетъчната мембрана.

Разграждането на въглеводородите започва с окисление на терминалната метилова група до алкохолна, катализирано от монооксигеназа:

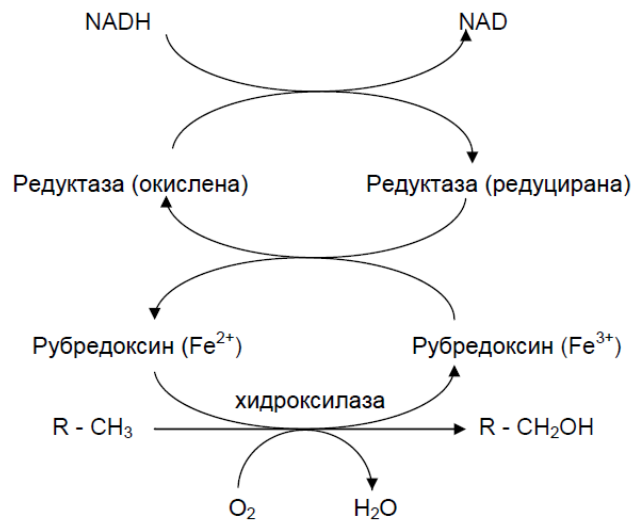


Монооксигеназата (хидроксилаза) въвежда единия атом на молекулния кислород в молекулата на субстрата; вторият кислороден атом се редуцира до вода.

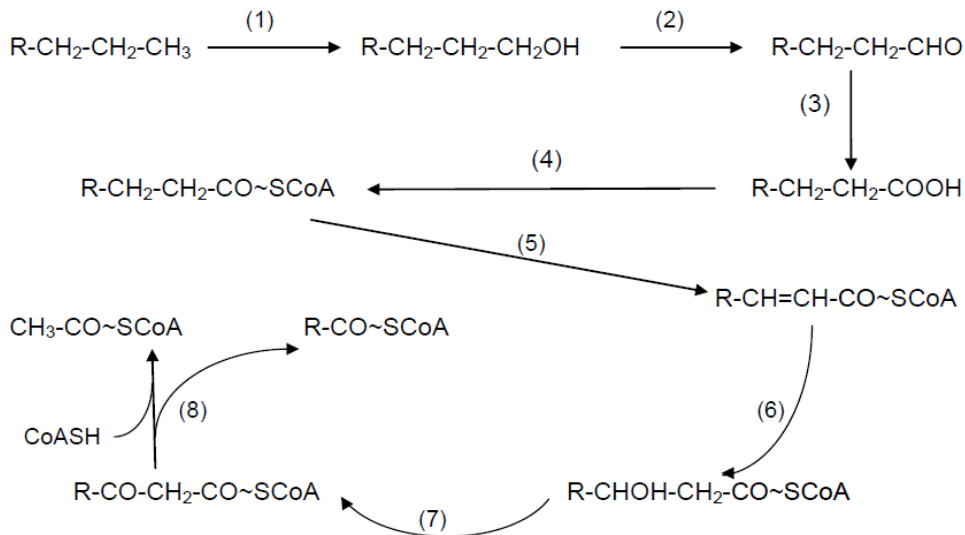
Pseudomonas putida осъществява окислението с три белтъка – рубредоксин, NADH-оксидоредуктаза и алкан-1-хидроксилаза (фиг. 6). Рубредоксинът се редуцира за сметка на NADH и осигурява електрони за монооксигеназата, окисляваща въглеводорода.

Образуваият се първичен алкохол се окислява първоначално до алдехид, а след това с NAD-зависима дехидрогеназа – до съответната мастна киселина. По-нататъшното окисление на мастната киселина се осъществява по пътя на β -окислението (Фиг. 7).

Характерът на продуктите зависи от природата на субстрата и съответния микроорганизъм. Редица *Pseudomonas* окисляват въглеводородите напълно, без да натрупват междинни продукти; *Acinetobacter calcoaceticus* отделя продуктите на окислението в средата, а *Nocardia* – в клетката.

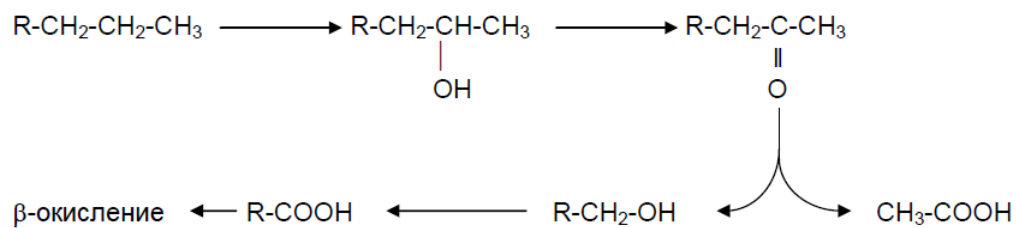


Фиг. 6. Алканхидроксилазна система при *Pseudomonas*.



Фиг. 7. Разграждане на алкани. (1) монооксигеназа (алкан-1-хидроксилаза); (2) алкохолдехидрогеназа; (3) алдехиддехидрогеназа; (4) ацил-CoA синтетаза; (5) ацил-CoA дехидрогеназа; (6) 3-хидроксиацил-CoA хидролизаза; (7) 3-хидроксиацил-CoA дехидрогеназа; (8) β -кетотиолаза

Има данни за субтерминално (β -) окисление на въглеводородите, при което се получават метилкетони. По-нататъшното разграждане на кетоните води до получаване на първичен алкохол, чиято въглеродна верига е с два атома по-къса в сравнение с изходния субстрат:



При някои микроорганизми (*Mycobacterium smegmatis*, *Candida lipolytica*) функционират едновременно и двата механизма – окисление в положение C₁ и C₂. *Corynebacterium* осъществяват дитерминално окисление на въглеводородите: образуващата се мастна киселина повторно се хидроксилира до дикарбонова, която се подлага на окисление.

Хемолитотрофните микроорганизми получават енергия и редуциращи еквиваленти при окисление на неорганични съединения или техните йони – NH₄⁺, NO₂⁻, S⁰, S²⁻, S₂O₃²⁻, SO₃²⁻, Fe²⁺, H₂. Акцепторът на електрони обикновено е кислород (аеробно дишане), но някои хемолитотрофи използват нитрат или сулфат (анаеробно дишане). При повечето бактерии CO₂ е единствен или главен източник на въглерод.

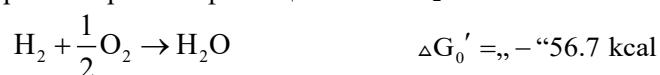
При окислението на неорганичните молекули е достъпна по-малко енергия, отколкото при пълното окисление на глюкозата. Причината за това е, че NADH, който отдава електрони към дишателната верига има по-негативен потенциал от повечето неорганични субстрати, които хемолитотрофите използват като електронни донори. Тъй като добивът на АТР е нисък, хемолитотрофите трябва да окислят голямо количество неорганичен субстрат за растеж и възпроизводство. Това е валидно в по-голяма степен за автотрофните хемолитотрофи, които фиксират CO₂. В зависимост от природата на донора и акцептора на електрони се обособяват различни групи хемолитотрофи.

1. Водород-окисляващи бактерии

Водород-окисляващите бактерии използват молекулен водород като електронен донор. Тези бактерии са факултативни хемолитотрофи, с малки изключения. Водород-окисляващите бактерии се изолират от различни местообитания – сладководни водоеми, седименти, почви, активна утайка, горещи извори, хидротермални отвори и изпълняват важна роля в кръговрата на водорода в биосферата.

Молекулен водород се отделя при анаеробното разграждане на субстратите, в анаеробни почвени участъци и водоеми. Голяма част от водорода се окислява от бактерии, които съжителстват с микроорганизмите осъществяващи ферментациите. Окислението на водорода е свързано с редукция на SO₄²⁻ (сулфати) до S²⁻ (сулфида), или CO₂ до CH₄. Водород се образува също в добре аерирани почви (с бобови растения). Той се отделя в нитрогеназната реакция и дифундира от бактериоидите на грудките в средата.

Аеробните водород-окисляващи бактерии са хетерогенна група, включваща представители на родове *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Paracoccus*, *Aquaspirillum*, *Xanthobacter* (Грам-отрицателни), *Nocardia*, *Bacillus*, *Mycobacterium* (Грам-положителни). Окислението на молекуления водород осигурява енергия за фиксацията на CO₂:



Водородните бактерии са факултативни хемолитотрофи, тъй като могат да използват и органични субстрати. Ако в средата присъстват неорганични (CO₂ и H₂) и органични субстрати, водородните бактерии се отнасят като **миксотрофи**, т.е. асимилират органичните съединения за синтез на клетъчни компоненти, а енергия получават при окислението на водорода. Факултативната хемолитоавтотрофна бактерия *Ralstonia eutropha* (предишно наименование *Alcaligenes eutrophus*) може да използва H₂ като единствен източник на енергия.

Водородните бактерии усвояват амоняк под формата на урея, нитрати, нитрити, аминокиселини и азотни бази; някои видове могат да фиксират молекулен азот.

Анаеробни водород-окисляващи бактерии, които използват H₂ + CO₂ осъществяват **анаеробно дишане**.

Молекуленият водород се включва в метаболитните процеси с ензима *хидрогеназа*. Установени са два типа хидрогенази.

Мембранно-свързана, която предава електрони в електрон-транспортна верига, включваща различни хинони и цитохроми. Установена е при повечето водородни бактерии, като *Pseudomonas facilis*, *Paracoccus denitrificans*, *Xanthobacter flavus*, *Hydrogenobacter thermophilus*, *Rhizobium japonicum*.

Разтворима, която редуцира $\text{NAD} - \text{H}_2:\text{NAD}$ *оксидоредуктаза*. Открита е при *Alcaligenes denitrificans*, *Nocardia autotrophica*, *Rhodococcus opacus*. Редуцираният NAD може да участва в биосинтетични реакции.

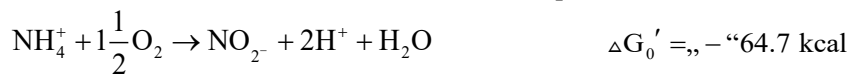
Някои водород-окисляващи бактерии, като *Pelomonas saccharophila* (предишно наименоване *Pseudomonas saccharophila*) и *Ralstonia eutropha* съдържат и двата типа хидрогенази. От всички хемолитоавтотрофи само водородните бактерии с разтворима хидрогеназа могат пряко да редуцират NAD при окислението на неорганичния субстрат.

Въглеродният диоксид се асимилира автотрофно в цикъла на Калвин. Облигатния хемолитотроф *Hydrogenobacter thermophilus* включва CO_2 чрез редукиривен цикъл на трикарбоновите киселини.

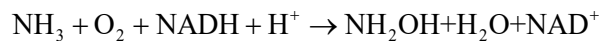
2. Нитрифициращи бактерии

Нитрификацията е процес на генериране на енергия при окисление на амоняка до нитрати. Осъществява се на два етапа от две групи бактерии, които са предимно облигатни хемолитотрофи.

Бактерии, окисляващи амоняк до нитрити. Включва представители на родове *Nitrosococcus*, *Nitrosomonas*, *Nitrosolobus*, *Nitrosospina*, които окисляват амоняка до нитрит:

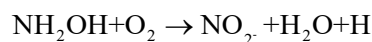


Процесът се осъществява на етапи. Първоначално амонякът се окислява до хидроксиламин с ензима *амоняк монооксигеназа*. Ензимът катализира присъединяване на единия атом на молекулния кислород към молекулата на амоняка; вторият кислороден атом се редуцира до вода:



Този етап е ендергоничен, т.к. се консумира енергия.

Следва окисление на хидроксиламина до нитрит с *хидроксиламин оксидоредуктаза*:



Като междинен продукт се образува нитроксил:



Електроните постъпват в дихателна верига на нивото на цитохром *c* или цитохром *a*, след което с терминална *оксидаза* се прехвърлят върху крайния акцептор – молекулния кислород. Транспортът на електрони по електрон-транспортната верига, разположена в цитоплазмената мембрана е съпроводен от преноса на два протона през мембраната. Това води до възникване на протонен градиент и синтез на АТР.

Бактерии, окисляващи нитрити до нитрати

Окислението на нитрита до нитрат се осъществява от молибден-съдържаща *нитрит оксидаза*:



Електроните се поемат от цитохром *a*₁ и чрез цитохром *c* се прехвърлят на терминална цитохром *aa*₃ *оксидаза*, където се акцептират от молекулния кислород.

Към втората група нитрифициращи бактерии се отнасят родове *Nitrococcus*, *Nitrobacter*, *Nitrospira*. Бактериите, окисляващи амоняк осигуряват субстрат за бактериите, окисляващи нитрити.

Нитрифициращите бактерии са разнородна група и се отнасят към различни таксономични групи: род *Nitrobacter* – към семейство *Bradyrhizobiaceae* на α -протеобактериите; родове *Nitrosomonas* и *Nitrospira* към семейство *Nitrosomonadaceae* на β -протеобактериите; *Nitrococcus* и *Nitrosococcus* към γ -протеобактериите. Нитрифициращите бактерии са Грам-отрицателни, с различна форма и размери. Подвижни, с полярно или перитрихално разположени флагелуми или неподвижни; често съдържат в цитоплазмата мембранни комплекси; не образуват ендоспори. Нитрифициращите бактерии са облигатни аероби; повечето и облигатни автотрофи, чийто растеж се инхибира от органични съединения в концентрации, типични за хетеротрофните прокариоти. Фикси-

рат CO_2 в цикъла на Калвин. Оптимални условия за растеж са температура $25 - 30^\circ\text{C}$ и $\text{pH } 7.5 - 8.0$. Обитават морски и сладководни водоеми, почви, канализационни системи.

Двете групи нитрифициращи бактерии, както и редица бактерии, окисляващи водород, съединения на сярата и Fe(II) се намират в неизгодно енергетично положение, т.к. субстратите, които усвояват имат положителен редукционен потенциал (E_0' на двойката $\text{NH}_4^+/\text{NO}_2^-$ е $+0.44 \text{ V}$, а на двойката $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ е $+0.42 \text{ V}$). Окислението на тези субстрати не може да бъде свързано с редукция на NAD , който обаче е необходим за фиксация на CO_2 в цикъла на Калвин. Електроните, отделящи се при окислението на тези субстрати се включват в дихателната верига на ниво на цит. c или цит. a , което води до синтез на неоглямо количество ATP . Фосфорилиране се осъществява само в един етап на окислението.

Част от синтезираната енергия се изразходва за „обратен пренос на електрони“ – пренос на електрони „назад“ по електрон-транспортната верига, от компоненти с положителен към компоненти с отрицателен E_0' , до нивото на пиридиннуклеотидите и редукцията им (Фиг. 1). Преносът на $2e^-$ от NO_2^- до NO_3^- води до синтез на 1 молекула ATP . Значителна част от енергията се изразходва за редукция на NAD . Поради това, *Nitrobacter* расте бавно с разход на голямо количество субстрат.

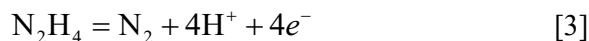
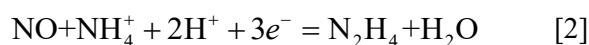
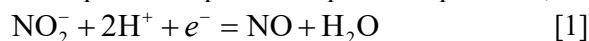
3. Анамокс бактерии

Анамокс е съкращение за анаеробно окисление на амониак, което е важен етап от биогеохимичния цикъл на азота. В тази реакция, хемолитотрофите използват амониевия йон като донор на електрони, а нитритът като акцептор.

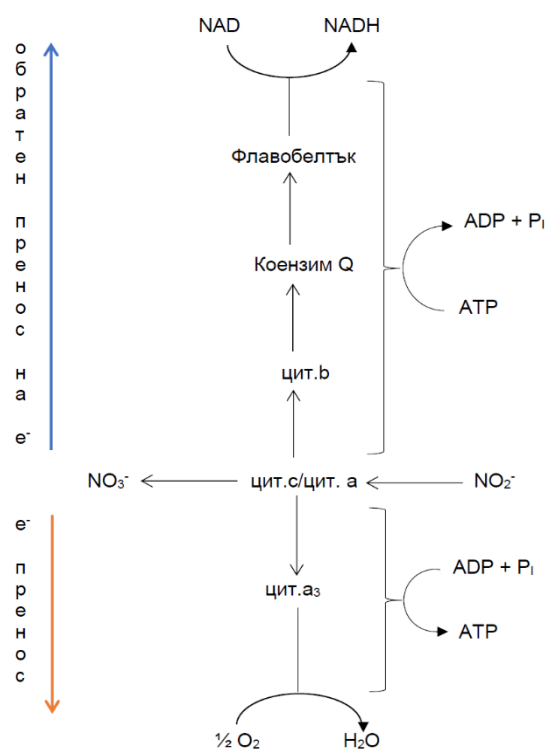


Превръщането на субстрата протича през две токсични междинни съединения – азотен оксид (NO) и хидразин (N_2H_4).

Анаеробното окисление на амониак включва три етапа, които протичат в анамоксозомата и създават протонен градиент през мембраната ѝ, което може да се използва за синтез на ATP .



Анамокс-бактериите са облигатни анаероби и принадлежат към пет рода: *Brocadia*, *Kuenenia*, *Anammoxoglobus*, *Jettenia* (сладководни видове) и *Scalindua* (морски видове). Отнасят се към разред *Brocadiales*, отдел *Planctomycetes*, Група 5 от определителя на бактериите. Анамокс-бактериите са кълбовидни клетки с диаметър приблизително $800 - 1100 \text{ nm}$. Клетъчната им стена е белтъчна, без пептидогликан и външна мембрана, по което се различават както от Грамположителните, така и от Грам-отрицателните бактерии. Притежават анамоксозома – мембранно-свързан участък в цитоплазмата, в който се осъществява анаеробното окисление на амониак. Съставът на техните мембранни липиди е специфичен, тъй като присъстват мастни киселини, свързани както с естерни така и с естерни връзки. Бактериите притежават мембранни липиди, наречени ладерани със структури, които не се срещат при други прокариоти. Тези специални липиди правят клетъчните мембрани по-плътни и по-твърди, намалявайки пропускливостта и нежеланата загуба на метаболити.



Фиг. 1. Обратен пренос на e^- при *Nitrobacter*.

4. Желязо-окисляващи бактерии

Желязо-окисляващите бактериите са хемотрофи, способни да окисляват Fe(II) до Fe(III), като начин за генериране на биологически използвана енергия:



Желязо-окисляващите бактерии са три групи. Едните са ацидофили, като *Thiobacillus ferrooxidans*, *Leptospirillum ferrooxidans* и архебактерията *Ferroplasma*. Тези микроорганизми окисляват желязото в среди с много ниско рН, като киселинните минни дренажи.

Втората група микроорганизми окислява желязото при неутрално рН. Тези бактерии, като *Gallionella ferruginea* и *Leptothrix ochracea* са микроаерофили.

Третият вид са анаеробни фототрофни бактерии, като *Rhodospseudomonas*, които използват Fe(II) за редуция на NAD, необходим за автотрофната фиксация на въглеродния диоксид.

От биохимична гледна точка, аеробното окисление на Fe(II) е енергетично много слаб процес. Образуването на редуциран NAD или NADP, необходим за фиксацията на въглероден диоксид, се осъществява чрез обратен пренос на електрони (Фиг. 1). Електрон-транспортната верига съдържа всички видове преносители, но участъкът свързан с получаването на енергия е много къс. Повечето щамове са облигатни хемолитоавтотрофи, които асимилират CO₂, като единствен източник на въглерод.

Бактериите от вида *Thiobacillus ferrooxidans* са способни да окисляват не само Fe(II), но и редуцирани серни съединения. *Gallionella ferruginea* е типичен хемолитоавтотроф. Донор на електрони е единствено Fe(II), а източник на въглерод е CO₂. Бактериите обитават бикарбонатни среди, най-често хладни води, с неутрални рН стойности и микроаерофилни условия. Във водопроводните тръби, бактериите образуват отлагания, които замърсяват питейната вода и повреждат съоръженията. Екстремно термофилната архебактерия *Sulfolobus acidocaldarius* расте хемолитотрофно, използвайки сулфид и Fe(II) като електронни донори. *Sulfolobus acidocaldarius* е факултативен хемолитотроф. Освен Fe(II), различни прокариоти могат да се използват като донори на електрони As(III) и U(IV).

5. Бактерии, окисляващи съединения на сярата

Редица прокариоти, наречени **серни бактерии**, могат да използват неорганични серни съединения, включително сулфид (S²⁻), елементарна сяра (S⁰), тиосулфат (S₂O₃²⁻), като енергиен източник. Серните бактерии проявяват висока метаболитна адаптивност. Повечето видове са мезофилни с оптимална температура за растежа около 30°C, но са описани и термофилни. Някои серни бактерии са ацидофилни.

Род *Thiobacillus* се отнася към β-протеобактериите. Включва Грам-отрицателни, пръчковидни бактерии, неподвижни или с полярно разположени флагелуми. Бактериите растат аеробно чрез окисление на различни серни съединения. АТФ се синтезира чрез комбинация от окислително фосфорилиране и фосфорилиране на ниво субстрат. Обикновено използват CO₂ като основен въглероден източник. *Thiobacillus thiooxidans*, *T. thioautotrophicus*, *T. denitrificans*, са облигатни хемолитоавтотрофи, фиксиращи CO₂. Видовете *T. novellus* и *T. intermedius* могат да растат и хемохетеротрофно. *Thiobacillus thiooxidans* могат да се развиват в силно кисела среда. Растат при рН 0.5; оптимална рН стойност за растежа им е около 2.0; при рН 6.0, растежът е невъзможен. *Thiobacillus ferrooxidans* може да окислява Fe(II) като електронен донор.

Безцветните серни бактерии, които при окислението на сулфид натрупват сяра в клетките са две групи – нишковидни (*Beggiatoa*, *Thiothrix*, *Thioploca*) и едноклетъчни (*Achromatium*, *Macromonas*, *Thiovulum*, *Thiospira*, *Thiobacterium*). Някои серни бактерии са алкалофили и се развиват в алкални езера – *Thioalkalimicrobium* и *Thioalkalivibrio*. Видовете *Sulfolobus* (отнасят се към отдел *Crenarchaeota* на архебактериите) са Грам-отрицателни, със сферична форма. Термоацидофили с оптимална температура 70 – 80°C и рН оптимум 2 – 3. Растат хемолитотрофно върху серни гранули в горещи, кисели извори и почви. Освен редуцирани серни съединения, могат да окисляват Fe(II) до Fe(III), като електронен донор. Източници на въглерод и енергия могат да бъдат захари и аминокисели, като глутамат.

Серните бактерии окисляват сяра (S⁰), сулфид (S²⁻), тиосулфат (S₂O₃²⁻) и други серни съединения до сулфат като краен продукт. Окислението на сулфид до сулфат е свързано със загуба

на 8 електрона, които постъпват в електрон-транспортна верига; образуват се елементарна сяра и сулфит като междинни продукти. При електронния пренос възниква протондвижеща сила, която генерира енергия за синтеза на АТР. АТР се синтезира чрез окислително фосфорилиране и фосфорилиране на ниво субстрат. Бактериите притежават две ензимни системи, окисляващи SO_3^{2-} до SO_4^{2-} : (1) сулфитоксидаза; (2) APS редуктаза + ADP сулфурилаза. Във втория случай се осъществява субстратно фосфорилиране.

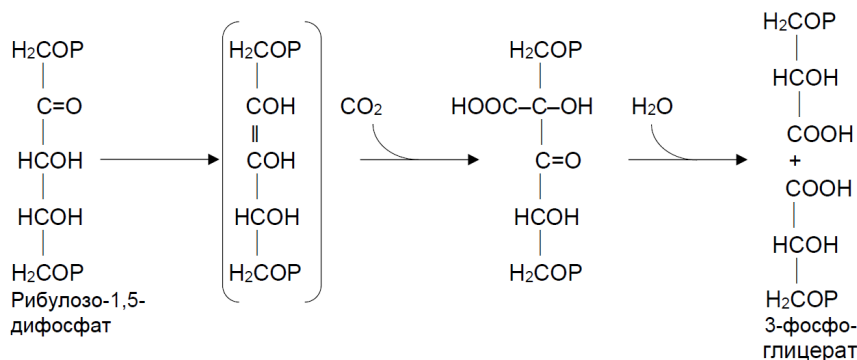
АВТОТРОФНА ФИКСАЦИЯ НА CO_2

1. Цикъл на Калвин

Цикълът на Калвин (рибулозодифосфатен) е най-общия механизъм за фиксация на CO_2 сред автотрофите. Това е единствения механизъм при еукариотите, който се осъществява също от цианобактериите, пурпурните фототрофни бактерии и хемолитотрофите. Зелените фототрофни бактерии и метаногените, които не синтезират ензима *рибулозодифосфат карбоксилаза* имат алтернативен механизъм за автотрофна фиксация на CO_2 .

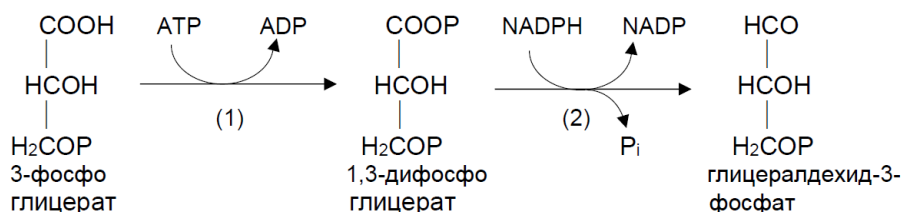
В цикъла на Калвин могат да се обособят три етапа:

(1) **фиксация на CO_2** – осъществява в рибулозо-1,5-дифосфаткарбоксилазна реакция:



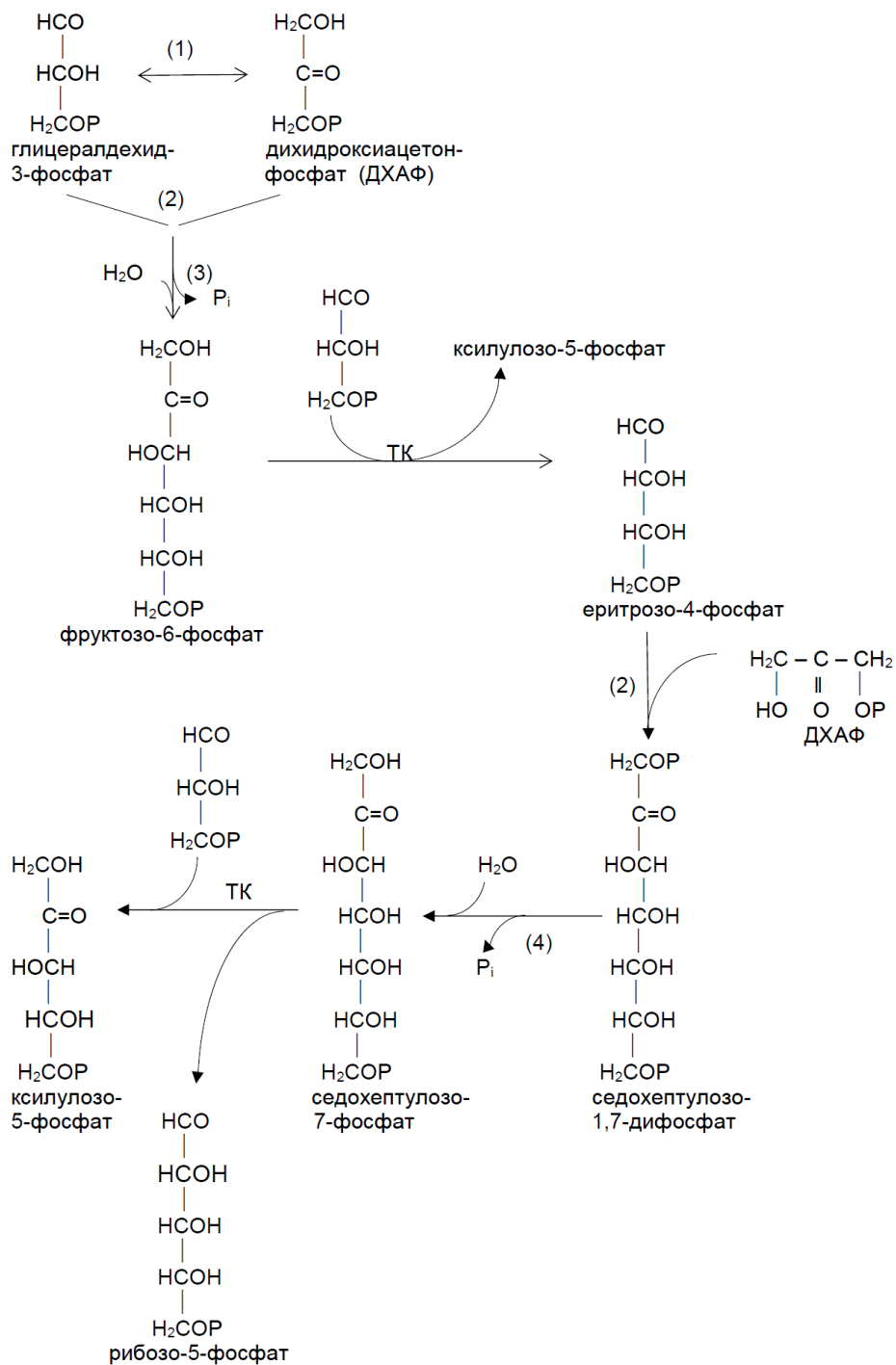
Рибулозодифосфат карбоксилазата е един от ключовите ензими в цикъла. Ензимът използва рибулоза и CO_2 като субстрати. CO_2 се фиксира, като се присъединява към рибулозодифосфата, който веднага се разцепва на две молекули 3-фосфоглицерат.

(2) **редукция на образуваните се 3-фосфоглицерат до глицералдеhid-3-фосфат** протича в две последователни реакции, катализирани от ензимите *фосфоглицераткиназа* (1) и *глицералдеhid-3-фосфат дехидрогеназа*:



(3) **регенерацията на акцептора на CO_2** – рибулозо-1,5-дифосфата се осъществява в поредица от реакции с участието на ензима *транскетолаза*. Глицералдеhid-3-фосфатът (ГАФ) се намира в равновесие с дихидроксиацетонфосфат (ДХАФ) и двете триози в *алдолазна* и *фосфатазна* реакции образуват фруктозо-6-фосфат. В реакции на хексозната молекула с две молекули глицералдеhid-3-фосфат и една молекула дихидроксиацетон-фосфат се получават две молекули ксилулозо-5-фосфат и една рибулозо-5-фосфат (Фиг. 3).

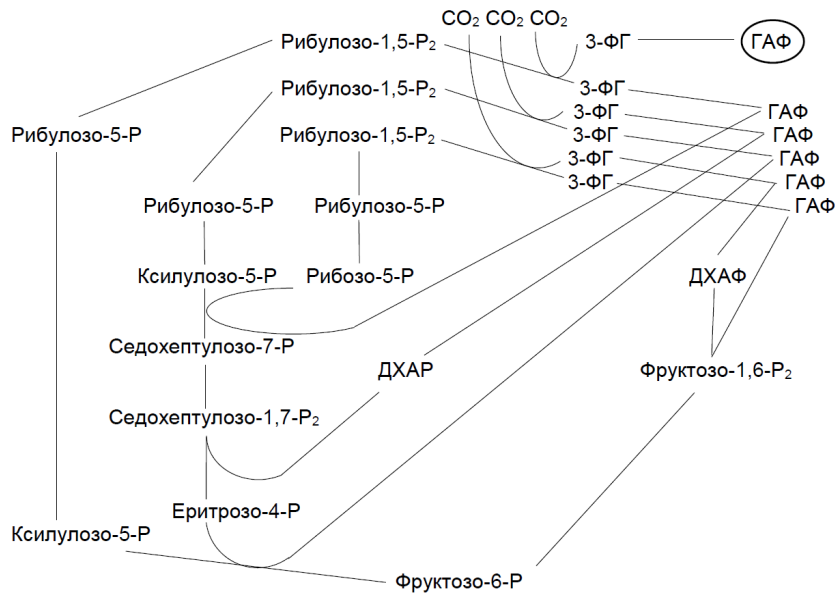
Пентозофосфатните молекули се превръщат в 3 молекули рибулозо-5-фосфат с ензимите *рибулозофосфат епимераза* (1) и *рибулозофосфат изомераза* (2). Трите молекули рибулозо-5-фосфат след фосфорилиране с *фосфорилукиназа* (3) възстановяват трите молекули рибулозо-1,5-дифосфат, които акцептират CO_2 в първия етап.



Фиг. 3. Регенерация на рибулозо-1,5-дифосфат. (1) триозофосфат изомераза; (2) алдолаза; (3) фруктозодифосфатаза (алостерично се стимулира от фруктозо-1,6- P_2); (4) седохептулозодифосфатаза

Цикълът на Калвин се различава от пентозофосфатния път по замяна на обратимата алдолазна реакция на синтез на седохептулозо-7-фосфат с обратима седохептулозо-1,7-дифосфат алдолазна и необратима фосфатазна реакции (Фиг. 4). Това обезпечава еднопосочно превръщане на субстрата в пентозофосфати, които след изомеразна и епимеразна реакции се фосфорилират, регенерирайки акцептора на CO_2 . *Фосфорорибулокиназата* е втория ключов ензим в обменния път.

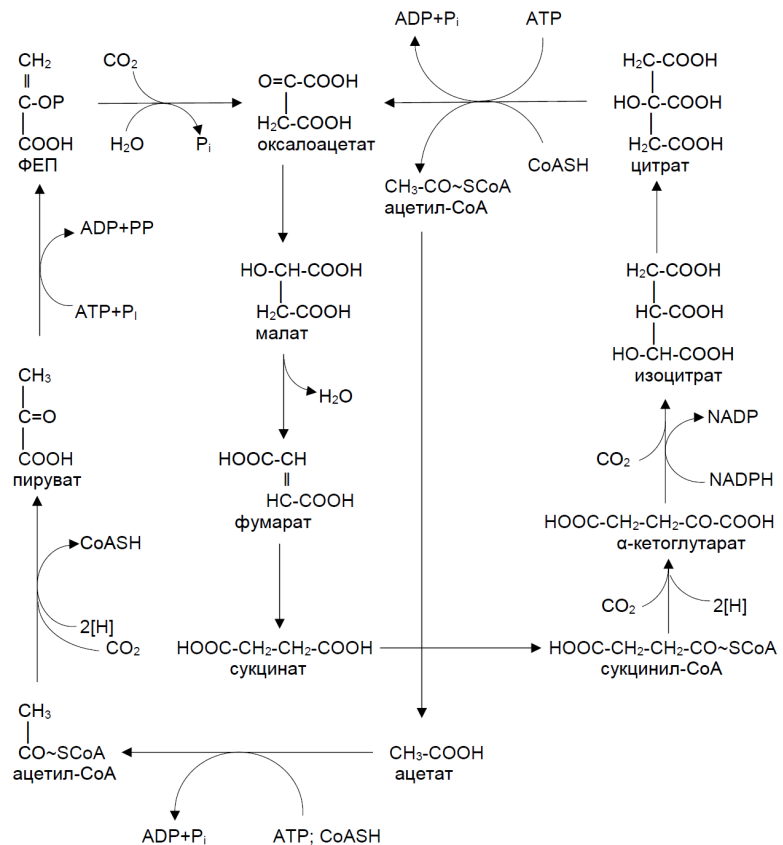
Функцията на цикъла на Калвин се свежда до осигуряване на органични предшественици за биосинтез на клетъчен материал. Фиксацията на CO_2 до нивото на глюкоза изисква 18 молекули АТФ и 12 редуциран NADP.



Фиг. 4. Цикъл на Калвин. 3-ФГ – 3-фосфоглицерат; ГАФ – глицералдехид-3-фосфат; ДХАФ – дихидроксиацетонфосфат.

2. Редуктивен цикъл на трикарбоновите киселини

Присъства при редица фототрофни и хемолитотрофни бактерии (ЦТК); нарича се още редуктивен С₄ цикъл (Фиг. 5). Фиксацията на CO₂ се осъществява с ензимите *α*-кетоглутарат дехидрогеназа и NADP-зависима изоцитрат дехидрогеназа. В хода на редуктивния ЦТК, цитратът се преобразува в оксалоацетат и ацетил-СоА. Ацетил-СоА взаимодейства със сукцинат, в резултат на което се получава сукцинил-СоА. Цикълът се допълва от анаплеротични реакции, чрез които се образуват ацетил-СоА, пируват и фосфоенолпируват. Всички микроорганизми, осъществяващи редуктивния цикъл притежават ензима *пируват: орто-фосфат дикиназа*, с който синтезират фосфоенолпируват от пируват. От фосфоенолпируват, с *ФЕП карбоксилаза* се получава оксалоацетат. Ключевите ензими за цикъла са също *малат дехидрогеназа* и *сукцинат дехидрогеназа*.



Фиг. 5. Редуктивен цикъл на трикарбоновите киселини.

Редуктивният ЦТК е обратим цикъл, в който *пируват дехидрогеназната* и *α-кетоглутарат дехидрогеназната* системи са заменени от ферредоксин-зависима *пируват синтетаза* и *α-кетоглутарат синтетаза*. Тези ензими катализират реакции на редукция на ацетил-СоА до пируват и на сукцинил-СоА до α-кетоглутарат.

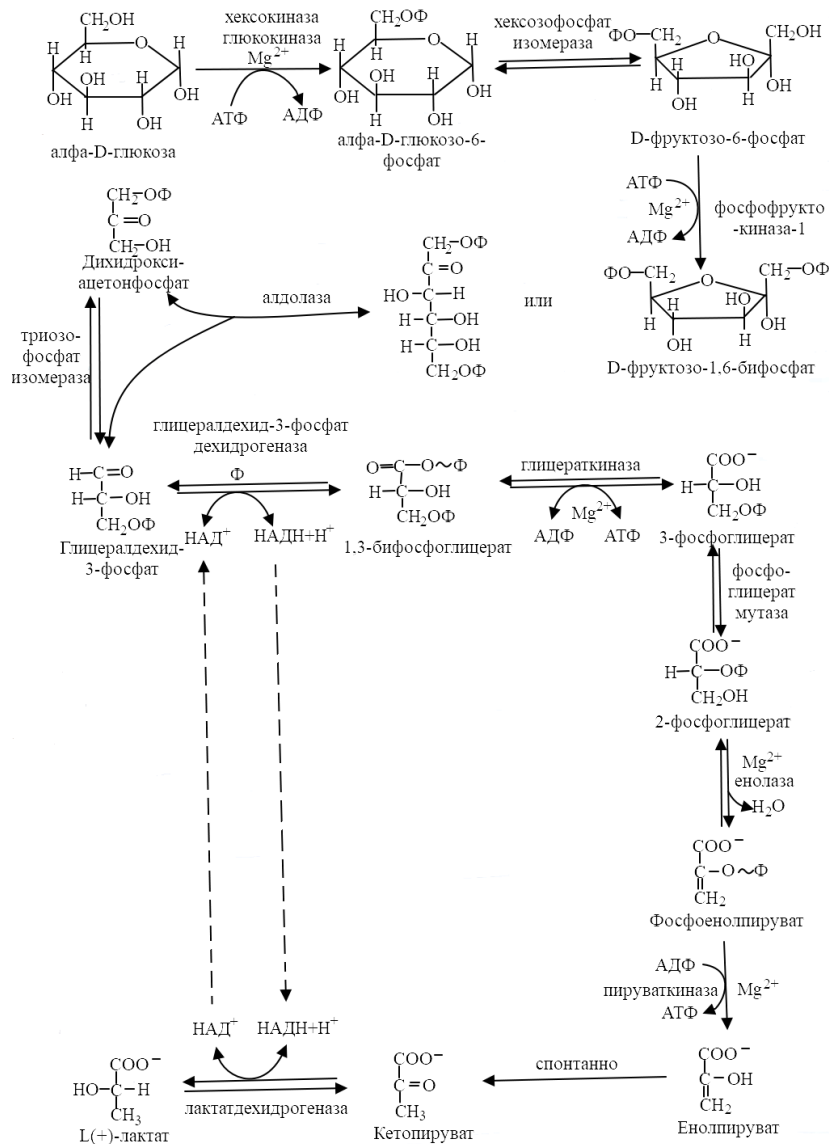
Редуктивният ЦТК е единствения цикличен път за асимилация на СО₂ при някои фототрофни бактерии, като *Chlorobium*.

1. Катаболизъм на въглехидрати

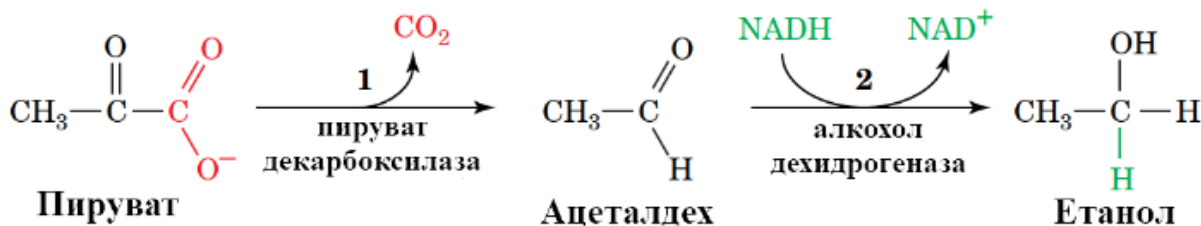
Въглехидратите са най-предпочитаният източник за окислително разграждане, в хода на което организмите получават енергия в използвана форма. Разграждането на въглехидратите протича в два етапа: 1) полизахаридите и олигозахаридите се разграждат до монозахариди; 2) монозахаридите се разграждат до CO_2 и H_2O .

Анаеробно разграждане на глюкоза – гликолитичен обменен път (гликолиза).

Разграждането на глюкозата (респ. др. монозахариди) в клетката започва в цитоплазмата, при анаеробни условия, по гликолитичния обменен път, наречен гликолиза. В хода на гликолизата, 1 молекула глюкоза се разгражда до 2 молекули пирогроздена киселина (пируват), а отделената енергия се съхранява в макроергични връзки – синтезира се АТФ (Фиг. 1., Г. Косекова – Лекции по биохимия).



Фиг. 1. Реакции в гликолитичната верига



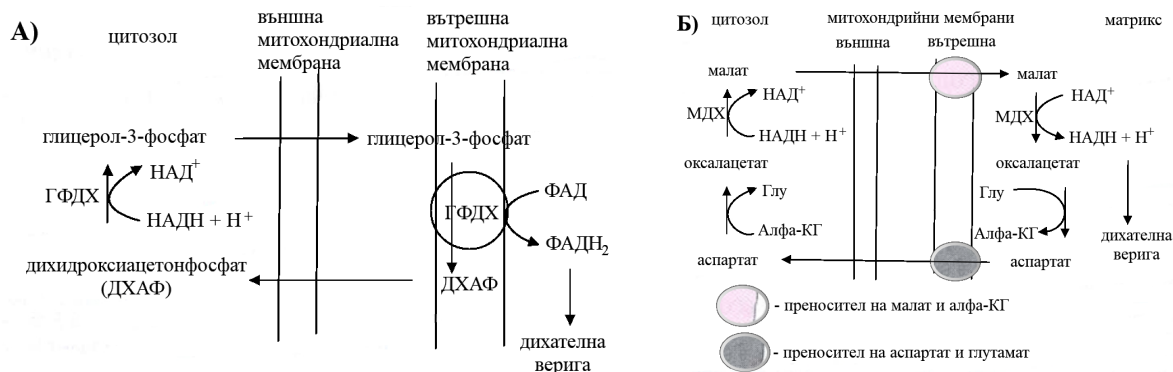
Фиг. 2. Анаеробно разграждане на пируват до етанол (алкохолна ферментация)

Разграждането на 1 молекула глюкоза по гликолитичната верига, в анаеробни условия, води до получаване на: 2 молекули пируват + 2H₂O + 4АТФ. От добитата енергия, под формата на АТФ, само 2 молекули АТФ са реален добив, тъй като в подготвителната фаза на гликолизата се изразходват 2 молекули АТФ.

При анаеробни условия, напр. при хлебни дрожди *Saccharomyces cerevisiae*, пируватът се превръща в етанол (алкохолна ферментация) (Фиг. 2. Voet & Voet, 5th Ed.)

Връзки меду гликолиза и дихателни вериги

Вътрешната митохондриална мембрана е непропусклива за НАДН и НАДФН, които се отделят в хода на окислителните процеси в цитоплазмата (вкл. гликолизата). Установени са 2 совалкови механизма, осъществяващи преноса на водород от цитоплазмата към митохондриите, където се осъществява транспортирането му по дихателните вериги до кислорода: 1) глицеролфосфатна совалка; 2) малатна совалка (Фиг. 3, Г. Косекова – Лекции по биохимия). При разграждане на 1 молекула глюкоза до 2 молекули пируват по гликолизата (2АТФ) и при използване на глицеролфосфатна совалка (4АТФ) или малатна совалка (6АТФ) се синтезират 6 и съответно 8 молекули АТФ. Глицеролфосфатната совалка действа в скелетните мускули и мозъка, а малатната совалка – в сърдечния мускул, черния дроб и мастната тъкан.



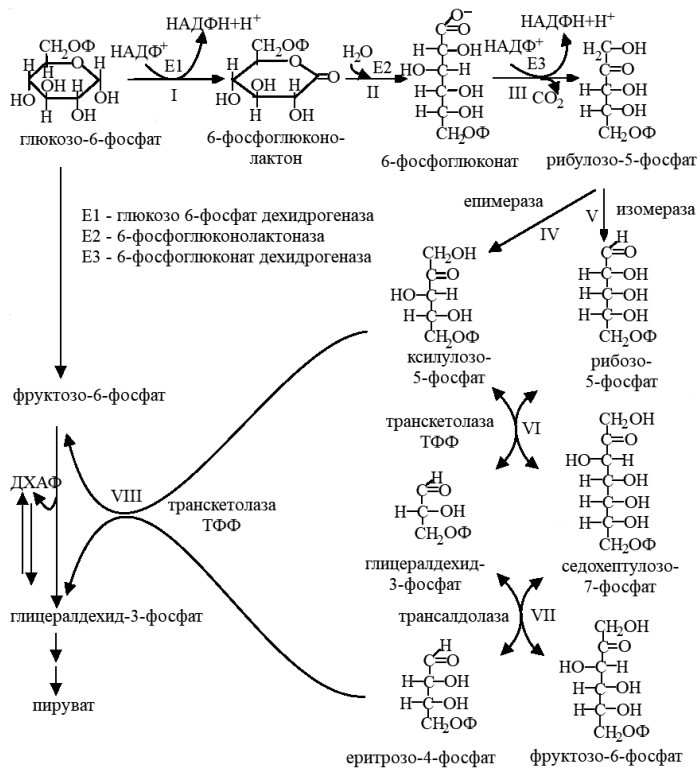
Фиг. 3 Совалкови механизми за пренос на водород от цитоплазмата към дихателните вериги в митохондриите. А) Глицеролфосфатна совалка. Б) Малатна совалка.

Съкращения: ГФДХ – глицеролфосфат дехидрогеназа; МДХ – малат дехидрогеназа; Глу – глутамат; α-КГ – α-кетоглутарат

Други пътища за разграждане на глюкоза

Пентозофосфатен път (ПФП)

ПФП протича в цитоплазмата при анаеробни условия и се отклонява от гликолизата на нивото на глюкозо-6-фосфат. Отново се влива в гликолизата на нивото на фруктозо-6-фосфат и глицералдехид-3-фосфат. В хода на ПФП се получава НАДФН, който е необходим за синтезните процеси. Получава се рибозо-5-фосфат, който се използва в биосинтеза на нуклеотиди, а от тях и на нуклеинови киселини. Полученият глицералдехид-3-фосфат се използва за получаване на глицерол-3-фосфат в мастна тъкан за синтеза на триацилглицероли (Фиг. 4, Г. Косекова – Лекции по биохимия).

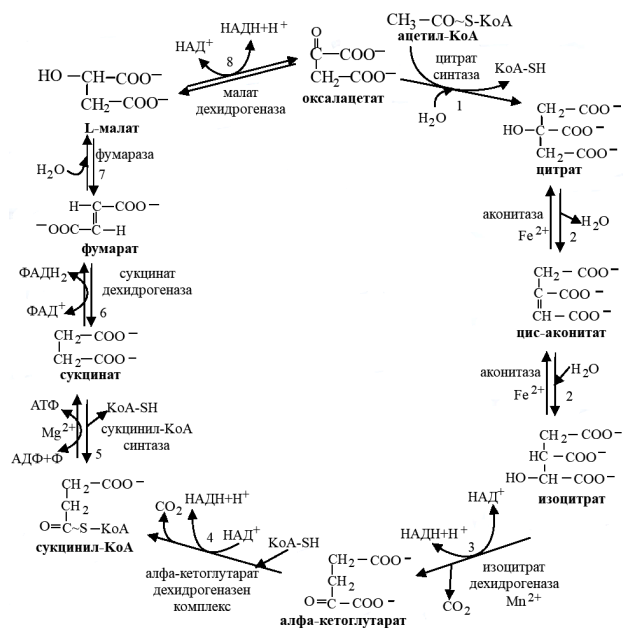


Фиг. 4. Пентозофосфатен път, в който 3 молекули глюкозо-6-фосфат се превръщат в 3 CO_2 , 2 фруктозо-6-фосфат и 1 глицералдехид-3-фосфат. Вляво вертикално е представена схематично гликолизата. В реакции VI и VIII, катализирани от транскетолаза, се пренасят C_2 -фрагменти. C_3 -фрагмент се пренася от трансалдолазата в реакцията VII.

Ензими: I – глюкозо-6-фосфат дехидрогеназа; II – лактоназа; III – 6-фосфоглюконат дехидрогеназа; IV – епимераза; V – изомераза; VI – транскетолаза; VII – трансалдолаза; VIII – транскетолаза.

Цитратен цикъл (цикъл на Кребс)

Серия от реакции, катализирани от осем ензима, които разграждат ацетиловата група на ацетил-КоА до CO_2 и H_2O (**Фиг. 5, Г. Косекова – Лекции по биохимия**). Протича в митохондриалния матрикс при аеробни условия. Главен източник на АТФ – отделя се водород от отделните метаболити, който се поема от НАД и ФАД и се подава към дихателните вериги – синтезира се АТФ. Главен катаболитен път за разграждане на въглехидрати, мазнини и белтъци. Цикълът на Кребс е тясно свързан и с анаболитните процеси – от негови метаболити започват важни синтезни пътища.



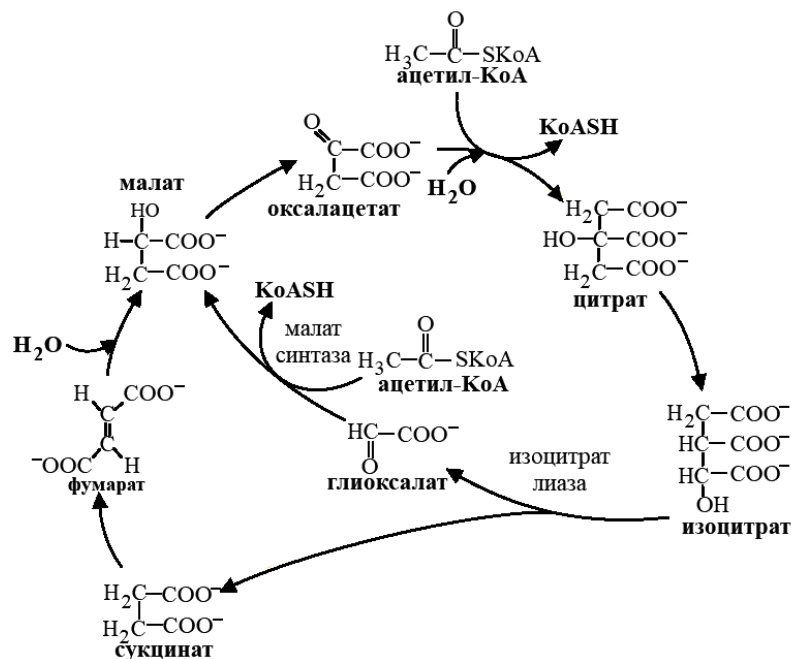
Фиг. 5. Реакции на цитратен цикъл. 1 – Кондензация на оксалацетат и ацетил-КоА до цитрат; 2 – превръщане на цитрат в изоцитрат; 3 – окислително декарбоксилиране на изоцитрат (като β -хидроксикиселина) до α -кетоглутарат; 4 – окислително декарбоксилиране на α -кетоглутарат (като α -кетокиселина) до сукцинил-КоА; 5 – енергията на тиоестерната макроергична връзка на сукцинил-КоА се пренася върху АДФ и се получава сукцинат и АТФ на субстрано ниво; 6 – Дехидрогениране на сукцинат до фумарат; 7 – хидратиране на фумарат до малат; 8 – дехидрогениране на малат до оксалацетат.

Енергиен добив от цитратния цикъл. От разграждането на 1 молекула ацетил-КоА в цикъла на Кребс се получават 12 молекули АТФ. От 1 молекула глюкоза се получават 2 молекули ацетил-КоА, от които се синтезират 24 молекули АТФ в комбинацията цикъл на Кребс + дихателни вериги.

Енергиен добив при анаеробно и аеробно разграждане на 1 молекула глюкоза до CO₂ и H₂O: гликолиза (2 молекули АТФ) + совалкови механизми за пренос на редуциращи еквиваленти (6/4 молекули АТФ) + окислително декарбоксилиране на пируват до ацетил-КоА (6 молекули АТФ) + цикъл на Кребс (24 молекули АТФ) = 38/36 молекули АТФ.

Глиоксалатен цикъл

Представява скъсен вариант на цикъла на Кребс. Характерен за някои микроорганизми и растения. При еукариотните организми е локализиран в специализирани цитоплазмени органели – глиоксизоми. От включени в цикъла 2 молекули ацетил-КоА се синтезира оксалацетат или негов предшественик от цитратния цикъл – малат, фумарат или сукцинат. Не се отделя CO₂ (не се разгражда органично съединение), но има окислителни стъпала – печели се енергия (макар и по-малко). Има синтетично значение – получения оксалацетат респ. малат да се използват за синтез на въглехидрати; да се синтезират аминокиселини. Използва се от микроорганизми и прорастващи растения за превръщане на мазнини във въглехидрати и в аминокиселини (белтъци) (Фиг. 6 Г. Косекова – Лекции по биохимия).



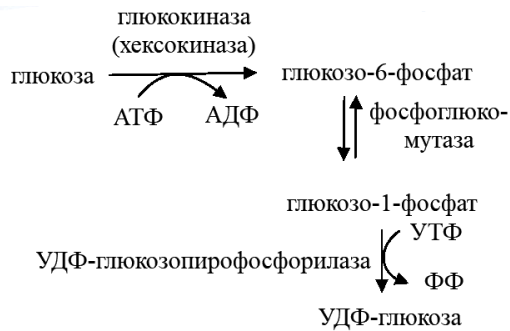
Фиг. 6. Глиоксалатен цикъл

2. Биосинтез на олиго- и полизахариди

Олигозахаридите са най-често междинен продукт от разграждането и/или биосинтезата на полизахаридите. Под действие на α -амилаза, вътрешните α -1,4-гликозидни връзки в хомополизахаридите скорбяла и гликоген биват хидролизирани до получаване на смес от малтоолигозахариди с разклонена структура. Под действие на α -1,6-гликозидаза, биват хидролизирани α -1,6-разклоненията в скорбялата и гликогена.

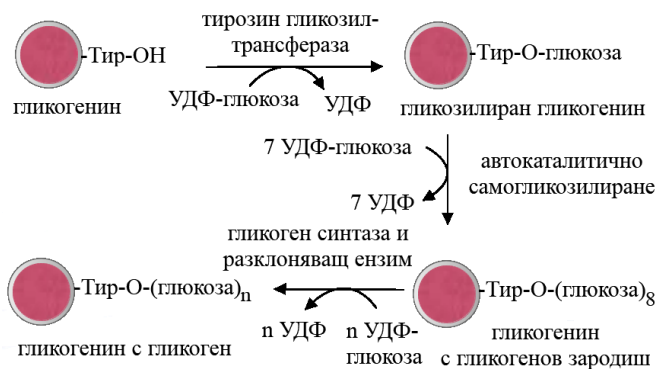
Биосинтез на гликоген

Синтезата на гликоген в започва с активиране на глюкозата до УДФ-глюкоза. Хексокиназа в мускулите и глюकोкиназа в черния дроб фосфорилират глюкозата до глюकोзо-6-фосфат (Фиг. 7. Г. Косекова, Лекции по биохимия).



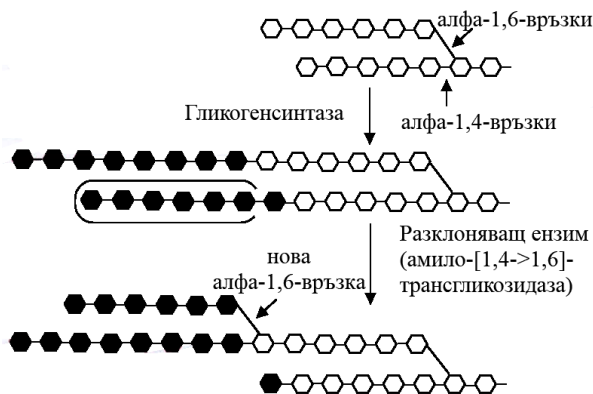
Фиг. 7. Активиране на глюкоза до УДФ-глюкоза при синтезата на гликоген

За синтезата на гликоген е нужен зародиш от поне 7 глюкозни остатъка, свързани с α -1,4-гликозидни връзки. Той се образува с участието на ензимите тирозин гликозилтрансфераза и гликогенин (автогликозилиращ се ензим) (**Фиг. 8. Г. Косекова, Лекции по биохимия**).



Фиг. 8. Образуване на гликогенов зародиш (праймер), с участието на тирозин гликозилтрансфераза и гликогенин

Полученият къс фрагмент е зародишът, необходим за действие на гликоген синтазата. Тя удължава веригата, добавяйки един по един глюкозни остатъци от УДФ-глюкоза към нередуциращия край на веригата, образувайки α -1,4-гликозидни връзки (**Фиг. 9. Г. Косекова – Лекции по биохимия**).



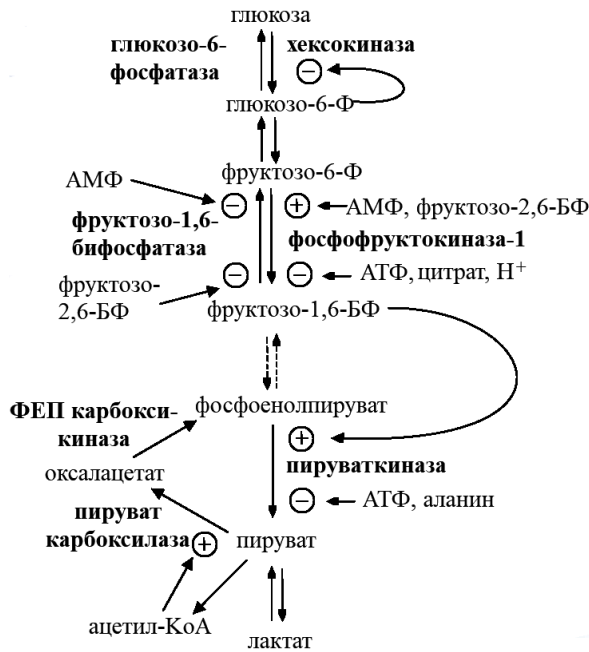
Фиг. 9. Действие на гликоген синтаза за удължаване на веригата и на амило-(1,4->1,6)-трансгликозидаза за разклоняване на веригата. Синтазата прехвърля глюкозни остатъци (един по един) от УДФ-глюкоза към нередуциращия край на веригата, а разклоняващият ензим прехвърля фрагмент от 7 остатъка от главната верига към -ОН група на 6-о място в глюкозен остатък от същата или друга верига.

3. Регулация на въглехидратния метаболизъм

Регулация на гликолиза и глюконеогенеза

Гликолизата и глюконеогенезата не протичат едновременно, а се регулират реципрочно, в зависимост от нуждите на организма. Регулаторни ензими за глюконеогенеза са: пируват карбоксилаза, ФЕП карбоксикиназа, фруктозо-1,6-бифосфатаза и глюкозо-6-фосфатаза (**Фиг. 10, Г. Косекова – Лекции по биохимия**). Катализираните реакции са екзергонични и необратими. Най-важният регулаторен ензим при глюконеогенезата е фруктозо-1,6-бифосфатазата – инхибира се алостерично от фруктозо-2,6-бифосфат, който активира фосфофруктокиназа-1 от гликолизата. Ба-

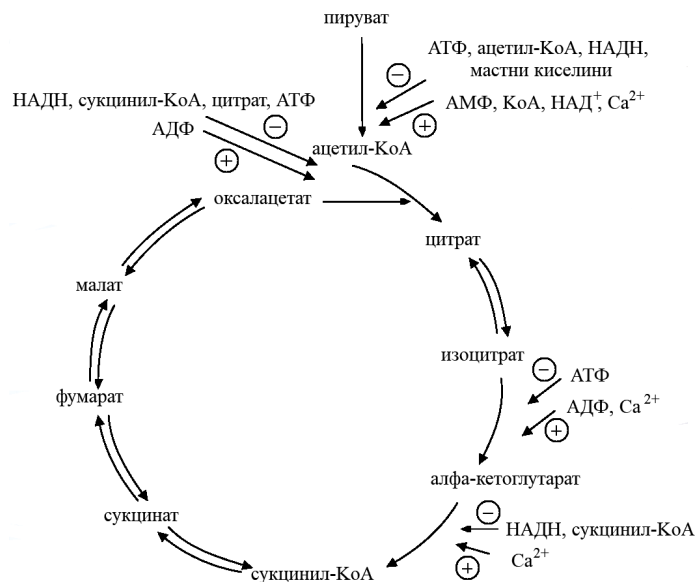
лансът между гликолиза и глюконеогенеза е под хормонален контрол. В черния дроб, при ниско ниво на глюкоза, глюкагонът стимулира образуване на АМФ, който активира протеин киназа А да фосфорилира фосфофруктокиназа-2 (инактивиране) и фруктозо-2,6-бифосфатаза (активиране). Това инактивира фосфофруктокиназа-1 и активира фруктозо-1,6-бифосфатаза. Това измества равновесието в полза на глюконеогенезата. Високо ниво на глюкоза намалява концентрацията на цАМФ, увеличава концентрацията на фруктозо-2,6-бифосфат и това стимулира гликолизата.



Фиг. 10. Регуляция на глюконеогенеза и гликолиза.

Регуляция на цикъла на Кребс

В цикъла на Кребс има 3 регулаторни ензима: цитрат синтаза, изоцитрат дехидрогеназа, α -кетоглутарат дехидрогеназен комплекс. Значение има и пируват дехидрогеназния комплекс (ПДХК), който доставя ацетил-КоА (Фиг. 11, Г. Косекова – Лекции по биохимия).



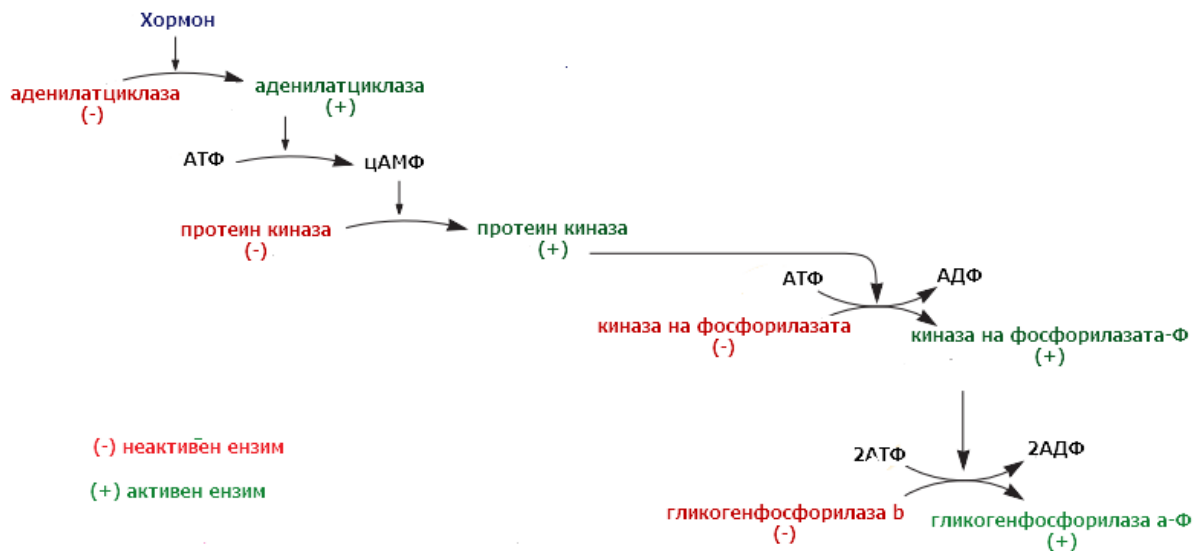
Фиг. 11. Регуляция на пируват дехидрогеназен комплекс и цитратен цикъл. Знакът плюс показва активиране, а минусовият знак – инхибиране

ПДХК се инхибира алостерично от висока концентрация АТФ, НАДН и ацетил-КоА – показател за наличие на енергия и субстрати. АМФ, КоА и НАД⁺ активират алостерично ПДХК. Интезитетът на цитратния цикъл намалява при недостиг на субстратите (оксалацетат и ацетил-КоА) или НАД⁺. Сукцинил-КоА, АТФ и цитрат са алостерични инхибитори на началните реак-

ции на цикъла. Калциевите йони сигнализируют мускулно съкращение и стимулират окислителните реакции, доставящи енергия в използваем вид.

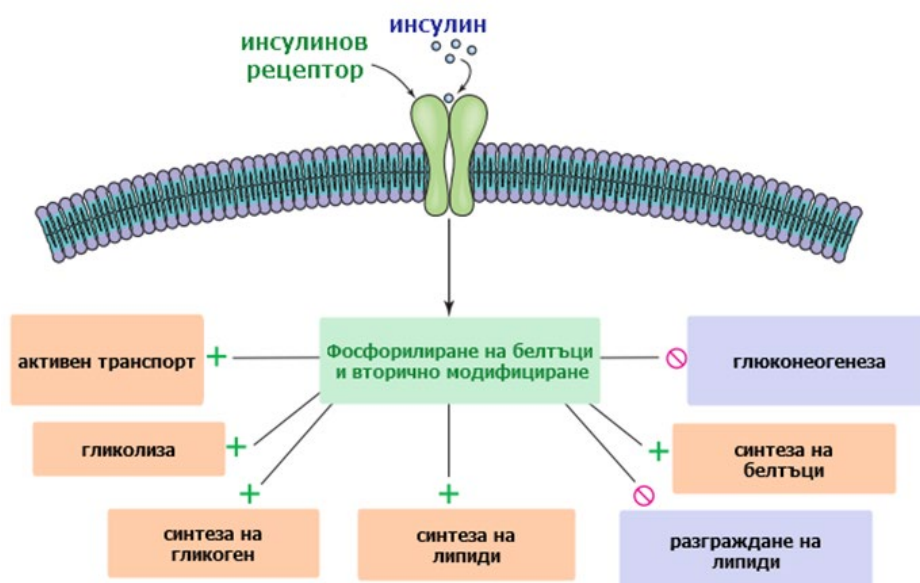
Регулация на гликогеновия метаболизъм

Глюкагон и епинефрин (адреналин) стимулират разграждането на гликогена (гликогенолиза) – епинефрин активира гликогенолизата в черния дроб и в мускулите. Хормон-активирана ензимна каскада активира гликоген фосфорилазата, водеща до разграждането на гликогена (Фиг. 12, Garrett & Grisham, 6th ed.).



Фиг. 12. Хормон-активирана ензимна каскада активира гликоген фосфорилазата

Инсулинът стимулира синтеза на гликоген, чрез активиране на фосфопротеин фосфатаза, която дефосфорилира гликоген синтаза b (неактивна) и я превръща в активна форма (гликоген синтаза a) (Фиг. 14, Garrett & Grisham, 6th ed.).



Фиг. 13. Ефекти на инсулина върху гликогеновия метаболизъм и ковалентното модифициране на регулаторни ензими

Динамичното състояние на белтъците в организма е свързано с процеси на непрекъснато разграждане. При животните и човека, разграждането на белтъците има и смилателна стойност – постъпващите с храната белтъци се разграждат до α -аминокиселини (АК), които се усвояват от организма. Разграждането на белтъците е хидролитно – извършва се от протеолитични ензими, наречени пептидхидролази (протеази), които хидролизират пептидните връзки, при което се получават по-къси белтъчни фрагменти (пептиди) и свободни аминокиселини. Протеази се синтезират от всички живи организми, като изпълняват разнообразни функции – храносмилателна, защитна, регулаторна и др. Според мястото си на действие в полипептидната верига, протеазите се разделят на две основни групи ендопептидази и екзопептидази. Ендопептидазите хидролизират връзки във вътрешността на полипептидната верига, като повечето от тях проявяват специфичност по отношение на аминокиселините, участващи в образуването на пептидната връзка (трипсин, химотрипсин, пепсин, ренин, тромбин, плазмин, еластаза, колагеназа, кератиназа, протеази с растителен произход, като папаин, химопапаин, фицин, бромелин, както и някои микробни протеази).

Пепсин, трипсин, химотрипсин и ренин са смилателни ендопептидази при животинските организми. Те се отделят извън клетката и действат в средата или в кухината на храносмилателния тракт. Тези ензими се синтезират в клетките в неактивна форма – като преензими или зимогени и се активират извън клетките. Това е защитен акт на организма срещу нежелано вътреклетъчно действие. Активирането се състои в отделяне на части от полипептидната верига, които блокират активния център.

Екзопептидазите хидролизират крайни пептидни връзки в полипептидната верига, което води до освобождаване на аминокиселини и дипептиди. Разделят се на: карбоксипептидази – отделят АК със свободна карбоксилна група от С-края на полипептидната верига и аминокиселини – отделят АК със свободна амино група от N-края на полипептидната верига.

Хидролизното разграждане на белтъците води до получаване на 20 α -АК, които се подлагат на разграждане (катаболизъм).

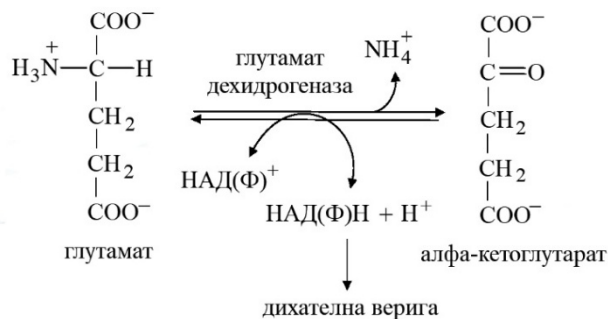
Катаболизъм на α -аминокиселини

Разграждането на аминокиселините започва с отделяне на амино групата.

Дезаминиране на АК – отделяне на аминокиселината от АК като амоняк.

Окислително дезаминиране

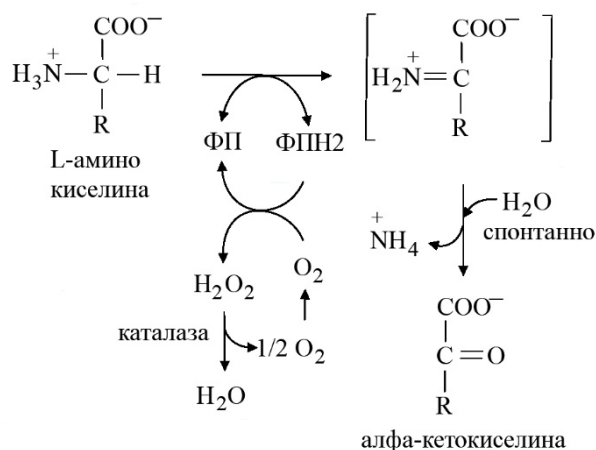
Единствено глутаматът се дезаминира окислително с ензима глутамат дехидрогеназа, която пренася отделения водород върху НАД, който се редуцира и по дихателната верига се синтезират теоретично 3 молекули АТФ. Азотът се отделя като амониев йон (Фиг. 1).



Фигура 1. Окислително дезаминиране на глутамат под действие на ензима глутамат дехидрогеназа (Косекова Г. и съавт., 2010)

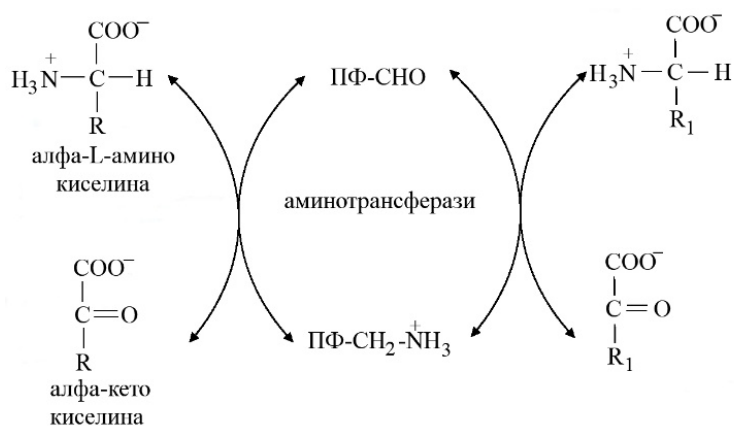
С изключение на глутамат, всички останали АК се дехидрогенират от ензими, свързани с флавинова редокс-система, която е свързана с аеробни дехидрогенази и отдава водорода дирек-

тно на кислорода с образуване на водороден пероксид H_2O_2 – процес, при който не се печели енергия. Ензимите, които катализират този процес се наричат аминоксидози (Фиг. 2).



Фигура 2. Окислително дезаминиране на L-аминокиселини (Косекова Г. и съавт., 2010)

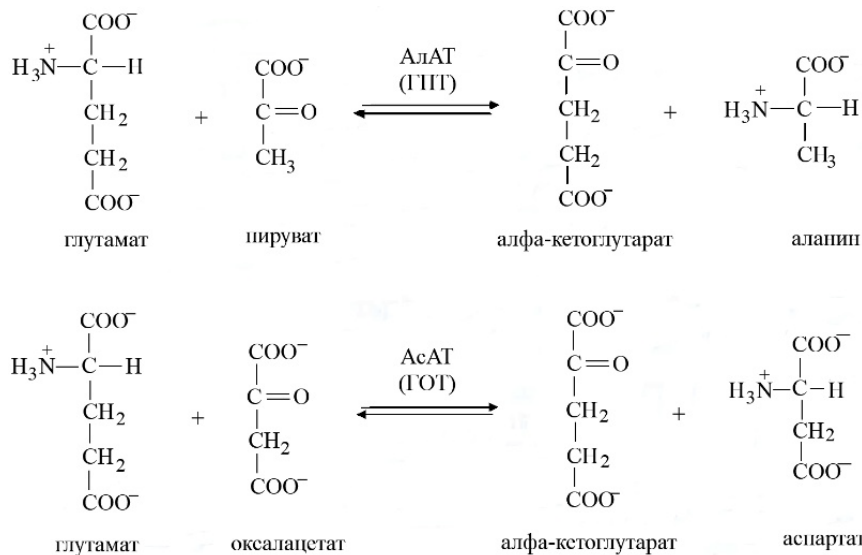
Трансаминиране на АК – прехвърляне на amino група от една АК към кетокиселина, при което АК се превръща в кетокиселина, а кетокиселината в аминокиселина. Широко застъпен процес в животински организми и микроорганизми. Ензимите, които катализират този процес са аминотрансферази, които действат с коензим пиридоксал фосфат (ПФ) (Фиг. 3).



Фигура 3. Трансаминиране на аминокиселина и кетокиселина под действие на аминотрансферази с кофактори пиридоксал фосфат (ПФ-СНО) и пиридоксаминфосфат (ПФ-СН₂-NH₃⁺) (Косекова Г. и съавт., 2010)

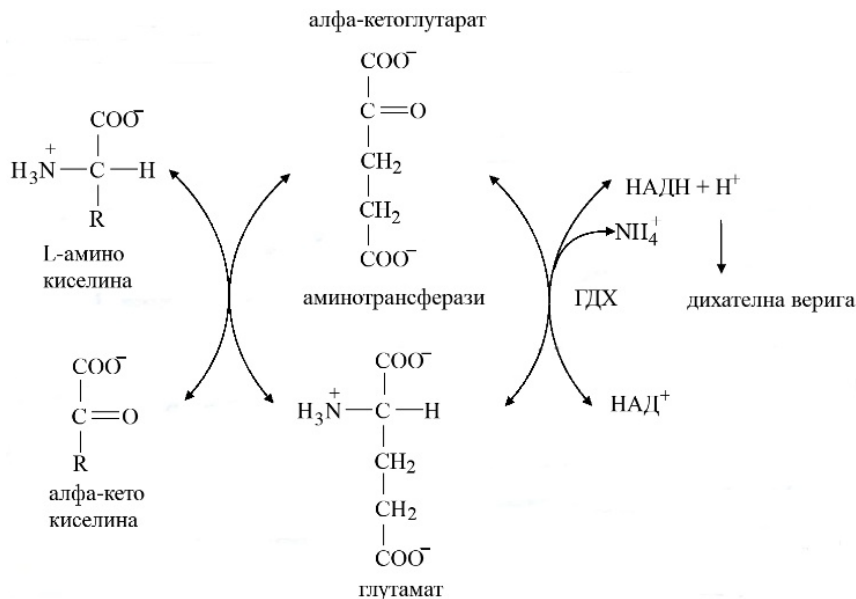
Като примери се представят реакциите, катализирани от аланин аминотрансферазата (АлАТ) и аспартат аминотрансфераза (АсАТ). Amino групата на глутамата се прехвърля към кетокиселината пируват. При отделяне на amino групата, глутаматът се превръща в α-кетоглутарат. Прехвърлянето на amino групата към пируват води до получаване на аминокиселината аланин. Тази реакция се катализира от аланин аминотрансферазата. Аспартат аминотрансферазата катализира прехвърляне на amino групата от глутамат към кетокиселината оксалацетат, който се превръща в аминокиселината аспартат (Фиг. 4).

При трансаминирането amino групите не се отделят като амоняк, но процесът има значение за превръщането на кетокиселините (продукти от въглехидратната обмяна) в АК и обратно т.е. осъществява се връзка между обменните пътища на белтъци и въглехидрати. Чрез трансаминирането се регулира в качествено отношение АК резервоар в клетките в зависимост от нуждите на белтъчната биосинтеза.



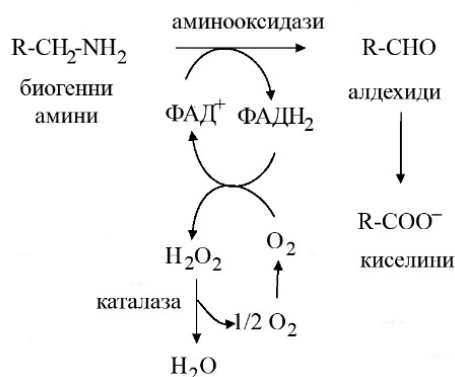
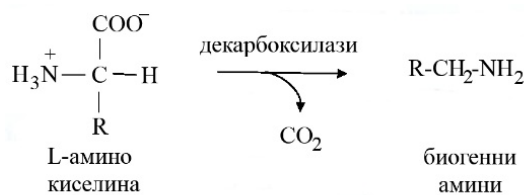
Фигура 4. Реакции, катализирани от аланин аминотрансферазата (АлАТ) и аспаргат аминотрансфераза (АсАТ). (Косекова Г. и съавт., 2010)

Трансдезаминиране на АК – комбинация между трансаминиране и окислително дезаминиране на глутамат, който е единствената АК, дезаминираща се с енергетичен добив. Ако АК се трансаминира с α -кетоглутарат ще се получат различни кетокиселини и глутамат. Глутаматът се подлага на окислително дезаминиране, отделя се амоняк и отново се превръща в α -кетоглутарат, с което се затваря кръгов процес. Така се осигурява бързо и лесно дезаминиране на всички АК (Фиг. 5).



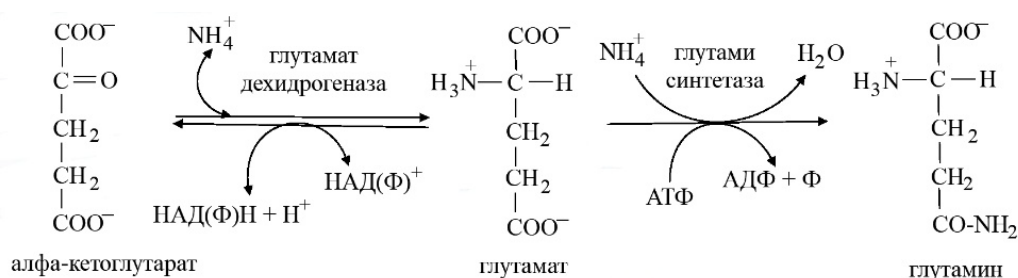
Фигура 5. Обща схема на трансдезаминиране. (Косекова Г. и съавт., 2010)

Декарбоксилиране на АК – отделяне на CO₂ от АК. Процесът се катализира от декарбоксилази. Страничен обменен път за АК при растенията и животинските организми. При микроорганизмите декарбоксилирането на АК е широко застъпен процес и обикновено доминира над дезаминирането като главен обменен път. Получават се амини, които в малки количества упражняват физиологични и фармакологични ефекти върху организмите и се наричат биогенни амини. Отстраняването на биогенните амини от клетките включва окислително им дезаминиране до алдехиди. Процесът се катализира от аминоксидази, които действат с ФАД и в резултат на дехидрогенирането се получава H₂O₂. Получените алдехиди се окисляват до карбоксилни киселини, които се включват в катаболитните пътища на мастните киселини. (Фиг. 6).



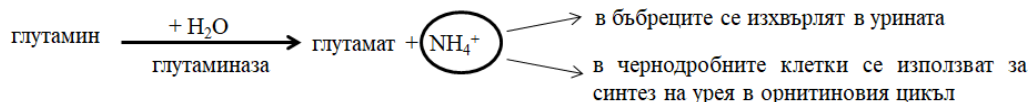
Фигура 6. Декарбоксилиране на аминокиселини до биогеинни амини и тяхното обезвреждане (Косекова Г. и съавт., 2010)

Обезвреждане на токсичния амоняк, отделен при разграждане на аминокиселините става чрез свързването му в използваема и нетоксична форма. Това става чрез редуktivно аминироване на α -кетоглутарат и синтез на глутамин (Фиг. 7). Глутаминът се синтезира в мозъка и други тъкани. Тази аминокиселина е транспортна форма на включения в нея амоняк.



Фигура 7. Редуktivно аминироване на α -кетоглутарат и синтез на глутамин (Косекова Г. и съавт., 2010)

Глутаминът лесно преминава през мембрани, тъй като е незареден и е източник на безвреден амоняк, който може да се използва за различни синтези. По кръвен път се пренася до черния дроб, бъбреци и други тъкани. Под действие на ензима глутаминаза, глутамин се разгражда хидролитно до глутамат и амониев йон:



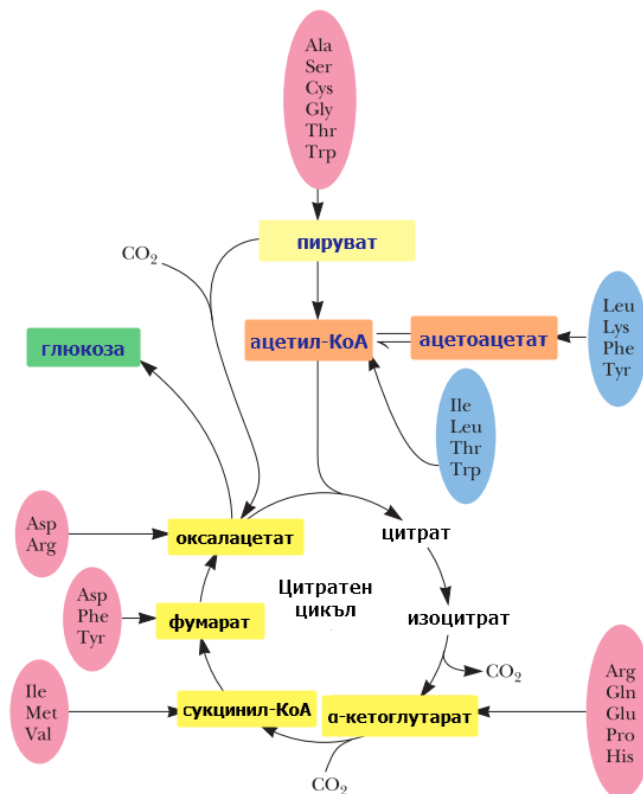
Разграждане въглеродния скелет на аминокиселините

В зависимост от това до какви метаболити се разграждат АК, се разделят на гликогенни, кетогенни и смесени (Фиг. 8).

Гликогенни АК – при разграждане се превръщат в предшественици на глюкозата (пируват, оксалацетат, α -кетоглутарат, фумарат, сукцинил-КоА).

Кетогенни АК – при разграждане се превръщат в ацетоацетат, ацетил-КоА, ацетоацетил-КоА

Смесени АК – при разграждането им може да се получат както предшественици на глюкозата, така и на кетоновите тела.



Фигура 8. Обобщена схема за разграждане на гликогенни аминокиселини и кетогенни аминокиселини (R. Garrett & C. Grisham, 2010)

Основни закономерности при разграждане на аминокиселини

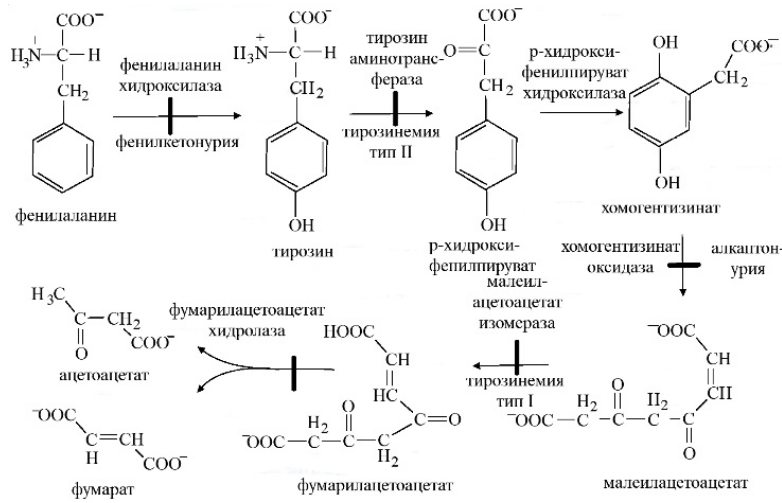
Азотът на АК се отделя като амоняк, а при аргинин се отделя като урея (карбамид). Съдържащите сяра АК губят свързаната сяра чрез пренасяне (при метионин), отделяне в неокислена форма (сулфид) или в окислена форма (сулфит). Въглеродните скелети на АК чрез различни реакции се включват в основните катаболитни пътища – гликолиза или цикъл на Кребс.

Някои АК достигат до две от посочените места, защото имат различни пътища на разграждане или при своя път на разграждане дават два различни продукта. Повечето АК дават отклонения от основните пътища за разграждане, което води до различни крайни продукти, някои от които имат специфично биологично действие. При някои от тези отклонения АК се превръщат една в друга. При разграждане на някои АК се отделят едновъглеродни групи: формилни (-CHO), формиминни (-CH=NH), хидроксиетилни (-CH₂OH), метилови (CH₃), които чрез трансферни процеси вземат участие в синтеза на важни от биологична гледна точка метаболити. Като преносител на тези групи се явява кофакторът тетраhydroфолиева киселина (ФКН4), която се получава от фолиева киселина (ФК). С ензимния белтък (специфични трансферази) ФКН4 се свързва посредством ковалентна връзка. В образуването на връзката взема участие карбоксилната група на глутаминовата киселина от кофактора.

Като пример се представя разграждане на фенилаланин и тирозин.

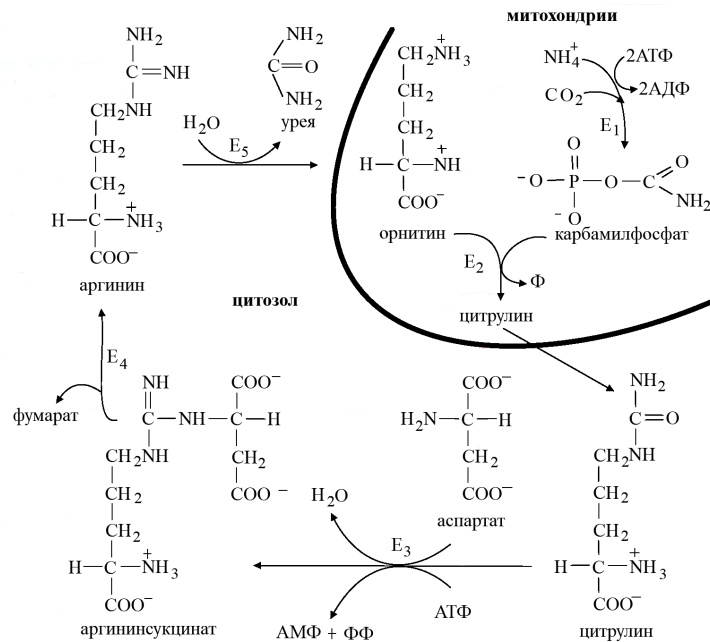
Нормалният път за разграждане на фенилаланин в тъканите е хидроксилирането му до тирозин – реакцията се катализира от фенилаланин хидроксилаза (Представя се реакцията, Фиг. 8 – 20, стр. 279). При недостатъчност на някои от ензимите, необходими за разграждането на тези две аминокиселини се развиват някои заболявания. При невъзможност да се хидроксилира, фенилаланинът се дезаминира до фенилпируват, който със своите производни фениллактат и фенилацетат се натрупват като крайни продукти – при деца това води до нарушаване на умственото развитие. Тирозинът може да се включи в синтеза на важни от биологична гледна точка съедине-

ния: хормони на щитовидната жлеза; хормона на сърцевината на надбъбречните жлези – адреналин; меланин – кожен пигмент или да се декарбоксилира до биогенния амин тирами (Фиг. 9).



Крайно обезвреждане на амоняка в уреен (орнитин) цикъл

Орнитиновият цикъл протича в чернодробните клетки – част от реакциите протичат в митохондриите, а друга част в цитозола. В този обменен път се извършва крайно обезвреждане на токсичния амоняк до урея. Уреята се синтезира от амоняк, CO₂ и азота от α-аминогрупата на аспартат. За получаване на 1 молекула безвредна урея в уреиния цикъл се изразходват 3 молекули АТФ. Уреята е крайния продукт на азотния катаболизъм при човека (при човека липсва ензима уреаза, който разгражда уреята до CO₂ и 2NH₃) (Фиг. 10).



Орнитиновият цикъл е свързан с цикъла на Кребс (цитратен цикъл) чрез обмен на метаболити и енергия. Цикълът на Кребс доставя на уреиния цикъл необходимите CO₂ и АТФ. Полученият фумарат в уреиния цикъл, в митохондриите може да се включи в цикъла на Кребс и да се превърне в оксалацетат, който чрез трансаминиране да се превърне в аспартат (необходим за уреиния цикъл).

Появата на тъканите при растенията е резултат от еволюционния преход от водна към сухоземна среда и от необходимостта от приспособяване към специфичните условия на сушата. Този преход налага функционалното специализиране на еднородни по структура и взаимно свързани клетки, които да изпълняват определени физиологични функции в растителния организъм.

Растителните тъкани представляват съвкупност от клетки с еднаква форма, външна и вътрешна структура, специализирани за изпълнение на определена функция и имащи общ произход в онтогенезата. Клетките в тъканите са тясно свързани помежду си чрез плазмодезми при живите клетки или посредством механични връзки при мъртвите клетки.

Класифицирането на тъканите се основава на различни критерии. Според произхода си, както недиференцираните, така и трайните биват *първични* и *вторични*. Първичните водят началото си от зиготата и зародишната меристема, която формира зародишни листа, стъбло и коренче. Вторичните тъкани възникват в онтогенезата от трайни тъкани, които вторично преминават към меристемно състояние. Намират се в стъблото и корена на многогодишните видове.

Според физиологичната функция и степента на диференциация те се разделят на *недиференцирани* и *диференцирани тъкани*. Недиференцираните образуват непрекъснато нови клетки и осигуряват нарастването на растенията. Наричат се още образувателни (делителни, меристемни). Диференцираните тъкани (трайни) изпълняват различни функции (защитна, опорна, хранителна, проводяща и др.). Трайните тъкани биват основни (паренхимни), покривни, механични, проводящи и отделителни.

Образувателните тъкани, наричани още меристеми, се характеризират с интензивна делителна активност. Техните клетки са млади, малки, с тънки първични клетъчни стени, голямо ядро и слабо развита вакуоларна система. Меристемите осигуряват растежа на растенията през целия им живот. В зависимост от произхода образувателните тъкани са зародишни, първични и вторични. Според местоположението си първичните образувателни тъкани са върхни, вмъкнати и странични. Върхните се намират във върховете на корена и стъблото и осигуряват нарастване на дължина. Вмъкнатите се разполагат в основата на междувъзлията и допринасят за удължаването им. Страничните (прокамбий и перицикъл) се намират в стъблото и корена на растенията. Прокамбият се разполага между проводящите тъкани на стъблото и дава възможност за тяхното нарастване. Перицикълът се разполага между външния и вътрешния цилиндър на корена. Той образува страничните корени. Вторичните меристеми – камбий и фелоген са характерни за многогодишните растения. Те осъществяват задебеляването на стъблото и корена.

Основните или паренхимни тъкани заемат най-голям обем в растителния организъм. Те се състоят от живи, тънкостенни клетки с различна форма и големина. Паренхимът изпълнява разнообразни функции, свързани с фотосинтеза, запасяване и газообмен. Асимилиращият паренхим съдържа хлоропласти и е отговорен за протичане на фотосинтезата. Среща се във всички зелени части на растението. Най-типичен е в листата и стъблата на тревистите растения. Резервният паренхим натрупва запасни вещества като скорбяла, белтъци и липиди. Намира се в семната, плодовете, корените, гредките, луковичите и кореноплодите. Въздухоносният паренхим улеснява газообмена и е характерен за водни и блатни растения. Клетките на водоносния паренхим са тънкостенни, едри, с голяма вакуола, изпълнена с вода и разтворени в нея слезести вещества, захари, органични киселини и др. Среща се при сукулентните растения.

Покривните тъкани защитават растението от неблагоприятни външни въздействия. Те образуват външната повърхност на органите и регулират обмена на вещества с околната среда. В зависимост от произхода си биват първични и вторични. Към първичните се отнасят епидермата и екзодермата. Епидермата покрива надземните органи на растенията – листата, младите стъбла, цветните части и плодовете. Клетките на епидермата са плътно подредени и обикновено лишени от хлоропласти. В нея се разполагат устица, които осъществяват газообмен и транспирация. При по-стари органи епидермата се заменя от вторична покривна тъкан – перидерма (корк). Екзодермата покрива подземните части на растенията (корена) и се образува след разрушаването на всмукващата тъкан (ризодермата). Екзодермата изпълнява защитна функция.

Механичните тъкани придават здравина и устойчивост на растителното тяло. Те са приспособени да издържат на опън, натиск и огъване. Основните типове механични тъкани са коленхим и склеренхим. Коленхимът се състои от живи клетки с неравномерно удебелени първични стени и осигурява еластична опора. Склеренхимът е изграден от мъртви клетки със силно удебелени и лигнифицирани вторични стени. Той осигурява механична устойчивост на органите, които вече са завършили развитието си.

Проводящите тъкани осъществяват транспорта на вода, минерални вещества и органични съединения. Те са представени от ксилема и флоема. Ксилемата транспортира вода и разтворени минерални соли от корена към надземните органи. Основните елементи на тази тъкан са трахеи, трахеиди, паренхимни клетки и склеренхимни влакна. Флоемата пренася органични вещества, образувани при фотосинтезата, към различните части на растението. Флоемата е съставена от решетести клетки, решетести цеви, придружаващи клетки и склеренхимни влакна.

Функцията на **отделителните тъкани** е да отделят или натрупват продукти, получени при обмяната на веществата в растението. Отделяните вещества са секрети – физиологично полезни (хормони, ферменти), и екскрети – безполезни, крайни продукти на обмяната. Химичната природа на отделяните вещества е разнообразна – вода, захари, белтъчни вещества, дъбилни вещества, етерични масла, слизести вещества, смоли, соли, неорганични вещества и др. Тези вещества могат да се отделят навън от растението или да се натрупват в самото растение в отделни клетки или във вътрешни вместилища и канали.

Отделителните структури се класифицират в две големи групи: външни – когато секретираното вещество се отделя навън от растението, и вътрешни – когато секретираното вещество остава вътре в растението.

Външни секреторни структури

Разположени са на повърхността на растението и отделят секрети навън. Към тях се отнасят жлезисти власинки (трихоми), жлезисти полета (осмофори), водни устица (хидатоиди) и нектарници.

Жлезистите власинки са образувания на епидермата. Те са живи и специализирани да отделят секрети (етерични масла, смолисти и слизести вещества). Отделянето става от една или няколко излъчващи клетки, чийто секрет се отделя в пространството между клетъчната обвивка и кутикулата на отделящите клетки, която често се разкъсва и секретът излиза навън. При някои секретът се отделя заедно с излъчващата клетка (лудо биле). Жлезистите власинки могат да бъдат главести или люсповидни. Главестите власинки са с една (мушкато, индрише и др.) или с няколко излъчващи клетки (четири при домат). Люсповидните (седащи) жлезисти власинки се срещат при етеричномаслените растения от сем. Устноцветни. В зависимост от веществата, които отделят, жлезистите власинки биват маслени (при сем. Устноцветни, Черничеве, Сложноцветни и др.), смолисти (по люспите на презимуващите пъпки на брезата, тополата и др.), водни (по листата на фасула, нахута и др.), парливи (коприва), солни (образуват се при халофитни растения) и др. При насекомоядните растения са обособени външни жлезисти структури, които по тип също са жлезисти трихоми и отделят сок, близък до стомашния (смилателни жлези).

Осмофорите представляват жлезисти полета, разположени във венчелистчетата или другите части на цвета. Изградени са от няколко реда клетки, които отделят летливи ароматни вещества, на които се дължи ароматът на цветовете при редица растения (нарцис, казанлъшка роза, момина сълза, салеп и др.). Отделянето на секрета става за кратко време и е свързано с изразходването на големи количества запасни вещества.

Хидатодите (водни устица) имат подушна стаичка, рехаво разположена паренхимна тъкан с плътно допрени до нея трахеи, но се различават от другите устица по мъртвите затварящи клетки и по това, че винаги са отворени. Те отделят вода от вътрешността на листата върху повърхността им във вид на капки – процесът се нарича гутация. В отделената вода се съдържат захари, соли и др.

Нектарниците са епидермални клетки или няколко реда клетки, разположени под епидермата, в близост до проводящите тъкани, най-често по цветовете на растенията. Нектарниците отделят вода с разтворени в нея вещества (нектар). Нектарът е гъст, сладък сок, който привлича насекоми опрашители. Той съдържа вода, захари (глюкоза, захароза, фруктоза), слизести вещества и др. Нектарът се отделя навън през клетъчната обвивка и разкъсаната кутикула или през устицата.

Вътрешни секреторни структури

Вътрешните секреторни структури са разположени във вътрешността на растенията в различни техни органи. Те натрупват в себе си отделяните вещества, излъчват ги в специални вместилища или в междуклетъчните пространства. Вътрешните отделителни структури са секреторни клетки, секреторни вместилища, секреторни канали и млечни цеви.

Секреторните клетки се срещат поединично разпръснати между клетките на останалите тъкани, от които се различават по форма. В зависимост от веществата, които съдържат, се различават: етеричномаслени секреторни клетки – в листата на дафиновото дърво, камфоровото дърво, в корените на диланката, перуниката и др.; слизести клетки – в плодовете на бамята, в корените на медицинската ружа и слеза; танинови клетки – в проводящите снопчета (ликото) на шарения фасул, бъза; кристалоносни клетки (оксалатни) – срещат се в почти всички растения и съдържат прости кристали, друзи или иглести кристали.

Секреторни вместилища и канали се образуват във всички растителни части под формата на кръгли празнини или канали, получени по схизогенен и лизигенен начин. При схизогенното формиране жлезистите клетки се раздалечават и образуват празнина, постлана със секреторни клетки. В нея се събира секретираното от клетките вещество. Секретът се отделя периодично. Празнините могат да бъдат кръгли вместилища (жълт кантарион) или канали. Смолисти канали се формират в иглолистните растения (бор, смърч), които образуват цяла система в растението. Схизогенни етеричномаслени канали има в растенията от сем. Сенникоцветни (магданоз, копър, анасон, целина). Лизигенните вместилища се формират от група излъчващи клетки, които, след като образуват секрета, по ензимен път разтварят (лизират) стените си и съдържимото им се слива в една обща празнина. Характерни са за листата и плодовете на цитрусовите растения.

Млечните цеви представляват единични клетки, които могат да бъдат неразклонени (коприва, зимзелен) или разклонени. Последните са с голяма дължина и малко напречно сечение (млечки, фикус, смокиня, черница). Многоклетъчните млечни цеви са група клетки, свързани помежду си във вериги, като преградните им стени са перфорирани или изцяло изчезнали. Когато отделните цеви се свързват с напречни каналчета (анастомози), се означават като анастомозиращи млечни цеви, изграждащи една обща мрежа (глухарче, салатата, синя жлъчка, мак и др.). При неанастомозиращите млечни цеви липсват странични връзки (змийско мляко, чесън). Клетките на млечните цеви са живи, с целулозни, невдървесинени клетъчни стени и изпълнени с латекс вакуоли (глухарче, змийско мляко, лук, мак, каучуконосните дървета). Латексът (млечният сок) представлява гъста емулсия, която е прозрачна (при черницата), бяла (при глухарчето), оранжева (при змийското мляко), жълто-кафява (при конопа), червена (при кървавия корен). Млечният сок съдържа захари – до 5%, дъбилни вещества, гликозиди, алкалоиди, соли, органични киселини, ензими (смокиня, пъпешово дърво), белтъчни зърна и кристали, скорбялни зърна, етерични масла, восъци, смоли, каучук, гутаперча и др.

Съвкупността и взаимодействието между различните растителни тъкани осигуряват цялостното функциониране на растителния организъм. Чрез тях растенията се адаптират към условията на средата и поддържат своите жизнени процеси.

Водораслите са примитивни прокариотни и еукариотни организми, които нямат обособени стъбло, корени и листа. Повечето от тях се използват от човека като хранителен ресурс още от древността. Съвременните научни изследвания доказват редица благоприятни ефекти на водораслите върху човешкото здраве, поради което те се прилагат широко като хранителни добавки и функционални храни.

Основните здравословни ползи от водораслите са свързани с тяхното антиоксидантно, имуностимулиращо и детоксикиращо действие. Съдържащите се в тях биологично активни вещества ограничават действието на свободните радикали, подпомагат елиминирането на токсини и проявяват защитен ефект при редица заболявания, включително някои видове онкологични и сърдечно-съдови заболявания. Освен това водораслите подпомагат лечението на диабет, анемия, чернодробни заболявания, язвена болест, алергии, както и при радиационни и химични интоксикации.

Най-широко приложение във фармацията и медицината от микроводораслите намират синьозелените водорасли (цианобактерии) и зелените водорасли.

Цианобактериите (отдел Cyanoprokaryota) се характеризират с висока екологична пластичност, като издържат на екстремни условия на средата. При бързо развитие предизвикват „цъфтежи“ във водните басейни, а някои от тях продуцират и отделят токсини във водата. За човека могат да бъдат опасни при масово развитие в питейни язовири (такива са *Microcystis*, *Anabaena*, *Cylindrospermopsis*, *Planktothrix* и др.). Наред с токсичните форми, много цианобактерии имат значителна хранителна и фармацевтична стойност. Представители на род *Spirulina* се култивират индустриално в различни части на света (Мексико, Алжир, Хавай), а вече и в България. Някои почвени видове от род *Nostoc* традиционно се използват като храна в Китай и Южна Америка.

През последните години цианобактериите се разглеждат и като перспективен биотехнологичен ресурс за производство на биогорива. Чрез молекулярно-биотехнологични методи и използване на генетично модифицирани щамове от родовете *Synechocystis*, *Synechococcus*, *Anabaena* и *Cyanothece* се получават етанол, бутанол, захароза, млечна киселина и други органични съединения.

Най-голямо приложение във фармацията намират видовете *Aphanizomenon flos-aquae* и *Spirulina platensis*.

Aphanizomenon flos-aquae (AFA) е нишковидно водорасло, разпространено в еутрофни сладководни и бракични водоеми. Образува масови популации и често причинява „цъфтеж“ на водата. Биомасата му съдържа до 63% белтъци с добре балансиран аминокиселинен състав, както и витамини (аскорбинова киселина, β -каротен, биотин, кобаламин, пантотенова киселина, витамин Е) и минерални елементи (Ca, Na, K, Mg, Zn, Mn, Cu и др.). Използва се като хранителна добавка и суровина за фармацевтичната и козметичната индустрия. Поради възможната продукция на токсини от някои популации е задължителен строг токсикологичен контрол на биомасата.

Spirulina platensis е обект на индустриално култивиране от 70-те години на XX век. Биомасата ѝ представлява изключително богат природен източник на лесно усвоими белтъци (до 68%), съдържащи всички незаменими аминокиселини, както и витамини от група В, витамин А и микроелементи като Fe, Ca, Zn и Mg. Спирулина не продуцира цианотоксини и се счита за безопасна. Използва се като функционална храна и хранителна добавка с имуностимулиращо, антиоксидантно, антибактериално и антивирусно действие. Подпомага поддържането на нормални нива на кръвната захар и подобрява общото физиологично състояние на организма.

Зелените водорасли (отдел Chlorophyta) са предимно сладководни, като приблизително 13% от видовете обитават морска среда. Срещат се също така почвени и аерофилни видове, развиващи се върху скали, дънери, мъхове. Някои представители участват в изграждането на лишките. Зелените водорасли имат съществено екологично значение като първични продуценти във фитопланктона на сладководните екосистеми и в бентоса на морета и океани. Морските видове предпочитат топлите области на Световния океан, като се развиват главно в добре осветената зона на крайбрежията.

Зелените водорасли се характеризират с изключително високо морфологично разнообразие. При тях са представени почти всички основни морфологични типове, познати при растенията. *Флагелатният тип* зелени водорасли включва подвижни форми, които извършват активно движение с помощта на два или четири флагелума. *Тетраспоровидният тип* обхваща предимно колониални, по-рядко едноклетъчни зелени водорасли, които не извършват активно движение; при тях се наблюдават два флагелума, излизащи извън клетката, но поради дефектна ултраструктура те не осигуряват подвижност. *Клетъчният тип* зелени водорасли се характеризира с липса на флагелуми и неподвижност; тези зелени водорасли са микроскопични едноклетъчни форми или образуват колонии и ценобии. *Сифонният тип* представлява гигантска многоядрена клетка с множество хлоропласти. *Нишковидният тип* включва многоклетъчни зелени водорасли, изградени от едноклетъчни клетки, подредени в различно оформени нишки. При *сифонокладалния тип* вегетативното тяло е нишка, чиито клетки са многоядрени.

Интересът към микроскопичните зелени водорасли като източник на биологично активни вещества и функционални храни се засилва значително след 80-те години на XX век. В редица държави се отглеждат индустриални култури на представители от родовете *Scenedesmus*, *Chlorella*, *Dunaliella*, *Chlamydomonas* и др. Получената биомаса се използва като източник на β -каротен, витамини, глицерин, докозахексаенова киселина и други ценни съединения.

В България през 1966 г. в местността Рупите е създадена първата на Балканския полуостров база за индустриално култивиране на микроводорасли. В продължение на десетилетия тя осигурява производство на разнообразни хранителни добавки, основно от щамове на *Scenedesmus* и *Chlorella*. Биомасата от тези видове намира приложение също във фармацевтичната промишленост при производството на лекарствени препарати и в козметиката като източник на оцветители и биоактивни компоненти.

Chlorella vulgaris е едноклетъчно зелено водорасло, широко разпространено във водни басейни и почви. Индустриалните култури на този вид се използват за производство на хранителни добавки. Биомасата на хлорелата представлява балансиран източник на хранителни вещества и подпомага храносмилателните процеси чрез стимулиране на чревната перисталтика и развитието на полезна микрофлора. Хлорелата съдържа така наречения „Хлорела растежен фактор“, който оказва благоприятно въздействие при възпалителни заболявания на храносмилателната система. Високото съдържание на хлорофил е свързано с детоксикиращ ефект и антиоксидантна активност. Белтъчният хидролизат от хлорела се използва като концентриран хранителен продукт в медицината, козметиката и микробиологията. Видът *Chlorella pyrenoidosa* е важен източник за промишлено производство на витамин С.

Dunaliella salina представлява подвижно едноклетъчно водорасло с два флагелума, което се характеризира с изключителна способност за натрупване на β -каротен. При високи концентрации този пигмент маскира зеления цвят на хлоропласта и придава червеникав оттенък на клетките. Видът е халофилен и обитава солени езера, включително солниците в района на Бургас и Поморие. При масово развитие може да предизвика червеникаво оцветяване на водата. Индустриалните култури на *Dunaliella* се използват за добив на белтък, глицерин и β -каротен.

Scenedesmus obliquus образува микроскопични ценобии, съставени от 2, 4, 8 или 16 клетки. Видът е широко разпространен във фитопланктона на мезо- и еутрофни водоеми. Биомасата му е богата на белтък (45 – 50%), въглехидрати, минерали (бор, ванадий, желязо, йод, калай, калий, кобалт, магнезий, манган, молибден, натрий, никел, селен и др.) и витамини (С, провитамин А, Е, биотин, фолиева киселина, пантотенова киселина, ниацин, тиамин и др.). Използва се като добре балансиран хранителен продукт.

Поради краткия си жизнен цикъл и лесно култивиране, редица видове от родовете *Chlamydomonas*, *Scenedesmus* и *Chlorella* се използват като моделни организми в цитологични, генетични, физиологични и биохимични изследвания. Някои зелени микроводорасли притежават способността да акумулират редки и ценни метали като кобалт, никел, молибден, злато и др., поради което се използват за добив на тези метали, след отделянето им от разтворите.

Към **висшите спорови растения** принадлежат отделите Rhyniophyta, Psilotophyta, Bryophyta, Lycopodiophyta, Equisetophyta и Polypodiophyta. Ще бъдат разгледани последните четири отдела. Размножаването при тях става със спори и оплождането им е зависимо от водната среда.

Отдел Мъхообразни (Bryophyta) включва примитивни кормусни растения без коренова система. Прикрепването към почвата се осъществява чрез тънки нишковидни образувания, наре-

чени ризоиди. Те обитават предимно сенчести и влажни места. В жизнения им цикъл доминира половото поколение (гаметофитът), върху което е прикрепено и физиологично зависимо безполовото поколение (спорофитът). Мъхообразните са разпространени на всички континенти с изключение на Антарктида.

От мъхообразните медицинско и фармацевтично приложение имат видове от род *Sphagnum* (Торфен мъх). Те са водни растения със разклонено стъбло. Цялото растение съдържа сфагнол и притежава антисептично и хигроскопично действие. Използва се като превързочен материал и при лечение на ревматоидни заболявания.

Отдел Плаунообразни (Lycopodiophyta) са древни спорови кормусни растения с дихотомично разклонено стъбло, дребни люсповидни листа и добавъчни корени. Спорангиите са разположени по горната повърхност на листата, при някои видове спороносните листа са събрани във върхни класчета. Отделът обединява два класа – *Lycopodiopsida* и *Isoëtopsida*, като лечебни представители се срещат в първия от тях.

Иглолистната хуперция (*Hyperzia selago*) е многогодишно пълзящо растение с дихотомично разклонено стъбло и твърди, игловидни, спирално разположени листа. Спорангиите се образуват в пазвите на средните листа. За лечебни цели се използва надземната част, която е богата на минерални вещества, тлъсто масло, въглеhidрати, пектин, флавоноиди и алкалоиди. В народната медицина се прилага като очистително средство и при лечение на хроничен алкохолизъм. Растението съдържа селлагин с парализиращо действие, поради което терапията следва да се провежда под медицински контрол.

Бухалковидният плаун (*Lycopodium clavatum*) е многогодишно тревисто растение с пълзящи, дихотомично разклонени стъбла. От тях излизат изправени клонки, завършващи с две до три спороносни класчета. Спорите съдържат тлъсто масло, захари, фитостероли, минерални вещества, белтъци и терпенови съединения. Те се използват като абсорбент и противовъзпалително средство при кожни раздразнения. Надземната част съдържа алкалоиди и флавоноиди. Действа болкоуспокояващо и диуретично. Използва се при заболявания на дихателната система и черния дроб.

Отдел Хвоще (Equisetophyta) включва тревисти растения с изправени, кухи и начленени на възли и междувъзлия стъбла. Листата са силно редуцирани, разположени на възлите и срастват в ръкавче. Епидермисът на стъблото е импрегниран със силициев диоксид, а фотосинтезата се извършва основно от стъблото. При някои видове се формират два типа стъбла – пролетни със спороносна функция и летни с фотосинтезираща функция. В България се срещат седем вида, пет от които са включени в Закона за лечебните растения.

Полският хвощ (*Equisetum arvense*) е многогодишно тревисто растение, при което от коренището се развиват пролетни и летни стъбла. За лечебни цели се използва лятното стъбло. То съдържа силикати, сапонини, флавоноиди, минерални и карбоксилни киселини. Притежава диуретично, противовъзпалително и кръвоспиращо действие и се използва при заболявания на отделителната и храносмилателната система, както и при кожни увреждания. Не се препоръчва при нефрит.

Блатният хвощ (*Equisetum palustre*) образува само един вид стъбла и се среща в блатисти и мочурливи местообитания. Използва се надземната част, която съдържа полифеноли, силиций и алкалоиди. Прилага се в народната медицина главно за външно лечение на рани.

В България се срещат още пет вида хвощ, от които в народната медицина се използват големият хвощ (*Equisetum telmateia*), горският хвощ (*Equisetum sylvaticum*) и речният хвощ (*Equisetum fluviatile*). И при трите вида са установени алкалоиди и са включени в Закона за лечебните растения.

Отдел Папратообразни (Polypodiophyta) са втората по разнообразие група кормусни растения след семенните. Стъблото е видоизменено в коренище. Листата изпълняват две функции – фотосинтезираща и спорообразуваща (спорангиите се разполагат по долната листна повърхност). За папратите е характерна синтезата на дъбилни вещества, на някои фенолни съединения, представляващи средство против тения и други хелминтози.

Мъжката противоглистна папрат (*Dryopteris filix-mas*) е многогодишно тревисто растение, широко разпространено в планинските райони. Листата са два пъти перести, а по долната им повърхност се разполагат спорангиите, групирани в сори с бъбрековиден индузий. За лечебни цели се използва коренището, което съдържа фенолни съединения, етерични масла, смоли и танини. Видът се използва като суровина във фармацевтичната промишленост за производство на

препарати с противоглистно действие срещу тении и други хелминти, както и във ветеринарната медицина срещу метил.

Обикновеното изтравниче (*Asplenium trichomanes*) е дребна папрат, разпространена по сенчести скалисти места и в скални пукнатини. Сорите са продълговати и разположени по долната страна на листата. За лечебни цели се използва надземната част, която проявява нервоуспокоително действие. Външно се прилага при косопад. В народната медицина растението традиционно се използва при страхови състояния, откъдето произлиза и народното му название „страшниче“.

Стенното изтравниче (*Asplenium ruta-muraria*) се среща по зидове и скални пукнатини в цялата страна. В народната медицина се използва като диуретично и затягащо средство. Със сходно действие са черното изтравниче (*Asplenium adiantum-nigrum*) и северното изтравниче (*Asplenium septentrionale*). Трите вида са включени в Закона за лечебните растения.

Лечебната златиста папрат (*Asplenium ceterach*) се среща по варовити, сухи и скалисти припечни места. Сорите са продълговати до линейни. Листата се използват в народната медицина против кашлица, като диуретично и затягащо средство.

Обикновеният волски език (*Asplenium scolopendrium*) расте по влажни сенчести места в горите. Листата са широко ланцетни и целокрайни, а сорите са линейни, разположени в две редици по долната страна на листната петура. За лечебни цели се използват листата, които действат омекчаващо и диуретично. Прилагат се при чернодробни заболявания, както и външно за обработка на рани.

Обикновената женска папрат (*Athyrium filix-femina*) се среща по влажни и сенчести места в планинските райони. Листата са два до три пъти перести, а сорите са едри и разположени по долната страна на листните дялчета. Отвара от коренището се използва в народната медицина като глистогонно средство.

Обикновената орлова папрат (*Pteridium aquilinum*) е широко разпространена в цялата страна. Листата са два до три пъти перести и могат да достигнат до 3 m дължина. Сорите са линейни, почти слети помежду си и разположени под ръба на листните дялове. Използва се коренището, което е богато на скорбяла. В народната медицина се прилага като слабо глистогонно средство.

Обикновената сладка папрат (*Polypodium vulgare*) расте по влажни скалисти и каменливи места в горите. Листата са кожести, ланцетни, с линейни дялове, изрязани почти до средната жилка. Сорите са кръгли и разположени в две редици по долната страна на листните дялове. За лечебни цели се използва коренището, което съдържа ябълчна киселина, глициризин, сапонини, тлъсто масло, смоли и захари и има характерен сладникав вкус. Проявява диуретично, жлъчегонно, противоглистно и противокашлично действие.

Обща характеристика на голосеменните растения

Голосеменните растения (Gymnospermae) заемат важно място в еволюцията на растителния свят. Те са първите растения, при които се появява семето като нов генеративен орган, осигуряващ защита и хранителен резерв на зародиша. Това е довело до значително повишаване на приспособителните възможности на растенията към сухоземни условия и е позволило широкото им географско разпространение.

Голосеменните растения са дървета и храсти с различни по форма листа – игловидни, ветриловидни, люсповидни. Характеризират се с формирането на специфични размножителни органи – шишарки. Всяка шишарка има семенни люспи. При мъжките шишарки върху семенните люспи има пращници, а при женските – семепъпки. Семепъпката се превръща в семе след оплождането, което лежи открито върху семенната люспа.

От гледна точка на фармацията и медицината, голосеменните растения представляват ценен източник на вторични метаболити с висока биологична активност. Много от тези съединения изпълняват защитна функция за растенията (антисептична, инсектицидна, токсична), но същевременно намират приложение като лекарствени средства или като суровини за фармацевтичната индустрия. Характерно за голосеменните растения е натрупването на смоли и етерични масла в специализирани канали, терпеноиди, фенолни вещества, флавоноиди, а при някои видове и алкалоиди.

Таксономично разнообразие на голосеменните растения

Голосеменните растения са представени главно от семейства Гинкови (Ginkgoaceae), Борови (Pinaceae), Кипарисови (Cupressaceae), Тисови (Taxaceae) и Ефедрови (Ephedraceae). Макар броят на видовете да е ограничен в сравнение с покритосеменните, значението им за екосистемите и медицината е изключително голямо.

Семейство Гинкови (Ginkgoaceae) включва измрели и съвременни растения, като най-голямо е било тяхното разнообразие през мезозойската ера. Днес това семейство включва само един род с един вид.

Двуделното гинко (*Ginkgo biloba*) е листопадно двудомно дърво с прости, ветриловидни листа, врязани на върха. Семената имат месеста обвивка с неприятна миризма. Отглежда се като парково дърво. Реликтен вид, произхождащ от Китай. Листата съдържат флавоноли, сесквитерпенов лактон, гинкголиди, алкалоиди, стероли, карбоксилни киселини и др. Влизат в състава на различни лекарствени препарати, влияещи благоприятно върху кръвообръщението, смущения на нервната система, световъртеж, стимулира умствената дейност, подобрява паметта и концентрацията. Семената се използват за храна и в народната медицина.

Семейство Борови (Pinaceae) включва някои от най-широко разпространените горски дървета в умерения пояс. Те са еднодомни растения с ясно изразена диференциация между мъжки и женски шишарки. Листата са игловидни или линейни, разположени единично, по две до пет или в снопчета, което намалява изпарението и позволява оцеляване при сурови климатични условия. Представителите на това семейство са основно източник на смоли, терпентини и етерични масла. Смолите и етеричните масла на боровите растения съдържат монотерпени, сесквитерпени и смолни киселини. Те проявяват антисептично, противовъзпалително, отхрачващо и локално дразнещо действие, поради което влизат в състава на мехлеми и балсами, инхалационни препарати, средства за лечение на ревматизъм и невралгии. Към това семейство се отнасят следните представители:

Бялата ела (*Abies alba*) е еднодомно дърво, листата са линейни, плоски, отдолу с две бели ивици. Женските шишарки са цилиндрични, изправени, при узряване люспите се разпадат. Във фитотерапията се използват листата, младите връхчета и незрелите шишарки при грип и простудни заболявания, външно – при косопад. От листата се добива етерично масло, което притежава силно антимикробно действие и се използва в ароматерапията, козметиката, медицината и фармацията. Прилага се при бронхит, дезинфекциращо средство при грипни епидемии, ревматизъм и др.

Хималайският кедър (*Cedrus deodara*) е еднодомно дърво, листата са разположени последователни при дългите и в снопчета при късите клонки. Женските шишарки при узряването се разпадат. У нас се отглеждат и видовете *Cedrus libani* (Ливански кедър) и *Cedrus atlantica* (Атласки кедър). Кората, дървесината и листата намират приложение при кожни болести и главоболие. От дървесината на хималайския и атлаския кедър се добива кедровото масло, което действа антисептично. Прилага се при изгаряния, акне, косопад, кашлица, бронхит, ревматизъм. Използва се също в ароматерапията и парфюмерията.

Европейската лиственица (*Larix decidua*) е еднодомно листопадно дърво, листата са игловидни, последователни при удължените и в снопчета при скъсените клонки. От смолата се добива „венециански терпентин“. Листата съдържат витамин С и етерично масло. Намира приложение при ревматизъм, невралгия, подагра, хронично главоболие и др.

Обикновеният смърч (*Picea abies*) е еднодомно дърво, листата са игловидни, единични. От него се получава смола, дъбилни вещества, терпентин, колофон, медицински въглен на прах, използван при отравяне.

Бялата мура (*Pinus peuce*) е балкански ендемит, разпространен в България, Македония, Сърбия и Черна гора. От кората се извлича балсам, от който се получава терпентиново масло с отхрачващо, противовъзпалително и ревулзивно действие, намиращо приложение като при белия бор. Използва се в медицината, парфюмерията и козметиката. В народната медицина се лекуват гъбички по краката, акне, болни венци и др.

Белият бор (*Pinus sylvestris*) е вечнозелено еднодомно дърво, листата са игловидни, по две в скъсената клонка. Женските шишарки узряват на третата година. Дървесината и кората на белия бор са пронизани в различни посоки от смолести канали, изпълнени с боров балсам. Боровият балсам представлява смес от борова смола и етерично масло. Той е суровина за производство на различни продукти – терпентин, терпентиново масло, колофон. Терпентинът намира широко приложение в лаковото производство. Терпентиново масло се използва за направата на пластири, влиза в състава на кремове за лечение на ревматизъм, ишиас и простудни заболявания. Колофонът се получава след отстраняване на етеричните масла от смолата. Намира приложение при производство на хартия, гума, пластмаси и др. От дървесината на бора се получава боров катран с противовъзпалително и противомикробно действие. Прилага се външно при кожни обриви, екземи и лишеи. Етеричното масло от листата на белия бор влиза в състава на лекарствени препарати с антисептично, противовъзпалително и ревулзивно действие. Екстракт от листата се използва и при укрепващи вани. Използват се също боровите връхчета, събрани през април-май. Действието им е омекчаващо при възпаление на лигавиците, отхрачващо при бронхит, диуретично, потогонно, за инхалации при възпалението на горните дихателни пътища. В домакинството младите летораста (боровите връхчета), а също и двугодишните женски шишарки се използват за приготвяне на боров мед и като добавка към билков чай.

Семейство Кипарисови (Cupressaceae) включва вечнозелени еднодомни и двудомни дървета и храсти. Листата са игловидни и люсповидни, разположени в прешлени или срещуположно. Смолите се натрупват в специализирани клетки (идиобласти), а не в смолести канали. Мъжките шишарки са разположени единично. Женските шишарки са дребни, вдървеняли или месести (галбули). Намират приложение в официалната и народната медицина, по-рядко в козметиката или кулинарията като подправка.

Вечнозеленият кипарис (*Cupressus sempervirens*) е дървесен вид, с дребни, люсповидни листа. Женските шишарки са сферични. Отглежда се като парково дърво. Използват се шишарките. Те имат антисептично и укрепващо вените действие.

Обикновената хвойна (*Juniperus communis*) е двудомен храст или ниско дърво с шиловидни, твърди, заострени и бодливи листа, от горната страна с бяла ивица по средата, разположени по 3(4) в прешлени. Женските шишарки (галбули) са разположени в пазвите на листата единично или по 2 – 3. Те имат кълбовидна форма, гладки, синкавочерни, със сив восъчен налеп. Узряват през есента на втората година. С лечебна цел се използват галбулите и извличаното от тях етерично масло. Прилага се като диуретично средство при хронични възпаления на бъбреците и пикочния мехур, болки в ставите и др. Маслото намира вътрешно и външно приложение. Хвойновият катран, получен при суха дестилация на хвойнова дървесина се употребява външно при гъбични и паразитни кожни заболявания.

Червената хвойна (*Juniperus oxycedrus*) се отличава от обикновената хвойна главно по двете бели ивици на горната листна повърхност и по червенокафявите, без налеп галбули. Използват се дървесината и галбулите, които имат подобен състав и действие както на обикновената хвойна. От галбулите се извлича етерично масло, което се прилага външно при кожни заболявания.

Казашката хвойна (*Juniperus sabina*) е храст с полегнали и разпрострени близо до земята клони. Листата върху младите клонки са игловидни, а върху старите люсповидни. Галбулите са сини. От връхните клонки се получава сабинол, имащ медицинско приложение при кожни заболявания и ревматизъм. Използва се за ароматизиране на бани, а също и против глисти във ветеринарната медицина.

Западната туя (*Thuja occidentalis*) е еднодомно дърво с люспести листа, разположени срещуположно. Женските шишарки са светлокафяви, обратно яйцевидни, с керемидовидно подредени люспи. Семената подсилват имунната система на организма. В народната медицина се прилагат срещу кашлица, хроничен бронхит, астма и др.

Семейство Тисови (Taxaceae) включва предимно двудомни вечнозелени дървета и храсти. Листата са ланцетни, игловидни или люсповидни, разположени спираловидно или срещуположно. Нямаат смолести канали. У нас семейството е представено от един род с един вид.

Обикновеният тис (*Taxus baccata*) е двудомен храст или ниско дърво с линейни листа. Характеризира се с бавен растеж и липса на смола. Семето е кафяво и е обхванато от червена месеста обвивка (арилус). Цялото растение е отровно с изключение на арилуса, който е ядлив. В народната медицина се използват клонките от тис при сърдечни и нервни заболявания. От кората на северноамериканския вид *Taxus brevifolia* е изолиран таксол – едно от най-важните противотуморни лекарства в съвременната медицина. То действа чрез инхибиране на клетъчното делене и се използва при лечение на различни злокачествени заболявания. Напоследък се прилагат биотехнологии за изкуственото му култивиране за добиване на таксол.

Семейство Ефедрови (Ephedraceae) включва 1 род с 42 вида, у нас се срещат 2 вида.

Обикновената ефедрa (*Ephedra distachya*) е дребно, двудомно храстче. Стъблото е зелено, прешленесто разклонено. Листата са недоразвити, люспести. Семената са обхванати от червеникава месеста обвивка, образувана от разрастналите се люспи, разположени под шишарката. С лечебна цел се употребява надземната част. Съдържа алкалоиди (ефедрин, псевдоефедрин), танини, смоли. Повишава артериалното налягане, подобрява кръвообращението, разширява бронхите. Ефедринът засилва и учестява сърдечните съкращения. Прилага се при бронхиална астма, спастичен бронхит, сenna хрема (в състава на капки за нос), ниско кръвно налягане.

Голосеменните растения, въпреки ограниченото си таксономично разнообразие, имат изключително важно значение за фармацията и медицината. Те предоставят традиционни лечебни суровини (смоли, етерични масла), високоефективни лекарствени вещества (таксол, ефедринови алкалоиди), моделни обекти за развитие на съвременни биотехнологии. Много от голосеменни растения са включени в Червената книга на България, което налага ограничаване на директния добив от природата. Биотехнологичните методи са ключови за опазване на биоразнообразието, устойчивото производство на лекарствени вещества и намаляване на екологичния натиск върху редки видове. Поради тази причина съвременната фармацевтична индустрия прилага клетъчни и тъканни култури, контролирано култивиране, биосинтетични и полусинтетични методи. Тисът е пример за устойчиво използване на растителни ресурси чрез биотехнологии.

1. Фенолни съединения – обща характеристика и класификация.

Фенолните съединения са голяма група природни съединения, които съдържат ароматно ядро и свързана с него фенолна група. Когато съдържат повече ядра и фенолни групи се наричат полифеноли. Когато фенолни съединения се свързват с гликозидна връзка със захари (най-често с глюкоза) се образуват фенолни гликозиди.

Фенолните съединения се подразделят на групи според структурата, свойствата и биологичното действие. Класификацията се базира основно на броя на ароматните ядра и броя на С-атоми в страничната верига или свързващата ги верига, както и наличието в нея на функционални групи (–ОН, –СНО, =СО, –СООН): с едно ароматно ядро (*прости феноли, фенолни киселини и техни производни, хидроксиканелени киселини и техни производни, фенилоцетни киселини, кумарини*); с две ароматни ядра (*бензофенони, стилбени, флавоноиди, лигнани*); с хиноидна структура (*бензохинони, нафтохинони и антрахинони*); с повече ароматни ядра (*полифеноли – танини, лигнани*) и др.

2. Прости феноли

2.1 Кратка обща характеристика и класификация

Простите феноли са хидроксилни производни на фенола (С₆–ОН структура, като –ОН групата е непосредствено свързана с ароматното ядро). Простите феноли се срещат рядко в свободна форма в растенията. Най-често са под формата на гликозиди или съставки на полифеноли и други метаболити като смоли, етерични масла и др. Класифицират се според броя на фенолните групи: едновалентни (с 1 фенолна група) – *Фенол, двувалентни* (с 2 фенолни групи) – *Пирокатехол (катехол), Резорцинол, Хидрохинон* и тривалентни (с 3 фенолни групи) – *Пирогалол, Флороглуцинол*. По-известни техни производни са *гваякол* (метилкатехол), *метилхидрохинон*, гликозидите *арбутин* и *метиларбутин*, флороглуцинолите *хумулон, лупулон, филицини, хиперфорин, адхиперфорин*.

2.2 Растителни субстанции, съдържащи прости феноли

Hyperici herba^{Ph.Eur.} (Жълт кантарион стрък). Фармакопейна субстанция^{Ph.Eur.} – добива се от растението *Hypericum perforatum* (Жълт кантарион), сем. Clusiaceae. Съдържа флороглуцинолите хиперфорин, адхиперфорин, но също кондензирани антрахинони (хиперицин), флавоноиди, кондензирани танини и етерично масло. Прилага се при лека и умерена депресия; при гастрити, колити, язви; при маточни и др. кръвоизливи; външно – при рани, изгаряния. Стандартизиран сух екстракт от жълт кантарион се влага в лекарствени препарати с меко антидепресивно действие, като *Esbericum caps.; Remotiv tabl., Laif 600 tabl., Laif 900 tabl.* !Да не се приемат едновременно с антидепресанти, имуносупресори, цитостатици, антикоагуланти. Да се избягва интензивно облъчване с ултравиолетови лъчи или слънчеви лъчи – хиперицинът действа фотосенсибилизиращо на кожата.

Lupuli flos^{Ph.Eur.} (Хмел цвят). Използват се женските шишарковидни съцветия на хмела (*Humulus lupulus*, сем. Cannabaceae – Конопови), както и добитите етеричномаслени жлези (**Lupulinum** – **лупулин**) от прицветниците. Субстанцията съдържа флороглуцинолите хумулон и лупулон, но също ксантохумол, фитоестрогени, етерично масло, смоли. Действа седативно, антибиотично, естрогенно, апетитовъзбуждащо и жлъчегонно (горчив вкус). Прилага се при безсъние, възбуда, при хормонални терапии, за производство на бира. !Токсично при предозиране (дразни лигавицата на стомаха и червата, рязко снижава кръвното налягане). Сухи екстракти от субстанцията влизат в състава на лекарствени препарати с приложение при повишена нервна възбудимост и леки нарушения в съня (*Redormin tabl., Sedacur forte tabl.* и др.).

Pini pix liquida (Боров катран). Добива се от борова дървесина (р. *Pinus* – Бор, сем. Pinaceae – Борови) чрез суха дестилация. Използва се в дерматологията при екземи, дерматити, псориазис. От овъглената дървесина, след добиване на катрана се добива **Carbo activatus** (Активен въглен), който

абсорбира токсини, алергени, микроорганизми, газове и др., и се използва за детоксикация на организма, подобряване на храносмилането, избягване на зъбите и редица други ползи.

Uvae-ursi folium^{Ph.Eur.} (Мечо грозде лист). Субстанцията се добива от *Arctostaphylos uva-ursi* (Мечо грозде), сем. Ericaceae (Пиренови). Съдържа арбутин, метиларбутин, флавоноиди, галотанини, урсолова киселина. Проявява уроантисептично (дължащо се на фенолите хидрохинон и метилхидрохинон, получени при хидролизата на арбутина и метиларбутина) и диуретично действие. Прилага се при инфекции на пикочните пътища – хроничен цистит, уретрит. Сух екстракт от мечо грозде е вложен в препарата *Cystinol akut* tabl. Сходен състав, действие и приложение имат и листата на червената боровинка (*Vaccinium vitis-idaea*, сем. Ericaceae).

3. Кумарини

3.1 Кратка обща характеристика и класификация

Кумарините са хетероциклени съединения, в основата на които стои кондензирана система на α -пирон с бензолно ядро. Едни от най-разпространените природни вещества в растенията (семейства Сенниковцветни, Бобови, Брошови, Устноцветни, Маслинови и др.). Те проявяват антикоагулантно, капиляроукрепващо, фотосенсибилизиращо, спазмолитично и диуретично действие. Някои предизвикват алергични реакции, хепатотоксично и канцерогенно действие.

Видове кумарини:

- прости хидроксид- и метоксикумарини: *кумарин* (незаместен); *умбелиферон*, *херниарин* (монозаместени); *ескулетин*, *ескулин*, *скополетин*, *скополин* (дизаместени); *фраксетин*, *фраксин* (тризаместени); *дикумарол* (димерно производно на кумарина, антикоагулант и модел за синтез на непреки антикоагуланти);
- фуранокумарини (фуран, кондензиран с кумарин) – *ангелицин*, *псорален*, *бергантен*, *ксантотоксин*, *императорин*;
- пиранокумарини (2,2-диметилпиран, кондензиран с кумарин) – *сезелин*;
- други кумарини – *афлатосини* (микотоксини), *новобиоцин* (антибиотик).

3.2. Растителни субстанции, съдържащи кумарини

Meliloti herba^{Ph.Eur.} (Лечебна комунига стрък). Получава се от *Melilotus officinalis* (Лечебна комунига), сем. Fabaceae (Бобови). В свежата дрога се съдържа глюкозида мелилотозид, а в сухата – кумарин, dikuмарол. Действието е седативно, антикоагулантно и се прилага при безсъние, неврози, хистерия. Растителната субстанция е източник на кумарин за парфюмерията и за ароматизатиране на цигари. Лекарствени препарати: *Cyclo 3 cream* (съдържа течен екстракт от комунига + сух екстракт от миши трън; подобрява кръвообращението; при уморени крака); *Venalot depot*, tabl (съдържа кумарин и троксерутин; при възпалени повърхностни вени, хемороиди, едеми след спортни травми).

Fraxini cortex (Ясен кора). Добива се от *Fraxinus excelsior* (Планински ясен) и от *Fraxinus ornus* (Мъждрян) от сем. Oleaceae (Маслинови). Кората съдържа кумариновите гликозиди ескулин, фраксин, но също и танини. Оказва противовъзпалително и адстрингентно действие. Прилага се при ревматизъм, диария, дизентерия. Екстракти от *Fraxini cortex* (+ трепетлика, златна пръчица) са вложени във *Phytodolor oral drops*, които се прилагат при лумбаго, ишиас, невралгии. С подобен състав, действие и приложение са листата от планински ясен (**Fraxini folium**^{Ph.Eur.}). Корите и листата са суровина за добив на ескулин, който се влага в различни фармацевтични препарати с венотонично, капиляроукрепващо и противовъзпалително действие.

Hippocastani cortex (Конски кестен кора). Добива се от *Aesculus hippocastanum* (Конски кестен), сем. Sapindaceae (Сапиндови). Субстанцията съдържа ескулин, но също и флавоноиди (кверцетин), тритерпенови сапонини (есцин). Повишава устойчивостта на капилярите и се прилага при разширени вени и хемороиди. Кората е източник на ескулин.

Herniariae herba (Изсипливче стрък). Добива се от *Herniaria glabra* (Голо изсипливче) и *H. hirsuta* (Влакнесто изсипливче), сем. Caryophyllaceae (Карамфилови). Съдържа херниарин, тритерпенови сапонини, флавоноиди. Дрогата действа диуретично и спазмолитично. Прилага се при възпаление, пясък и камъни в бъбреците, пикочния мехур.

Angelicae archangelicae radix^{Ph.Eur.} (Пищялка корен), добиван от *Angelica archangelica* (Лечебна пишялка), сем. Apiaceae (Сенникоцветни). Съдържа умбелиферон, фуранокумарини и етерично масло по което се стандартизира. Действа диуретично, спазмолитично, фотосензибилиращо.

Ammi majoris fructus (Амми плод) от *Ammi majus* (сем. Apiaceae). Съдържа фуранокумарини. *Puvalen tabl.* от амми се прилагат при витилиго и косопад.

4. Флавоноиди

4.1 Обща характеристика и класификация

Флавоноидите са група фенолни съединения, чиито преставители показват голямо разнообразие и широко разпространение в растенията (особено в сем. Rosaceae, Asteraceae, Rutaceae, Fabaceae, Lamiaceae, Polygonaceae). Срещат се във всички растителни органи, обикновено като гликозиди. За флавоноидите е характерен въглероден скелет C₆-C₃-C₆. Съдържат 3 ядра – А, В и С, от които две са ароматни (А, В), свързани с пропанова верига. Действия, които проявяват флавоноидите: капиляроукрепващо (за почти всички флавоноиди); венотонично, кардиотонично, диуретично, спазмолитично, антиоксидантно, естрогенно и др.

Класификация на флавоноидите:

- според мястото на пръстен В (*истински флавоноиди* – при C₂, *изофлавоноиди* – C₃, *неофлавоноиди* – C₄)
- според окислението на пръстен С: *проантоцианидини* (*катехини* и *левоцианидини*); *антоцианидини*; *флаванони*; *флаваноноли*; *флаволи* и *флавоноли*- най-окислени)
- други – *халкони*, *аурони*, *бифлаволи* и др.

4.2. Растителни субстанции, съдържащи флавоноиди

Betulae folium^{Ph.Eur.} (Бреза лист). Листата на бялата бреза (*Betula pendula*, сем. Betulaceae) съдържат флавонолови гликозиди (хиперозид, кверцитрин), тритерпенови алкохоли, катехинови танини. Субстанцията действа диуретично, потогонно и се прилага при бъбречни заболявания, отоци. Външно се прилага при кожни възпаления, труднозарастващи рани.

Citri reticulatae epicarpium et mesocarpium^{Ph.Eur.} (Мандарина кора), **Aurantii amari epicarpium et mesocarpium**^{Ph.Eur.} (Горчив портокал кора) и корите на други цитруси се използват за получаване на хесперидин и диосмин, които се влагат в лекарствени препарати за лечение на разширени вени и хемороиди (*Detralex tabl.*, *Diosmin tabl.*, *Cyclo 3 fort caps.* и др.).

Crataegi folium cum flore^{Ph.Eur.} (Глог лист със цвят). Източник е *Crataegus monogyna* (Обикновен глог), сем. Rosaceae (Розоцветни), но се допуска събиране и от други видове от рода. Съдържа витексин, хиперозид, рутин и др. флавоноиди. Проявява кардиотонично действие и се прилага при сърдечна невроза, исхемия, хипертония, безсъние. Лекарствени препарати: *Tinctura Crataegi drops*; *Sympathyl tabl.*, *Cardiplant tabl.*, *Doppelherz energie-tonikum N sol.* (тинктури от глог, валериана, хмел). Сходно действие и приложение (запарки, тинктури, екстракти) имат и плодовете на глога (**Crataegi fructus**^{Ph.Eur.}), които са богати на проантоцианидини.

Equiseti herba^{Ph.Eur.} (Хвощ стрък). Източник е *Equisetum arvense* (Полски хвощ), сем. Equisetaceae). Съдържа флавоноиди, тритерпенови сапонини, органично свързани силикати и се прилага при пясък и камъни в бъбреците, отоци.

Ginkgonis folium^{Ph.Eur.} (Гинко лист), чийто източник е *Ginkgo biloba* (Двуделен гинко), сем. Ginkgoaceae (Гинкови). Съдържа флавонолите кемпферол, кверцетин и техни гликозиди, бифлаволи (аментофлаволи, билобетин, гинкгетин), сесквитерпенови лактони (билобалид). Субстанцията е мозъчен и периферен вазодилатор, подобрява паметта, антагонизира агрегацията на тромбоцитите. Прилага се под формата на стандартизиран сух екстракт, вложен в лекарствени препарати, при мозъчна исхемия, деменция, световъртеж (*Memoplant tabl.*, *Tebokan tabl.*, *Tanacan tabl.*, *sol.*).

Liquiritiae radix^{Ph.Eur.} (Сладник корен), *Glycyrrhiza glabra* (Гол сладък корен, Сладник), сем. Fabaceae (Бобови). Действа спазмолитично, противоязвено (флавоноиди – ликвирицин, изоликвирицин, ононин и др.), експекториращо (сапонина глициризин – 50х по-сладък от захарта), диуретично (ононин), слабително. Дрогата влиза в състава на чайове, но се влага и като сух и гъст екстракт, прах в състава на отхрачващи средства, в лаксативна смес. Деглициризиран екстракт от корените, съдържащ флавоноиди, се включва в състава на противоязвени препарати.

Myrtilli fructus recens^{Ph.Eur.} (Черна боровинка плод свеж), добита от *Vaccinium myrtillus*, сем. Ericaceae, Плодът съдържа антоциани (производни на делфинидина), катехинови танини, витамини. Прилага се при стомашно-чревни възпаления, подагра, ревматизъм, кокоша слепота, подобряване на зрението.

Ononidis radix^{Ph.Eur.} (Гръмотрън корен). Коренът на *Ononis spinosa* (Бодлив гръмотрън), сем. Fabaceae (Бобови) съдържа изофлавоноа ононин, тритерпеновия сапонин оноцерин, ситостерол и др. Действа диуретично и се прилага при бъбречни заболявания и възпаления на пикочните пътища.

Sambuci flos^{Ph.Eur.} (Черен бъз цвят), добит от *Sambucus nigra* (Черен бъз), сем. Viburnaceae (предишно Caprifoliaceae). Съдържа флавоноидите рутин, хиперозид и изокверцитрин, слузни вещества, етерично масло. Действа диуретично, потогонно, омекчително и се прилага при простудни заболявания.

Sophorae japonicae flos/flos immaturus^{Ph.Eur.} (Японска софора цвят/цветни пъпки), добити от *Styphnolobium japonicum* = *Sophora japonica* (Японска софора), сем. Fabaceae (Бобови). И двете дроги съдържат гликозида рутин (почти 2 пъти повече в цветните пъпки) и са източник за неговото получаване. Проявява капиляроукрепващото и противовъзпалително действие (*Rutascorbin tabl.* съдържат рутин). От рутин се получава троксерутин, който се влага в редица препарати при разширени вени (*Troxemed caps, Troxevasin caps., gel; Venoruton caps., gel; Indovasin gel.*).

5. Танини (Дъбилни вещества)

5.1. Обща характеристика и класификация

Танините са полифеноли с високо молекулно тегло, производни на многовалентните алкохоли. Името дъбилни вещества идва от способността на екстракти от дъбови кори да превръщат суровата животинска кожа в гъон, който е устойчив на влага и микроорганизми – наречен процес „дъбене“ на кожи, дължащ се на способността на танините да се свързват трайно с протеините на кожата. Танините са широко разпространени в растенията, особено в семейства Букови, Розоцветни, Бобови, Устноцветни, Пиренови, Смардликови, Сложноцветни. Натрупват се патологични образувания (шикалки по дъбовете), в кори и плодове (при дървесните видове) и в листа и подземни части (при тревисти растения). Не са установени в семейства Кръстоцветни, Макови и Сенникоцветни. Танините образуват утайки със соли на тежки метали и алкалоиди, утаяват желатина и предизвикват аглутинация на червените кръвни клетки. Типично тяхно действие: адстрингентно (затягащо), противовъзпалително и кръвоспиращо. Някои проявяват висока биологична активност – антиоксидантна, капиляроукрепваща, антитуморна. Прилагат се в умерени дози (с цел предизвикване на обратима реакция, за разлика от дъбенето на кожи) при възпалена лигавица, рани, кожни проблеми; като антидот при отравяния с алкалоиди и тежки метали; избистрители на вина, оцветители.

Класификация на танините:

- Хидролизиращи се танини – галотанини и елаготанини. Лесно хидролизират под действие на киселини, основи и ензими. Прилагат се предимно външно, защото силно дразнят лигавицата. Представители: *глюкогалин, китайски танин (октагалоил-глюкоза), танинова киселина (пентадигалоил-глюкоза), гераниин* и др.;
- Кондензирани танини – *полимеризирани катехини, левкоантоцианидини* и други редуцирани форми на флавоноидите. Прилагат се външно и вътрешно.;
- Псевдотанини – ниско молекулни феноли, обикновено съпътстващи вещества, характерни за сем. Lamiaceae, каквито са *катехини, розмаринова, галова, хлорогенова киселина* и др.

5.2 Растителни субстанции, съдържащи танини

Bistortae rhizoma^{Ph.Eur.} (Кървавиче коренище). Източник е *Bistorta major* (Обикновено кървавиче), сем. Polygonaceae (Лападови). Съдържа висок процент танини, предимно галотанини и оказва затягащо, кръвоспиращо, противовъзпалително действие. Намира външно приложение – при възпаление на устната кухина и бавно нарастващи рани, но и умерено вътрешно – като запарка, при кръвотечения и възпаления на стомаха и червата.

Cotini folium (Смрадлика лист). Листата на смрадликата (*Cotinus coggygria*, сем. Anacardiaceae) са богати на галотанини и са източник за тяхното получаване. Екстракти от тях се прилагат външно за промивки, гаргари, компреси при възпалителни процеси в устната кухина, циреи, хемороиди. Препарати: *Ginvasin gel* (при пародонтити, гингивити), *Sandrin sol.* (за устна хигиена, за укрепване на венци).

Gallae turcicae (Турски шикалки). Шикалките са патологични образувания, в резултат на ензимно дразнене от насекомо (*Cynips gallae tinctoriae*) върху неразвити вегетативни пъпки на *Quercus infectoria* (Алепски/Малоазийски дъб), сем. Fagaceae (Букови). Шикалките съдържат 50 – 70% галотанини (основно танинова киселина – **Acidum tanicum pulv.**^{Ph.Eur.}). Те са източник за получаване на танинова киселина, която се използва в медицинската практика за лечение на диарии, хемороиди, възпаления в устната кухина (като затягащо и противовъзпалително средство). Шикалки от китайски шмак (*Rhus chinensis*), **Gallae chinensis**, са суровина за получаване на китайски танин, който оказва затягащо, антибактериално, антивирусно, противотуморно, хепатопротективно и антиоксидантно действие.

Други субстанции, съдържащи предимно хидролизиращи се танини: **Lythri herba**^{Ph.Eur.} (Блатия стрък), **Sanguisorbae radix**^{Ph. Eur.} (Лечебна динка корен), **Uvae-ursi folium**^{Ph. Eur.}, **Alni fructus** (Елша плод), **Granati pericarpium** (Нар плодна обвивка).

Agrimoniae herba^{Ph.Eur.} (Камшик стрък). Източник е *Agrimonia eupatoria* (Лечебен камшик, сем. Rosaceae). Съдържа кондензирани танини, мономерни катехини флавоноиди (рутин, хиперозид, кверцитрин и др.). Прилага се при стомашно-чревни възпаления с диария, жлъчни и бъбречни възпаления, външно – при екземи, кървящи венци, хемороиди.

Quercus cortex^{Ph.Eur.} (Дъб кора). Добива се от клони на различни видове от род *Quercus* (*Q. robur*, *Q. petraea*, *Q. pubescens*). Съдържа смес от кондензирани (катехинови) танини, галотанини, галова киселина. Намира външно приложение при кожни заболявания, хемороиди, бяло течение.

Tormentillae rhizoma^{Ph.Eur.} (Изправен очиболец коренище). Коренището на изправения очиболец (*Potentilla erecta*, сем. Rosaceae – Розоцветни) съдържа катехинови танини. Прилага се като тинктура (**Tormentillae tinctura**^{Ph.Eur.}) при кръвоизливи в носа, матката, хемороиди, чернодробни заболявания и външно – при кожни заболявания.

Theae folium (Китайски чай листа). Добива се от чаения храст (*Camellia sinensis*). Съдържа кондензирани танини, мономерни катехини, флавоноиди, кофеин. Действа затягащо, антиоксидантно, капиляроукрепващо, противолъчево, възбуждащо ЦНС, диуретично.

Други субстанции, богати на кондензирани танини: **Rosae damascenae flos** (Маслодайна роза цветвенчелистчета), **Myrtilli folium** (Черна боровинка лист), **Hyperici herba**^{Ph.Eur.}.

1. Обща характеристика, методи за получаване, приложение и класификация на етеричните масла

Етеричните масла (ЕМ) са сложни многокомпонентни смеси с растителен произход и характерна миризма. Отлагат се в растенията в готов вид (като отпадни продукти) в специални секреторни структури. Те са летливи и липидоразтворими (в етер, бензин, петролев етер), не се разтварят във вода, по-леки от водата, оптически активни. На въздух и светлина потъмняват, придобиват кисела реакция и отделят смоли. ЕМ се срещат се в отделни органи, в цялото растение или в растителни ексудати. Натрупват се предимно във висши растения, като за представители от някои семейства те са хемотаксономичен белег (*Lamiaceae*, *Ariaceae*, *Rosaceae*, *Pinaceae*, *Asteraceae*, *Lauraceae* и др.). Варират в широки граници – от 0,001% до 20%.

ЕМ се получават основно чрез дестилация с водна пара, но също чрез пресуване (за цитрусовите плодове), анфлораж (*помада* – от свежи цветове на жасмин, тубероза с индиферентна мазнина, за термолабилни ЕМ), екстракция (*конкрет* – от свежи цветове с етер, бензол, петролев етер без загряване; *резиноид* – от смоли, балсами с алкохол, ацетон при загряване; *абсолю* – от конкрет, резиноид или помада с алкохол).

Във фармацевтичното производство ЕМ са главно коригенси на лекарства, дерматологични препарати с антисептично и ревулзивно действие, препарати за инхалация, слънчезащитни препарати и др. Те намират широко приложение в парфюмерията и козметиката, в ароматерапията, като подправки на храни и др.

Според главните съставки – 3 основни групи ЕМ:

- ЕМ съдържащи терпени (най-голяма и разнообразна) – терпените са производни на изопрена (C_5H_8), сред които съставки на ЕМ са предимно монотерпени (две изопренови единици) и сесквитерпени (три изопренови единици);
- ЕМ съдържащи предимно производни на фенилпропана ($C_6 - C_3$);
- ЕМ съдържащи други съединения (серни, азотни, разпадни продукти от мастни киселини).

2. Растителни субстанции и етерични масла, съдържащи предимно монотерпени

Представители на монотерпени ($C_{10}H_{16}$) влизащи в състава на ЕМ: ациклични -*мирцен*, *оцимен*, *линалол*, *гераниол*, *нерол*, *цитрал а* и моноциклични -*лимонен*, *терпинен*, *феландрен*, *ментол*, *карвеол*, *терпинеол=терпинен-4-ол*, *ментон*, *типеритон*, *пулегон*, *карвон*, *1,8-цинеол=евкалиптол*; бициклични – *борнеол*, *камфора*, *пинени*, *миртенол*, *туйол*, *туйон*; ароматни (2 изопренови единици и ароматно ядро) – *тимол*, *карвакрол*.

Eucalypti aetheroleum^{Ph.Eur} (Евкалиптово масло), добито от листата на видове от род *Eucalyptus* (*E. globosus*, *E. polybractea*, *E. smithii*), сем. *Myrtaceae*. В състава на маслото преобладава монотерпена цинеол (евкалиптол). Действа бактерицидно, ревулзивно. ЕМ се прилагат при възпаления на ГДП за инхалации, в капсули, пастили (*Strepsils Menthol and Eucalyptus tabl.*, *pastillen*; *Septotele past.* и др.) и външно- за разтривки, компреси при ревматизъм, простудни заболявания (*Pulmex/Pulmex baby ung.*) Евкалиптолът, добит от маслото, се влага като компонент на антисептични и отхрачващи средства, в пасти за зъби, еликсири.

Juniperi aetheroleum^{Ph.Eur} (Хвойново ЕМ). Добива се чрез парна дестилация от наситнените галбули на *Juniperus communis* (Обикновена хвойна), сем. *Cupressaceae* (Кипарисови). Маслото е с терпентинова миризма, поради преобладаващо съдържание на двупръстенни монотерпени α -пинен, β -пинен, камфен. Оказва силно противовъзпалително действие и се използва се за инхалации при възпаление на ГДП. Поради изразеното ревулзивно действие се прилага и външно при кожни заболявания и ревматизъм.

Lavandulae flos^{Ph.Eur.} (Лавандула цвят) и **Lavandulae aetheroleum**^{Ph.Eur.} (Лавандулово ЕМ). Цветовете на теснолистната лавандула (*Lavandula angustifolia*, сем. Lamiaceae – Устноцветни) съдържат флавоноиди, танини и ЕМ. Дрогата действа успокояващо нервната система, спазмолитично, дезинфекционно и се прилага при безсъние, сърдечна невроза, мигрена. Цветовете предпазват дрехите от молци. От тях се добива лавандулово ЕМ, което съдържа ацикличните монотерпени линалол и линалилацетат. Приложението е както на дрогата, но също при стомашно-чревни колики, ревматизъм, простудни заболявания, невралгии и в парфюмерията. Лекарствени препарати с лавандулово масло: *Лавандулов спирт*; *Tabunek caps.* (отхрачващо); *Revulsan ung.* (при травми, простудни заболявания, невралгии); *Carmolis sol.* (при артрит, невралгия).

Melissae folium^{Ph.Eur.} (Маточина лист). *Melissa officinalis* (Лечебна маточина), сем. Lamiaceae (Устноцветни). Съдържа етерично масло (монотерпените цитронелал, цитрал), розмаринова киселина. Действа успокояващо, понижава кръвното налягане, спазмолитично. Прилага се като сух екстракт^{Ph.Eur.} в лекарствени препарати за подобряване на съня: *Dormiplant tabl.* (+екстракт от валериана), *Sedacur forte tabl.* (+ екстракти от валериана и хмел), *Persen tabl.*, *Persen forte caps.* (+екстракти от валериана и мента) и др.

Menthae piperitae folium^{Ph.Eur.} (Мента лист) и **Menthae piperitae aetheroleum**^{Ph. Eur.} (Ментово масло). Дрогата, получена от пиперливата мента (*Mentha x piperita*, сем. Lamiaceae), се прилага под формата на сух екстракт или тинктура при стомашно-чревни и жлъчни заболявания. Ментовото масло и ментола (еднопръстен монотерпов алкохол, основна съставка) имат слабо нервноуспокояващо, анестетично и охлаждащо действие. Маслото се прилага външно като алкохолен разтвор (ментов спирт) или унгвенти при невралгия, ревматизъм, мускулни болки, спортни травми (*Deep Relief gel.*, *Revulsan ung.*).

Salviae officinalis folium^{Ph.Eur.} (Салвия лист), *Salvia officinalis* (Градински чай, Салвия, сем. Lamiaceae). Съдържа ЕМ (1,8-цинеол (евкалиптол) до 10%, α - и β -туйон до 50%, камфора, борнеол), розмаринова киселина, флавоноиди и др. Използва се при възпаления на ГДП (ларингит и трахеобронхит) и на стомашно-чревния тракт (ентерит, язва), а външно – дезинфекционно (гаргара при ангина, зъбобол и възпаление на лигавицата). С близък състав, действие и приложение е и **Rosmarini folium**^{Ph.Eur.} (Розмарин лист), а добитото от дрогата **Rosmarini aetheroleum** (Розмариново ЕМ) се прилага външно при косяпад, ревматизъм, натъртване, кожни обриви.

Terebinthinae aetheroleum^{Ph.Eur.} (Терпентиново масло). Получава се чрез парна дестилация на боров балсам (жълтеникава лепкава маса) от борови растения (*Pinus sylvestris*, *P. nigra*, *P. pinaster*) от сем. Борови. Съдържа основно пинени и малки количества борнилацетат, камфор. Действа ревулзивно; отхрачващо и противовъзпалително. Прилага се предимно външно при простудни, ревматични и невралгични заболявания. Влиза в състава на мази и пластири.

Valerianae radix^{Ph.Eur.} (Дилянка корен). Корените на дилянката (*Valeriana officinalis*, Valerianaceae) съдържат ЕМ, валепотриати, монотерпенови алкалоиди (актинидин, валеринин). В състава на ЕМ влизат монотерпени (двупръстенните борнеол, борнилацетат, борнилизовалерианат, пинени) и сесквитерпени (кариофилен, валеренова киселина). Прилага под формата на галенови препарати (тинктура, сухи екстракти), самостоятелно или в комбинация с други екстракти (хмел, маточина) или ЕМ (лавандулово), като седативни и сънотворни средства (*Valeriana, tabl.*; *Tinctura Valerianae drops*, *Persen tabl.*, *Persen forte caps.*, *Sedacur forte tabl.*, *Dormiplant tabl.*, *Redormin, tabl.*).

Thymi herba (Градинска мащерка стрък)^{Ph.Eur.} **Thymi aetheroleum**^{Ph.Eur.} (Мащерково ЕМ). *Thymus vulgaris* (Градинска мащерка), сем. Lamiaceae (Устноцветни). Стръковете съдържат ЕМ, танини, флавоноиди, тритерпени (уролова и олеанолова киселини). Действат отхрачващо, антисептично, спазмолитично, карминативно и се използват при спастичен бронхит, коклюш; възпаления на устната кухина, заболявания СЧТ с колики и метеоризъм. Под формата на течни екстракти се влагат в сиропи за кашлица (*Bronchicum elixir S*, *Tussiol*, *Tussavit*). Основни съставки на ЕМ са ароматните монотерпени тимол и карвакрол. ЕМ и тимола, получен от него, имат силно антисептично действие и се влагат в лекарствени препарати за лечение на възпаления в гърлото, синусите (*Septolete D- pastilen*, *Hustagil cold balsam oint.*, *Sinulan*, *Sinulan forte*). Субстанцията **Serpylli herba**^{Ph.Eur.} (Обикновена мащерка стрък) има състав, действие и приложение като *Thymi herba*, но се добива от диворастящи видове мащерка (*Thymus serpyllum = Thymus sp. diversa*) и маслото е с по-ниско съдържание на тимол и карвакрол.

Други субстанции и ЕМ, съдържащи предимно монотерпени: *Aurantii amari aetheroleum*^{Ph. Eur.} (Портокалово масло от горчив портокал), *Coriandri fructus*^{Ph. Eur.} (Кориандър плод), *Pini sylvestris aetheroleum*^{Ph. Eur.} (Борово масло), *Rosae aetheroleum* (Розово масло) – (действие и приложение – вж. Фармакогнозия).

3. Растителни субстанции и етерични масла, съдържащи предимно сесквитерпени и сесквитерпенови лактони

Сесквитерпените (C₁₅H₂₄) влизат в състава на етерични масла. Представители: *фарнезен*, *фарнезол* (ациклични); *бизаболен*, *бизаболол*, *зингиберен*, *кариофилен*, *гермакрон* (двупръстенни); *кадинен*, *азулен* и техни производни (двупръстенни). Основни действия на сесквитерпените: противовъзпалително (*фарнезен*, *хамазулен*, *кариофилен*=*хумулен*), успокоително, хипотензивно (*гермакрон*), апетитовъзбуждащо (*зингиберен*) и др.

Сесквитерпеновите лактони (C₁₅) са производни на сесквитерпените и са характерни за представители на сем. Asteraceae (Сложноцветни). Имат циклична структура, две или три ядра, от които едното е 5-членен лактонен пръстен): *гермакранолиди* (*кницин*, *аркциопикрин*, *парте-нолид*); *еудезманолиди* (*алантолактон*, *сантонин*, *артемизин*); *гваянолиди* (*матрицин*, *лактокопикрин*, *цинаропикрин*, *артабсин*, *абсинтин*, *ахилин*, *ахилицин*, *хеленалин*, *арнифолин*) и с друга структура (*артемизинин*, *билобалид*). Проявяват широк спектър на биологична активност (апетитовъзбуждащо, холагогно и холеретично, противоглистно, противомаларийно, противовъзпалително, антитуморно действие). Придружават ЕМ, но често не са техни съставки. Кристални вещества, без миризма, нелетливи, силно горчив вкус.

Matricariae flos^{Ph. Eur.} (Лайка цвят). Съцветията на лечебната лайка (*Matricaria chamomilla*, *syn. Chamomilla recutita*, сем. Asteraceae), съдържат ЕМ, сесквитерпенов лактон матрицин, флавоноиди (апигенин, лутеолин, кверцетин) и кумарини (умбелиферон, херниарин), слузни вещества. Чрез парна дестилация на цветни кошнички се получава **Matricariae aetheroleum**^{Ph. Eur.} (Лайково масло). В него се съдържат сесквитерпени: *фарнезен*, *бизаболол*, *хамазулен* (вторичен продукт от матрицина при дестилацията; придава син цвят на маслото). Във фармацията се използва предимно цвета при възпаления на устната кухина, ГДП, СЧТ и външно за промивки, компреси. Влага се в лекарствени препарати под формата на тинктура, течен екстракт, сух екстракт – *Kamillosan*, *spray oral muc*, *Kamillosan oint.*, *Sanoral sol.*, *Phytodont sol.*, *Dentinox gel N*.

Millefolii herba^{Ph. Eur.} (Бял равнец стрък), *Achillea millefolium* (Бял равнец), сем. Asteraceae. Съдържа ЕМ, сесквитерпенов лактон ахилицин, танини. В маслото преобладава *хамазулен* (50%), но има и монотерпени – *пинени*, *цинеол*, *туйон*. Дрогата се прилага при стомашни и маточни кръвоизливи, безапетитие, а външно – при кървене на носа, венците и хемороиди.

Zingiberis rhizoma^{Ph. Eur.} (Джинджифил коренище), *Zingiber officinale*, сем. Zingiberaceae. Съдържа ЕМ (60% *зингиберен*) и нелетливи парливи съставки. Използва се при простудни заболявания, кашлица, хрема. Оказва добър ефект при морска болест, световъртеж, гадене, повръщане (*Avioplant junior*, *caps.* – вложен джинджифил на прах).

Arnicae flos^{Ph. Eur.} (Арника цвят), *Arnica montana* (Планинска арника), сем. Asteraceae. Съдържа сесквитерпенови горчиви лактони (*хеленалин*, *арнифолин*), танини, флавоноиди. Използва се външно като запарка и като галенов препарат (*Arnicae tinctura*^{Ph. Eur.}) за промивки, компреси при пресни и гнойни рани, кожни възпаления, хематоми.

Absinthii herba^{Ph. Eur.} (Пелин стрък), *Artemisia absinthium* (Горчив пелин), сем. Asteraceae. Съдържа сесквитерпенови лактони (*артемизин*, *артабсин*, *анабсинтин*, *абсинтин*) и ЕМ, в чийто състав влизат сесквитерпени (*хамазулен*, *кадинен*, *бизаболен*), но също и монотерпените *туйол*, *туйон* (!токсични в големи дози). Оказва апетитовъзбуждащо и спазмолитично действие, възбужда ЦНС. Прилага се при безапетитие; чернодробни, жлъчни и стомашни заболявания. Етеричното масло се прилага предимно външно при инфектирани рани, екзема, за дезинфекция на помещения, против молци, но и за овкусяване на напитки (*вермут*, *абсент* – не повече от 10 мг/л пелин).

Други субстанции и ЕМ, съдържащи сесквитерпени и сесквитерпенови лактони: **Geranii macrorrhizi aetheroleum** (Здравецово масло), добито от *Geranium macrorrhizum* (Обикновен здравец). Съдържа сесквитерпени (основен *гермакрон*). Действа успокоително, хипотензивно; **Artemisiae santonici flos** (Сантонинов пелин цвят) – съдържа *сантонин* с противоглистно

действие; **Artemisiae annua herba** (Едногодишен пелин стрък) – съдържа лактона артемизинин, с противомаларийно действие.

4. Растителни субстанции и етерични масла, съдържащи предимно фенилпропаноиди

Производни на фенилпропана (1-пропилбензен) влизат в състава на етерични масла предимно на представители от сем. Ариасеае (Сенникоцветни), но и в Муртасеае, Лаврасеае. Представители на фенилпропаноиди: *анетол*, *анизалдехид*, *анизкетон*, *метилхавикол (естрагол)*, *евгенол*, *евгенилацетат*, *канелен алдехид*, *канелена киселина*, *миристицин*, *аниол*.

Anisi fructus^{Ph.Eur.} (Анасон плод) и **Anisi aetheroleum**^{Ph.Eur.} (Анасоново масло). Плодовете на анасона (*Pimpinella anisum*) от сем. Ариасеае (Сенникоцветни) съдържат ЕМ, кумарини и тлъсто масло. Те се използват при колики, метеоризъм и като подправка. Етеричното масло съдържа основно анетол (транс-анетол, който е нетоксичен) и действа анестетично, отхрачващо, лактогонно, газогонно. ЕМ и анетолът се прилагат при простуда, грип (*Mucoplant anisol caps.* – отхрачващо средство; в състава на *Kamillosan spray*, *Revulsan oint.*; *D-r Theiss Angi Sept tabl.*, *pastillen* и др.), в спиртната промишленост (в мастика, узо, перно), в ароматерапия (инхалации, масажи, вани), козметика и парфюмерия.

Плодовете на *Foeniculum vulgare* (Обикновено резене), сем. Ариасеае, съдържат ЕМ, кумарини, тлъсто масло. Култивират се два вариетета горчиво и сладко резене заради плодовете (**Foeniculi amari fructus**^{Ph.Eur.} -Горчиво резене плод; **Foeniculi dulcis fructus**^{Ph.Eur.} – Сладко резене плод). Екстракт от плодовете помага против колики при бебета (*Carminativum Babynos colic drops sol.*). В състава на етеричните масла преобладава анетола и те се използват за неговото получаване. Предпочита се маслото от сладкото резене (**Foeniculi dulcis fructus aetheroleum**^{Ph.Eur.}), тъй като маслото на горчивото резене (**Foeniculi amari fructus aetheroleum**^{Ph.Eur.}) има камфоров мириз, заради по-високото съдържание на фенхон (монотерпен).

Caryophylli flos^{Ph.Eur.} (Карамфилово дърво цвят), **Caryophylli fl oris aetheroleum**^{Ph.Eur.} (Карамфилово масло), добити от *Syzygium aromaticum* (Карамфилово дърво), сем. Муртасеае. Използват се цветните пъпки, които имат много високо съдържание на ЕМ (15 – 20%). Цветните пъпки се използват в сладкарството, във фитотерапията при простудни заболявания (действат успокояващо, обезболяващо). Карамфиловото масло е по-тежко от водата. Съдържа основно евгенол, на който се дължи антисептичното и аналгетично действие. Прилага се предимно в стоматологията, но също при мускулни болки и кожни проблеми (акне, кандида), в хранително-вкусовата промишленост (есенции, шоколад, уиски). ЕМ се използва за получаване на евгенол, който се използва широко в стоматологичната практика (временни пломби, дентални пасти).

Cinnamomi cortex^{Ph.Eur.} (Канелено дърво кора), *Cinnamomum verum* (Канелено дърво), сем. Лаврасеае (Лаврови). Добива се ликото на кората от клонки на 2 – 4 годишни дървета. Субстанцията съдържа етерично масло, катехинови танини, слузни вещества. Проявява карминативно, апетитовъзбуждащо, хипогликемично действие. Използва се като подправка (канела) в сладкарството. В канеленото ЕМ (**Cinnamomi corticis aetheroleum**) преобладава канелен алдехид, на който се дължи приятната миризма, но има също канелена киселина и евгенол. То се прилага във фармацията като коригенс, за подобряване на храносмилането, в ароматерапията, в козметиката за масажи, грижа за косата.

1. Обща характеристика и класификация на алкалоидите

Алкалоидите са съединения с растителен произход, съдържащи азот, поради което проявяват алкални свойства. Намират широко приложение в медицината, поради силното физиологично действие което оказват върху човека и животните. Най-често действат върху нервната система, като възбуждат или задържат дадена реакция, което зависи от вида, но и от дозата. В медицината алкалоидите се прилагат като чисти вещества под формата на соли и като галенови препарати, силно действащи до токсични (обезболяващи -морфин, кодеин; спазмолитици –папаверин; стимуланти – кофеин; противоракови средства – таксоли; отрови – стрихнин, кониин). Първият изолиран алкалоид е *морфин*, в началото на 19 век, от опия на сънотворния мак. Последва откриване на *хинин*, *стрихнин*, *никотин*, *атропин*, *кодеин*, *аконитин*, *теобромин*, *хармин* и др.

Алкалоидите се срещат предимно в покритосеменни двусемеделни растения, като за някои семейства те са хемотаксономичен белег – Solanaceae, Papaveraceae, Apocynaceae, Berberidaceae, Fabaceae, Lobeliaceae и др. От едноседелните растения са разпространени в сем. Amaryllidaceae, Liliaceae. При голосеменните са установени главно при родовете *Taxus* и *Ephedra*, рядко при хвощове и плауни (*Equisetum*, *Lycopodium*) и гъби (*Claviceps purpurea*, *Psilocybe mexicana*).

Алкалоидите са най-често кристални вещества с горчив вкус, рядко са в течно състояние (*никотин*, *кониин*, *пелетиерин*). Обикновено са безцветни, но може да са оцветени в жълто (*берберин*), червено (*сангвинарин*). Като соли са разтворими във вода, а като бази са разтворими в органични разтворители. Те са оптически активни, като L-формите са физиологично по-активни от дясновъртящите и рацемичните. Образуват неразтворими утайки с танини и тежки метали.

Класификацията на алкалоидите се прави най-вече въз основа на строежа на основното ядро:

- Карбоциклени бази:
 - с азот в страничната верига (*ефедрин*, *колхицин*, *капсаицин*);
- Хетероциклени бази:
 - пиролидинови (*хигрин*, *стахидрин*, *бетоницин*),
 - пиролизидинови (*платифилин*, *сенецифилин*),
 - пиперидинови (*пиперин*, *седамин*, *кониин*, *ареколин*),
 - пиридинови (*анабазин*, *никотин*),
 - тропанови (*хиосциамин*, *атропин*, *скополамин*, *беладонин*, *екгонин*, *кокаин*),
 - хинолизидинови (*цитизин*),
 - хинолинови (*хинин*),
 - изохинолинови (*папаверин*, *наркотин*, *морфин*, *кодеин*, *глауцин*, *берберин*, *тубокурарин*, *хелидонин*, *галантамин*, *еметин* и др.),
 - индолни (*резерпин*, *стрихнин*, *бруцин*, *йохимбин*, *ергоалкалоиди*, *винка* и *катарантус алкалоиди*-*винкамин*, *винбластин*, *винкрестин*),
 - имидазолови (*пилокарпин*),
 - пуринови (*кофеин*, *теобромин*, *теофилин*)

2. Растителни субстанции, съдържащи алкалоиди с азот в страничната верига

Ephedrae herba^{Ph.Eur.} (Ефедра стрък). Стръковете се събират от няколко вида от род *Ephedra* (сем. Ephedraceae, Гнетови голосеменни). В тях се съдържа алкалоида ефедрин, който участва сърдечната дейност, дишането, свива кръвоносните съдове, отпуска бронхиалната мускулатура. Прилага се при ниско кръвно налягане, астма, спастичен бронхит, сenna хрема (*Ephedrinium hydrochloricum amp.*, *Broncholytin syr.*, *Tussiolol syr.*, *Mucoseptonex E drops nasal*, *Rhinolex oint.*). От ефердрин се получават полусинтетични аналози (*норепедрин*, *фенилефрин*) с

по-продължително действие и по-малко странични ефекти, които се влагат в различни лечебни продукти (*Coldrex sashets, tabl.*; *Vibrocil drops nasal*; *Sinutab tabl.*).

Capsici fructus^{Ph.Eur.} (Лютя чушки плод). *Capsicum annuum* var. *minimum*; *C. frutescens* (Пипер лют), сем. Solanaceae. Лютите чушки съдържат основно капсаицин (индекс на лютивина 1:2 млн.), който действа хиперемично, апетитовъзбуждащо, карминативно. Субстанцията приета вътрешно подобрява храносмилането, а външно (тинктура, пластир) се прилага при ревматизъм, артрит, ишиас.

Colchici semen (Мразовец семена). Семената на *Colchicum autumnale* (Есенен мразовец, кърпикожух, сем. Liliaceae -Кремове) съдържат над 20 алкалоида. Основен сред тях е *колхицин*, който няма основен характер и с киселини не образува соли. ! Колхицинът е едно от най-отровните вещества – симптомите на отравяне наподобяват тези на арсеник и няма антидот. В подходящи малки дози действа болкоуспокояващо, противотуморно, мутагенно. Използва се при кожен рак, подагра, в цитогенетиката. Сух стандартизиран екстракт от семената, вложен в *Colchicum-Disperit coat. tabl.* се прилага при подагра като обезболяващо средство. Семената са източник за добиване на колхицин.

Taxi brevifolii cortex (Тис кора) и **Taxi folium** (Тис листа). Кората се добива от късолистния тис (*Taxus brevifolia*), а листата – от обикновения тис (*T. baccata*), сем. Тахасеае (Тисови). Двете субстанции съдържат таксоли (дитерпенови алкалоиди с N в страничната верига), които са токсични, имат противотуморно действие. Кората съдържа *паклитаксел*, а листата – прекурсори на полусинтетичния *доцетаксел*. От таксолите се правят лечебни препарати за химиотерапия при рак на гърдата и яйчниците: *Taxol fl.* (с паклитаксел), *Taxotere fl.* (с доцетаксел).

3. Растителни субстанции, съдържащи тропанови алкалоиди

Основната структура в молекулата е на алкохола *тропан-3-ол* (кондензиран пиридинов и пиперидинов пръстен). В зависимост от положението на ОН групата при третия С атом се различават два изомера: тропан-3- α -ол = тропин (тропинова група) и тропан-3- β -ол=псевдотропин (екгонинова група). Алкалоиди от тропиновата група (*атропин*, *хиосциамин*, *скополамин*, *апоатропин*, *беладонин*) се натрупват в представители на сем. Solanaceae (Картофиви), в родовете *Atropa*, *Datura*, *Hyoscyamus*, *Mandragora*, *Scopolia* и др. Екгониновата група (*кокаин*, *цинамилкокаин*, *тропа-кокаин*) е представена в листата на *Erythroxylum coca* (Кока, Сем. Erythroxylaceae).

Belladonnae folium^{Ph.Eur.} (Лудо биле, Беладона лист). Листата на лудото биле (*Atropa belladonna*, Сем. Solanaceae) съдържат тропанови алкалоиди – основен L-хиосциамин, но също атропин, скополамин, беладонин). От субстанцията се приготвят галенови препарати (тинктура, сух екстракт и прах), които са спазмолитични и болкоуспокояващи средства. Листата са източник на L-хиосциамин, който рацемизира до атропин (D- и L-хиосциамин). Атропинът намира широко приложение в медицинската практика. Той е M-холинолитик (антагонист на ацетилхолина) и действието му се изразява в понижаване тонуса на гладката мускулатура на коремните органи и успокояване на спазмите на стомах, черва, жлъчка, пикочни пътища, матка; намаляване секрецията на слюнчените и стомашните жлези; отпускане на бронхите; ускоряване сърдечните съкращения и възбуждане на дишането; разширяване на зениците и повишаване на вътреочното налягане; сърцебиене, гърчове и халюцинации в по-големи дози. Прилага се като болкоуспокояващо при язвена болест, бъбречни и жлъчни колики; в очната практика; при морска болест; при бронхит, астма; противоотрова при отравяния с морфин, пилокарпин и др. Лекарствени препарати: *Bellergamin, tabl.* (тотална алкалоидна смес от лудо биле; при мигрена), *Atropinum sulfuricum, amp* (атропинов сулфат – инжекционен разтвор), *Atropin vision eye drops* (в очната практика); *Atem spray, susp. inh pres*; *Atrovent susp. inh.pres.*; *Atrovent nasal spray, sol.*; *Berodual sol. inh.* и др.(инхалатори с полусинтетично производно на атропина – ипратропин бромид).

Stramonii folium^{Ph.Eur.} (Татул лист). Листата на татула (*Datura stramonium*, сем. Solanaceae) съдържат L-хиосциамин, скополамин. Действието и приложението е като при лудо биле. Използва се стандартизиран прах от листата (*Stramonii pulvis normatus*^{Ph.Eur.}) и за получаване на L-хиосциамин, респективно атропин.

Daturae innoxiae folium (Индиански татул лист), *Datura innoxia* (Индиански татул), сем. Solanaceae. Произхожда от Южна и Централна Америка. Промислен източник за получаване на скополамин, който е 50% от алкалоидната смес. Скополаминът действа като атропина, но за раз-

лика от него не възбужда, а потиска ЦНС. Влага се в лекарствени препарати: *Buscolysin, amp., tabl.*; *Buscomed, tabl.*; *Buscopan, tabl.* (спазмолитици).

Hyoscyami folium (Черен блян лист). Листата на бляна (*Hyoscyamus niger*, сем. Solanaceae) съдържат алкалоиди от тропиновата група (основно хиосциамин и скополамин). Дрогата е спазмолитик като беладоната (при дразнеща и спастична кашлица, астма). Външно се ползва масло, получено чрез варене на листа в растително масло и амоняк, при невралгии и контузии. Прилагат се и хомеопатични продукти от блян.

Mandragorae radix (Мандрагора корен), *Mandragora officinarum*, сем. Solanaceae. Корените на мандрагората, която расте в Близкия изток и Южна Европа, съдържат тропанови алкалоиди и действа като хипнотик и афродизиак. В древността от дрогата са правени напитки и мазила, с които се извършвали магии.

4. Растителни субстанции, съдържащи изохинолинови алкалоиди

В основата на тази група алкалоиди стои изохинолин. Различават се по степента на хидриране на изохинолина, вида на заместителите, съчленяване на допълнителни пръстени към основното ядро и др. Разделят се на повече от 10 групи, като често в една субстанция има алкалоиди от различни групи (генетична връзка помежду им).

Изохинолиновите алкалоиди се срещат в сем. Papaveraceae – Макови (*Papaver somniferum*, *Papaver rhoeas*, *Glaucium flavum*, *Fumaria officinalis*, *Chelidonium majus* и др.), Berberidaceae – Киселтрънови (*Berberis vulgaris*), Ranunculaceae – Лютикови (*Hydrastis canadensis*, *Thalictrum minus*), Amaryllidaceae – Кокичеви (*Galanthus*, *Leucojum aestivum*), Rubiaceae – Брошови (*Cephaelis ipecacuanha*) и др.

Opium crudum^{Ph.Eur.} (Опий). Добива се от неузрелите плодни кутийки на сънотворния мак (*Papaver somniferum*, Papaveraceae). Изсушеният суров латекс (2 – 3 седмици след цъфтежа) е най-богатата алкалоидна дрога – 40 вида алкалоиди, които са една четвърт от опия. Преобладават опиевите алкалоиди морфин (най-много), наркотин=носкапин, кодеин, папаверин, тебаин. Обезболяващото действие на опия се дължи основно на морфина, съчетано със спазмолитичния ефект на папаверина и потискащо центъра на кашлицата действие на кодеина, наркотина. От опиума се получават и използват галенови продукти (сух екстракт, тинктура, прах), като при продължителен прием настъпва привикване и натравяне. От опия се получават чисти алкалоиди – морфин, папаверин, кодеин, наркотин и тяхни полусинтетични аналози (дротаверин, етилморфин, апоморфин, налоксон и др.) които се влагат в редица лекарствени препарати – спазмолитици, аналгетици, антигусиви, антидоти (*Papaverin tabl.*, *No-Spa tabl.*, *amp.*, *Morphini hydrochloricum, amp.*; *Morphine sulphate, tabl. prolong*, *Doltard tabl.*, *Kapanol caps.*; *Aceffein tabl.*, *Sedalgin Neo tabl.*, *Solpadeine caps, tabl. Eff.*, *Tussiol syr.*, *Dimex syr.*, *Codterpin tabl.*, *Naloxone amp.* и мн. други).

Papaveris rhoeados flos^{Ph.Eur.} (Полски мак цвят). От цветовете на полския мак (*Papaver rhoeas*, сем. Papaveraceae) се събират само венчелистчетата, които са червени или розови. В тях се съдържат изохинолинови алкалоиди (главно реадин, по-малко папаверин, тебаин, глауцин), слюзни вещества, пектини и др. Морфин не е установен. Субстанцията има противокашлично и омекчаващо действие при мъчителна и дразнеща кашлица.

Glaucii herba (Жълт мак стрък). Стръковете на *Glaucium flavum* (Жълт мак, Папаронка; сем. Papaveraceae) съдържат изохинолинови алкалоиди, главно глауцин. Използват се като суровина за получаването на глауцин. Той оказва противокашлично действие, като потиска центъра на кашлицата (като кодеина, но без привикване) и се влага в противокашлични препарати: *Glauvent tabl.*; *Broncholytin, syr.* .

Chelidonii herba^{Ph.Eur.} (Змийско мляко стрък), *Chelidonium majus*, сем. Papaveraceae. Дрогата съдържа оранжев млечен сок, в който са установени над 20 алкалоида, предимно изохинолинови -хелидонин, сангвинарин, берберин, протопин и др. Действа спазмолитично и аналгетично (хелидонин), холеретично (берберин) и се прилага при камъни в жлъчката, жълтеница, хипертония. Външно – млечния сок за премахване на брадавици, мазоли.

Leucoji aestivi herba (Блатно кокиче стрък). Добиват се цъфтящите стръкове от блатно кокиче (*Leucojum aestivum*, сем. Amaryllidaceae -Кокичеви). Те съдържат алкалоиди, главно галантамин и ликорин. Те са холиномиметици, улесняват провеждането на нервните импулси и се влагат в препарати за лечение на полиомиелит, парези и парализи. Нивалинът (*Nivalin amp.*,

tabl.) е български препарат, който съдържа галантамин и се прилага за лечение на заболявания на периферните нерви, свързани с двигателни нарушения, полиомиелит, детска церебрална парализа, слабо до умерено изразена деменция от типа на Алцхаймер.

5. Растителни субстанции, съдържащи индолни алкалоиди (винка, катарантус, ергоалкалоиди)

Индолните алкалоиди намират голямо приложение във фармацевтичната и медицинска практика. Производни на индола–кондензирани бензол и пиролов пръстени.

Винка и катарантус алкалоидите са група индолни алкалоиди, които се съдържат в представители на сем. Аросупасеае (главно в р. *Vinca* и р. *Catharanthus*), откъдето идва и тяхното наименование. В р. *Vinca* са установени над 100 алкалоида, по-важни от които са *винкамин*, *виндолин*, *катарантин*. Катарантин и виндолин участват в изграждането на димерните катарантус алкалоиди *винбластин*, *винкристин*, открити в р. *Catharanthus*.

Ергоалкалоидите се срещат в моравото (ръжено) рогче и са производни на ерголина. По-важни представители: *ергометрин*, *ерготамин*, *ергостин*, *ерготоксини*.

Vincae minoris herba (Зимзелен стрък). Цъфтящите стръкове на дребния зимзелен (*Vinca minor*, сем. Аросупасеае – Зимзеленови) съдържат индолни алкалоиди. Субстанцията оказва понижаващо високото кръвно налягане действие и намалява мозъчните спазми (дължи се на *винкамина*). Прилага се за лечение на хипертония, главоболие, атеросклероза. Дрогата е източник на винкамин. От него чрез полусинтез се получава *винпоцетин*, който се влага в препарати за лечение на мозъчни циркулационни нарушения (*Cavinton tabl.*; *Vicetin tabl.*, *Vinpocetine tabl.*).

Catharanthi folium (Катарантус лист). Източник на субстанцията е вечнозелен полухраст от Мадагаскар *Catharanthus roseus* (Катарантус, Розова винка), сем. Аросупасеае. Листата съдържат над 60 индолни алкалоида, но особено важни са димерните алкалоиди *винбластин* и *винкристин*, които са с противотуморно действие. Това са първите алкалоиди с антитуморно действие, въведени в медицинската практика. Прилагат се за лечение на левкемия (винкристин) и болест на Ходжкин (винбластин).

Secale cornutum (Мораво рогче). Субстанцията представлява изсушени склероции (рогчета) на паразитна гъба (*Claviceps purpurea*), която се развива по ръжта (*Secale cereale*). Те съдържат ергоалкалоиди, които намират широко приложение в гинекологията – утеротонично, кръвоспиращо при маточни кръвоизливи. Действат и съдоразширяващо при спазми на мозъчните съдове (мигрена), на съдовете на крайниците (болест на Бюргер) и др. Поради изразена токсичност, алкалоидите на моравото рогче не се прилагат при бременност. Лекарствени препарати с ергоалкалоиди (ергометрин, ерготамин): *Ergotyl amp.*, *Methergin tabl.*, *Methylergometrin NIHFI tabl.* (в гинекологията); *Bellergamin tabl.*, *Coffergamin coat. tabl.* (при мигрена).

Понятие за среда и фактори на средата (екологични фактори)

Среда на обитаване е онази част от околната среда, която обкръжава организма и въздейства пряко или косвено върху най-важните му функции като растеж, развитие, цъфтеж, опрашване, оплождане, размножаване и др. Средата на обитаване на всеки организъм включва множество компоненти с органичен или неорганичен произход. Всеки вид има своя собствена среда. За паразитите това е организъмът на гостоприемника, докато за някои сапрофити, които се хранят с гниещи органични вещества, такава среда може да бъде мъртвото органично вещество.

Едно от най-важните свойства на живите организми е приспособяването им (адаптация) към условията на околната среда и регулирането на жизнената им дейност в съответствие с периодичните и непериодичните промени в нея.

Съвкупността от жизнено важните и незаменими за всеки организъм елементи на средата се нарича *условия за съществуване*, а отделните компоненти на средата за съществуване, които оказват пряко или косвено влияние върху организмите, се наричат *екологични фактори*.

Съществуват редица класификации на екологичните фактори, в основата на които са предложени различни критерии. Най-широко разпространение е получила класификацията, предложена от Наумов (1963), използвана и от Даждо (1975), Каменов (1988) и др. В зависимост от произхода и механизма на въздействие са обособени три основни групи екологични фактори:

1. Абиотични фактори са целият комплекс от елементи на неживата природа, които оказват пряко или косвено влияние върху организмите. Според Радкевич (1983) това е сборно понятие, което включва съвкупността от условията на неорганичната материя, въздействащи върху организмите и техните съобщества. Те включват: *климатични* или *атмосферни фактори*, към които се отнасят светлината и лъчистата енергия на Слънцето, температурата, влажността на въздуха, валежите и снежната покривка, атмосферното налягане, вятърът, газовият състав на въздуха, стратификацията на атмосферата и движението на въздушните маси (вятър); *едафични (почвени) фактори*, които определят физичните свойства, механичния и химичния състав на почвата; *геоморфологични (орографски) фактори*, които определят особеностите и характера на релефа; *хидрологични фактори*, които определят особеностите на водната среда.

2. Биотични фактори са всички форми на вътрешовидови и междуовидови взаимоотношения между живите организми. Едни от тях могат да служат за храна, други се явяват среда на обитаване, трети участват в размножаването и пренасянето на семената на растенията. Има и такива, които оказват химично въздействие (алелопатия) или механично въздействие.

3. Антропогенни фактори са всички дейности на човека, които пряко или косвено са свързани с изменения в условията на околната среда. През последните десетилетия, антропогенните фактори са се превърнали в изключително мощна сила, която нарушава крехкото равновесие между отделните компоненти на биосферата. По силата си на въздействие могат да се равняват дори на геологичните процеси, които променят средата в продължение на хиляди, дори милиони години, а антропогенните го правят изключително бързо.

В зависимост от изменчивостта и приспособителната реакция на организмите Каменов (1988) отделя две основни групи фактори на средата: *устойчиви*, които не оказват влияние върху географското разпространение и числеността на популациите (такива са: земното притегляне, състава на атмосферата, хидросферата и литосферата, релефа и др.), и *неустойчиви* – изменящи се фактори, които биват *периодични* и *непериодични*. Първите са свързани с въртенето на Земята около оста ѝ и около Слънцето и обуславят периодичните изменения на времето и климата. Те обуславят денонощния и годишния ход на метеорологичните елементи, а самите организми са се приспособили към тази периодичност. Към периодичните фактори се отнасят слънчевата радиация, фотопериодизмът, приливите и отливите и др.

Към непериодичните фактори се отнасят абиотичните фактори, които са свързани с нахлуването на атмосферни фронтове, циклони и антициклони и свързаните с тях резки изменения на времето (облачност, вятър, валежи, температура и др.), биотични фактори (нападение от болести, неприятели и паразити, нападение от хищници) и антропогенни фактори (изсичане на горите,

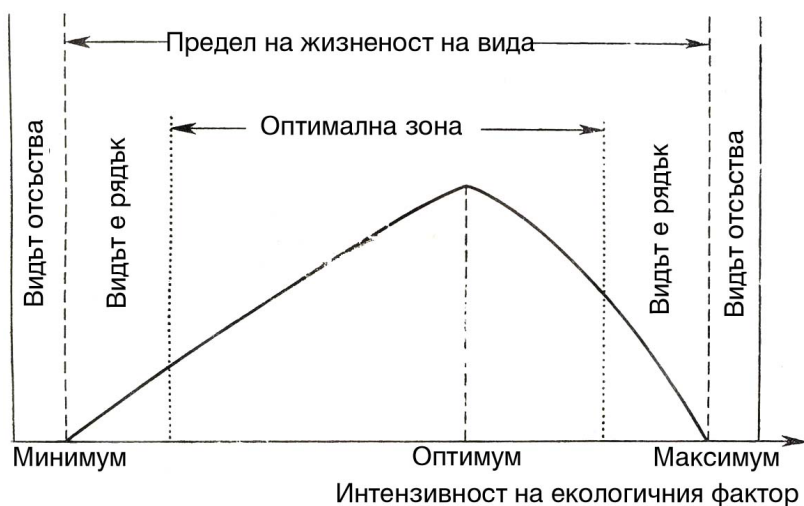
неправилно земеделие, аварии в АЕЦ, ядрени взривове и много други). Антропогенните фактори често внасят трайни изменения в условията на околната среда. Важна особеност е, че тяхното въздействие върху биосферата може да бъде положително или отрицателно. Положителни са въздействията, свързани например с дрениране на заблатени участъци, изграждане на полезащитни горски пояси и залесяване, разсейване на облаци и мъгли, борба срещу градушките, мразовете и други неблагоприятни явления на времето и климата. Отрицателните въздействия най-често са свързани с внасянето на съществени изменения в микроклимата, а оттук – и в останалите компоненти на биосферата. Те са най-опасните въздействия за живите организми.

Непериодично изменящите се фактори обикновено не оказват съществено влияние върху сезонните биологични цикли. Тяхното влияние се ограничава главно върху числеността и равномерното разпределение на популациите върху дадена територия. При голяма честота и продължителност те могат да доведат до трайни изменения и в периодичността на сезонните явления. Такъв е случаят със замърсяването на атмосферата и увеличената концентрация на т.нар. „парникови газове“, довели до трайни изменения на климата през последните две десетилетия в глобален и регионален мащаб.

В зависимост от характера на въздействие върху организмите екологичните фактори могат да се разделят на *пряко* или непосредствено *въздействащи* (светлина, топлина, влага и др.) и *косвено въздействащи* (надморска височина, релеф, наклон и изложение на склона и др.). Това влияние може да бъде различно както за отделните видове, така и за един и същи вид, но през отделни периоди и етапи от неговото развитие. Независимо от това могат да се отделят и общи закономерности в характера на въздействието на екологичните фактори върху организмите.

Общи закономерности при действието на факторите на средата върху организмите. Основата за взаимодействие между живата и неживата материя, което в най-голяма степен определя и жизнената дейност на организма – растеж, развитие, цъфтеж, опрашване, оплождане, размножаване и др., е динамичното равновесие между него и обкръжаващата го среда, което се нарича хомеостаза.

Въздействието на отделните екологични фактори силно зависи от тяхното количествено изражение – интензивност (степен на въздействие), продължителност, честота и диапазон на действие (амплитуда), формулирано като закон от Клементс и Шелфорд (1913), наречен **Закон за оптимума** (фиг. 1).



Фиг. 1. Интензивност на жизнените функции на организма, в зависимост от колебанието на екологичния фактор (по Даждо, 1975)

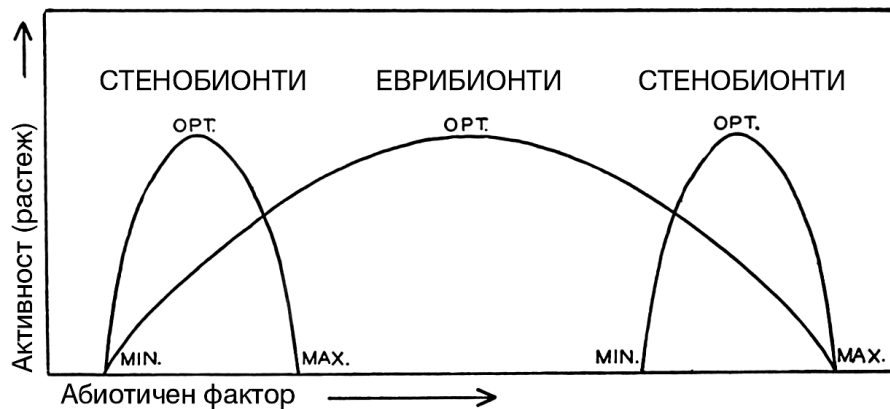
Една от основните характеристики за въздействие на отделните фактори е амплитудата – разликата между максималната и минималната стойност, която определя размаха или границите на вариране на екологичния фактор. За жизнената дейност на всеки организъм са характерни три кардинални точки – минимумът и максимумът, които определят критичните стойности за живота му, извън пределите на които той загива, и *биологичният оптимум* – най-благоприятните за вида

стойности на фактора, при който физиологичните процеси и развитието са най-добри. Само в зона оптимум настъпва размножаване.

С отдалечаване от оптимума и приближаване към крайните точки (минимум и максимум), жизнените процеси в организмите отслабват, те изпитват все по-нарастващ стрес, който определя зоната на угнетяване или *песимума*. Заедно с оптималната зона те определят степента на поносимост на видовете към даден фактор, а амплитудата на вариране на фактора – от неговия минимум до максимума, определя границите на толерантност или устойчивост на вида. Тесният диапазон на толерантност показва адаптация на организма към конкретни стойности на даден фактор като например сухоустойчивост, устойчивост към студ и др.

Способността на организмите да се адаптират към колебанията на един фактор или комплекс от фактори определя тяхната *екологична пластичност* (валентност, бионтност). Колкото по-широк е диапазонът, в границите на който видът може да съществува, толкова по-висока екологична пластичност притежава и толкова по-добра е неговата адаптация към резки изменения в условията на обкръжаващата го среда, и обратно – ограничени възможности за приспособяване към такива колебания имат екологически слабо пластичните или непластичните видове (Odum & Barrett, 2004).

В зависимост от екологичната пластичност всички организми се делят на две групи – *еврибионти* (eugos – широк) и *стенобионти* (stenos – малки, тесни) (фиг. 2).



Фиг. 2. Екологична пластичност на видовете (по Odum & Barrett (2004), с изменения)

Видове, които могат да съществуват при сравнително малки отклонения на екологичните фактори от оптималната зона и в сравнително тесни граници на толерантност или устойчивост на вида, се наричат *стенобионтни* или тясно специализирани. Тези видове притежават *ниска* екологична пластичност.

Организмите, които могат да съществуват при сравнително голям диапазон на вариране на екологичните фактори и притежават висока екологична пластичност, се наричат *еврибионтни* или широкоспециализирани. Тези видове притежават *висока* екологична пластичност.

Затова еврибионтността и стенобионтността характеризират отношението и степента на адаптация на организмите към средата и отделните фактори. За тази цел към названието на съответния фактор се използват приставките *еври-* или *стено-*. Видовете, които дълго време са се развивали при сравнително постоянни условия на външната среда, впоследствие губят екологичната си пластичност и придобиват чертите на стенобионтност и обратно – в условията на голям диапазон на вариране на екологичните фактори те повишават своята екологична пластичност и стават еврибионтни. Както подчертават Odum & Barrett (2004), стенобионтността на някои растителни и животински видове позволява тяхното използване в качеството им на екологични индикатори.

Всички екологични фактори са тясно свързани и въздействат комплексно върху организмите. Тяхното действие се основава на следните основни биологични закони (по Каменов, 1988):

Закон за равностепенност или незаменяемост на основните фактори за живота. Същността на този закон се състои в това, че нито един от жизнено необходимите фактори (въздух, светлина, топлина, влага), не може да бъде нито изключен, нито заменен с друг. Всички те са необходими за живота.

Закон за неравнозначност или неравноценност на факторите на средата. Съгласно този закон, по своето действие върху организмите факторите на средата се делят на основни или незаменими – които оказват непосредствено и силно влияние върху организмите, и без които популацията не може да съществува (светлина, топлина, влага, биогенни елементи, съдържание на незаменими макро- и микроелементи в почвата), и второстепенни – които имат косвена роля, като усилват или отслабват действието на основните фактори. Към тях се отнасят облачността, вятърът, атмосферното налягане, нивото на подпочвените води, прозрачността на водата и др.

Закон за минимума или лимитиращия (ограничаващия) фактор. Съгласно него при неизменящи се други условия оптималното развитие и максималната продуктивност на организмите се определя от този фактор, който се намира в минимум или в излишък. Факторите на средата, които са най-отдалечени от оптимума, затрудняват в най-голяма степен съществуването на вида. Той е заплашен даже и тогава, когато при оптимално съчетаване на всички останали фактори един от тях излезе извън границите на толерантност или устойчивост на вида (максимум и минимум). Към ограничаващите фактори се отнасят особеностите на климата – недостиг на влага или преовлажняване; късни пролетни и ранни есенни мразове и др. Например лимитиращ фактор в полусухите и сухите райони е влагата. В същото време тя се явява лимитиращ фактор и в заблатените и преовлажнените територии.

Закон за оптимума или съвкупното действие на факторите. Съгласно този закон всички фактори са взаимосвързани и действат в комплекс, но най-добро развитие и най-висока продуктивност се обезпечава само при оптималното съчетаване на всички екологични фактори.

Закон за критичните периоди. Съгласно него през отделни периоди и етапи от развитието си организмите са особено чувствителни към количественото значение на факторите на средата и особено към основните фактори – светлина, топлина и влага. За по-голяма част от висшите растения, например, критичен по отношение на влагата е периодът около цъфтежа. По отношение на температурата критичен към резки понижения в температурата на въздуха е целият период на образуване на репродуктивните органи (образуване на съцветия, цъфтеж, образуване на завръз, зреене). При животните неблагоприятното въздействие се проявява най-силно през периода на размножаване и хибернация.

Закон за относителната независимост на адаптация на организмите, съгласно който организмите могат да притежават висока адаптация към един екологичен фактор, но ограничени възможности към други фактори на средата; Тук е в сила и *правилото за екологичната индивидуалност*, съгласно което всеки вид притежава свои специфични адаптивни възможности. По-широко разпространение са получили организмите с по-широк обхват на поносимост към голям брой екологични фактор.

Организмите съществуват в диалектическо единство с непрекъснато променящите се условия на жизнената среда благодарение на своите приспособителни механизми или адаптивна реакция. Тяхна основна цел е постоянството на вътрешната среда в съответствие с промените на външната среда (хомеостаза), т.е. динамичното равновесие на структурата и процесите на организма при изменящите се условия на средата.

Векторите са един от най-важните елементи при клониране и експресия на хетероложни гени. По дефиниция, вектор е всяка ДНК молекула, способна да осъществи насочен пренос на генетична информация, като осигури: репликация чрез *ori* сайт (осигурява размножаване на вектора независимо от генома на клетката-гостоприемник); възможност за клониране на чужда ДНК чрез MCS или други методи (позволява вграждане на целевия ген, Gene of Interest – GOI); и селекция на трансгенни от нетрансгенни организми чрез селективен маркер (дава възможност да се избера само клетките, приели вектора).

Въз основа на своя произход, векторите се подразделят на плазмидни, вирусни/фагови, фагмиди, космиди и изкуствени хромозоми.

Класификация и основни компоненти на векторите

Векторите се класифицират по редица признаци като произход и капацитет за клониране, поведение в клетката-топология и др. Плазмидните вектори са производни на бактериални плазмиди (кръгови двДНК) и имат капацитет за клониране на чужди фрагменти до 3 – 4 kb. Те се използват за рутинно клониране и експресия на протеини. Фаговите вектори са базирани на вирусни секвенции и могат да клонират фрагменти до 30 – 35 kb (приместителни вектори), което ги прави подходящи за разработване на геномни ДНК библиотеки. Фагмидите са хибридни плазмидни вектори с включен фагов *ori* сайт (напр. *f1 ori*), които запазват капацитета на плазмидите, но позволяват получаване на едноверижна ДНК за секвениране или сонди. Космидите са плазмидни вектори, включващи фаговите *cos* краища на фаг-лямбда, и са проектирани да клонират големи фрагменти до 45 kb, използвани също за геномни ДНК библиотеки. Най-голям капацитет имат изкуствените хромозоми (ВАС – бактериални и YAC – дрождеви), които се прилагат за картиране на големи геноми, например човешкия. Според предназначението си векторите могат да бъдат подразделени на клониращи и експресионни. Клонирещите вектори са предназначени за изолиране, размножаване, субклонирание и секвениране на ДНК фрагменти. Те не предполагат задължително експресия на клонирания ген. Типични представители са pBR322, pUC и pBluescript SK+/- (следва да се даде кратко описание на един от векторите и да се представи диаграма на организацията му). Експресионните вектори от своя страна са проектирани така, че клонираният ДНК фрагмент да се транскрибира и транслира в белтъчен продукт. Те съдържат промотори, рибозомно-свързващи сайтове, терминатори и често регулаторни елементи за контрол на експресията. Всички те изискват клониране в определена ориентация и спазване на рамката на четене на зададена от промотора. Пример за такъв вектор е pKK233-2 (следва да се даде кратко описание на вектора и да се представи диаграма на организацията му).

Според капацитета си за конюгативен трансфер плазмидните вектори биват конюгативни и неконюгативни. Конюгативните плазмиди притежават способност да се предават от една бактериална клетка на друга чрез бактериална конюгация. Това свойство има значение както за експерименталната ефективност, така и за биобезопасността. Неконюгативните плазмиди не могат самостоятелно да се пренасят между клетки. Поради по-ниския риск от хоризонтален генен трансфер те са предпочитани в лабораторната практика.

Според модела на функциониране векторите могат да бъдат подразделени както следва:

- Автономни вектори – съдържат всички необходими елементи за репликация и функциониране в клетката-гостоприемник.
- Бинарни вектори – изискват допълнителен помощен вектор за правилното си функциониране.
- Коинтегративни вектори – функционират чрез рекомбинация между два различни вектора, които поотделно не са автономни.

Всеки вектор, независимо от типа следва да притежава няколко основни генетични елемента. Първият е началото на репликация (*ori*-сайт), който отговаря за инициране на процеса на репликация и е пряко участва в контрола на броя копия на плазмидите в клетката. Броят копия

на плазмидите зависи също и от размера на плазмидната молекула, като зависимостта е обратно пропорционална. Например, pBR322 ori осигурява малък до среден брой копия, около 15 – 20, докато мутиралният pMB1 ori (използван в pUC) осигурява голям брой копия, около 500 – 700. Векторите се делят на такива със слаб контрол (висок брой копия, напр. pUC) и строг контрол (нисък брой копия, напр. pSC101). Вторият компонент е селективен ген, който обикновено кодира устойчивост към антибиотик (AmpR, TetR, KmR и др.) и се използва за селекция на трансгенни от нетрансгенни бактерии. Третият ключов елемент е множественият сайт за клониране (MCS). Това е къса област от вектора, в която са клъстерирани няколко уникални рестрикционни сайта. MCS служи като място за инсертиране на чуждата ДНК и често е локализиран в рамките на втори селективен или репортерен ген, което позволява скрининг на рекомбинанти чрез инсертна инактивация или синьо-бяла селекция.

Плазмидни вектори: Класически примери и механизми

Плазмидните вектори са най-често използвани поради лесната им поддръжка, добив във високи количества и удобство за работа.

Вектор pBR322. Векторът pBR322 е един от първите популярни плазмидни вектори, създаден през 1977 г. Той е с размер 4361 bp и има ori от pBR322 ori, който осигурява малък до среден брой копия. Основна негова характеристика е, че носи два гена за устойчивост: AmpR (ампицилин) и TetR (тетрацилин). Всеки от тези гени може да бъде инактивиран чрез инсерция; например, инсертирането на ДНК фрагмент с BamHI или HindIII инактивира TetR гена. Тази характеристика позволява инсертна инактивация за скрининг на рекомбинанти. Недостатъците на pBR322 включват неговата конюгативност (потенциален риск за хоризонтален генен трансфер), ограничени възможности за клониране, поради малкото уникални рестрикционни сактове и сравнително по-нисък добив на ДНК в сравнение с по-новите вектори.

Векторите pUC са с по-малък размер (2686 bp) и са неконюгативни. Те използват pUC ori (мутирал pMB1 ori), който осигурява голям брой копия (около 500 – 700) и висок добив на плазмидна ДНК. За разлика от pBR322, pUC19 има само един селективен ген – AmpR. За скрининг на рекомбинанти се използва синьо-бяла селекция чрез lacZ ген, кодиращ alpha-субединицата на beta-галактозидазата, който е прекъснат от MCS при успешно клониране (При представяна на тази част следва да се представи фигура илюстрираща картата на вектора pUC19).

Фагмиди – вектори pBlueScript II SK+/-

Това са хибриди вектори (фагмиди) с размер 2961 bp, които имат pUC ori и AmpR ген (подобно на pUC) и използват синьо-бяла селекция. Ключов фагов елемент е включването на fl ori-сайт на бактериофага fl. Наличието на този ori позволява, при инфекция с помощен фаг, клонираната двойноверижна ДНК да бъде пакетирани и получена като едноверижна ДНК, което е важно за секвениране или получаване на ДНК сонди. Векторът също така разполага с два фагови промотора (T3 и T7), фланкиращи MCS, които дават възможност за in vitro синтез на РНК от клонирания фрагмент.

Фагови вектори и космиди

Фаговите вектори са разработени за клониране на по-големи ДНК фрагменти, необходими при изграждане на геномни библиотеки. Бактериофаг lambda е типичен фаг с „глава и опашка“ и литичен/лизогенен цикъл. Геномът му е 49 kb, линейен, с cos сайтове в краищата. Cos сайтовете са 12 bp едноверижни краища, които са комплементарни и позволяват ковалентно затваряне на ДНК след инжектирането в *E. coli*. Те са и места за нарязване от А протеина (ендонуклеаза), който генерира индивидуални фагови геноми от дългите ДНК вериги по време на пакетиранието. Фаг-lambda може да толерира ДНК фрагменти, които са с около 10% по-дълги или по-къси от нормалния му геном. Заместителните вектори (напр. EMBL4) използват концепцията за заместване на ненужен за литичния цикъл фрагмент (stuffer регион) с чужда ДНК, което увеличава капацитета за клониране до 25 kb.

Космидите са хибридни вектори, които съчетават характеристиките на плазмидите и фаговите вектори. По същност те са плазмидни вектори, модифицирани с два cos края на фага lambda.

Космидът се държи като плазмид в *E. coli*, но може да бъде пакетирани като фагов геном. Ключовият механизъм е, че фаговият пакутиращ механизъм на lambda фага разпознава два *cos* сайта и пакутира ДНК между тях, което позволява *in vitro* пакутиране на голям ДНК фрагмент. Основното предимство е клониране на фрагменти до 45 kb, което ги прави идеални за създаване на геномни ДНК библиотеки.

Клониране в плазмидни вектори, скрининг и селекция на рекомбинанти

Класическият подход за клониране използва ензимите рестриктази за нарязване и ДНК лигаза за свързване и протича в няколко етапа: подготовка на векторната и чуждата ДНК, лигиране, трансформация, селекция и скрининг.

Селекция на трансформанти. Целта е да се изолират само бактериалните клетки, които са приели ДНК молекула (трансформанти), което се постига чрез селективния ген на вектора (напр. AmpR). Култивирането на твърда среда, съдържаща съответния антибиотик, осигурява прорастването само на клетките, приели плазмидна ДНК (трансгенни).

Скрининг за рекомбинанти. Скринингът е критичната стъпка за различаване на нерекомбинантните плаزمиди (самозатворен вектор) от рекомбинантните плазмиди (вектор с инсериран GOI).

Инсертна инактивация. Този метод разчита на наличието на втори селективен ген (напр. TetR в pBR322), чиято функция се инактивира (прекъсва) при инсерирането на чуждата ДНК в рамките му. Използва се фактът, че включването на чужда ДНК в рамките на гена за устойчивост към антибиотик (напр. TetR) води до промяна в аминокиселинната последователност на кодиращия протеин, което го прави нефункционален. Процедурата (пример pBR322) започва със селекция, където трансформантите се посяват на среда с ампицилин и всички прорасли колонии са AmpR. Следва скрининг чрез реплика (копиране на coloniите) на втора среда, съдържаща тетрациклин. Нерекомбинантните клонове (празен вектор) са с генотип AmpR, TetR и прорастват и на двете среди, докато рекомбинантните клонове (с инсерт) са с генотип AmpR, TetS и прорастват само на ампицилин. Рекомбинантните клонове са тези, които не са прораснали на тетрациклин, поради инактивацията на TetR гена.

Синьо-бяла селекция. Този метод се използва при вектори като pUC и pBluescript, където клонирането се извършва в MCS, разположен в рамките на lacZ репортерния ген. Принципът се основава на alpha-комплементация, където векторният lacZ ген кодира alpha-субединицата на beta-галактозидаза, допълвайки дефекта на бактериалния щам гостоприемник. Когато плазмидът е празен, се формира функционален ензим. Инсерирането на чуждата ДНК в MCS прекъсва lacZ рамката на четене, като по този начин деактивира ензима beta-галактозидаза.

Процедурата включва посевка на среда, съдържаща селективен антибиотик (Amp), X-gal (безцветен хромогенен субстрат) и IPTG (индуктор). Нерекомбинантните клонове (празен вектор) имат активна beta-галактозидаза, която разгражда X-gal, образувайки синьо съединение. Рекомбинантните клонове имат неактивна beta-галактозидаза и coloniите остават бели. Белите колонии се избират като вероятни рекомбинанти. Този подход е по-ефективен и бърз от инсертната инактивация, тъй като не изисква пренасяне на coloniите на втора селективна среда (При представяна на тази част следва да се представи фигура илюстрираща синьо-бяла селекция).

Получаването на индивидуални ДНК клонове представлява фундаментален и концептуално определящ елемент на съвременната молекулярна биология и генното инженерство. Чрез изолирането, поддържането и възпроизводимото анализиране на отделни ДНК фрагменти в подходящи векторни и хост-системи става възможно детайлното изследване на структурата, функцията и регулацията на гените. Тези подходи са в основата на функционалната геномика, молекулярната медицина, индустриалната биотехнология и синтетичната биология.

Геномни и копи ДНК библиотеки

Геномните библиотеки представляват представителни колекции от рекомбинантни клонове, които съвкупно обхващат целия геном на даден организъм. Те включват както кодиращите гени, така и некодиращите региони – интрони, промоторни области, енхансери, терминатори и интергенни последователности. Основната цел на геномната библиотека е да осигури дългосрочен и стабилен достъп до всяка геномна последователност, независимо от това дали съответният ген се експресира, в каква тъкан и при какви физиологични условия. Поради тази причина геномните библиотеки са особено ценни за структурен анализ на генома, за идентифициране на регулаторни елементи и за сравнителна геномика.

Първата и критична стъпка при разработването на геномна библиотека е изолирането на висококачествена, високомолекулна геномна ДНК. Изискванията към този етап са строги, тъй като механичните срязвания и химичните увреждания могат да доведат до фрагментация и загуба на информация. Изолираната ДНК се подлага на частично рестрикционно третиране с една или повече рестрикционни ендонуклеази. Частичната рестрикция има за цел да генерира припокриващи се ДНК фрагменти с различна дължина, което осигурява пълно покритие на генома и минимизира риска даден ген да бъде разрязан на нефункционални части.

След рестрикционната обработка ДНК фрагментите се фракционират по размер чрез агарозна гел-електрофореза. Изборът на фрагменти с определена дължина е пряко свързан с използвания вектор. За клониране на малки фрагменти (до няколко килобази) могат да се използват плазмидни вектори, докато за по-големи участъци се предпочитат фагови вектори, космиди, бактериални изкуствени хромозоми (BAC) или дрождеви изкуствени хромозоми (YAC). След лигиране на геномните фрагменти във вектора се извършва трансформация или трансдукция в подходяща хост-система, най-често *E. coli* или *Saccharomyces cerevisiae*. Всеки получен бактериален или дрождев клон съдържа различен фрагмент от генома, а съвкупността от всички клонове образува геномната библиотека. Следва да се представи фигура, илюстрираща получаването на геномна ДНК библиотека.

Съществено свойство на всяка геномна библиотека е нейната пълнота или представителност, която се дефинира като вероятността всеки ген или геномен участък да бъде представен поне в един клон. Теоретично необходимият брой клонове зависи от големината на генома, средния размер на вмъкнатите фрагменти и желаната вероятност за пълно покритие. В практиката това налага работа с голям брой клонове и използване на високоефективни методи за трансформация и скрининг.

Копи ДНК библиотеките представляват принципно различен тип библиотеки, тъй като те отразяват само експресиранията част от генома. Изходният материал за тяхното създаване е информационната РНК, изолирана от определена тъкан, орган или клетъчна популация при конкретни физиологични или експериментални условия. Това означава, че кДНК библиотеката съдържа само онези гени, които се транскрибират към момента на изолиране на РНК, като липсват интрони и повечето регулаторни некодиращи последователности.

Изолирането на РНК изисква особено внимание поради високата чувствителност на РНК молекулите към действието на рибонуклеази. За получаване на висококачествена РНК се използват строги условия, включващи инактивиране на РНази и работа в стерилна среда. Тъй като информационната РНК представлява само малка част от тоталната РНК, често се прилага обогатяване на РНК с рибозомни РНК.

тяване на мРНК чрез използване на олиго(dT) конюгирани носители, които се свързват със специфичната поли(А) опашка на еукариотните мРНК.

След изолирането на мРНК се извършва синтез на първата κДНК верига чрез обратна транскрипция. Процесът се катализира от обратна транскриптаза и изисква праймер, който може да бъде олиго(dT), случаен хексамер или ген-специфичен олигонуклеотид. След частично или пълно отстраняване на РНК матрицата се синтезира втората ДНК верига с участието на ДНК полимераза. Получената двуверижна κДНК се подлага на допълнителни ензимни обработки за получаване на подходящи краища за клониране. Следва да се представи фигура, илюстрираща получаването на κДНК библиотека.

κДНК библиотеките имат редица предимства, особено когато целта е експресия на еукариотни гени в прокариотни системи. Липсата на интрони позволява директен синтез на функционален белтък, без необходимост от сплайсинг. От друга страна, κДНК библиотеките не съдържат информация за регулаторните елементи на гените и не отразяват пълната геномна организация, което ограничава тяхното приложение при определени типове анализи.

Скрининг на библиотеки

Скринингът на геномни и копиДНК (κДНК) библиотеки представлява ключов етап в геномното инженерство, тъй като позволява идентифицирането и изолирането на конкретни гени или клонове с желани функционални характеристики. Независимо от типа библиотека, целта на скрининга е да се открият онези рекомбинантни клонове, които съдържат целевата ДНК последователност или експресират съответния белтъчен продукт. Изборът на подходящ метод за скрининг зависи от естеството на библиотеката, характеристиките на търсения ген и наличната информация за неговата структура или експресия.

Скринингът на геномните библиотеки най-често се базира на анализ на ДНК ниво. За разлика от тях, κДНК библиотеките представляват прилагането както на нуклеин-киселинни, така и на експресионно-базирани методи за скрининг.

Критичен фактор при всички подходи е представителността на библиотеката, т.е. вероятността търсеният ген да присъства поне в един клон. Поради големия брой клонове, особено при геномните библиотеки, скринингът изисква ефективни, чувствителни и специфични методи.

Най-широко използваните подходи за скрининг на геномни и κДНК библиотеки са хибридационните методи, базирани на комплементарното свързване между нуклеинови киселини. Те изискват наличието на сонда – маркирана ДНК или РНК последователност, хомоложна на търсения ген.

Друг метод за скрининг е т. нар. colony и plaque хибридизация. При този подход бактериалните колонии (или фагови плаки) се реплицират върху мембрана, след което клетките се лизират и ДНК се фиксира върху носителя. Мембраната се инкубира с белязана сонда, която се хибридира със съответните комплементарни клонове. Положителните сигнали позволяват директна идентификация на клоновете, съдържащи целевата последователност. Този метод е приложим както за геномни, така и за κДНК библиотеки и е особено ефективен при наличие на предварителна информация за нуклеотидната последователност на гена.

Когато библиотеката е конструирана в експресионен вектор, е възможно скринингът да се извърши на протеиново ниво. Това е характерно предимно за κДНК библиотеки, при които целта е изолиране на ген, кодиращ определен белтък. В този случай може да се използва Western blot. При Western blot скрининга рекомбинантните протеини се експресират в host системата (обикновено *E. coli*), разделят се чрез SDS-PAGE и се детектират с помощта на специфични антитела. Този метод позволява не само идентификация на положителните клонове, но и оценка на молекулното тегло и експресионното ниво и стабилността на белтъка.

Получаване на индивидуални клонове, чрез PCR

Друг подход за получаване на индивидуални клонове е използването на полимеразна верижна реакция. Тя представлява мощен и широко използван метод за получаване на индивидуални ДНК клонове по целенасочен начин. PCR позволява селективна амплификация на конкретна ДНК последователност, дефинирана от два праймера, които фланкират целевия регион. Методът се основава на циклично повтарящи се етапи на денатурация на двойноверижната ДНК, анелиране на праймерите и елонгация на новосинтезираните вериги от термостабилна ДНК полимераза.

Изборът на полимераза е от решаващо значение за последващото клониране.

Класическата Taq ДНК полимераза притежава способността да добавя по един несдвоен аденинов остатък в 3'-края на PCR продукта. Тази характеристика, първоначално считана за недостатък, се превръща в основа на T/A клонирането. За разлика от нея, високоточните (high fidelity) полимерази не добавят такива надвеси, което изисква допълнителни ензимни стъпки при подготовката на PCR продукта за клониране.

Клонирането на PCR продукти в pGEM-T Easy е класически пример за T/A клониране. Векторът pGEM-T Easy е линеен плазмиден вектор с предварително добавени 3'-тиминови нуклеотиди, които са комплементарни на 3'-адениновите краища на PCR продукта. Това позволява ефективно и ориентационно независимо лигиране без необходимост от рестрикционна обработка на амплифицирания фрагмент. Следва да се представи фигура, илюстрираща вектора и клонирането в него.

Векторът съдържа репликационен произход от типа pUC, което осигурява висок брой копия в бактериалната клетка, както и ген за резистентност към ампицилин, използван за селекция на трансформиранияте клетки. Допълнително, в зоната на клониране е разположен lacZ α фрагмент, който позволява прилагането на синьо-бяла селекция. Вмъкването на чужд ДНК фрагмент прекъсва рамката на lacZ α , което води до образуване на бели колонии върху хранителна среда, съдържаща X-gal и IPTG.

След лигирането рекомбинантните плазмиди се въвеждат в компетентни клетки на *E. coli* чрез химична трансформация или електропорация. Получените колонии се подлагат на селекция и скрининг, а положителните клонове се анализират допълнително чрез PCR, рестрикционен анализ или секвениране. По този начин се потвърждава наличието, размерът и интегритетът на клонируания фрагмент.

Получаването на индивидуални ДНК клонове чрез описаните подходи създава основата за последващи функционални, структурни и експресионни изследвания. Геномните и кДНК библиотеките осигуряват глобален и систематичен достъп до генетичната информация, докато PCR-базираното клониране предоставя бърз и целенасочен инструмент за изолиране на конкретни гени. Комбинацията от тези методи формира ядрото на съвременните генно-инженерни стратегии и продължава да бъде ключов двигател за развитието на биологичните и биомедицинските науки.

Стандартизирани системи за клониране на гени

Gibson Assembly е широко използван в синтетичната биология, генното инженерство и други области, където е необходимо бързо и прецизно изграждане на сложни ДНК конструкции. Има и модифицирани версии на метода, които допълнително подобряват ефективността и надеждността, особено при клониране на големи ДНК фрагменти с високо съдържание на GC.

Gibson Assembly е стандартизиран метод за клониране на ДНК, който позволява едновременното клониране на множество ДНК фрагменти в една реакция. Този метод елиминира нуждата от рестрикционни ензими и лигаза в традиционния смисъл, предлагайки по-бърз, по-гъвкав и по-ефективен подход за конструиране на рекомбинантни ДНК молекули. Методът се основава на едновременното действие на три ензима в една изотермална реакция (протичаща при постоянна температура):

1. **5' Екзонуклеаза:** създава едноверижни ДНК лепливи краища (overhangs).
2. **ДНК Полимераза:** запълва абазичните никове.
3. **ДНК Лигаза:** формира фосфодиестерната връзка между ДНК фрагментите.

Клонирането по метода на Гибсън включва няколко етапа: 1) **проектиране на фрагментите с припокриващи се краища:** Всеки ДНК фрагмент, който трябва да бъде сглобен се разработва така, че да има къси, припокриващи се краища от приблизително 20 – 40 базови двойки със съседните фрагменти. Обикновено тези фрагменти се генерират чрез PCR; 2) **Изотермно асемблиране:** ДНК фрагментите, смесват в една епруветка с трите ензима и буфер. Реакцията се провежда при фиксирана температура, обикновено 50°C. Екзонуклеазата разгражда 5' краищата на двуверижните ДНК фрагменти, създавайки едноверижни краища. Благодарение на тях ДНК фрагментите се свързват в определената последователност. След анелинга се формират абазични никове, които следва да се поправят от ДНК полимеразата. Накрая, ДНК лигазата формира фосфодиестерна връзка между ДНК фрагментите

Асемблирането по Гибсън предполага редица предимства като: 1) **Висока Ефективност:** Методът е изключително ефективен за сглобяване на множество фрагменти едновременно; 2) **Гъвкавост:** Позволява сглобяване на фрагменти с произволни последователности, без да е необходимо наличието на специфични рестрикционни места; 3) **Изотермна реакция:** Реакцията протича при постоянна температура, което опростява протокола и намалява необходимостта от специализирано оборудване; 4) **Бързина:** Целият процес може да бъде завършен в рамките на един час; 5) Може да се използва за сглобяване на много големи ДНК молекули, включително цели геноми или синтетични хромозоми; 6) **Scarless метод:** Крайният ДНК конструктор не съдържа нежелани „белези“ или рестрикционни места на местата на свързване.

Golden Gate клонирането е друга широко използвана техника в молекулярната биология, предназначена за ефективно и прецизно сглобяване на множество ДНК фрагменти в определен ред. Този метод улеснява създаването на сложни рекомбинантни ДНК конструкции, в повечето случаи в рамките на една реакция. В основата на Golden Gate клонирането стои използването на рестрикционни ензими от тип IIS. За разлика от традиционните рестрикционни ензими, които разрязват ДНК в рамките на своята разпознаваща последователност, ензимите от тип IIS разпознават специфична последователност, но извършват разрязването на определено разстояние извън нея. Това уникално свойство е ключово за метода, тъй като позволява създаването на специфични, непалиндромни, лепкави краища, които са независими от разпознаващата последователност на ензима.

GoldenGate клонирането включва няколко етапа: 1) *In silico* подготовка: Всеки ДНК фрагмент, който ще бъде сглобен, се фланкира от двете страни с уникални последователности. От едната страна се поставя разпознаващата последователност за ензима от тип IIS и желаният „ляв“ лепкав край, а от другата страна – разпознаващата последователност за същия ензим и желаният „десен“ лепкав край. Тези лепкави краища са проектирани така, че да са уникални и съв-

местими само със съседните фрагменти в желаната последователност; 2) Асемблиране: Всички ДНК фрагменти или плазмиди, заедно с реципиентния плазмид (вектор) и рестрикционния ензим от тип IIS, както и ДНК лигаза, се добавят в една реакционна смес.

Реакцията протича в 15 цикла на повишаване до 37°C и понижаване на температурата до 18°C, които редуват активността на рестрикционния ензим и ДНК лигазата. При една температура 37°C, рестрикционният ензим разрязва ДНК фрагментите и вектора, освобождавайки лепкавите краища. Тъй като разпознаващите последователности на ензима са връзани по време на разрязването, те не присъстват в получените фрагменти, което предотвратява повторното разрязване на вече сглобените ДНК молекули. При температура 18°C, ДНК лигазата свързва свободните фрагменти заедно. Благодарение на уникално проектираните лепкави краища, фрагментите се свързват само в правилния ред и ориентация.

Този цикличен процес на разрязване и свързване продължава, докато всички фрагменти се сглобят правилно във вектора. Неправилно сглобените или нелигирани фрагменти се разрязват отново от ензима, докато само правилният конструктор остава стабилен. Представети процеса схематично, дайте примери за рестриктази от тип IIS.

Golden Gate, е по-усъвършенствана, стандартизирана и циклична система, изградена върху принципите на Golden Gate.

И двата метода споделят една и съща фундаментална технология, описана по-горе.

Разликата между двата метода се крие в логиката на сглобяване и крайните резултати, които се целят

	Golden Gate	Golden Braid
Логика на сглобяване	Линейна и еднократна. Сглобяват се набор от части (ниво 0) в краен вектор (ниво 1). Процесът обикновено спира дотук.	Йерархична и циклична. Използва две редуващи се нива на вектори (α и ω) и два различни ензима (напр. BsaI и BsmBI).
Мащабируемост	Ограничена. Подходящ за сглобяване на една транскрипционна единица или умерено сложна конструкция. Създаването на по-големи конструкции изисква ново планиране и често допълнителни стъпки на клониране.	Теоретично неограничена. Конструкция, сглобена на ниво β , може веднага да се използва като <i>единична част</i> за ново сглобяване на ниво α . Този цикъл ($\alpha \rightarrow \omega \rightarrow \alpha \dots$) позволява експоненциално нарастване на сложността.
Стандартизация	Опционална. Можете да използвате принципа на Golden Gate по напълно персонализиран начин. Съществуват стандарти (като MoClo), но не са задължителни за прилагане на метода.	Вродено стандартизирана. За да работи системата, <i>трябва</i> да се придържате към стриктните правила на Golden Braid за дизайн на вектори и последователности на „лепкавите краища“. Това насърчава обмена на части.
Краен продукт	Обикновено крайна конструкция, съдържаща няколко генетични елемента (напр. промотор-ген-терминатор).	Многогенни конструкции, съдържащи цели метаболитни пътища или сложни генетични вериги, сглобени от предварително конструирани транскрипционни единици.

Получаване на рекомбинантни белтъци в бактерии и дрожди

Технологията на рекомбинантната ДНК революционизира биотехнологиите и медицината, позволявайки производството на специфични белтъци в организми-гостоприемници, различни от естествения им източник. Като основни „клетъчни фабрики“ за тази цел са се наложили бактериите и дрождите, като всеки от тези микроорганизми предлага уникален набор от предимства и недостатъци.

Производство в бактерии (*Escherichia coli*)

Escherichia coli е най-широко използваната система за производство на рекомбинантни белтъци. Това се дължи на комбинация от бърз растеж, евтино култивиране, отлично познаване на генетиката ѝ и възможност за постигане на изключително високи добиви. Въпреки това, като прокариотна система, *E. coli* не може да извършва сложни посттранслационни модификации, което е основен недостатък при производството на много еукариотни белтъци. Често срещан проблем е и образуването на неразтворими и нефункционални белтъчни агрегати, наречени включения.

Една от най-популярни системи за експресия в *E. coli* е рЕТ системата. Процесът обикновено следва няколко основни стъпки:

Създаване на експресионен вектор: Първата стъпка е клонирането на гена, кодиращ целевия белтък, в експресионен вектор от серията рЕТ. Тези вектори съдържат няколко ключови елементи: 1) Силен промотор: използва промоторът на бактериофаг Т7, който е изключително активен и специфичен; 2) Оператор-*lac* оператор, който позволява строг контрол и репресия на експресията в отсъствие на индуктор; 3) Селективен маркер: Ген за антибиотична резистентност (ампицилин или канамицин), който позволява само клетки, съдържащи плазмид, да растат в присъствието на антибиотика; 4) N или C терминален таг-къса последователност, кодираща афинитетен „таг“ (напр His-tag), който се слива с целевия белтък и впоследствие улеснява значително неговото пречистване и детекция.

Трансформация: След като е конструиран, рекомбинантният плазмид се въвежда в специално създаден щам на *E. coli*, какъвто е BL21(DE3). Уникалното при този щам е, че той носи в своя геном гена за РНК полимеразата на фага Т7. Този ген е поставен под контрола на *lac* промотор, което означава, че самата полимераза също ще бъде произведена само след добавяне на индуктор.

Култивиране и индукция: Трансформираните бактерии се отглеждат в течна хранителна среда в биореактор при оптимални условия. Когато културата достигне логарирмична фаза на развитие, се добавя индуктор – изопропил-β-D-тиогалактопиранозид (IPTG). IPTG премахва репресията от *lac* промотора, което води до синтез на Т7 РНК полимераза. Тази полимераза, от своя страна, се свързва със силния Т7 промотор на плазмид и започва интензивна транскрипция на целевия ген, водейки до свръхпроизводство на рекомбинантния белтък.

Клетъчен лизис: След няколко часа индукция, клетките се отделят от културалната среда чрез центрофугиране. Тъй като белтъкът се произвежда вътреклетъчно, следващата стъпка е лизис на клетките, което може да се осъществи чрез различни методи като ултразвук, високо налягане или ензимно третиране.

Пречистване: Полученият клетъчен лизат съдържа смес от множество различни бактериални белтъци, нуклеинови киселини и други компоненти, заедно с целевия рекомбинантен белтък. Пречистването е ключов етап и зависи от това дали белтъкът е разтворим или е в телца на включване.

Производство в дрожди (*Pichia pastoris*)

Дрождите, като едноклетъчни еукариоти, предлагат важна алтернатива, особено за белтъци, изискващи посттранслационни модификации. Метилотрофните дрожди *Pichia pastoris* са сред най-популярните дрождеви системи, тъй като предполагат постигане на изключително висока клетъчна плътност и притежава много силен и строго регулируем промотор. Системата за експресия на гени в *P. pastoris* се основава на способността им да използват метанол като източник на енергия. Процесът обикновено следва няколко основни стъпки:

Създаване на експресионен вектор и трансформация с последваща интеграция: Подобно на бактериалната система, генът на интерес се клонира в експресионен вектор. Този вектор съдържа *P_{AOX1}* промотора. Често се добавя и сигнална последователност (например от α-MF на *S. cerevisiae*), която насочва синтезирания белтък за секреция извън клетката. За разлика от *E. coli*, при *Pichia* плазмидът не остава като отделна молекула, а се интегрира в генома на клетката. Това се постига чрез линейаризиране на вектора в област, която е хомоложна на част от генома на дрождата (например в самия *AOX1* локус).

Трансформация и селекция: Линейаризираният плазмид се трансформира в клетките на *Pichia* чрез електропорация. Чрез хомоложна рекомбинация експресионната касета се интег-

рира в хромозомната ДНК, създавайки генетично стабилна дрождева линия. Следва селекция на успешните трансформанти (например чрез ауксотрофен маркер или резистентност към антибиотик като зеоцин).

Култивиране и индукция: Производството обикновено протича в биореактор и е разделено на фази: 1) Фаза на растеж (Batch Phase). Клетките се отглеждат в среда с въглероден източник като глицерол. При тези условия P_{AOXI} промоторът е напълно потиснат и не се произвежда рекомбинантен белтък, но се натрупва голямо количество биомаса; 2) Фаза на подхранване с глицерол (Fed-batch Phase). За достигане на още по-висока клетъчна плътност, към културата се добавя контролирано количество глицерол; 3) Фаза на индукция. След изчерпване на глицерола, започва поетапно и контролирано подаване на метанол в средата. Метанолът служи едновременно като индуктор на P_{AOXI} промотора и като въглероден източник за клетките. Тази фаза може да продължи няколко дни; 4) Изолиране и пречистване на продукта.

Тъй като белтъкът често се секретира в културалната среда, първата стъпка е отделянето на клетките от течната фаза (супернатанта) чрез центрофугиране или филтрация. Супернатантата, съдържаща целевия белтък и много малко други дрождеви протеини, се подлага на пречистване. Този процес е значително по-опростен в сравнение с пречистването от бактериален лизат. Обикновено включва стъпки като концентриране на средата, последвано от няколко хроматографски процедури (афинитетна, йонообменна, гел-филтрация) до получаване на хомогенен продукт.

Пречистване на рекомбинантни белтъци

Производството на рекомбинантен белтък в хетерожна система е само първата стъпка. Полученият продукт е груба смес, съдържаща целевия белтък, но и множество други клетъчни компоненти като протеини, нуклеинови киселини, липиди и метаболити. Процесът на пречистване има за цел да изолира целевия белтък от тази сложна смес до висока степен на чистота, като същевременно запази неговата правилна триизмерна структура и биологична функция. Стратегията за пречистване зависи силно от начина на производство и от биохимичните свойства на самия белтък. Хроматографията е основният инструмент за разделяне на белтъци. Тя се основава на преминаването на белтъчната смес през колона, съдържаща неподвижна фаза, която взаимодейства по различен начин с различните белтъци в сместа.

Афинитетна хроматография (Affinity Chromatography – AC). Методът се основава на високоспецифичното и обратимо свързване между белтъка и лиганд, имобилизиран върху хроматографската матрица. Най-често към рекомбинантния белтък се добавя къса последователност, наречена афинитетен таг. Най-популярният такъв е полихистидиновият таг (His-tag), състоящ се от 6 до 10 последователни хистидинови остатъка. Пречистването преминава през три основни етапа: 1) свързване – Избистреният лизат се пропуска през колона, съдържаща матрица с имобилизирани метални йони (най-често никел, Ni-NTA, или кобалт, Co-Talon) (Javanshad, 2023). His-тагът има силен афинитет към тези йони и се свързва здраво с тях, докато по-голямата част от останалите клетъчни белтъци преминават през колоната без да се задържат; 2) промиване – Колоната се промива с буфер, съдържащ ниска концентрация на конкурентен агент (напр. имидазол), за да се отмият неспецифично свързаните примесни белтъци; 3) елуиране – Целевият белтък се освобождава от колоната чрез пропускане на буфер с висока концентрация на имидазол, който се конкурира с His-тага за свързване с металните йони и така го измества.

Методът е изключително ефективен и често позволява достигане на над 90% чистота само в една стъпка, намалявайки значително броя на необходимите етапи на пречистване.

Йонообменна хроматография (Ion-Exchange Chromatography – IEX). Този метод разделя белтъците въз основа на техния сумарен повърхностен заряд при дадено рН.

Всеки белтък има уникална изоелектрична точка (pI) – рН, при което сумарният му заряд е нула. При рН над pI белтъкът е отрицателно зареден, а при рН под pI – положително.

В зависимост от заряда на белтъка може да се използват два варианта на йонообменна хроматография анионообменна – Използва положително заредена матрица, която свързва отрицателно заредени белтъци (аниони). Или катионообменна хроматография: Използва отрицателно заредена матрица, която свързва положително заредени белтъци (катиони). Пречистването се извършва в два основни етапа: 1) свързване: Белтъчната смес се нанася върху колоната в буфер с

ниска йонна сила (ниска концентрация на соли). Белтъците с подходящ заряд се свързват с матрицата. 2) елуиране: Свързаните белтъци се освобождават чрез постепенно увеличаване на концентрацията на сол в буфера (солени градиент). Солните йони се конкурират с белтъците за свързване с матрицата и при определена концентрация изместват даден белтък. Белтъците с по-висок заряд се нуждаят от по-висока солева концентрация, за да бъдат елуирани.

ИЕХ е отлична стъпка за междинно пречистване или полиране, като ефективно разделя белтъци, които са останали като примеси след афинитетната хроматография.

Гел-филтрационна хроматография (Size-Exclusion Chromatography – SEC). Известен още като молекулно-ситова хроматография, разделя белтъците въз основа на техния размер и форма. Колоната е запълнена с порести сферични частици (матрица). Когато белтъчната смес преминава през колоната, малките белтъци навлизат в порите на частиците, което забавя тяхното движение. Големите белтъци не могат да навлязат в порите и ги заобикалят, поради което се движат по-бързо и излизат по-рано от колоната. Средно големите белтъци навлизат в някои от порите и излизат след големите, но преди малките. Белтъците се елуират в ред от най-голям към най-малък.

SEC е идеална за финална „полираща“ стъпка. Тя не само премахва остатъчни примеси с различен размер, но и служи за прехвърляне на пречистения белтък във финалния буфер за съхранение. Също така е полезна за разделяне на мономерната форма на белтъка от възможни агрегати.

След като белтъкът е пречистен до желаната степен, обикновено следват още няколко етапа. В много случаи афинитетният таг трябва да бъде премахнат. Това се постига чрез вграждане на специфично място за разпознаване от протеаза (напр. TEV или тромбин) между тага и белтъка. След пречистване се добавя протеазата, която освобождава белтъка в неговия автентичен вид. Следва допълнителна хроматографска стъпка за отстраняване на тага и протеазата. При необходимост белтъкът може да се концентрира чрез методи като ултрафилтрация. Чистотата на финалния продукт се проверява, най-често чрез SDS-PAGE която разделя белтъците по маса и позволява визуализация на крайния резултат.

Фаговият дисплей (Phage display) е лабораторен метод, разработен през 1985 г., който позволява пептиди и протеини да бъдат изложени на повърхността на бактериофаги. Тази техника свързва изложения протеин с ДНК последователността, която го кодира. Това се постига чрез вмъкване на чужд ген в един от гените на фага, кодиращ протеин от неговата обвивка. В резултат на това се създава слят протеин, който се включва във вириона и излага чуждата аминокиселинна последователност по имунологично достъпен начин. Изложените протеини или пептиди запазват своята пространствена структура и биологична активност, което им позволява да се свързват със специфични мишени.

Процесът на селекция, известен като „панинг“ (panning), използва огромни библиотеки от фаги, всеки от които показва различен пептид. Тези библиотеки се използват за скрининг и идентифициране на лиганди с висок афинитет към почти всяка мишена, включително йони, малки молекули, клетки, бактерии и тъкани. Фагите, които се свързват с мишената, могат да бъдат изолирани и намножени, което позволява идентифицирането на взаимодействащия пептид. Поради своята простота, висока ефективност и ниска цена, Phage дисплей технологията има широко приложение в биотехнологиите и медицината.

Основните приложения включват: Откриване на лекарства, Таргетна терапия, Диагностика и биосензори, Получаване на ваксини, Разработване на биоматериали и др.

Повърхностен дисплей (Cell Surface Display)

Тази стратегия свързва генотипа (гена, кодиращ протеина) с фенотипа (изложения протеин и неговата функция) и намира различни биотехнологични приложения. Чрез сливане на целевия протеин с анкерни протеини, които са естествена част от клетъчната обвивка, микроорганизмите се превръщат в платформа за представяне на функционални молекули.

Бактериалният дисплей най-често Грам-отрицателни като *E. coli*, за да представи протеини на външната си повърхност. При Грам-отрицателните бактерии процесът разчита на анкерни трансмембранни или повърхностни протеини, експозирани на външната мембрана. Целевият протеин се слива в отворена рамка на четене с такъв анкер и клетъчните механизми го транспортират до повърхността. Съществуват множество анкерни системи, които се разделят на няколко основни типа:

- **Липопротеини:** Например, чрез сливане с първите няколко аминокиселини на основния липопротеин на *E. coli* и част от външномембранен протеин може да се постигне закотвяне на хетероложен протеин към външната мембрана.
- **Външномембранни протеини:** Протеини като OmpA, OmpC, PhoE и LamB, които естествено формират структури във външната мембрана, могат да бъдат модифицирани, за да включат и изложат чужди пептиди в своите повърхностни структури.
- **Автотранспортери (Autotransporters):** Това е голямо семейство протеини, които имат уникалната способност сами да медиат своя транспорт през външната мембрана. Те се състоят от N-терминален „пасажерски“ домен (който може да бъде заменен с целеви протеин) и C-терминален домен, който формира бета-барелна структура във външната мембрана и улеснява преминаването на пасажерския домен. Системи като Autodisplay са показали почти количествено излагане на ензими на повърхността.
- **Други системи:** Използват се и други протеини като протеин за ледена нуклеация ice-nucleation protein, (INP) или новооткрити анкери като MirA, който показва висока ефективност при излагане на ензими.

Основно предимство на бактериалния дисплей е възможността за създаване на огромни библиотеки от протеинови варианти и провеждане на високопроизводителен скрининг. Приложенията са многобройни и включват: разработка на живи ваксини, биокатализа, биоремедиация, скрининг на библиотеки, разработка на лекарства и др.

Дисплеят при дрожди, най-често използващ *S. cerevisiae*, е еукариотна алтернатива, която предлага ключови предимства, особено при работа с протеини от бозайници, включително човешки. Системата при дрождите използва естествения секреторен път на клетката. Целевият протеин, слят с анкер, преминава през ендоплазмения ретикулум и апарата на Голджи, където претърпява правилно нагъване и пост-транслационни модификации, преди да бъде транспортиран и закотвен в клетъчната стена.

- **α -Аглутининова система:** Това е най-широко използваната система. Целевият протеин се слива с Aga2p, малка субединица на протеина аглутинин. В клетъчната стена е закотвена по-голямата субединица Aga1p. След секреция, Aga2p (заедно със слятия протеин) формира две дисулфидни връзки с Aga1p, което води до стабилното му излагане на повърхността.
- **Flo1p-базирани системи:** Други анкерни протеини са от семейството на флокулините, като Flo1p, които също са естествени компоненти на клетъчната стена на дрождите и могат да служат като анкери.

Способността на дрождите да извършват пост-транслационни модификации е основното им предимство, което ги прави идеална платформа за работа със сложни еукариотни протеини.

Приложенията на системата са многобройни и включват: разработка на антитела, нови ензими, ваксини и биосензори.

Error prone PCR

Error-prone PCR (epPCR) е мощна и широко използвана техника в молекулярната биология, която представлява модификация на стандартната полимеразна верижна реакция (PCR). За разлика от конвенционалната PCR, чиято цел е да амплифицира ДНК с възможно най-висока точност, целта на epPCR е умишленото въвеждане на случайни мутации в амплифицираната ДНК последователност. Тази техника е в основата на случайната мутагенеза и служи като ключов двигател за експерименти по насочена еволюция, позволявайки на изследователите да създават големи библиотеки от генни варианти, които впоследствие могат да бъдат скринирани за нови или подобрени функции.

Основният принцип на epPCR се състои в намаляване на точността (fidelity) на ДНК полимеразата по време на синтеза на ДНК. Стандартните ДНК полимерази, особено тези с коригираща (proofreading) активност, притежават механизми за поправка на грешки, което гарантира изключително ниска честота на мутации. При epPCR реакционните условия се променят целенасочено, за да се „подведе“ полимеразата да прави грешки по-често. Това се постига чрез няколко основни стратегии:

1. Използване на полимераза без коригираща активност: Най-често се използва Taq ДНК полимеразата, която по своята същност няма 3'→5' екзонуклеазна (коригираща) активност и има естествено по-висока честота на грешки в сравнение с високоточните полимерази.
2. Дисбаланс в концентрацията на нуклеотиди (dNTPs): Чрез умишлено създаване на неравни концентрации на четирите дезоксирибонуклеозидтрифосфата (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) в реакционната смес, полимеразата е по-склонна да включи грешен, но по-достъпен нуклеотид на мястото на правилния, но по-малко наличен.
3. Добавяне на манганови йони (Mn^{2+}): Това е един от най-ефективните методи за увеличаване на честотата на мутации. Мангановите йони заместват магнезиевите йони (Mg^{2+}), които са стандартният кофактор за ДНК полимеразите. Mn^{2+} променя геометрията на активния център на ензима, което намалява неговата способност да разпознава правилното сдвояване на базите и по този начин драстично увеличава честотата на грешки.
4. Използване на нуклеотидни аналози: Добавянето на модифицирани нуклеотиди (например dPTP или 8-охо-dGTP) в реакционната смес може да доведе до грешки. Тези аналози могат да се сдвояват с повече от една канонична база, което води до въвеждане на точкови мутации в следващите цикли на PCR.

Чрез внимателен контрол на тези параметри (концентрация на Mn^{2+} , съотношение на dNTPs и брой PCR цикли), изследователите могат да настроят средната честота на мутации –

обикновено се цели постигането на 1 до 2 аминокиселинни замени на ген, за да се избегне създаването на голям брой нефункционални протеини.

Приложенията на ерPCR са многобройни и обхващат почти всички сфери на протеиновото инженерство и синтетичната биология: Насочена еволюция на ензими; Разработване на антитела; Изучаване на взаимовръзките структура-функция; Оптимизация на метаболитни пътища и др. (дайте примери).

DNA Shuffling

DNA shuffling е технология за насочена еволюция, разработена от Стемер през 1994 г. Тя представлява метод за *in vitro* рекомбинация, който позволява бързото създаване на големи библиотеки от нови, хибридни гени чрез рекомбиниране на фрагменти от няколко хомоложни родителски гена. Процесът на DNA shuffling протича в няколко ключови стъпки, които комбинират ензимна фрагментация и специфични полимеразни верижни реакции (PCR). Началната точка е изборът на два или повече хомоложни гена, които кодират протеини с желаната функция, но с различни полезни характеристики (напр. висока активност и висока термостабилност). Тези гени се амплифицират и след това се нарязват с помощта на DNase I на малки, случайни фрагменти с размер обикновено между 10 и 50 базови двойки. Получената смес от къси, едноверижни ДНК фрагменти се използват за PCR, при който не се добавят външни праймери. В този етап самите фрагменти действат едновременно като матрици и като праймери един за друг. Когато фрагмент от един родителски ген се хибридизира с комплементарен участък от фрагмент на друг родителски ген, ДНК полимеразата го удължава. Този процес, наречен template switching. Процесът на денатурация, хибридизация и удължаване се повтаря в няколко цикъла, което води до сглобяването на пълноразмерни хибридни гени. След като са сглобени пълноразмерни хибридни гени, се провежда стандартна PCR реакция. Този път се използват два праймера, специфични за началото и края на целевия ген. По този начин се амплифицират селективно само правилно сглобените гени с пълна дължина, които формират „библиотека“ от хиляди до милиони уникални хибридни варианти. На края получената библиотека се клонира в подходящи експресионни вектори, например плазмиди. Следващата критична стъпка е скринингът, при който се идентифицират клетките, произвеждащи протеини с желаните подобрени характеристики. Най-добрите варианти могат да послужат като родителски гени за следващ кръг на ДНК шъфлинг, позволявайки итеративно натрупване на полезни мутации и постигане на значителни подобрения.

Поради своята ефективност, ДНК шъфлинг има широко приложение в множество области на биотехнологиите и медицината: подобряване на ензими; разработване на ваксини; фармацевтична индустрия; генна терапия; биоремедиация и селско стопанство.

Основна задача на съвременната биотехнология е разработването и внедряването на научно обосновани и ефективни технологии за получаване на биопродукти, като аминокиселини, органични киселини, витамини, антибиотици, протеини, ензими, ваксини и др., базирани на биосинтетичните, биотрансформационните и биодеградационни способности на различни биологични агенти. От тези, използвани за индустриално производство, микроорганизмите са доминираща група, защото: имат най-кратко генерационно време; проявяват най-висока специфична скорост на растеж; характеризират се със значително по-проста генетична организация; позволяват по-лесно целево манипулиране на генома; проявяват висока степен на пластичност на метаболизма и възможност за насочването му в желана посока, дори и само чрез промяна в състава на хранителната среда; имат сравнително прости за удовлетворяване хранителни изисквания; позволяват сравнително лесно култивиране в изкуствени условия; могат да усвояват отпадни продукти, в качеството на хранителни субстрати, което позволява разработването на технологии със сериозен екологичен ефект и не на последно място продуктивността им не зависи от климатични, географски условия и сезонност.

Към промишлените микроорганизми се предявяват и редица изисквания: да имат кратко генерационно време и възможности за бързо натрупване на биомаса в комплексни хранителни среди; да проявяват висока специфична скорост на растеж в условията на индустриално култивиране; да синтезират целевия продукт във висока концентрация от единица субстрат за единица време; да синтезират преимуществено целевия продукт и да не продуцират или в минимална степен, странични метаболитни продукти; да са устойчиви на мутагенни фактори и фаги; микробните клетки да са големи или лесно да образуват агломерати; по възможност да са мицелни култури; да не синтезират токсини; да не са патогенни и да са безвредни за околната среда. Като индустриални продуценти на микробни биопродукти намират приложение представители от различни таксономични групи бактерии, актиномицети, дрожди и плесенни гъби.

Бактерии

Най-характерните особености на бактериите, имащи отношение към използването им като промишлени продуценти на биопродукти, са техните малки размери, кратко генерационно време, сравнително проста генетична организация и това, че една част от тях – Грам-отрицателните, натрупват синтезираните целеви продукти преимуществено вътре в клетката. Малките размери са основният технологичен недостатък на бактериите, защото значително затрудняват отделянето на фино суспендираните клетки от течните ферментационни среди чрез сепарация или центрофугиране. За целта трябва да се прилагат процеси на разделяне под високо налягане с използването на филтър преси, които са по-трудни за експлоатация. Едно от най-важните предимства на бактериите от технологична гледна е краткото генерационно време, което значително съкращава продължителността на ферментационния процес и намалява икономическите разходи за производството. По-простата им генетична организация позволява сравнително лесно да се въздейства върху техния геном, респективно да се повиши биосинтетичния им потенциал. Натрупването на целевите вещества вътреклетъчно също създава затруднения при изолирането и пречистването на биопродуктите и налага прилагането на допълнителни технологични операции за дезинтеграция на бактериалната биомаса. Болшинството от бактериите, използвани за индустриално производство на биопродукти, са от групата на мезофилните. По време на култивирането се отделя значително количество биологична топлина от системата, което налага използването на огромни обеми охлаждаща вода за биореакторите, което е и един от най-големите разходи в производствени условия. Това провокира повишен интерес към възможностите за използване на термофилни бактерии, като продуценти на термостабилни биопродукти. Най-широко промишлено приложение са намерили представители от следните видове: *Bacillus subtilis* – продуцент на протеази; термофилни щамове *Bacillus*

stearothermophilus, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis* – продуценти на термостабилни амилолитични ензими; *Xanthomonas campestris*, *Leuconostoc dextranicum*, *Erwinia amylovora* – продуценти на микробни екзополisahариди; регулаторни мутанти на *Corynebacterium glutamicum* и *Brevibacterium flavum* – продуценти на аминокиселини; *Pseudomonas dentrificans* – продуцент на витамин В₁₂, млечнокисели бактерии от видовете *Lactobacillus bulgaricus* и *Streptococcus thermophilus* – за производство на ферментационни млечнокисели продукти и органични киселини, както и смесени бактериални култури, формиращи активната утайка, използвана за аеробно пречистване на отпадни води.

Актиномицети

Актиномицетите са прокариотни микроорганизми с мицелен строеж, изграден от мрежа от гъсто преплетени, но много тънки хифи, които лесно се разкъсват. Мицелният строеж на актиномицетите позволява по-лесното им отделяне от културалните среди чрез вакуум филтрация, което е предимство от технологична гледна точка. Актиномицетите имат продължително генерационно време, като за пълното спорулиране на някои видове са необходими 10÷14 дни, което значително удължава продължителността на индустриалните биотехнологични процеси, особено в частта получаване на посевен материал. Например продължителността на ферментационния процес за получаване на макролидният антибиотик тилозин от *Streptomyces fradiae* е 140 – 160 часа, а на салиномицин и монензин – достига и над 360 часа. Устройството на актиномицетния геном е значително по-сложно в сравнение с бактериалния, а по обем е приблизително два пъти по-голям от този на другите прокариоти, напр. при *Streptomyces avermitilis*, продуцент на антипаразитния препарат аверметкин, който включва около 9 млн. базови двойки. Регулацията на генната експресия при актиномицетите е много по-сложна от тази при останалите прокариоти. При стрептомицетите, продуценти на биологично активни вещества, са идентифицирани между 60 и 65 σ -фактора, които разпознават различни типове промотори, докато при *E.coli* те са едва 7. Всичко това сериозно затруднява приложението на различни техники за генетична рекомбинация с цел повишаване продуктивността на шамовете. Актиномицетите са аеробни микроорганизми, които в условията на дълбочинно култивиране изискват най-интензивна аерация в сравнение с всички останали групи промишлени продуценти на биопродукти, достигаща стойности до и над 1 m³/(m³.min⁻¹). Повечето от актиномицетите с промишлено значение са мезофилни, но се прилагат и някои термофилни шамове – продуценти на термостабилни ксиланази. Оптималната стойност на рН за развитието на актиномицетите е в диапазона 6,8÷7,2. Подобно на плесенните гъби, те продуцират широк набор външноклетъчни ензими, което им позволява да усвояват и голям брой хранителни субстрати, дори някои отпадни продукти. Основните технологични предимства на актиномицетите се изразяват в мицелния им строеж и във възможността да усвояват голям брой хранителни субстрати, а недостатъците – в продължителното генерационно време и повишената потребност от кислород по време на промишленото им култивиране. Над 80% от промишлено произвежданите антибиотици по биотехнологичен път се продуцират от актиномицети, като интерес представляват представителите главно от три семейства – *Streptomycetaceae*, *Micromonosporaceae* и *Nocardiaceae*. Към различните видове от род *Streptomyces* се отнасят най-голям брой от шамовете, които са намерили индустриално приложение като продуценти на антибиотици: *S.aureofaciens* – тетрациклин и хлортетрациклин; *S.rimosus* – окистетрациклин; *S.griseus* – стрептомицин; *S.erythreus* – еритромицин; *S.noursei* – нистатин; *S.albus* – салиномицин; *S.cinamonensis* – монензин; *S.fradiae* – тилозин; *S.levoris* – леворин; *S.venezuellae* – хлорамфеникол; *S.antibioticus* – олеандомицин; *S.tenebrarius* – тобрамицин и др.

Дрожди

Дрождите са еукариотни микроорганизми, чиито клетки са значително по-големи от бактериалните, което позволява по-лесно да се отделят от културалните среди чрез центрофугиране, сепарация или флотация. Дрождевата клетка е обхваната от здрава и трудна за разрушаване клетъчна стена, изградена основно от глюкани и манани, което значително затруднява технологичните операции по изолиране и пречистване на вътреклетъчните целеви продукти. Дрождите се размножават главно чрез пъпкуване, чрез спори и много рядко чрез бинарно делене. Хаплоидните аскоспори могат да се слоят или да се разделят, което позволява да се получат диплоидни,

полиплоидни или изогенни шамове дрожди с подобрени биосинтетични качества. Дрождите, намерили индустриално приложение в биотехнологичните производства са сапрофитни, мезофилни, факултативно анаеробни с рН оптимум в слабокиселата област на рН 4,5 ÷ 5,0, което е естествена бариера срещу бактериална контаминация на ферментационните среди и предимство. Като въглеродни източници усвояват ферментируеми захари от групата на хексозите и не проявяват амилолитична активност, което в известна степен ограничава спектъра на субстратите, влагани в състава на комплексните хранителни среди, използвани в индустриални условия. Интерес от технологична гледна точка представляват отделни представители на клас *Ascomycetes*. Най-голямо промишлено приложение от групата на аскоспорогенните дрожди имат видове от родовете *Saccharomyces* и *Kluyveromyces*, главно за получаване на етанол, микробни-белтъчни продукти и някои витамини.

Плесенни гъби

Плесенните гъби са еукариотни организми, изградени от хифи, които образуват мицелна структура. Хифите на плесените са много по-дебели от актиномицентните и са обхванати със здрава клетъчна стена, която съдържа хитозан, глюкани и известно количество целулоза. Това позволява да бъде преодолян проблема с възможността за разкъсване на хифите от разбъркващите устройства в биореактора. Мицелният строеж на плесените улеснява отделянето на биомасата от ферментационната среда чрез филтрация под вакуум. Повечето плесени, използвани за индустриалното производство на биопродукти, са мезофилни, развиват се при висока относителна влажност и в сравнително широк рН диапазон 4,5 – 8,0, като съответните оптимални стойности са 65 – 75% и рН 5,5 – 7,5. Усвояват много широк набор хранителни субстрати като отпадни продукти от селското стопанство, ХВП и др., което улеснява композирането на индустриалните хранителни среди. Имат много добре развит секреторен апарат, което ги прави подходящи продуценти на различни външноклетъчни целеви биопродукти. Плесените са доминиращите промишлени продуценти на ензими, а по отношение на антибиотиците отстъпват водещото място на актиномицетите. Основен недостатък на плесените е продукцията на токсини от някои видове, което лимитира промишленото приложение на токсигенни шамове. Накратко ще изброим само някои от най-използваните видове плесени в индустриалните биотехнологии и продуцираните от тях целеви продукти: от род *Aspergillus*, видовете *A. niger*, *A. oryzae*, *A. awamori*, *A. terreus* – продуценти на амилази, ксиланази, пектинази, протеази и лимонена киселина; род *Penicillium*, видовете *P. notatum* и *P. chryzogenum* – продуценти на β-лактамни антибиотици; род *Rhizopus*, видовете *Rh. arrhizus* и *Rh. nigricans* – продуценти на липази; род *Mucor*, видовете *M. miehei*, *M. mucedo*, *M. pusillus* – продуценти на протеази; род *Trichoderma*, видовете *T. reesei* и *T. longibrachiatum* – продуценти на целулази и ксиланази.

Детайлното познаване на морфологичните, физиологичните, генетичните и технологичните особености на микробните продуценти на биопродукти е задължително условие за разработването на ефективни индустриални биотехнологични процеси, които да осигурят условия за максимална експресия на биосинтетичния потенциал на продуцентите с висок коефициент на икономическа ефективност.

Както вече изяснихме, промишлените микроорганизми трябва да притежават редица ценни свойства и да отговарят на голям брой технологични изисквания. Най-добри възможности за изолиране на нови или малко проучени шамове – продуценти на нови и важни биопродукти, предоставят техните естествени местообитания в природата, като почва, различни растителни субстрати, водоеми и много рядко въздухът, защото той е само временно местообитание на микроорганизмите. Изолирането на природни шам-продуценти е изключително сложен и продължителен процес, защото в природата микроорганизмите не съществуват във вид на чисти култури, а най-често са под формата на сложни микробни съобщества. В повечето случаи интересуваният ни микробен продуцент е минорен, т.е. не е доминиращ вид в естественото микробно съобщество. За изолирането му се прилагат поредица от микробиологични техники, чиято последователност и брой могат да бъдат изключително разнообразни в зависимост от конкретния продуцент. За успешното изолиране на конкретен продуцент е важно да се вземе проба, например почвена, от най-характерното местообитание на дадената микробна група. Например, за изолиране на нови микробни продуценти на термостабилни ензими е целесъобразно търсенето в геотермални води.

От изключителна важност за успешното изолиране на продуцентите е правилното вземане и съхранение на природната проба и възможно най-бързата ѝ обработка. Обикновено възможността за директно изолиране на микробни продуценти с промишлено значение от природни образци е само теоретична. Най-често пробите се подлагат на предварително третиране, което има за цел да увеличи относителния дял на микроорганизмите с желаните качества в смесената микробна култура, без да се прилагат набогатителни (селективни) процедури. Най-често прилаганите методи за предварително третиране са изменение на температурата, промяна на рН, обработка с химични съединения и др. Методът на набогатителните култури се изразява в създаването на селективни условия за преимуществено развитие на желания микробен вид в смесената микробна култура или създаването на условия, потискащи развитието на останалите членове на асоциацията. Това обикновено се постига чрез използване на селективни хранителни среди, съдържащи определени инхибитори или стимулатори на растежа на конкретна микробна група. По-рядко за получаването на набогатителни култури се използва методът на подхранването или използването на фаги. В набогатителната култура броят на микробните клетки от целевия вид е значително увеличен и той се е превърнал от минорен в доминантен. От получената течна набогатителна култура, след подходящо разреждане, се изолират чисти микробни култури, които са потенциални продуценти на целевия продукт. По пътя на полифазната таксономия, базирана на морфологични, културални, физиолог-биохимични и молекулярно биологични методи, природните изолати се идентифицират видово. Изолираните по този начин продуценти са природни (диви) шамове, които на практика може да са мутантни, но природата, мястото и механизмът на действие на природния мутаген са неизвестни. За създаване на промишлени шам-продуценти, природните изолати се подлагат на многостепенен подбор на активни варианти от изолираните във вид на чисти култури шамове. Първичният подбор се основава на оценка на даден качествен показател, т.е. цели да се установи кои варианти продуцират целевия продукт. Вторичният подбор се основава на оценка на количествен показател, т.е. установява се какво е количеството (концентрацията, активността) на синтезирания целеви продукт от отделните варианти, селектирани при първичния подбор. Вероятността за изолиране на „диви“ шамове – свръхпродуценти на биопродукти от природата, непретърпели мутагенна или друга генетична обработка, на практика е много малка. Поради това повечето промишлени микробни продуценти на биопродукти обикновено са специално селектирани мутантни шамове. За да се увеличи биосинтетичният потенциал (продуктивността) на изолираните природни шам-продуценти, те се подлагат на насочен индуциран мутагенез. За целта се използват различни физични и химични мутагени, прилагани самостоятелно, но по-често в комбинация, в различна доза и време на експозиция. На мутагенна обработка обикновено се подлага микробна суспензия от скринирания перспективен природен (див) шам с висок титър на клетките. След обработка със съответния мутаген от микробната суспензия се прави посев върху подходяща твърда хранителна среда, откъдето се изолират получените мутанти и се прави оценка на активността им. За улеснено изолиране на регулаторни мутанти обикновено търсеното качество се съчетава с ауксотрофност, което позволява много лесното изолиране на мутантите от останалите шамове, които са прототрофи чрез посев на пълноценни и минимални хранителни среди. Понастоящем за генетично конструиране на промишлени шам-продуценти на биопродукти с предварително програмирани свойства, широко се прилагат методите на генното и метаболитното инженерство. Например широко приложение за индустриално производство на аминокиселини, като L-лизин, L-глутаминова киселина и др., намират т.нар. регулаторни мутанти от видовете *Brevibacterium flvum* и *Corynebacterium glutamicum*.

Една от основните задачи в сферата на индустриалната микробиология е създаването на условия за съхранение на шамовете, които да гарантират запазване на активността на културата, генетичната ѝ еднородност и микробна чистота. Успоредно с това методите за съхранение трябва да позволяват адекватното обезпечаване на производствения процес с достатъчно количество качествен посевен материал. Счита се, че най-подходящи за съхранение са микробните култури, намиращи се в края на експоненциалната или началото на стационарната фаза на развитие. В науката липсва единно становище по въпроса дали културите трябва да се съхраняват на богати или бедни по състав хранителни среди. Според някои автори по-подходящи за съхранение на промишлените микроорганизми са бедните хранителни среди. В бедни на хранителни субстрати среди метаболитните процеси в микробните клетки протичат с много ниска скорост, което елиминира опасността от натрупване на отпадни метаболитни продукти, които инхибират съхраня-

вания шам. Други автори са на коренно противоположното мнение. Според тях само богатите на хранителни субстрати среди могат да гарантират запазване на жизнеспособността на микробните клетки. В зависимост от срока на съхранение на промишлените микроорганизми методите се разделят на две групи:

1. Методи за непродължително съхранение (срок до 1 година) – съхранение чрез перидично препосяване (субкултивиране), съхранение под слой минерално масло, съхранение чрез обикновено замразяване или изсушаване. Срокът на съхранение между две последователни препосявания зависи от видовата принадлежност на конкретния микробен вид, от физиологичните и морфологичните му особености и се определя експериментално за всеки отделен продуцент. Методите за непродължително съхранение на промишлените микроорганизми се прилагат като допълнителна стъпка към методите за продължително съхранение или като единствена, в случай че конкретният микробен вид не понася съхранение чрез ултразамразяване или лиофилизация. Общ недостатък на методите за непродължително съхранение е необходимостта от препосяване през сравнително кратки интервали от време, което индуцира процесите на дегенерация и контаминация на производствените култури. Недостатъците на тази група методи са преодолявани при методите за продължително съхранение.

2. Методи за продължително съхранение (срок до 30 години) – лиофилизация и криоконсервация (ултразамразяване)

Льофилизация е най-съвременният и подходящ метод за дългосрочно съхранение на промишлените микроорганизми. Той се изразява в замразяване на микробната суспензия и отделяне на влагата от замразения продукт чрез сублимация. През първия етап на процеса микробната суспензия, която е в края на експоненциалната или началото на стационарната фаза на развитие, се замразява при температура от -20 до -30°C . Съществено влияние върху ефективността на този етап от процеса и запазване максималната жизнеспособност на микробните клетки оказва скоростта на замразяване и наличието на криопротектори. Те биват два вида – криопротектори, които лесно преминават през клетъчната мембрана и осигуряват вътре- и външноклетъчна защита от действието на ниските температури, а вторите не преминават през клетъчната мембрана и осигуряват само външна защита на клетката. Към първия тип се отнасят глицеринът и диметилсулфоксидът, а към втория – главно въглехидрати като захароза, глюкоза, манитол и др. Различните микробни култури имат различна криотолерантност, поради което скоростта на замразяване за всеки отделен продуцент се определя експериментално. На втория етап от процеса влагата се отделя от замразения продукт чрез сублимация, т.е. директно изпарение от твърдо състояние, без да се преминава през течено състояние. Сублимацията се провежда при парциално налягане и температура, разположени по-ниско от тройната критична точка на фазово равновесие на водата. Най-често лиофилизацията се осъществява в специални бавно оборотни хладилни центрофуги, където се осъществява изпарително охлаждане под вакуум. Ампулите с лиофилизираната култура се съхраняват в хладилни условия или във фризер за неограничен период от време. От съществено значение за запазване на биосинтетичния потенциал на културата е и процесът на рехидратация на микробните клетки след лиофилно съхранение. Препоръчва се културите да се рехидратират с течна хранителна среда, в която е проведен процесът на замразяване, а не с дестилирана вода. Леофилното съхранение е най-сигурният метод за продължително съхранение на промишлени микроорганизми, като единственият му недостатък се изразява в използването на скъпо струващо специализирано оборудване.

Ултразамразяването е метод, който се изразява в замразяване на микробните култури при ултраниски температури -196°C с течен азот и пари на течен азот. Криогенното съхранение при ултраниски температури гарантира съхранението на различни биологични агенти с висока степен на преживяемост, жизнеспособност и генетична стабилност за период над 30 години. Задължително условие за успешното криогенно съхранение на микробните култури е физиологичното им състояние да съответства на средата на експоненциалната фаза на развитието им; титърът на микробната суспензия да бъде не по-малък от $1 \cdot 10^8 \text{ cfu/cm}^3$ и наличието на криопротектори. От технологична гледна точка най-съществено влияние върху преживяемостта на културите оказва скоростта на замразяване. За да се избегне образуването на вътреклетъчни кристали и електролитен дисбаланс, замразяването на ампулите с микроорганизми се осъществява на два етапа. Първоначално микробната суспензия се охлажда бавно със скорост на понижаване на температурата 1°C/min до достигане на температура -30°C . На втория етап скоростта на охлаждане се увеличава на 15°C/min до достигане на темпера-

тура -196°C – реактивацията на културата е много лесна и бърза. Ампулите със замразената култура се поставят на водна баня при $30 - 37^{\circ}\text{C}$ за време $40 - 60$ сек. Методът е много подходящ за съхранение на актиномицети, дрожди и млечнокисели бактерии, които не понасят лиофилизация. Установено е, че Грам-положителните бактерии са по-устойчиви на ултразамразяване от Грам-отрицателните. Предимствата на ултразамразяването като метод за продължително съхранение на м.о. се изразяват в пълно запазване на желаните свойства на промишлените продуценти, практически липсва вероятност за контаминация на производствената култура, както и във възможността за директна употреба на културата след кратка реактивация. Недостатъците на метода се изразяват в необходимостта от специални криостати и обезпечаване на безопасността на работа.

Изборът на един или друг метод за съхранение на промишлените микроорганизми и определянето на оптималните параметри за провеждането му зависят най-вече от физиологичните и генетични особености на конкретния микробен вид и спецификата на конкретното производство. По тази причина липсва единна и универсална стратегия за избора на най-подходящ метод за съхранение на промишлените микроорганизми, а се прилага индивидуален експериментален подход за всеки отделен щам-продуцент.

За култивиране на промишлените микроорганизми в лабораторни или промишлени условия се използват разнообразни по състав хранителни среди. Хранителните среди трябва да бъдат добре балансиран набор между източниците на въглеродно, азотно, фосфорно хранене, микро- и макроелементи. Потребността на продуцентите от едни или други хранителни вещества се определя от техните физиологични особености и елементарния химичен състав на микробната клетка. Но тук трябва да отбележим, че химичният състав на клетката може значително да варира в зависимост от състава на използваната хранителна среда.

Изисквания на микроорганизмите към източниците на въглеродно хранене

Въглеродът се отнася към биоенните елементи и влиза в състава на всички биополимери в клетката – белтъци, въглехидрати и липиди. Въглерод съдържащите субстрати са източник на градивни елементи за конструктивния (пластичен) метаболизъм, а след разграждането си и като източник на енергия за енергийния метаболизъм на клетката. Катаболизъмът на въглерод съдържащите съединения е строго специфичен и зависи от ензимния набор на съответния микроорганизъм. Като източници на въглерод в хранителните среди се използват различни захари – монозахариди, олигозахариди и полизахариди, органични киселини, алкохоли, а в някои случаи и въглеводороди (n-парафини). Към най-лесно усвоимите източници на въглерод се отнасят монозахаридите, следвани от дизахаридите и олигозахаридите – глюкоза, галактоза, фруктоза, захароза, лактоза и др. По-трудно усвоими са полизахаридите като нишесте и целулоза, а най-трудно – липидите. Усвояването на въглерод съдържащите субстрати от средата от микробните клетки може да осъществи по два механизма – адитивен и алтернативен. При адитивния механизъм на усвояване въглерод съдържащите субстрати се усвояват едновременно, като се окисляват в една и съща метаболитна верига или по няколко паралелно и независимо протичащи една от друга метаболитни вериги. При алтернативния механизъм на усвояване микробните клетки преимуществено усвояват един въглерод съдържащ субстрат в смес от няколко субстрата и едва след изчерпване на единия субстрат преминават към следващ. Обикновено първо се усвоява най-лесно метаболизируемият субстрат – глюкозата. Например в среда с излишък от въглерод, съдържаща глюкоза и ксилоза, клетките на *E. coli* първо усвояват глюкозата и едва след изчерпването ѝ от средата преминават към усвояване на ксилозата. Това явление е известно като диауксия или полиауксия. Когато обаче културата е в среда, лимитирана по въглероден източник, клетките усвояват едновременно и глюкозата, и ксилозата. Промяната на един въглероден източник с друг води до промяна не само във физиологията на микробната клетка, но в някои случаи може да предизвика и морфологични промени. Например при култивиране на дрождите *Hansenula polymorpha* в среда с глюкоза и метанол като въглероден източник след изчерпване на глюкозата културата преминава към усвояване на метанола. Този процес е съпроводен с образуване на канали (пори) в цитоплазмената мембрана на клетката и увеличаване броя на пероксизомите в цитоплазмата. Видът и количеството на въглеродния източник оказват влияние и върху вътреклетъчния аминокиселинен пул. Всичко казано до тук има за цел да покаже огромното значение на вида и количеството на въглеродния източник върху развитието на микроорганизмите, както в лабораторни, така и в промишлени условия и да подчертае интегриращата роля на въглеродния субстрат в състава на хранителните среди.

Изисквания на микроорганизмите към източниците на азотно хранене

Микробните клетки са в състояние да използват широк набор от органични и неорганични източници на азот, без да са в състояние да усвояват атмосферния азот (изключение правят азотфиксиращите бактерии). Азотът е абсолютно необходим за нормалното развитие на микробната клетка, защото участва в синтеза на важни биополимери като протеини и нуклеинови киселини и някои аминокиселини и витамини. От органичните източници на азот в биотехнологичната

индустрия най-често се използват аминокиселини, пептиди и пептони, а от неорганичните – амониеви соли. Най-лесно се усвоява азотът от амониевия йон, по-трудно – от нитратите и органичните източници, а за повечето микроорганизми нитритите са токсични. Изключително важно е съотношението между въглерода и азота, защото при високо съотношение С:N се увеличава липидната фракция за сметка на белтъчната фракция. Трябва да се отбележи, че при усвояване на азота от амониевия и други йони в средата се натрупват различни аниони, които изменят рН на хранителната среда. По тази причина е целесъобразно използването на напълно метаболизируеми източници на азот като уреята.

Изисквания на микроорганизмите към източниците на фосфорно хранене

Фосфорът също е един от основните химични елементи, влизащи в състава на микробната клетка. Той е абсолютно задължителен компонент на средата по време на трофофазата или това е фазата на натрупване на микробна биомаса и интензивен растеж на микробните клетки. Влиза в състава на ДНК, НАДФ и активно участва във всички метаболитни процеси, защото един от най-лесните начини за активиране на метаболитите при включването им в метаболитните пътища е фосфорилирането. Фосфорът е основен регулатор на скоростта на растеж на микробните клетки. При недостиг на фосфор в състава на хранителните среди растежът на микробните клетки значително се забавя. При излишък от фосфор в средата се инхибира синтезът на вторични метаболити (антибиотици), поради което количеството на този биогенен елемент в състава на средата трябва да бъде така определено, че да се изразходи до края на трофофазата. Едва след понижаване на фосфорната концентрация под определена стойност културата преминава към идиофаза, през която се синтезират вторичните метаболити. Фосфорът се внася в състава на хранителните среди главно под формата на фосфорна киселина, калиев моно- и дихидроген фосфат, както и чрез различни природни субстрати, които съдържат фосфор.

Изисквания на микроорганизмите към източниците на макро-, микроелементи и биостимулатори

Основната биологична функция на микро- и макроелементите се изразява в участието им в активния център на металоензимите. Към тези елементи се отнасят кобалт, никел, цинк, желязо, молибден и др. Обикновено тези елементи се внасят в състава на хранителните среди чрез водопроводната вода. Някои микробни продуценти на биопродукти са загубили способността си да синтезират един или повече метаболити – аминокиселина, витамин или др. Тези съединения са абсолютно задължителен компонент на хранителната среда, за да могат м.о. да се размножават и да осъществяват жизнената си дейност. Например за хлебопекарските дрожди *Saccharomyces cerevisiae* такива задължителни растежни фактори са тиаминът и биотинът. Обикновено от такива растежни фактори в средата се нуждаят ауксотрофните мутанти, продуценти на БАВ.

Оптималният състав на хранителните среди за даден продуцент се определя експериментално чрез многостадийен емпиричен подбор на оптималните стойности на даден компонент при постоянен фон на останалите компоненти. Този метод е много трудоемък и продължителен, но е резултатен. По-съвременни и експресни са математико-статистическите методи за определяне на оптималния състав на хранителната среда. При тези методи се получава уравнение, описващо оптималния състав на средата (модел), като коефициентите пред отделните членове на уравнението дават представа за тежестта (влиянieto) на всеки отделен компонент на средата върху биосинтетичния процес. Математико-статистическите методи позволяват да се определят и оптималните съотношения между С, N и P.

Видове хранителни среди, използвани в биотехнологичната промишленост

В биотехнологичната промишленост се използват изключително разнообразни по състав, предназначение и агрегатно състояние хранителни среди. За по-лесното им изучаване те се класифицират на групи по различни показатели.

В зависимост от състава си хранителните среди биват:

- *Синтетични* – това са хранителни среди със строго дефиниран компонентен състав, включващи само чисти химични съединения, например глюкоза, амониев сулфат, ка-

лиев хлорид и др. Тези хранителни среди се използват преимуществено в лабораторната практика за изучаване на физиологичните особености на микроорганизмите или за изучаване на биосинтетичните процеси в моделни условия;

- *Полусинтетични* – това са хранителни среди, които включват в състава си освен химически чисти съединения с постоянен и строго дефиниран състав, но и природни субстрати с относително непостоянен състав, например съдържат нишесте, дрождев екстракт като източник на аминокиселини и др.;
- *Комплексни* – това са хранителни среди, които съдържат природни субстрати, които са комплексни източници на С, N, P, микро- и макроелементи. Тези природни субстрати имат относително непостоянен състав, но поради лесната си достъпност и сравнително ниска цена се използват широко в БТП. Тези среди съдържат главно брашна (царевично, соево), шротове (соев, слънчогледов), трици, растителни хидролизати и др. субстрати, които са отпадъци главно от селското стопанство и ХВП. По този начин използването на комплексни хранителни среди в БТП има не само икономически, но и подчертан екологичен ефект.

В зависимост от агрегатното си състояние хранителните среди биват:

- *Течни* – представляват воден разтвор на компонентите на хранителната среда;
- *Твърди* – от своя страна твърдите хранителни среди се разделят на два вида:

Плътни – това са твърди хранителни среди, които са се получили след втвърдяване на течни хранителни среди чрез добавяне на желиращи агенти като агар-агар, желатин и др.;

Насипни – това са твърди хранителни среди, чиито компоненти са водонерастворими субстрати (царевични какалешки, малцови коренчета, цвеклови пресовки и др.), които се използват за твърдофазови ферментационни процеси.

В зависимост от предназначението хранителните среди биват:

- *Обикновени* – това са хранителни среди, подходящи за култивиране на голям брой м.о. от различни таксономични групи, напр. месо-пептонен бульон, агар-пивна мъст и др.
- *Специални* – това са хранителни среди със специално предназначение, които са подходящи за култивиране на строго определена група м.о., а съществуват и среди, предназначени за точно определен микробен вид. Към специалните среди се отнасят:

Диференциално-диагностични среди – използват се за идентификация на определени микробни видове и отдиференцирането им от други на база определени биохимични показатели;

Елективни – хранителни среди, които създават условия за преимуществено развитие на даден микробен вид от смесена микробна култура;

Селективни – хранителни среди, които създават условия за развитието само на един микробен вид от смесена микробна култура;

Пълноценни и минимални – използват се за изолиране и определяне на аутокотрофни и регулаторни мутанти.

Обикновените и специалните хранителни среди се използват само в контролните и научноизследователски микробиологични лаборатории на биотехнологичните предприятия. В производствени условия приложение намират течните и насипните комплексни хранителни среди.

Технологични изисквания към хранителните среди, използвани в промишлени условия:

- Да са пълноценни, т.е. да съдържат всички необходими субстрати за развитие на продуцента, осъществяване на конструктивния и енергийния му метаболизъм и, разбира се, за биосинтез на целевия продукт;
- Да съдържат евтини и леснодостъпни технологични суровини;
- Да имат определена стойност на рН, оптимална за развитие на продуцента и синтез на целевия продукт;
- Да имат определен окислително-редукционен потенциал и буферен капацитет;
- Да са непенещи се, т.е. да не съдържат или ако съдържат, да е в минимално количество компоненти, които лесно се пенят и образуват стабилни емулсии;
- Да бъдат стерилни;

- Да обезпечават лесно, пълно и икономически рентабилно изолиране и пречистване на целевия продукт.
- Едно от най-важните условия за провеждане на биотехнологичните процеси е използването на стерилни хранителни среди.

Стерилизацията на хранителните среди е една от основните технологични операции от преферментационния етап на биотехнологичните процеси. Хранителните среди могат да бъдат стерилизирани чрез периодична или непрекъсната стерилизация. Най-широко в съвременната биотехнологична промишленост се прилага методът на стерилизация в самия биореактор чрез наситена водна пара, която се подава директно в биореактора. Процесът на периодична стерилизация на хранителната среда преминава през три етапа: загряване до достигане температурата на стерилизация, задържане за определен интервал от време при температурата на стерилизация и охлаждане от температурата на стерилизация до температурата на ферментация, т.е. до температурата, оптимална за култивиране на щам-продуцента. Най-често прилаганият режим за стерилизация на промишлените хранителни среди е 120° С за 20 – 30 минути. Процесът на непрекъсната стерилизация преминава през същите етапи, но се прилага по-висока температура на стерилизация.

Поради това, че най-широко в съвременната биотехнологична практика се прилага периодичното култивиране на продуцентите за синтез на биопродукти, съвсем естествено е най-широко приложение да намира методът за периодична стерилизация на хранителните среди с наситена водна пара директно в работните биореактори.

Технологична характеристика на основни суровини, използвани за подготовка на хранителни среди

Както вече отбелязахме, поради висока продуктивност, лесна достъпност и ниска цена в индустриалните биотехнологични процеси се използват главно комплексни хранителни среди. Накратко ще разгледаме химичните и технологичните характеристики на някои от по-важните и най-често използвани суровини в състава на промишлените комплексни среди.

Меласа

Меласата е основен страничен продукт, който се получава при производството на захар. Представлява тъмнокафява силно вискозна течност с относително тегло 1,3 – 1,4 kg/m³ и специфичен мирис на бетаин (3-метилгликол). В зависимост от суровината, от която се добива захарта, меласата бива цвеклова и тръстикова. Химичният състав на меласата е много различен – той е в зависимост от вида и сорта на суровината, от която се добива захарта, от климатичните условия и от технологичния режим на производство на захарта. Средно меласата има около 76 – 84% сухи вещества, от които около 50% е захароза – тя е основният С източник в меласата. Установено е и съдържание на малки количества рафиноза (до 2,5%). Основният азотен източник е бетаинът, но той не се усвоява от микроорганизмите. Усвоимите източници на азот са аминокиселините и пептидите в меласата. В меласата се съдържат и меланоидини, карамелни и хоминови вещества, които не се усвояват от микробните клетки и адсорбирайки се по повърхността им, затрудняват транспорта на хранителни вещества от средата в клетката и обратно. За правилното протичане на култивирането, колоидите в меласата предварително се отстраняват при процеса, наречен осветляване или класификация на меласата. В нея се съдържат различни растежни фактори, главно витамини – рибофлавин, никотинова и пантотенова киселина, биотин и пиридоксин (0,21 – 51,35 µg/g меласа), както и редица микро- и макроелементи – калий, натрий, калций, магнезий, желязо, кобалт, никел и др. За разлика от цвекловата меласа тръстиковата се характеризира с по-ниско съдържание на захароза – до 35%, но освен захароза и рафиниза, съдържа 15 – 20% глюкоза и фруктоза. Характеризира се със значително по-висока концентрация на витамини и азот в сравнение с цвекловата меласа. Поради по-високия си вискозитет и голямото съдържание на колоиди в сравнение с цвекловата меласа тръстиковата намира по-ограничено приложение особено в Европа, където кристалната захар се добива основно от захарното цвекло. По технологични признаци меласата се разделя на две качества – нормална и дефектна меласа. В зависимост от нивото на изходната ѝ микробна обсемененост (контаминация) меласата се разделя на три качества: 1 качество – контаминация до 10.10³ cfu/g; 2 качество – контаминация до 100.10³ cfu/g и 3 качество –

контаминация над 100.10^3 cfu/g. Меласата се влага основно в среди за получаване на дрожева биомаса и аминокиселини.

Растителни хидролизати

Растителната маса (дървесина и отпадни продукти от селското стопанство) се характеризира с годишен прираст от над 2.10^{12} т/год. Тя се счита за практически неизчерпаема и перспективна суровина за получаване на хидролизати от дървесина, торф и други целулозосъдържащи суровини (слама, царевични кочани, слънчогледови стъбла и др.). Хидролизата на дървесината може да се осъществи по 2 начина – чрез киселинна хидролиза и ензимна хидролиза. Предимствата на ензимната хидролиза се изразяват в по-меките условия за провеждане на процеса, но киселинната се явява по-евтина и за момента все още основно тя се прилага за получаване на дървесни хидролизати. Получените хидролизати съдържат усвоими захари до 46 – 50% от сухото си вещество. Използват се като основна суровина главно при производството на фуражни дрожди.

Брашна и шротове

Брашната и шровете се получават от различни земеделски култури като слънчоглед, соя и др. след екстракция на маслото от тях. Полученият сух остатък се нарича шрот и може да се използва като фураж за животните. След смилане на шровете и пресяването им през сита с определен размер на порите се получават съответните брашна. Широко приложение в индустриалните биотехнологии намират слънчогледовият, соевият и памучният шрот. Брашната от шровете са източник главно на полизахариди (нишесте, целулоза) до 65 – 70%, протеини – до 12%, мазнини и минерални соли. Соевото брашно и шротът намират широко приложение при биотехнологичното получаване на антибиотици.

Млечна суроватка

Млечната суроватка се получава като вторичен продукт при производството на саламурено сирене. Характеризира се със съдържание на сухо вещество 6 – 7%, от които около 70% е лактоза, до 1% – протеини, мазнини и пепелни вещества. Богата е на почти целия комплекс от витамини, съдържа свободни аминокиселини и органични киселини. Намира приложение като компонент на хранителните среди за получаване на ензими, витамини, етанол и аминокиселини.

Царевичен екстракт

Царевичният екстракт е отпаден продукт от производството на нишесте от царевица. Представява концентриран воден извлек, който се получава при хидротоплинна обработка на накиснати във вода царевични зърна. При тази обработка в екстракта преминават много минерални соли, разтворими въглехидрати, органични киселини, аминокиселини и др. Съдържа главно витамини от група В и аминокиселини (аргинин, аланин и др.). Използва се главно като източник на азот и растежни фактори. Намира широко приложение при производството на пеницилинови антибиотици.

Редица други суровини като малцови коренчета, цвеклови пресовки, сулфитни луги, хидрол, спиртна шлемпа и др. също намират широко приложение в индустриални условия.

Оптималният състав на хранителната среда се определя експериментално и строго индивидуално за всяка конкретна двойка микроорганизъм – биопродукт.

Култивирането е процес на изкуствено контролирано развитие на даден микробен вид или смесена микробна култура в лабораторни или промишлени условия при осигуряване на оптимални процесни параметри. То представлява най-съществен етап от биотехнологичния процес, по време на който се продуцират целевите метаболити от микробния синтез и се формират техните ценни биологични качества. Съществуват различни методи за култивиране на микроорганизмите, които могат да се класифицират по различни показатели. В зависимост от агрегатното състояние на хранителната среда и локализацията на клетките в средата култивирането бива: повърхностно – клетките се развиват по повърхността на тънък слой течна хранителна среда; дълбочинно – клетките се развиват в дълбочина на дебел слой течна хранителна среда и твърдофазово – клетките се развиват по повърхността на насипни хранителни среди, съдържащи водонерастворими субстрати. В зависимост от продължителността на процеса култивирането бива периодично, полунепрекъснато и непрекъснато. В зависимост от условията за провеждане на процеса – аеробно или анаеробно; асептично или неасептично, а в зависимост от обема на средата – лабораторно, полупромишлено или промишлено. Най-широко приложение в биотехнологичната практика намира периодичното култивиране. При този метод микробната култура се развива в затворения обем на биореактора, който съдържа постоянно количество хранителна среда. Единствените входящи и изходящи потоци в системата са тези на аериращия въздух и изходящите газове. За начало на култивирането се счита моментът на посев на стерилната хранителна среда, а за край на процеса – източването на културалната среда от биореактора и отделянето на клетките от средата. В технологично отношение култивирането се предхожда от измиване, проверка за херметичност и стерилизация на биореактора, подготовка, стерилизация и охлаждане на хранителната среда до температура на култивиране. При периодичното култивиране развитието на микробната култура преминава през няколко последователни фази, които графично могат да бъдат представени с растежна крива, имаща интегрален вид.

I фаза: Лаг-фаза – започва от момента на инокулация на хранителната среда и се характеризира с адаптация на микробната култура към условията на средата в биореактора (температура, рН, концентрация на хранителните вещества и др.). През тази фаза клетките не се делят. Незначителното увеличение на биомасата в края на фазата не се дължи на увеличаване брой клетки, а на увеличаване им обем. По време на лаг-фазата количеството на биомасата остава постоянно. Продължителността ѝ е различна за различните продуценти и зависи от адаптивните им способности и най-често се определя графично. Поради това, че тази фаза е непродуктивна, целта в промишлени условия е продължителността ѝ да бъде сведена до минимум.

II фаза: Експоненциална фаза – характеризира се с най-интензивното развитие на микробната култура с максимална скорост на растежа. Концентрацията на хранителния субстрат в средата е основният лимитиращ фактор за скоростта на растеж на микробната популация. В този начален етап от процеса концентрацията на хранителните вещества все още не е лимитираща и не са се натрупали отпадни метаболитни продукти от жизнената дейност на микроорганизмите, които инхибират микробния растеж. По време на тази фаза става най-интензивното нарастване на количеството на биомасата и максимален синтез на първични метаболити. За съжаление в производствени условия продължителността на тази фаза е сравнително кратка. Тя зависи от вида на продуцента, вида и количеството на хранителните вещества и от условията на култивиране. Цялостна представа за ефективността на стадия култивиране по отношение развитието на продуцента, респективно продукцията на целеви продукт, ни дава специфичната скорост на растеж μ , h^{-1} .

III фаза: Стационарна фаза – през тази фаза настъпва равновесие между броя на новообразуваните и броя на умиращите микробни клетки за единица време, в резултат на което количеството на биомасата остава постоянно. Причина за това са както намаляващата концентрация на хранителните вещества в средата, така и проявяващото се инхибиторно действие на някои

отпадни метаболитни продукти от жизнената дейност на микробните клетки. По време на стационарната фаза се наблюдава максимум на продукцията на вторични метаболити.

IV фаза: Фаза на умиране – с течение на времето в затворената система биореактор – среда – микробна култура, настъпва момент, в който броят на умиращите за единица време клетки, надвишава броя на делящите се клетки. Фазата на умиране настъпва поради изчерпване на хранителните вещества от средата и засилване на инхибиторното действие на отпадните метаболити и автолизните продукти от умиращите клетки. Тя представлява интерес само за онези биотехнологични производства, при които целевият продукт се отделя в резултат на лизис на клетките.

Основни кинетични модели за описание на кинетиката на процеса периодично култивиране

Популацията от микроорганизми не е хомогенна, а нейното поведение и жизнена дейност зависят от редица фактори. Най-важната ѝ особеност е, че се намира в постоянен енергиен и материален обмен с околната среда, в която проявява висока устойчивост към външни въздействия и свойството саморегулиране. По аналогия с макрокинетиката на химичните реакции, изучаващи ролята на дифузията, топлопреминаването и конвекцията при протичане на химичната реакция, се развива и макрокинетиката на микробния синтез, изучаваща кинетиката на растеж, развитие и обмен на микроорганизмите в апарата при определени хидродинамични, топлинни и масообменни условия. Една от основните задачи на съвременната биотехнология е управлението и оптимизирането на периодичните биотехнологични процеси. Това е възможно с помощта на кинетични (математически) модели, които представляват функции или системи от уравнения, които описват основните зависимости, характеризиращи процеса: dX/dt – изменението на количеството на биомасата във времето, dS/dt – изменението на количеството на хранителния субстрат във времето и dP/dt – изменението на количеството на целевия продукт във времето. Математическият модел трябва да отразява най-съществените страни и взаимовръзки на изследвания микробиологичен процес.

Уравнението за експоненциалния растеж на микробна популация, известно като закон на Моно, е добре познато в науката и прилагането му е валидно при допускането, че микробната популация се размножава в условията на неограничени хранителни източници, в неограничено пространство и при липса на инхибиращи фактори.

$$X = X_0 \cdot e^{\mu \cdot \tau}$$

където: X – количество на биомасата, kg/m^3 ; τ – момент от време, h , e – Неперово число (2,71828), μ – специфична скорост на растеж на културата, h^{-1}

Анализът на уравнението показва безкрайно нарастване на броя на живите клетки. В действителност обаче клетките се инхибират от изменението на състава на хранителната среда, от отделените метаболитни продукти и от взаимното влияние на микроорганизмите при увеличаване на тяхната концентрация. Експериментално е установено, че уравнението на Моно е коректно само за малка част от общия цикъл на развитие на микробната популация в ограничени обем на биореактора. Моно установява, че специфичната скорост на растеж зависи от концентрацията на субстрата, лимитиращ развитието на микроорганизмите. Зависимостта на специфичната скорост на растеж от концентрацията на лимитиращия субстрат се подчинява на уравнение, аналогично на уравнението на Михаелис-Ментен за кинетиката на ензимните реакции.

$$\mu = \mu_{max} \cdot \frac{S}{K_s + S}$$

където: μ – специфична скорост на растеж на културата, h^{-1} ; μ_{max} – максимална специфична скорост на развитие на културата, h^{-1} ; S – концентрация на субстрата, kg/m^3 ; K_s – константа на насищане, kg/m^3 .

Предимства на периодичното култивиране: висока мобилност на процеса – едни и същи апарати могат да бъдат използвани за култивиране на различни продуценти и получаване на различни биопродукти; по-малък риск от контаминация в сравнение с непрекъснатия метод; по-

лесна поддръжка и ремонт на технологичното оборудване; в случаите на поява на спонтанни мутанти негативният им ефект върху ферментационния процес е много по-малък в сравнение с появата им при непрекъснатите ферментационни процеси.

Недостатъци на периодичното култивиране: сравнително ниски добиви; нестабилност на културата във физиологично отношение, която се намира в преходно състояние; условията на култивиране се променят бързо за сравнително кратък интервал от време; необходимост от многократно подготовка на посевен материал; целевите продукти се синтезират в кратък времеви интервал; по-трудно подлежи на автоматизиране и управление; периодичността на производствените цикли оскъпява производството.

Периодичното дълбочинно култивиране се прилага при биотехнологичното производство на антибиотици, витамини, аминокиселини, ензими и др. биопродукти. Вариант на периодичното култивиране е полунепрекъснатото култивиране. Този метод се изразява в периодично отнемане на определен обем от културалната среда в биореактора и добавянето на свежи порции стерилна хранителна среда. По този начин до известна степен се увеличава продължителността на експоненциалната фаза на развитие, а следователно и добивът от целевия продукт.

Върху развитието на продуцентите и синтеза на целеви продукти в условията на промишлено култивиране влияние оказват редица фактори на средата като температура, активна киселинност, аерация, интензивност на разбъркване, продължителност и др. Значимостта на отделните фактори е различна в зависимост от метода на култивиране и физиологичните особености на шам-продуцента, но могат да се посочат някои общи закономерности.

Влияние на температурата на култивиране. развитието на микроорганизмите и синтеза на продукти от тях е резултат от серия биохимични реакции. Подобно на всички химични реакции, и тяхната скорост на протичане зависи от температурата. Нормалното развитие на микробните култури и образуването на съответни продукти от тяхната жизнена дейност изискват поддържане на определена температура. Всеки продуцент се характеризира с оптимална температура на развитие: психрофилните продуценти имат оптимум на развитие при температура $12 \div 18^{\circ}\text{C}$; мезофилните продуценти – температура $30 \div 35^{\circ}\text{C}$, а термофилните – $40 \div 50^{\circ}\text{C}$. Обикновено индустриалните плесенни продуценти имат оптимум около 28°C , дрождите $25 \div 28^{\circ}\text{C}$, бактериите – $30 \div 37^{\circ}\text{C}$, а актиномицетите – около 28°C . Освен с оптимална температура за развитие, продуцентите се характеризират и с оптимална температура на биосинтез на целевия продукт, която невинаги съвпада с температурния оптимум за развитие. Например продуцентът на еритромицин *S. erythraea* има температурен оптимум на развитие през трофофазата 33°C , а температурен оптимум на синтез на антибиотика през идиофазата – 28°C . Температурата оказва влияние и върху процесите на молекулната дифузия, т.е. върху масопреминаването на хранителните вещества от средата в клетката и обратно. Провеждането на биотехнологичните процеси извън диапазона на температурния оптимум рязко увеличава продължителността на култивирането и понижава добива от целевия продукт. Поради това при съвременните биотехнологични производства за получаване на антибиотици ферментационният етап протичат при постоянен автоматичен контрол на температурата.

Влияние на рН. Активната киселинност на средата също оказва съществено влияние върху развитието на продуцентите и синтеза на целеви продукти. рН оказва пряко въздействие върху микробната клетка, като променя нейния заряд и косвено, като влияе върху степента на дисоциация на хранителните вещества в средата. Активността на клетъчните ензими, разтворимостта на хранителните вещества, междинните и крайни продукти и степента на тяхната дисоциация зависят най-вече от активната киселинност. В резултат на интензивното развитие на микробните продуценти и синтеза на целеви продукти бързо се изменя рН на ферментационната среда, което до голяма степен зависи от темповете на окисление на хранителните субстрати в средата. За неутрализиране на този ефект, по време на култивирането рН се регулира автоматично чрез подаване на киселини или основи и в състава на хранителните среди се влагат буферизиращи агенти като калциев карбонат или се използват среди с висок буферен капацитет. Оптималните рН стойности за развитието на бактерии и актиномицети е в неутралната област на рН $6,8 \div 7,2$, на дрожди – в слабокиселата област на рН около $5,5$. В най-широк рН-диапазон успешно се развиват и синтезират БАВ плесенните гъби.

Влияние на аерацията. развитието на микробната популация при аеробните биотехнологични процеси се осъществява в условията на обмен на вещества между хранителната среда

(*течна фаза*), аерация въздух (*газова фаза*) и микробния продуцент (*псевдоотвърда фаза*). Необходимият за аеробните процеси кислород се осигурява при продухване на средата със стерилен въздух и много рядко от подаването на чист кислород. Аерацията на хранителната среда с въздух освен, че осигурява необходимия кислород за процеса, осигурява и изнасянето на някои газообразни метаболити (най-често CO_2). Основният проблем на масообменния процес е ниската разтворимост на кислорода в хранителната среда, най-вече поради високите температури на култивиране. Както е известно разтворимостта на газовете намалява с увеличаване на температурата на течността. По тази причина за интензификация на масообменните процеси културалната среда се разбърква, което много често води до интензивно пенообразуване и свързаните с това проблеми. Култивирането на повечето продуценти в биотехнологията протича нормално при постоянно подаване на кислород, тъй като разтворимостта на кислорода в културалната среда е не по-висока от $6 - 9 \text{ g/m}^3$, а консумацията му от повечето аеробни микроорганизми е в границите $0,2 - 0,3 \text{ g/(m}^3 \cdot \text{s)}$. Аерацията на културалната среда се разглежда като съставена от два основни процеса: абсорбция на кислорода от газовата в течната фаза и консумация на кислорода от микроорганизмите. Първият от проблемите се решава чрез разнообразни методи за разбъркване и други процеси на химическата технология. Консумацията на кислорода от микроорганизмите, е в непосредствена връзка с тяхното физиологично състояние, което зависи от много фактори, в това число и от концентрацията на разтворения в културалната среда кислород. С величината степен на аерация означаваме количеството въздух, подавано в единица обем от хранителната среда за единица време. Степента на аерация при различните биотехнологични процеси е различна в зависимост от типа на продуцента и синтезирания продукт. Аерирането на растящите микробни култури има три цели: снабдяване на микроорганизмите с достатъчно количество кислород, отделяне на газообразните продукти на обмяна и частично отвеждане на отделената от микробния продуцент топлина. Микроорганизмите са в състояние да усвояват само разтворения в средата кислород, като оксидират в процеса на аеробно дишане субстратите до въглероден диоксид и вода, т.е. използват кислорода като краен акцептор на отделените електрони или водород. При дълбочинното аеробно култивиране

протичат 2 процеса: единият е разтваряне на кислорода в хранителната среда, а вторият е усвояването му от микроорганизмите. Ако усвояването на кислорода от клетките превишава скоростта на разтварянето му в хранителната среда, възниква кислороден дефицит. Необходимостта на микробната култура от кислород се обуславя от интензивността на дишане и клетъчната маса в единица среда. Интензивността на дишане зависи най-вече от възрастта на културата. По-младите клетки имат по-висока интензивност на дишане, а с увеличаването на възрастта тя намалява. Интензивността на дишане, респективно нуждата от кислород, зависи до голяма степен и от състава на хранителната среда, защото различните съединения се окисляват с различна скорост. Потребността от кислород е различна и в зависимост от количеството на клетките в средата. В началото през лаг-фазата, когато клетките са малко на брой, количеството на необходимия кислород е малко. През експоненциалната фаза броят на клетките рязко се увеличава, а оттам и потребността от кислород, която през стационарната фаза намалява по обясними причини. От всичко, казано до тук, става ясно, че през различните фази на стадия култивиране е необходимо различно количество разтворен кислород, поради което в промишлени условия се прилага степенна (градиентна) аерация, съобразена с физиологичното състояние на културата и състава на средата. Между трите фази в културалната среда се осъществява процес на масопренасяне на кислорода. Този процес протича по сложен физико-химичен механизъм и се контролира от съпротивлението на течната фаза. Най-интензивна аерация изискват процесите на биосинтез на антибиотици и като цяло биотехнологичните процеси, основаващи се на използването на актиномицетни култури. За правилното организиране на аерацията е необходимо да се знае не само критичната концентрация на разтворения кислород или зависимостта на някои от свойствата на клетката от неговата концентрация, но и необходимостта от кислород. Важна характеристика на микробната култура е специфичната максимална консумация на кислород (интензивност на дишането), чиито средни максимални стойности за повечето аеробни култури са в границите $0,6 - 1 \text{ kg/(m}^3 \cdot \text{h)}$. Известни са случаи, например при производството на дрожди, в които консумацията на кислород е значително по-висока и достига $10 - 12 \text{ kg/(m}^3 \cdot \text{h)}$. В повечето случаи аерацията е съпроводена с разбъркване на културалната среда. В лабораторни условия разбъркването се осъществява чрез разклащане на колбите, а в промишлените – чрез барботиране или в съчетание с

механично разбъркване. Разбъркването е задължително условие за интензификация на процеса култивиране. Чрез него се осъществява: достатъчна интензивност на абсорбция на кислорода от аериращия въздух и досорбция на газообразните метаболитни продукти; достатъчно малък градиент на концентрациите в зоната около клетката и средната концентрация на хранителните вещества в апарата; равномерно разпределение на биомасата и субстрата в обема на апарата. Разбъркването неизбежно е свързано с механично въздействие върху клетките. Последствията могат да бъдат благоприятни, ако се разрушават клетъчни конгломерати и вредни, ако се разрушават или повреждат микробните клетки. Следователно за всеки конкретен процес на култивиране разбъркването действа лимитиращо в едно от следните три направления: масопреминаване газ-течност, масопреминаване течност-клетка, механично въздействие.

Оптималните стойности на основните процесни параметри, като температура, рН и степента на аерация, осигуряващи най-интензивно развитие на продуцентите и максимален синтез на целевите продукти, обикновено се определят експериментално за всяка конкретна двойка продуцент – биопродукт, като зависят от генетичните и физиологични особености на продуцентите, от състава на хранителните среди и избрания метод за култивиране.

Дълбочинното култивиране на микроорганизмите е един от най-сложните процеси за получаване на микробни продукти. Биосинтетичните свойства на микроорганизмите зависят от редица фактори – температура, рН, концентрация на разтворен кислород, конструкция и материал на оборудването и др. Конструкцията на биореакторите трябва да бъде съобразена с изискването за създаване на оптимални условия на растеж и жизнена дейност на микроорганизмите. Биореакторите представляват съдове със специални устройства за: подаване и диспергиране на въздуха; хомогенизация на средата; пеногасене; загряване и охлаждане; арматура и КИП. Изборът на конструкция на биореактора се определя както от култивирувания микроорганизъм, така и от крайния продукт на биосинтеза. По предназначение биореакторите са лабораторни, пилотни и промишлени. Апаратите обикновено се изработват от неръждаема стомана.

В зависимост от методите за оценяване на тяхната работа биореакторите за дълбочинно култивиране на микроорганизми се разделят по следните признаци:

- ✓ Апарати с периодично или непрекъснато действие
- ✓ Херметични или отворени
- ✓ Според конструкцията – биореактори с дифузор и турбина; с въртящ се аератор; с циркуляционен контур;
- ✓ Според начина на внасяне на енергията и организацията на системата на разбъркване – апарати с подаване на енергията с газовата фаза; апарати с подаване на енергията с течната фаза; апарати с комбинирано подаване на енергията.

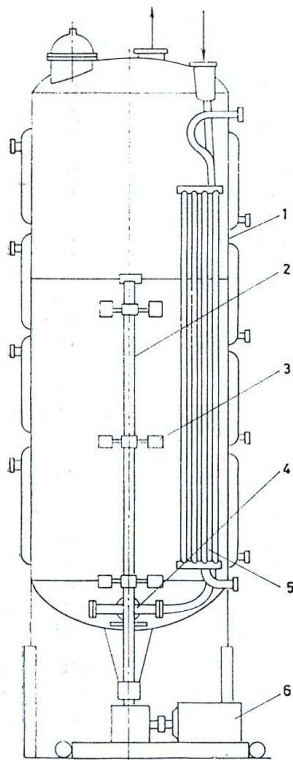
Биореактори с въвеждане на енергията чрез газовата фаза. В апаратите от този тип аерацията и разбъркването на културалната среда се извършва със сгъстен въздух, който се подава в биореактора с определено налягане. Конструктивно тези апарати се различават по начина на подаване на въздуха и конструкцията на аератора. Към тази група се отнасят барботажните, барботажно-еърлифтните, еърлифтните, биореакторите с контактни устройства, колонните тарелкови и биореакторите с плаващ пълнеж.

Биореактори с въвеждане на енергията чрез течната фаза и биореактори с въвеждане на енергията чрез течната и газовата фаза. Биореакторите с въвеждане на енергията с течната фаза и с течната и газовата фаза се явяват едни от най-сложните в конструктивно отношение оборудвания в заводите за производство на микробни продукти. Възможността за въвеждане на енергията в апарата чрез непосредствено смесване, чрез системата помпа-ежектор или помпа-струен елемент, води до разработването и внедряването на различни по конструкция и обем апарати.

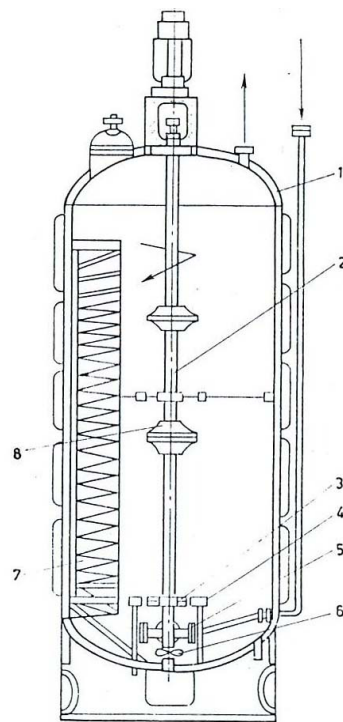
Биореакторите с разбъркващи устройства, при които енергията се въвежда, както чрез течната фаза в процеса на разбъркване, така и чрез газовата фаза при барботирането на течността, се явяват най-мобилните и широко прилагани апарати от тази група. Те се използват в най-голяма степен в промишлеността и за получаването на голям брой микробиологични продукти, в т.ч. антибиотици и витамини. На фиг. 1 е представен биореактор от тази група. Биореакторът представлява вертикален цилиндричен съд, в който по височина са монтирани няколко открити турбинни бъркачки. Лопатките на бъркачките са раздвижени, което позволява регулирането на техния диаметър. В долната част на апарата е разположен квадратен барботьор за подаване на въздух. За отвеждане на биологичната топлина, апаратът е снабден със секционирана топлообменна риза, а вътре в него е монтирано допълнително топлообменно устройство, изпълняващо роля и на отбойници.

Биореакторът на фиг. 2 също е вертикален цилиндричен съд, с елиптически дъна и монтирани бъркачки в него. В долната част на вала, непосредствено над барботьора е монтирана закрыта турбинна бъркачка с криволинейни лопатки. Над нея са монтирани две закрыти турбинни бъркачки с прави лопатки. В най-долната част на апарата е монтирана пропелерна бъркачка. Барботьорът е с квадратна форма. Вътре в апарата, симетрично са разположени 4 топлообменни устройства.

Разгледаните апарати са внедрени в промишленото производство и се използват при производството на редица микробни препарати. Интензификацията на процесите в тази група апарати е насочена в различни направления: масообмен, разбъркване, подобряване на възлите от гледна точка стерилност на системата и др. При проектиране на апаратите с разбъркващи устройства е необходимо да се познават някои основни хидродинамични и масообменни параметри.



Фиг. 1. Биореактор с разбъркващи устройства
 1 – корпус; 2 – вал; 3 – бъркачки;
 4 – барботьор;
 5 – топлообменник; 6 – задвижване

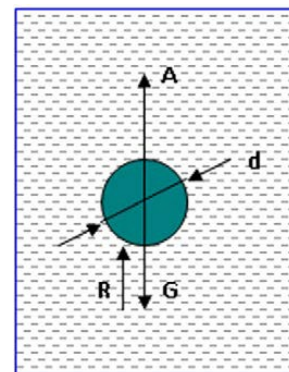


Фиг. 2. Биореактор с разбъркващи устройства
 1 – корпус; 2 – вал;
 3 – турбинна бъркачка с криволинейни бъркачки; 4 – статор;
 5 – барботьор; 6 – пропелерна бъркачка; 7 – топлообменник; 8 – турбинна бъркачка с прави лопатки

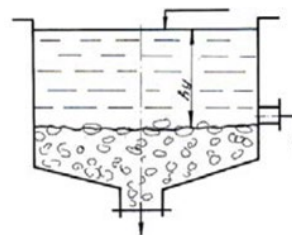
Голяма част от формираните в хода на биотехнологичните производства междинни и крайни продукти се отнасят към хетерогенните системи. Всяка нееднородна система се състои от две фази – дисперсна фаза и дисперсна среда. Дисперсната фаза е разпределена в дисперсната среда и между тях има разделителна повърхност. И двете фази могат да съществуват в трите агрегатни състояния, като в зависимост от агрегатното състояние на дисперсната среда (непрекъснатата среда), нееднородните системи биват течни и газови. Към групата на течните нееднородни системи се отнасят: суспензии (дисперсна среда течност – дисперсна фаза твърдо вещество); емулсии (дисперсна среда течност – дисперсна фаза течност) и пени (дисперсна среда течност – дисперсна фаза газ). Към групата на газовите нееднородни системи се отнасят: прахови (дисперсна среда газ – дисперсна фаза твърдо вещество) и аерозоли (дисперсна среда газ – дисперсна фаза течност). В зависимост от размерите на частиците на дисперсната фаза хетерогенните системи биват грубодисперсни, финодисперсни и колоидни разтвори. В биотехнологичната промишленост много често се налага предварително отделяне на биомасата от културалната среда. Методът на разделяне на хетерогенните системи, който се прилага, се избира в зависимост от състоянието на фазите в системата. Често за разделяне на нееднородни системи могат да се използват няколко метода. При това е необходимо да се отчитат редица фактори: минимален размер на частиците, които трябва да се отделят; температура на провеждане на процесите; разход на енергия за осъществяване на разделянето; стойност на оборудването и експлоатационни разходи. В зависимост от това, коя фаза се движи относно другата, при разделянето на нееднородните системи се различават два основни метода: утаяване и филтриране. В процеса на утаяване дисперсните частици се движат относно непрекъснатата течна среда. При филтрирането дисперсионната фаза преминава през дисперсната, която се отделя върху специално предназначено за целта поресто тяло. Трябва обаче да се отбележи, че в чист вид не протича нито един от процесите. Процесът на филтрация се съпровожда в една или друга степен от утаяване. Процесите на утаяване се осъществяват в гравитационно или центробежно силово поле и в електрическо поле. Филтрирането се осъществява основно под въздействие на налягане, на центробежна сила или на теглото. При това за разлика от утаяването, при филтрирането не е необходимо разлика в плътностите на двете фази.

Утаяване в гравитационно поле

Утаяването е широко използван процес в промишлеността. Скоростта на утаяване в гравитационно поле е по-ниска, поради което процесът на утаяване е малко ефективен и не осигурява разделяне на високодисперсни частици (дребни частици или концентрирани суспензии). Движещи сили на процеса са силата на тежестта (G), Архимедовата (подемната) сила (A) и съпротивителната сила (R) (силата на триене), която средата оказва върху частицата. За определяне на скоростта на утаяване се използва уравнението на Стокс. Обикновено скоростта на утаяване се определя опитно, след което се определя и режима на утаяване и коефициента на съпротивление при утаяване. Съоръженията, в които се извършва процеса на утаяване се наричат утайтели.



Те представляват цилиндрични съдове с конично дъно. Подлежащата на разделяне смес се запълва в апарата и се утаява (фиг. 1). Ако $\rho_{ч} > \rho_{с}$, например при разделяне утаяването на дрождеви суспензии частицата се утаява в долната част на апарата, а в горната част остава очистената течност (надутаечна течност) с височина h_y . Производителността на утайтеля зависи от скоростта на утаяване и площта на съда, но не и от височината на утаяване. В практиката намират приложение и утайтели с непрекъснато действие.

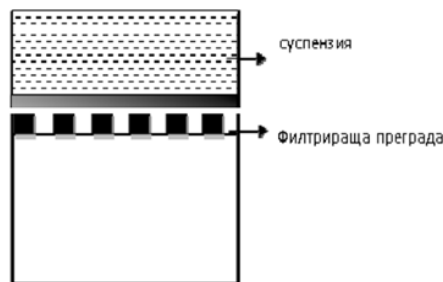


Фиг. 1. Утайтел с периодично действие

Най-често тези утайтели са канали или басейни с правоъгълно напречно сечение с ширина b и дължина l . Най-често такива съоръжения могат да се срещнат в градските пречиствателни станции, като първа стъпка на пречистване на питейни и отпадни води (фиг.5). В случаите на хоризонтални утайтели върху частиците освен скоростта на утаяване действа и скоростта на потока течност. Освен това е необходимо след като частиците се утаят те да остават на дъното на апарата.

Филтриране. Видове филтри

Филтрирането е хидродинамичен процес, при който твърдата фаза на нееднородните системи се отделя от течната среда чрез пореста преграда. Видът на филтриращата тъкан се избира в зависимост от химичната природа на суспензията. Като филтриращи материали се употребяват памучни или вълнени тъкани, метални филтриращи сита, азбестови шихти, керамични изделия и др. В зависимост от механизма на филтриране се различават две групи. Към първата група се отнася филтрирането на невискозни течности със значително количество утайки. При нея порите на филтъра са по-големи от размера на най-малките частици, поради което в началото на процеса във филтрат се отделя определено количество от твърдата фаза. С наслояване на утайката върху филтъра тя започва да играе основна роля при задържането на твърдата фаза. Дебелината на слоя утайка расте с времето, вследствие на което се увеличава съпротивлението на филтриране и намалява скоростта на филтриране. Втория тип филтриране се прилага, когато размерите на частиците са малки и количеството им е малко, а така също и при филтрирането на силновискозни суспензии. Разделянето на тези суспензии протича бавно и без образуването на свод над филтриращите пори от утаени частици. При този случай частиците навлизат в порите и ги затварят. С увеличаване на задържаните в порите частици намалява живото сечение на филтриращата преграда и се увеличава съпротивлението на филтриране. При този тип процеси най-често се използват спомагателни материали (кизелгур, перлит и др.), като предварително се подготвя суспензия, която се наслоява върху филтриращата преграда. Някои спомагателни вещества освен това притежават и адсорбционни свойства, при което при филтрирането може да се получи и известно обезцветяване и обезмирисяване на обработваната течност. Най-важният параметър на процеса филтриране е неговата скорост. Скоростта на филтриране (m/s) се изразява с количеството филтрирана течност за единица време, отнесена към единица филтрираща повърхност: $v = V / F \cdot t$, където: V – обем на филтрат, m^3 ; F – площ на филтъра, m^2 ; t – време за филтриране, s



Фиг. 2. Схема на филтриране с образуване на утайка

При този случай порите на филтъра са по-големи от размера на най-малките частици, поради което в началото на процеса във филтрат се отделя определено количество от твърдата фаза. С наслояване на утайката върху филтъра тя започва да играе основна роля при задържането на твърдата фаза. Дебелината на слоя утайка расте с времето, вследствие на което се увеличава съпротивлението на филтриране и намалява скоростта на филтриране. Втория тип филтриране се прилага, когато размерите на частиците са малки и количеството им е малко, а така също и при филтрирането на силновискозни суспензии. Разделянето на тези суспензии протича бавно и без образуването на свод над филтриращите пори от утаени частици. При този случай частиците навлизат в порите и ги затварят. С увеличаване на задържаните в порите частици намалява живото сечение на филтриращата преграда и се увеличава съпротивлението на филтриране. При този тип процеси най-често се използват спомагателни материали (кизелгур, перлит и др.), като предварително се подготвя суспензия, която се наслоява върху филтриращата преграда. Някои спомагателни вещества освен това притежават и адсорбционни свойства, при което при филтрирането може да се получи и известно обезцветяване и обезмирисяване на обработваната течност. Най-важният параметър на процеса филтриране е неговата скорост. Скоростта на филтриране (m/s) се изразява с количеството филтрирана течност за единица време, отнесена към единица филтрираща повърхност: $v = V / F \cdot t$, където: V – обем на филтрат, m^3 ; F – площ на филтъра, m^2 ; t – време за филтриране, s

Скоростта на филтриране зависи от редица фактори, основните, от които са: структура на утайката, дебелина на слоя утайка, характер на филтриращата преграда, виско-

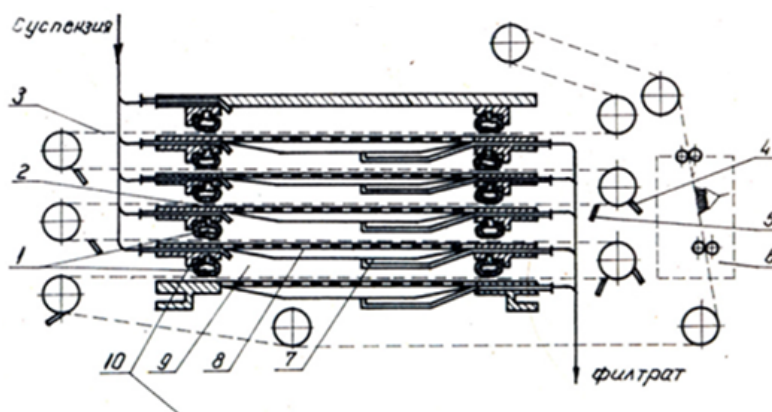
зитетът на течността, движещата сила на процеса. Последната представлява разликата в налягането от двете страни на филтриращата преграда, т.е. $\Delta p = P_1 - P_2$. Разликата Δp може да бъде създадена при повишаване на налягането пред филтриращата преграда или чрез създаване на вакуум след нея. В зависимост от начина на създаване на тази разлика се различават филтри работещи под налягане и под вакуум.

Видове филтри

Апаратите за филтриране могат да се разделят на две основни групи: филтри с периодично действие и филтри с непрекъснато действие. Към първата група се отнасят филтрите с неподвижна филтрираща преграда, а към втората с подвижна филтрираща повърхнина. В зависимост от начина на създаване на движещата сила на филтриране (разлика в налягането) се различават филтри, работещи с над налягане и филтри работещи под вакуум. Според вида на филтриращата преграда биват: керамични, листови, шихтови, филтри с тъкани прегради. Филтър-пресите са апарати за филтриране, в които за прегради се използват азбесто-целулозни листове (шихти), полипропиленови тъкани и др. Филтриращите прегради се поставят между филтриращи плочи и рамки, като по този начин се формира пространство за течността, която ще се филтрира. В промишлеността най-често намират приложение плочестите шихтови филтри, при които филтърната плоча е основен съставен елемент. По периферията си плочата е оградена от плосък уплътняващ кант. От двете страни се намират конзоли, а в ъглите са разположени ушите с кръгли отвори, които са свързани с вътрешността на плочите, която е набраздена, като между ребрата се образуват каналчета. В зоните на отворите ребрата са прекъснати така, че се образуват хоризонтални канали. Филтрите се изработват от хром-никелови киселиноустойчиви стомани или от алуминиеви сплави. При филтриране с кизелгур филтър пресите са снабдени освен с филтриращи плочи и с филтриращи рамки, които са по-дебели от плочите и образуват камери за мътна течност. Двата странични отвори на рамките са свързани с вътрешността чрез прорези. По тях се подава за филтриране мътната течност, а при необходимост може да се добавя и филтрираща суспензия.

Филтър-преса с автоматично действие

Филтър пресата се състои от две хоризонтално разположени една над друга филтрационни плочи 2, поставени на разстояние 23 – 30 mm. От двете страни на плочите има направляващи. Между плочите чрез ролки преминава филтриращата тъкан 3 за опъване, на която са предвидени натягащи устройства. За образуване на отделните камери в каналите на рамките са монтирани каучукови шлангове 1. Уплътнението в камерите се осъществява при подаване на течност в гумените шлангове под налягане 0,8 – 1 МПа. За отделяне на филтрат от утайката и отвеждането му от отделните камери на пресата те са покрити с перфорирани опорни плочи 2, под които са монтирани специални дъна за събиране и отделяне на филтрат. Утайката се отделя от филтриращата тъкан с ножове



Фиг. 3. Схема на филтър преса с автоматично действие

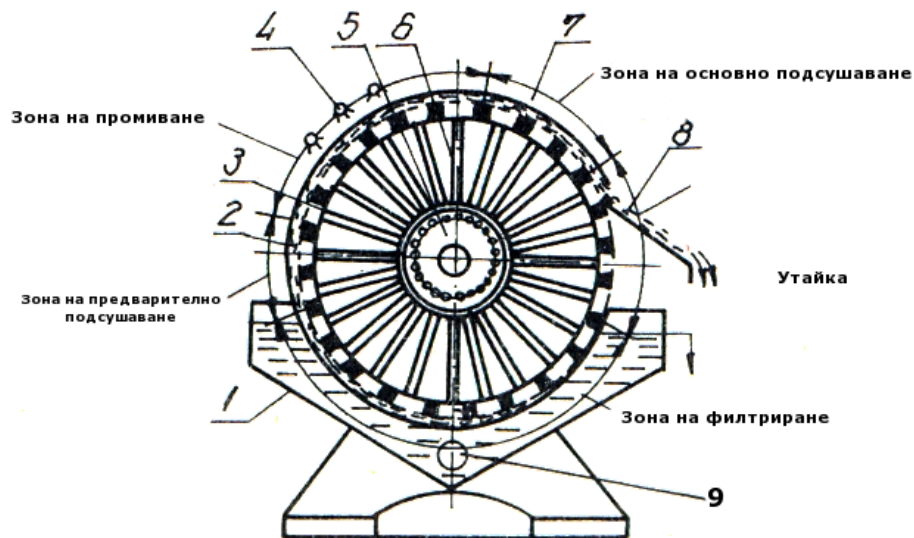
1 – гумен уплътнител; 2 – опорна перфорирана плоча; 3 – филтрираща тъкан; 4 – нож за отделяне на утайките; 5 – нож за почистване; 6 – камера за регенерация; 7 – дъно; 8 – камера за чист филтрат; 9 – камера за суспензия; 10 – опорна рамка;

За отделяне на филтрат от утайката и отвеждането му от отделните камери на пресата те са покрити с перфорирани опорни плочи 2, под които са монтирани специални дъна за събиране и отделяне на филтрат. Утайката се отделя от филтриращата тъкан с ножове

4. Регенерацията на тъканта се извършва в регенерационната камера 6. Пълният цикъл на работа на филтъра се състои от следните операции: подаване на течност в шланговете и образуване на камери, филтриране, промиване на утайката, подсушаване на утайката с въздух, отстраняване на утайката и регенерация на филтриращата тъкан. Целият процес е автоматизиран и се осъществява по зададена програма.

Вакуум филтрите с непрекъснато действие се характеризират с висока производителност и сравнително лесна експлоатация, поради което намират широко приложение в различни биотехнологични производства. Според формата на филтриращите прегради се делят на барабанни, дискови и лентови. Характерно за тях е, че филтриращата им повърхнина по време на работа непрекъснато се обновява и регенерира.

Барабанните вакуумфилтри са най-често използваните филтрационни апарати за големи биотехнологични производства, каквито са тези за получаване на антибиотици. В зависимост от работните елементи се делят на камерни и безкамерни барабанни вакуумфилтри. На фиг. 4 е показана схема на работата на камерен вакуумфилтър. В коритото за суспензия 1 е потопен въртящ се барабан 2, разделен на отделни секции 3 чрез прегради. Всяка секция е съединена с помощта на тръба към подвижната глава 8 на филтъра, която има толкова отвори, колкото е броят на оформените в барабана секции. Секциите са покрити с перфорирана опорна повърхнина, на която се поставя филтриращия плат. Над барабана е предвидено душово устройство 7 за промиване на утайката 4. За отделяне на утайката филтриращата повърхнина се използва нож 8, а в коритото е монтирано разбъркващо устройство 9 за предотвратяване на утаяването в него.



Фиг. 4. Схема на барабанен вакуумфилтър

1 – корито; 2 – барабан; 3 – секции; 4 – утайка; 5 – тръби;
6 – подвижна част на главата; 7 – душ; 8 – нож; 9 – бъркачка

Изолирането и пречистването на външноклетъчни биопродукти от културалната течност и вътреклетъчни биопродукти от дезинтегрирана биомаса е най-сложният в технологично отношение процес от следферментационния етап на биотехнологичните процеси. Той е свързан с много капиталовложения, експлоатационни разходи и загуба на целеви продукт. Методите за изолиране и пречистване на биопродуктите трябва да отговарят на следните условия:

- Да са селективни по отношение на целевия продукт;
- Да позволяват на всеки етап да се постига изолиране, пречистване и концентриране на целевия продукт;
- Да са приложими в индустриални условия;
- Да са безвредни;
- Да са икономически изгодни.

За изолиране и пречистване на биопродукти приложение намират следните методи: екстракция, йонообменна сорбция и седиментация.

Екстракция

Екстракцията е метод за разделяне на твърди или течни вещества с помощта на селективни разтворители, наречени екстрагенти. Физичната същност на процеса се изразява в масопреминаване на екстрахираното вещество от течната или твърдата фаза във фазата на екстрагента при взаимното им контактуване. Екстракцията протича на два етапа: първо, чрез молекулна дифузия екстрахираното вещество преминава от вътрешността на материала към повърхността му, а след това чрез конвективна дифузия – от повърхността на материала към фазата на екстрагента. В зависимост от агрегатното състояние на фазата, от която се екстрахира целевият продукт, екстракцията бива течно-течна и твърдо-течна.

Течно-течната екстракция. В зависимост от вида на екстрагента течно-течната екстракция бива два вида: с органичен разтворител и с две водни несмесващи се фази. Течно-течната екстракция с органичен разтворител намира широко приложение при изолирането на антибиотици от културални течности. Тя се основава на различната разтворимост на различните форми на целевия продукт във водната фаза и фазата на органичния разтворител. Обикновено превръщането на целевия продукт от една форма в друга става чрез промяна на рН. Например по този начин с бутилацетат се изолира бензилпеницилин от културалната течност на *P. chrysogenum*. При кисела стойност на рН (2,8 – 3,1) бензилпеницилинът е под формата на киселина и е разтворим в бутилацетата, а при алкална стойност на рН (7,8 – 8,1) е под формата на сол и е разтворим във водната фаза. Важно значение за ефективността на екстракцията има изборът на органичен разтворител. Най-често приложение като разтворители намират: ацетон, бензол, фенол, бутанол, амил-, етил-, бутилацетат и др. Тъй като в повечето случаи екстрахируемите продукти са полярни вещества, необходимо е да се използват полярни разтворители. Много от тези вещества, обаче се разтварят във вода, което значително намалява ефекта на провеждания процес. Изискванията, на които трябва да отговарят органичните екстрагенти, са: висок коефициент на разпределение; максимално да разтваря целевия продукт и в минимална степен примесите; да не се смесва с водата; да бъде евтин, достъпен, технологичен и безвреден за работещите и околната среда. Факторите, които влияят върху ефективността на процеса, са температурата, контактната повърхност между фазите и времето за контакт помежду им. Течно-течната екстракция с полярни органични разтворители намира приложение за изолиране на β -лактами (пеницилини и цефалоспорини) и макролидни антибиотици (еритромицин и тилозин).

Течно-течната екстракция с две водни несмесващи се фази е метод за изолиране на лабилни биопродукти като ензими и клетъчни органоиди, които не могат да бъдат третирани с органични разтворители. Процесът се основава на получаването на две водни фази с различна молекулна маса, които не се смесват помежду си, например ПЕГ и декстран. Предимствата на този метод за екстракция се изразяват в: провеждане на процеса при меки условия, температура и рН и не се налага използването на агресивни и скъпи органични разтворители.

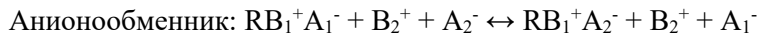
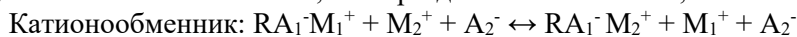
Екстракцията в системата „течност-течност“ протича в различни видове екстрактори. Те могат да се класифицират по следните признаци: организация на потоците; вид на контакта между фазите; начин на подаване на енергията за смесване на фазите; метод на разделяне на фазите. Широко приложение при производството на антибиотици намира ротационният екстрактор-сепаратор тип „Подбелняк“. Апаратът се състои от хоризонтално въртящ се барабан, поставен върху вал, през който навлизат потоците на екстрагента и разтвора и изтичат потоците на екстракта и обработения разтвор. Барабанът се състои от голям брой барабана и се движи към центъра, а по-тежката фракция се подава в центъра и се движи към периферията на барабана. Съотношението разтворител-екстрагент е 3:1, при което се постига максимално концентриране на веществото.

Твърдо-течна екстракция. При този метод на екстракция целевият продукт се екстрахира от влажната или обезводнена биомаса с подходящ разтворител, който се избира в зависимост от разтворимостта на целевия продукт. Влияние върху ефективността на процеса оказват температурата, рН, контактната повърхност, времето за контакт между фазите, размер и влажност на частиците. Най-подходяща за екстрахиране е биомасата, сушена в сушилни с псевдокипящ слой. Независимо че повишаването на температурата интензифицира молекулната дифузия, в промишлени условия екстракцията се провежда при ниска температура (под 30°C), защото болшинството от биопродуктите са термолабилни. Твърдо-течната екстракция намира приложение при изолиране на ензими от твърдофазови култури и вътреклетъчни антибиотици. Например противогъбичният антибиотик нистатин се изолира от изсушената биомаса на *Streptomyces noursei* с охладен 2% разтвор на CaCl₂ в CH₃OH.

В производствени условия екстракцията може да бъде реализирана като едностепенен или като многостепенен с правоъгълно или противотоково движение на екстрагента и екстрахирувания материал. Най-често процесът се реализира по схемата на многостепенната противоточна екстракция в батерия от последователно свързани апарати.

Йонообменна сорбция

Йонообменната сорбция е процес на еквивалентен обмен на част от подвижните йони на порест водонерастворим материал, наречен йонообменник или йонит със същите по заряд йони от намиращо се в контакт с него разтворено вещество. Този процес на практика представлява масообмен, съпроводен с химична реакция между еквивалентна част на подвижните йони на йонита с йоните на разтвореното вещество, при което се запазва електронеутралитетът на твърдата и течната фаза. Във всички случаи йонният обмен е съпроводен и с адсорбция, откъдето идва и наименованието на метода. Йонообменните материали са обикновено твърди, водонерастворими органични или неорганични вещества, които съдържат йоногенни групи. Йоногенните групи са ковалентно свързани с неразтворимия носител и се дисоциират във вода, като образуват неразтворими поликатиони или полианиони заряда, на които се компенсира от този на подвижни йони с противоположен знак. Според произхода си йонитите биват природни (глини, почви, алумосиликати, въглен) или синтетични (зеолити, фосфати, полистироли и др.). Според природата на пространствения скелет йонитите биват неорганични и органични. Според вида на подвижните йони, които обменят йонитите, те се разделят на катионити, анионити и амфолити.



R – полимерна верига на сорбента

Според степента на дисоциация на йоногенните групи йонитите биват силноелектролитни (силнокисели катионити и силноосновни анионити) и слабоелектролитни (слабокисели катионити и слабоосновни анионити).

Йонообменният процес протича на няколко фази:

I фаза: Йоните на разтвореното вещество преминават чрез дифузия и конвекция от обема на разтвора (течната фаза) през граничния слой на разтвора, който го разделя от повърхността на йонитните гранули (твърдата фаза).

II фаза: Дифузия на йоните на разтвореното вещество през фазовата разделителна повърхност към йоногенните групи на йонита.

III фаза: Химична реакция, свързана с еквивалентен обмен на йоните на разтвореното вещество и йоните на йонита.

IV фаза: Пренасяне чрез дифузия на изместените йони от йонита към фазовата разделителна повърхност йонит-разтвор.

V фаза: Пренасяне чрез дифузия на изместените йони от йонита през фазовата граница и преминаването им в обема на разтвора.

Факторите, които оказват влияние върху равновесието и скоростта на йонния обмен, са: размерът на зърната на йонита, концентрацията и природата на обменяните йони, степента на набъбване на зърната на йонита, рН и др.

Йонообменната сорбция намира широко приложение в биотехнологията за изолиране и пречистване на БАВ, особено от ниско концентрирани разтвори, каквито са болшинството от културалните течности в производствени условия. Йонообменните материали, използвани в промишлеността, трябва да отговарят на определени условия за механична, химична, биологична и термична устойчивост, както и да проявяват голям обменен капацитет. За изолиране и пречистване на БАВ най-често се използват синтетични неорганични и органични йонообменни сорбенти, наричани йонообменни смоли (Amberlite, Wofatite, Zeo Kard, Dowex и др.).

Предимства на йонообменната сорбция:

- Висока селективност;
- Сравнително проста регенерация на йонообменните смоли;
- Сравнително висока механична и биологична устойчивост на смолите, което позволява многократното им използване;
- Не се използват вредни и взривоопасни органични разтворители, което подобрява условията за работа;
- Малки капиталовложения;
- Лесно подлежи на механизирание и автоматизиране;
- Добри възможности за реализация на непрекъснат процес.

Недостатъци на йонообменната сорбция:

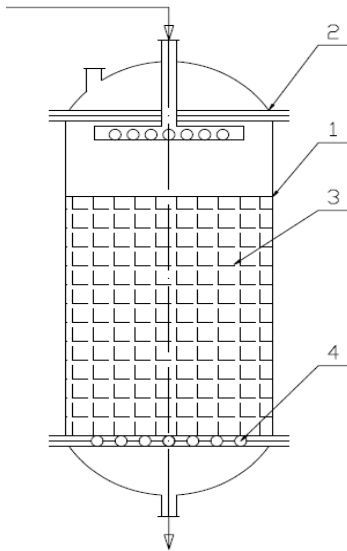
- Ниска ефективност при високо концентрирани разтвори поради бързото насищане на смолата;
- По-голяма продължителност в сравнение с други методи за изолиране и пречистване на БАВ;
- Методът е приложим при химично стабилни биопродукти.

Йонният обем може да се осъществи по три начина: статичен, динамичен и хроматографски. Статичният начин се състои в смесване и последващо разделяне на йонита и обработвания разтвор. Процесът се провежда в апарат с бъркачка за суспендиране на йонита в разтвора. След завършване на сорбцията йонитът, съдържащ целевия компонент, например антибиотик, се отделя от маточния разтвор, промива се с вода и се връща в апарата. Тук се провежда по подобен начин извличане на антибиотика. Статичният метод се прилага най-вече в лабораторната практика.

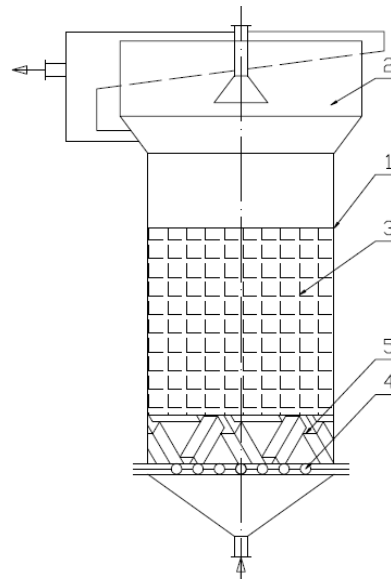
Динамичният метод е най-разпространен при йонообменно извличане на биологични вещества. При този метод разтворът се пропуска в едно направление през слой от йонита. При движението му разтворът обеднява на сорбираните йони, а контактува с активни слоеве от йонита. Протичащият разтвор изнася продуктите на йонообменната реакция, т.е. изместените йони. Чрез това се постига практически и пълно извличане на продуктите от разтвора и постепенно насищане на йонита. Отделянето на биологично активните вещества от сорбента в динамични условия позволява да се постигне по-пълната му десорбция и да се получат по-концентрирани елюати.

Йонообменната хроматография се прилага преимуществено в научната дейност и служи за пълно отделяне на активното вещество от други съединения, сорбирани от йонита.

Основен апарат за осъществяване на динамичен йонен обмен е йонитният филтър. Той представлява вертикален цилиндричен съд, запълнен с йонит през слоя, на който преминава обработваната течност. Тъй като височината на филтъра е значително по-голяма от неговия диаметър, апаратите се наричат йонообменни колони. В производството на антибиотици се използват два типа йонообменни филтри: затворен (фиг. 1) и отворен (фиг. 2) тип.



Фиг. 1. Схема на затворен филтър
 1 – колона; 2 – капак; 3 – слой;
 4 – перфорирано дъно



Фиг. 2. Схема на отворен филтър
 1 – колона, 2 – сепаратор, 3 – слой
 4 – перфорирано дъно; 5 – дренажен слой

Затвореният филтър (фиг. 1) е херметична конструкция, изчислена за работа под налягане на протичащата през него течност. На дъното на филтъра е монтиран диск с отвори, в които са поставени капачки с прорези. Йонообменната смола се насипва върху диска. Течността преминава през прорезите отгоре надолу, зърната на йонита се задържат в колоната. В горната част на филтъра има устройство за разпределяне на обработваната течност и изнасяне на промивната течност, когато тя се подава отдолу. По такъв начин не всички зърна и не цялата повърхнина на отделните зърна участват в йонообменния процес, което води до намаляване на производителността на колоната и степента на извличане. Освен това възниква опасност от инфектиране на филтъра с микрофлора в застоините зони на слоя.

Отвореният филтър (фиг.29) няма тези недостатъци. Нативният разтвор се подава в този филтър отдолу със скорост, при която зърната се поддържат във флуидизирано състояние. При това всяко зърно на йонита се обтича от разтвора от всички страни и йонита се използва по-ефективно. Горната разширена част на колоната е предназначена за утаяване на дребните частици под действието на силата на тежестта.

През запълнената с йонит с колона непрекъснато с определена скорост се подава нативен разтвор. Извършва се постепенно насищане на йонита с биологично активно вещество. В процеса на насищане на йонита концентрацията на напускащото вещество на изхода на разтвора става по-висока от допустимата. Тогава разтворът се изпраща за допълнителна сорбция в друга колона. Когато и тази колона се насити се включва трета колона и т.н. По такъв начин сорбцията на продукта се осъществява от батерия от последователно свързани филтри.

След изключване на дадена колона от батерията се провеждат следните технологични операции: изместване на запълващата колона нативен разтвор с обезсолена вода; дезинфекция на йонита с формалин; елюиране и регенериране на йонита. Елюатът се подава за концентриране и пречистване.

Както в затворените, така и в отворените филтри една от взаимодействащите фази (течната) се пропуска непрекъснато през апарата, а изменението на другата фаза протича в условията на периодичен процес. Голям технологичен ефект се получава при провеждане на йонообменния процес по непрекъснат метод – с разделяне на апарата на зони за сорбция, промиване, елюиране, регенерация при противотоково движение на течността и йонита във всяка зона.

Йонообменният метод намира приложение за изолиране на аминокликозидни антибиотици, като стрептомицин, гентамицин и др.

В комплексните технологични схеми за получаване на високопречистени биопродукти в производствени условия, посочените методи обикновено се прилагат в комбинация.

Витамините са клас есенциални съединения с разнообразна химична природа (ароматни, хидроароматни, алифатни, хетероциклени и др.), които проявяват биологична активност *in vivo*. От откритите и изучени 13 витамина, 4 са мастно разтворими – витамин А (ретинол), витамин D (холекалциферол), витамин Е (α -токоферол) и витамин К (филохинон). Останалите витамини – С (аскорбинова киселина), В₁ (тиамин), В₂ (рибофлавин), В₃ (ниацин), В₅ (пантотенова киселина), В₆ (пиридоксин), В₁₂ (цианкобаламин), F (фолиева киселина), Н (биотин) и РР (ниацин) са водоразтворими. Разбира се тази класификация до известна степен е относителна, защото съвременната фармацевтична наука и практика предлагат и мастноразтворими витамини във водоразтворима форма. От гледна точка на биологичната им активност, витамините могат да се категоризират, като такива с антиоксидантна (витамини А, Е и С), с коензимна (група В и Н), с регулаторна активност (D, Е, С) и др. Задълбочените физиолого-биохимични проучвания върху значението и функциите на витамините в живите организми и положителното им влияние върху здравето на човека и животните, разшири пазарните потребности от витаминни препарати. Това сериозно повлия върху разработването на технологии за получаване на витамини от различни природни източници, като животински органи, растения и микроорганизми. За задоволяване на тези нужди една голяма част от витамините се получават чрез химичен синтез независимо, че са разработени и биотехнологични методи за това. Например регистрирани са патенти за микробиологично производство на тиамин, рибофлавин, биотин, фолиева киселина, пантотенова киселина, приридоксин и цианкобаламин. Още от 1970 г. са разработени технологии за получаване на витамин А от β -каротен (провитамин А) с използване на микроорганизми. Подобни технологии са описани и за получаване на биотин (витамин Н). От витамините само В₁₂ (цианкобаламин) се получава индустриално единствено по биотехнологичен път чрез насочен биосинтез, В₂ (рибофлавин) – чрез комбинирани химични и биотехнологични подходи, а витамин С – чрез биотрансформация и серия от химични превръщания. В този смисъл биотехнологията на витамините е едно от основните направления на съвременната фармацевтична биотехнология.

Витамин В₁₂ представлява тъмно-червени кристали с Мм 1355,42 g/mol, много добре разтворим във вода, слабо разтворим в низши алкохоли и феноли и неразтворим в етер, ацетон, хлороформ и органични разтворители. В структурно отношение витамин В₁₂ се характеризира с най-голямата и сложно устроена молекула в сравнение с останалите витамини. Витамин В₁₂ е бионеорганично съединение с С-Ме връзка (С-Со) и принадлежи към групата на кобалкориноидите. Молекулата му се състои от две части – планарна и нуклеотидна, разположени под прав ъгъл една спрямо друга. Планарната част е представена от тетрапиролен коринов пръстен, чиито 4 ядра са координационно свързани с Со чрез N атоми. Подобно на порфирините и в молекулата на витамин В₁₂ има 4 пиролни ядра, но само 3 от тях са свързани помежду си чрез С-СН₃ или С-Н метиленова връзка (А, В и С), а пръстени А и D са свързани помежду си директно. Нуклеотидната част е представена от 5,6-диметилбензимидазол. Бензимидазолът е глюкозидно свързан с рибозо-3-фосфат, а той е свързан с пръстен А на кориновата структура чрез аминопропанол. Над планарната част на молекулата е разположен 5-тият лиганд на Со, означен с R. При R=ОН витаминът се нарича хидроксикобаламин и представлява най-лесноусвоимата форма на витамин В₁₂. При R=СН₃ – метилкобаламин, основната форма, под която витамин В₁₂ се съдържа в човешката плазма и цитозола, кофактор на ензима метионинсинтаза. При R=СН – цианкобаламин, фармакологично най-стабилната форма на витамин В₁₂. При R=5'-дезоксиаденозин – дезоксиаденозилкобаламин (коензим В₁₂), който е и най-широко разпространената форма в природата. При еукариотните организми се съдържа в митохондриите и е кофактор на ензима метилмалонилСоАмутаза. При облъчване със светлина метилкобаламинът и дезоксиаденозилкобаламинът преминават в хидроксикобаламин, който при образотка с KCN се превръща в цианкобаламин. В човешкия организъм всички форми се превръщат в дезоксиаденозилкобаламин

Методите за получаване на витамин В₁₂ могат да се разделят на три основни групи:

Изолиране от животински органи – говежди и агнешки черен дроб, бъбреци, риба, миди и др., но получаването на витамин В₁₂ от тях е икономически неизгодно и неефективно поради недостиг на суровини;

Химически синтез – включва между 70 и 100 последователни химични реакции, което също прави този начин за получаване на витамин В₁₂ икономически неизгоден;

Микробен биосинтез – единствените ефективни източници за промишлено получаване на витамин В₁₂ са микроорганизмите. Това е витамин, който се получава само и единствено по биотехнологичен път.

Поради сложната структура на кобаламина *de novo* образуване на молекулата се осъществява с участието на ензими, кодирани от над 30 различни гена. Това възлиза на около 1 % от целия бактериален геном. Съществуват два различни механизма за биосинтез на витамин В₁₂, характерни за аеробните и анаеробните микробни продуценти. Аеробният механизъм, който е по-коректно да бъде наричан кислород-зависим е изучен при *Pseudomonas denitrificans*, а анаеробният, наричан още кислород-независим, е доказан при *Propionibacterium shermanii*, *Salmonella typhimurium* и *Bacillus megaterium*.

Получаване на витамин В₁₂ от пропионовокисели бактерии. Бактериите от *p. Propionibacterium* – *P. shermanii* и *P. freudenreichii*, са микроаерофили, които се използват за получаване на витамин В₁₂ за хранителни и медицински цели. Продукцията на витамин В₁₂ при пропионовокиселите бактерии зависи най-вече от екзогенно внесения в средата предшественик 5,6-диметилбензимидазол и СоСl₂. Описани са и мутантни щамове *P. shermanii* и *P. freudenreichii*, получени чрез индуциран мутагенез с UV-лъчи, етиленимин, нитрозометилуретан и нитрозометилгуанидин, които са в състояние самостоятелно да синтезират 5,6-диметилбензимидазол. По тази технология е достигнат максимален добив около 30 – 40 mg/L в полупромишлени условия. В патенти на някои компании се съобщава за достигнат добив от 65 mg/L витамин В₁₂. Разработени са методи за получаване на витамин В₁₂ чрез използване на пропионовокисели бактерии имобилизирани в алгинатен гел. Имобилизираните клетки се култивират за 5 дни в среда богата на въглероден и азотен източник, включваща в състава си 5,6-диметилбензимидазол, Tween 80 и СоSO₄. Постигнат е добив от витамин 20 – 25 mg/L, като биокатализатора може да се използва неколкосткратно, защото запазва активността си непроменена за около 2 седмици.

Получаване на витамин В₁₂ от *P. denitrificans*. Приложение като продуценти на витамин В₁₂ са намерили щамове от вида *P. denitrificans*, които в аеробни условия в меласови хранителни среди, съдържащи бетаин, с добавка на кобалтови соли и предшественик 5,6-диметилбензимидазол продуцират над 65 mg/L витамин В₁₂. Бетаинът, който се съдържа в меласата, стимулира синтеза а ензима аланинсинтаза, който участва в образуването на δ-аминолевуланова киселина, от която започва биосинтеза на витамин В₁₂. Детайлното изясняване на кислород-зависимия механизъм на биосинтез на витамин В₁₂ при *P. denitrificans* е позволило да бъдат получени генно-инженерни щамове с продуктивност между 100 и 300 mg/L. Бланш и сътр. описват процедура за амплификация на *cobA*, *cobE* и 8 гена в *cobF-cobM* оперона на *P. denitrificans*, чрез използване на многокопийни плазмиди. По този начин са получени щамове с по няколко повтори на посочените гени, което води до 50 % увеличение в продуктивността им по отношение на витамин В₁₂. С цел да се постигне свръх експресия на *Cob* протеини са прилагани различни подходи за нарушаване на транскрипционния и транслационен контрол, като включване на силно индуцируеми промотори и др. За да се избегне субстратното инхибиране на *cobA*, кодиращ метилтрансфераза, която катализира първите реакции от биосинтеза на витамин В₁₂ е приложена хетероложна експресия на *corA* гена от *Methanobacter ivanovii*, кодиращ същия ензим, но не подлежащ на субстратно инхибиране. Чрез комбиниране на индуциран мутагенез и генно-инженерни подходи компанията Rhône-Poulenc, вече част от фармацевтичния гигант Sanofi, успява да създаде микробни продуценти, с които да осигури 80 % от световното производство на витамин В₁₂.

Чрез хетероложна експресия на гените *bluB*, *bluE* и *bluF* в щамове от вида *Rhodobacter capsulatus* се стимулира синтеза на 5,6-диметилбензимидазол в клетките, като по този начин отпада необходимостта от екзогенното му внасяне в състава на средата. По този начин е постигнато и значително повишение в тоталната продукция на витамин В₁₂.

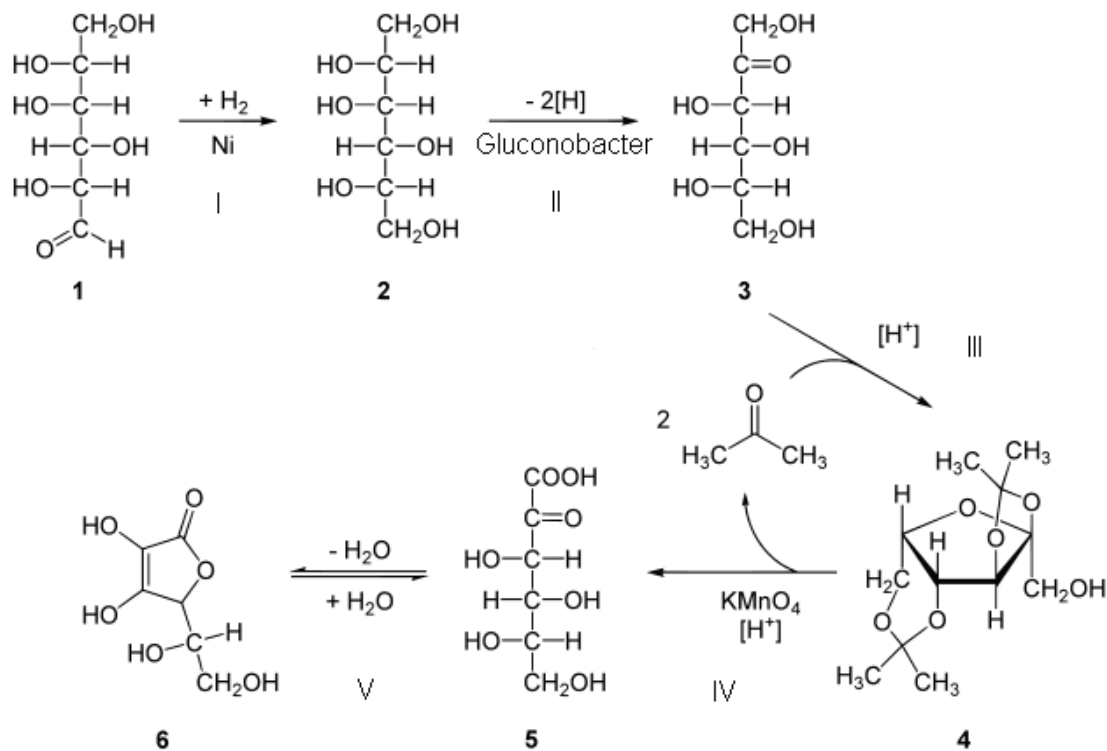
Чрез фузия на протопласти на *Protoaminobacter ruber* и *Rhodopseudomonas spheroides* са получени рекомбинанти *Rhodopseudomonas prtamicus*. При култивиране в комплексна хранителна

среда, съдържаща глюкоза, пептон, дрождев екстракт, урея CoCl_2 и соли при неутрална стойност на рН за 90 h, получените фузанти продуцират до 135 mg/mL витамин B_{12} .

Получаване на витамин B_{12} чрез насочена метанова ферментация. Процесът се осъществява чрез анаеробно култивиране на смесена култура от метаногенни бактерии *Methanobacterium*, *Methanococcus* и др. По тази технология се получават нископречистени витаминни добавки към фуража на животните.

За получаване на високопречистени кристални препарати за нуждите на медицината се налага отделяне и дезинтеграция на биомасата, защото всички описани продуценти натрупват синтезиран витамин вътреклетъчно. Технологичната схема за изолиране и пречистване на витамин B_{12} е доста сложна и включва 10 последователни етапа: I етап – Отделяне на биомасата от КТ; II етап – Лизиране на клетките чрез термична обработка при 80 – 120°C за 10 – 30 min, рН 6,5 – 8,5; III етап – Прибавяне на KCN за получаване на стабилен цианкобаламин; IV етап – Извличане на витамин B_{12} чрез йонообменна сорбция или утаяване с йони на тежки метали, рН 2,5 – 4,0; V етап – Десорбция на витамин B_{12} , рН 8,0 – 9,0; VI етап – Хроматографско пречистване с Al_2O_3 и елуиране с 50% ацетон; VII етап – Кристализация; VIII етап – Отделяне на кристалите чрез филтруване и вакуум сушене; IX етап – Прекристализация и X етап – Влагане в ГЛФ.

Витамин С е най-мащабно произвеждания витамин в света с годишна производителност около 350 000 т. Молекулата му е изградена от шест С атома два, от които C_4 и C_5 са асиметрични. Наличието на два асиметрични С атома определя възможността за съществуване на 4 различни оптични изомера, от които само L-аскорбиновата киселина проявява биологична активност. Между C_1 и C_4 има γ -лактонен пръстен, а между C_2 и C_3 – ендииолна групировка. Ключови за проявата на биологичната активност на витамин С са лактонният пръстен, ендииолната структура и L-конфигурация на хидроксилната група при C_5 . За индустриално получаване на L-аскорбинова киселина от D-глюкоза се прилагат технологии, които комбинират химични и биотехнологични етапи. Най-известният от тези синтези е разработен от Райхщайн и Грюснер и се основава на редукция на D-глюкоза. Технологичният процес включва пет последователни етапа, от които четири са химични, а един е биотрансформационен: I етап – каталитично хидриране на D-глюкоза (1) до D-сорбитол (2); II етап – биотрансформация на D-сорбитола (2) до L-сорбоза (3); III етап – получаване на 2,3,4,6-диизопропилиден -L-сорбоза (4) чрез ацетониране; IV етап – получаване на 2-кето-L-гулоновата киселина (5) и V етап – енолизация и лактонизация за получаване на L-аскорбинова киселина (6).



Фиг. 1. Синтез на Райхщайн и Грюснер за получаване на витамин С

Биотрансформацията на D-сорбитола в L-сорбоза се осъществява при дълбочинно аеробно култивиране на *Gluconobacter suboxydans*, като хранителната среда се инокулира с посевен материал в количество 10 – 15% (v/v). Процесът на микробна биотрансформация продължава 15 – 18 h, при което се достига степен на окисление на D-сорбитола, не по-ниска от 95%. Освен по периодичен начин, биотрансформационният процес може да се проведе по полунепрекъснат (доливен) или непрекъснат начин. Известни са промишлени процеси на превръщане на D-сорбитола в L-сорбоза с имобилизирани в ПААГ клетки на *Gluconobacter suboxydans*. В литературата са описани и други пътища за получаване на витамин С от глюкоза, които за разлика от синтеза на Райхщан и Грюснер започват с окисление на глюкозата до глюконова киселина. От тях най-известен е пътът на 2,5-дикето-D-глюконовата киселина. Той включва два основни биохимични етапа – (1) окисление на D-глюкозата през D-глюконова и 2-кето-D-глюконова киселина до 2,5-дикето-D-глюконовата киселина и (2) – редукция на 2,5-дикето-D-глюконовата киселина до 2-кето-L-гулонова киселина. Първият етап на процеса се осъществява с мутантни щамове от род *Erwinia* в среда, съдържаща глюкоза, царевичен екстракт и соли. Вторият етап се осъществява с мутантен щам от род *Corynebacterium* в среда, съдържаща глюкоза, царевичен екстракт, соли, тиамин и калциев пантотенат. Това е и икономически най-ефективният метод за получаване на витамин С. С цел да се избегне двустъпалния характер на процеса са конструирани щамове от вида *Erwinia herbicola*, в които успешно е експресиран ген от *Corynebacterium sp.*, кодиращ синтеза на 2,5-дикето-D-глюконат редуктаза. Това позволява процесът, да се провежда като едностъпален.

Витамин В₂ представлява жълто прахообразно вещество с Мм 376,36 mol/g. Витаминът не се разтваря много добре във вода, по-слабо се разтваря в етанол и е неразтворим в етер и хлороформ. Стабилен е в разтвори на силни минерални киселини и при загряване, но в алкална среда и при облъчване със светлина е нестабилен. В алкална среда от молекулата на витамина се отцепва карбамид и се образува биологично неактивната хиноксалинова киселина, а при облъчване със светлина витаминът преминава в биологично неактивното съединение лумихром. Стабилен е при нагряване до 280 – 290°C. Витамин В₂ (7,8-диметил-9-(1-D-рибитил)-изоалоксазин) представлява кондензирана система от едно бензолно ядро, едно пиразиново ядро с два хетероатома и едно пиримидиново ядро. Най-характерно за молекулата на витамина е наличието на изоалоксазинова структура от две спрегнати двойни връзки. В ароматното ядро има заместители -СН₃ групи, а на 9 позиция в пиразиновото е свързана D-рибоза. Установено е, че в природата витаминът се среща най-вече под формата на коензимите FMN и FAD.

Индустриално витамин В₂ се получава по три основни метода:

- Пълен химически синтез – 20% от световното производство
- Комбиниран синтез, включващ биосинтетичен и химичен синтез – над 50 % от световното производство
- Пълен микробен биосинтез – около 30% от световното производство

Пълният химичен синтез е разработен от Кун и Карер и включва използването на о-ксилен, D-рибоза и алоксан като изходни вещества. Витаминът се получава в резултат на 13 последователни химични реакции, които протичат при висока температура (115 – 120°C) и високо налягане (1,5 atm). В хода на процеса се използват вредни химични вещества, като бром, живак и концентрирани киселини.

Комбинираният синтез включва два етапа – биотехнологичен и химичен:

I етап) Микробен биосинтез на рибоза от *Bacillus subtilis* или *Bacillus pumilus*

II етап) Химически синтез на рибофлавин от рибозата

През първия етап е достигнат добив на кристална D-рибоза от *Bacillus pumilus* 72,3 g/L, а от мутанти на *B.subtilis* по транскетолаза се съобщава за добив 90 – 95 g/L.

Пълният микробен биосинтез може да се осъществи от различни микроорганизми, но промишлено значимите продуценти на рибофлавин се от видовете *Eremothecium ashbyii* и *Ashbya gossipii*. При използване на продуценти *E.ashbyii* максимален добив на рибофлавин 5,3 g/L се достига на 72 – 96 h от култивирането, при 28 – 30°C, рН 6,4, α 1 – 2 m³/(m³.min⁻¹). Щамът се оказва генетично лабилен. Често се появяват нискоактивни варианти, което ограничава промишленото му приложение. При използване на *A.gossipii* максимален добив на рибофлавин 8 – 10 g/L се достига на 120 – 140 h от култивирането, при 26 – 28°C, рН 6 – 7, α 0,25 m³/(m³.min⁻¹). Високопродуктивни варианти на щама са получени чрез индуциран мутагенез с UVлъчи, етиленимин, уранилнитрат, етилметансулфонат и др. Щамовете от този вид са най-широко използваният про-

мишлен продуцент на рибофлавин. Витаминът се отлага във вътрешността и по повърхността на хифите под формата на оранжево-червени кристали.

Чрез насочен мутагенез са получени свръх-продуценти на рибофлавин от вида *B.subtilis*. На първия етап от мутагенната обработка на природни щам-продуценти на витамин В₂ са получени мутанти, устойчиви на розеофлавин (*rosR*), който е структурен аналог на рибофлавина. Тези щамове секретират в средата до 10 g/L от витамина. Чрез насочен мутагенез са индуцирани мутации в *ribC*, като по този начин е нарушена регулацията на биосинтеза рибофлавин от типа „обратна връзка“. Чрез фузиране на геномите на щамовете устойчиви на розеофлавин (*rosR*) и щамовете с мутация в *ribC* са получени активни варианти, които в синтетични хранителни среди продуцират до 100 mg/L от витамина. На втория етап от мутагенната обработка с химични мутагени са получени варианти, устойчиви на 8-азогуанин. Съединението е структурен аналог на пурина и при тези мутанти синтеза на пурины не подлежи на регулация от типа „обратна връзка“ и щамовете синтезират многократно по-високо количество GTP, а както е известно той е предшественик за синтеза на рибофлавин. При култивиране в комплексни хранителни среди, съдържащи глюкоза, захароза и дрождев екстракт, тези щамове отделят в средата до 1 g/L рибофлавин.

По пътя на генното-инженерство е създаден и продуцент от вида *B.subtilis*, устойчив на еритромицин, при който е увеличен броя на копията на *ribC*. Като вектор е използван рекомбинантен плазмид рМХ45. С този щам, култивиран в комплексни хранителни среди, е достигнат максимален добив на рибофлавин 4,5 g/L, при 39 – 41°C само за 24 h. От ркомбинантите са получени и серия мутанти ауксотрофни по аденин, които се характеризират с промени в регулацията на биосинтеза на пурины, респективно на витамин В₂. В литературата се съобщава, че в резултат на оптимизация в състава на хранителната среда и условията за култивиране на мутантните щамове *B.subtilis* е достигнат добив на рибофлавин от 20 – 25 g/L.

Рибофлавинът получен по биотехнологичен път може да се използва като добавка към фуража на животните, поради което не се подлага на изолиране и пречистване. След края на култивирането цялата КС се подкислява до рН 4,5 и се концентрира под вакуум до 30% с.в. Полученият вакуум концентрат се суши разпръсквателно.

За получаване на високопречистен кристален рибофлавин, за нуждите на хуманната и ветеринарна медицина, рН на КС се коригира до 4,5 и се загрява при 121°C за 1h. При тази обработка рибофлавинът се разтваря, а онечистванията остават неразтворени. Неразтворената (твърда) фаза се отделя чрез центрофугиране. Филтратът, който съдържа витамина, се обработва с титаниевхлорид (редуциращ агент). Редуцираният рибофлавин е слабо разтворим и пада в утайка. Отделената утайка се продухва с въздух (реоксидиране) и се разтваря в 10% HCl при 60°C. След охлаждане и неутрализация пречистеният рибофлавин кристализира. Кристалите се отделят чрез филтрация и се сушат под вакуум.

Антибиотиците (АБ) са специфични нискомолекулни продукти от жизнената дейност на различни организми или техни аналози и производни, които притежават висока физиологична активност и избирателно потискат и/или задържат развитието на определени микроорганизми (бактерии, дрожди, плесенни гъби, актиномицети и протозои) и някои злокачествени образувания. Те се отнасят към групата на вторичните метаболити, в чиито синтез вземат участие редица структурни и регулаторни гени. Пътищата на биосинтез на АБ са варианти на нормалните метаболитни процеси на биосинтез на първични метаболити в клетката. Ролята на вторичните метаболити за продуциращите ги организми не е изяснена категорично, но се счита, че те увеличават адаптивните способности на клетките. Биологичната активност на АБ се изразява в условни международни единици (IU), отнесени към 1 ml (IU/ml) или 1 mg (IU/mg) препарат. За една единица антибиотична активност се приема минималното количество антибиотик, което потиска или задържа развитието на точно определен брой клетки от стандартен щам на чувствителен микроорганизъм, наречен тест-микроорганизъм, в единица обем хранителна среда. АБ потискат развитието на чувствителните микроорганизми чрез избирателно инхибиране функциите на определени макромолекули (ензими, нуклеинови киселини и др.) или клетъчни структури (стени, мембрани и др.), необходими за нормалното протичане на жизнените процеси в клетките. Молекулата на АБ се свързва с точно определен специфичен участък от макромолекулата или клетъчната структура, наречен мишена за действие, като образува функционално неактивен комплекс. АБ се характеризират с разнообразен механизъм на действие, който зависи най-вече от химичната природа на молекула им, концентрацията на АБ, вида на чувствителния организъм и условията на средата. В химично отношение АБ са изключително разнообразна група съединения, но общото за всички тях е, че са твърди и се отнасят към групата на нискомолекулните БАВ. АБ са изолирани от различни организми – микроорганизми, лишеи, висши и низши растения, растителни и животински клетъчни култури, но промишлено значение имат само микроорганизмите. До момента в науката са открити и описани над 16000 АБ вещества, от които само около 150 се произвеждат и прилагат, което изключително много затруднява тяхната класификация. До момента липсва единен критерий за класификацията на АБ.

В зависимост от вида на продуциращите ги организми, АБ биват:

- Синтезирани от актиномицети – тетрациклин, стрептомицин, еритромицин и др.;
- Синтезирани от плесенни гъби – бензилпеницилин, цефлоспорин Ц и др.;
- Синтезирани от бактерии – бацитрацин, вискозин и др.

Най-голям брой антибиотици се синтезират от актиномицети от родовете *Streptomyces*, *Micromonospora* и *Nocardia*.

В зависимост от антимикробния спектър на действие, АБ биват:

- Антибактериални – действат срещу бактерии;
 - ✓ С тесен спектър на действие – действат само на Грам-положителни бактерии (бензилпеницилин, линкомицин, олеандомицин и др.);
 - ✓ С широк спектър на действие – действат и на Грам-положителни и на Грам-отрицателни бактерии (стрептомицин, тетрациклин, карбеницилин и др.);
- Противогъбни (антимикотици) – действат на гъбички (нистаитин, амфотерицин В);
- Антипротозойни – действат на протозои (тилозин);
- Противоракови – действат на някои злокачествени образувания (дауномицин, адриамицин).

В зависимост от типа на действие, АБ биват:

- АБ със статично действие (бактериостатично, фунгистатично, цитостатично) – само потискат развитието на чувствителните организми, без да ги убиват;
- АБ с цидно действие (бактерицидно, фунгицидно) – убиват чувствителните организми.

Какъв ще бъде типът на действие на АБ, статично или убийствено, зависи най-вече от концентрацията, в която се прилага.

В зависимост от механизма на биологично действие, АБ биват:

- Инхибитори на синтеза на клетъчна стена – бензилпеницилин, ампицилин, цефлоспориин, ванкомицин и др.;
- Инхибитори на белтъчната биосинтеза – тетрациклин, стрептомицин, еритромицин и др.;
- Инхибитори на репликацията на РНК – рифамицин, новобиоцин, канамицин и др.;
- Инхибитори на репликацията на ДНК – митомицин, рубомицин, новобиоцин и др.;
- Инхибитори на нормалната пропускливост на клетъчната мембрана – нистатин, амфотерицин В, аскозин и др.;
- Инхибитори на синтеза на пуринови и пиримидинови бази – саркомицин, аскозин;
- Инхибитори на клетъчното дишане – патулин, антимицин;
- Инхибитори на процеса окислително фосфорилиране – валиномицин, грамицидин и др.;
- АБ антимеританболити – структурни аналози на нормалните клетъчни метаболити, главно на коензими – пурамицин, ацидомицин и др.;
- АБ с имуномодулаторно действие – циклоспорин, рубомицин и др.

АБ намират огромно приложение в хуманната и ветеринарна медицина, в ХВП като консерванти, в селското стопанство и научните изследвания. Обликът на съвременната биотехнологична промишленост в България се определя над 80% от производството на антибиотици.

Биотехнологично получаване на β -лактамни антибиотици

β -лактамните АБ спадат са от класа на пептидните АБ и към тях се отнасят:

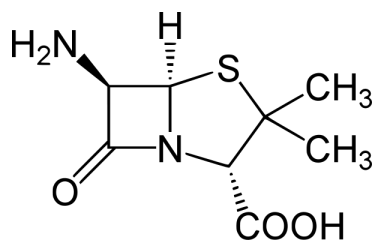
- пеницилини, цефалоспориини и цефеми – продуцират се от плесенни гъби;
- карбапенеми и цефамицини – продуцират се от представители от род *Streptomyces*;
- монобактами – продуцират се от представители от род *Nocardia*.

Общото за β -лактамните антибиотици е наличието в молекулата им на β -лактамен пръстен (цикличен амид), който е абсолютно задължителен за проява на антибиотичната им активност. Всички β -лактамни антибиотици имат еднакъв механизъм на действие, който се основава на инхибиране синтеза на пептидогликокана муреин – основен компонент на клетъчната стена на бактериите. По този начин те необратимо нарушават синтеза на клетъчната стена при бактериите и в този смисъл действието им е бактерицидно. Бета-лактамните АБ инхибират транспептидазите и D-аланин карбоксипептидазата, които катализират полимеризацията на пептидогликокановата верига. За някои пеницилини е доказано инхибиращото действие по отношение и на ендопептидази и трансглюкозилази, локализирани в плазматичната мембрана на бактериите.

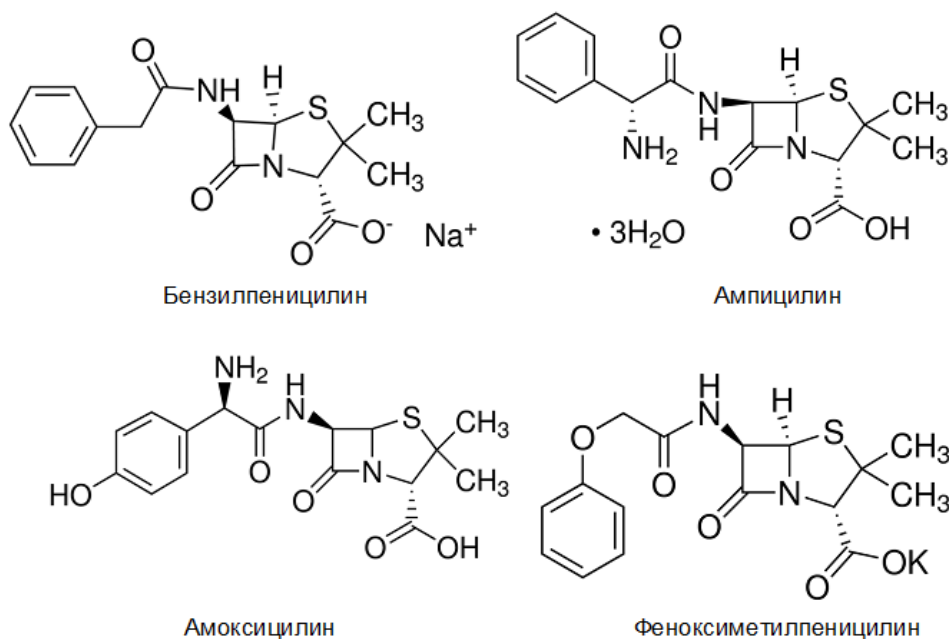
Поради относително широкия си спектър на действие, високата антимиробна активност, стабилност и ефективност β -лактамните АБ намират широко приложение в клиничната практика за лечение на голям брой бактериални инфекции, причинени от чувствителни микроорганизми.

Пеницилини

В химично отношение пеницилините представляват N-ацилни производни на 6-аминопенициланова киселина (6-АПК), която представлява бициклична кондензирана структура от β -лактамен и тиазолидинов пръстен.



Фиг. 1. Структура на 6-АПК



Фиг. 2. Структури на пеницилинови антибиотици

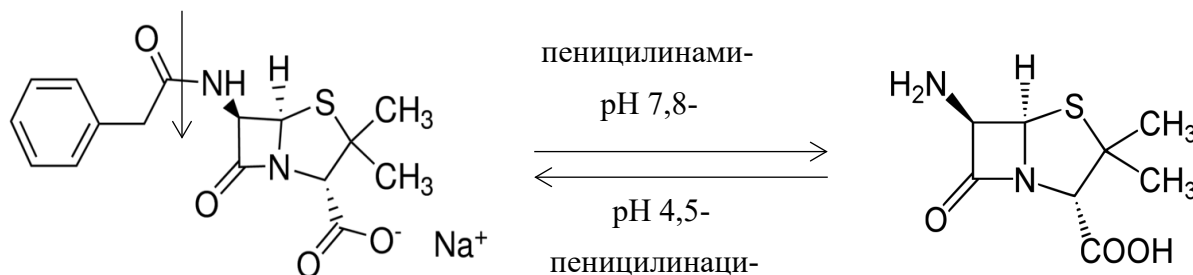
Бензилпеницилин

Бензилпеницилинът се използва като базична структура за получаване на полусинтетични пеницилини, а индустриалното производство на този антибиотик е едно от най-добре изучените и най-едромасщабните биотехнологични производства. Ежегодно по биотехнологичен път се получават около 17 000 т бензилпеницилин. Продуценти на антибиотика са щамове от видовете *Penicillium chryzogenum*, *P. turbatum*, *P. brevicompactum*, както и някои щамове от видовете *Aspergillus flavus*, *A. nidulans*, *A. flavipes*. Активността на някои производствени щамове достиг над 55 000 IU/mL културална течност или 50 g/L. Бензилпеницилинът и лизинът се синтезират по общ метаболитен път от α -кетоглутарат до α -L-аминоадипиновата киселина. Първият междинен метаболит L- α -аминоадипинил-L-цистеинил-D-валин (ACV трипептид) се образува под действието на ензима ACV синтаза. На втория етап от процеса ACV трипептида циклизира под действието на циклаза, кодирана от гена *pcbC*, и се получава изопеницилин N. Бензилпеницилинът се получава като ензима ацилтрансфераза, кодиран от гена *penDE*, прехвърля фенилоцетна киселина от фениацетилКоА към изопеницилин N и се освобождава ацетилКоА.

На принципа на обратната връзка лизинът инхибира ензима хомоцитратсинтаза, който катализира първата реакция от общия биосинтетичен път с бензилпеницилина и по този начин инхибира образуването на предшественик на антибиотика. Този негативен ефект се преодолява чрез екзогенно прибавяне на α -L-аминоадипиновата киселина във ферментационната среда. Предполага се, че бензилпеницилинът също инхибира собствения си биосинтез на принципа на обратната връзка. Глюкозата е катаболитен репресор на биосинтеза на бензилпеницилин и за да се избегне нейния ефект във ферментационната среда, като въглероден източник се използва лактоза.

Бензилпеницилинът се получава чрез тристепенно дълбочинно аеробно култивиране на високопродуктивни щамове от вида *P. chryzogenum*. Посевната и ферментационната среда съдържат по два вида въглеродни източници с различна степен на усвояемост – глюкоза и лактоза. Посевната среда съдържа по-високо количество лесноусвоим въглероден източник глюкоза, която да обезпечи интензивното развитие на културата, а ферментационната среда съдържа основно по-трудно усвоим въглероден източник лактоза и минимални количества глюкоза. Целта е глюкозата да се изконсумира по време на трофофазата и културата бързо да премине към биосинтетичната идиофаза. За насочен биосинтез на бензилпеницилин и минимална продукция на съпътстващи пеницилини в състава на културалната среда задължително трябва да присъства и предшественик ФОК. ФОК се подава на малки порции, защото в количество над 0,2% тя е токсична за микробните клетки. Интензивността на аерацията по време на култивирането трябва да

бъде съобразена със степента на концентрираност на ХС. С цел да се увеличи продължителността на продуктивната идиофаза се прибегва до подаване на свежи порции ХС, т.е. процесът се реализира като периодичен с подхранване. Както отбелязахме бензилпеницилинът се използва като суровина за получаване на полусинтетични пеницилини, които имат по-широк антимикробен спектър на действие. Антибиотикът се подлага на хидролиза за получаване на 6-АПК, която е базичната структура, от която се получават полусинтетичните производни. Дълго време за тази цел е прилаган химичен метод, но в момента основният начин за получаване на 6-АПК е ензимната хидролиза на бензилпеницилин с пеницилинамидаза.



Фиг. 3. Ензимна трансформация на бензилпеницилин в 6-АПК

Ензимът пеницилинамидаза катализира хидролизата на бензилпеницилина до 6-АПК и фенолоцетна киселина при рН 7,8 – 8,1 и температура 42 – 50°C. При рН 4,5 – 5,1 ензимът катализира обратната реакция – на ацилиране на 6-АПК. Пеницилинамидазата катализира в най-висока степен трансформацията на бензилпеницилина и в по-ниска степен – на ампицилина, феноксиметилпеницилина и др. пеницилини. Ензимът се продуцира от бактерии, актиномицети и плесенни гъби, като пеницилинамидазата от различните микроорганизми се характеризира и с различна субстратна специфичност. Значение като промишлени продуценти на ензима имат бактерии от вида *E.coli*. Те са предпочитани поради това, че продуцират пеницилинамидаза с максимална субстратна специфичност спрямо бензилпеницилин, който се произвежда в най-големи количества и с най-висок добив. Щамове от вида *E.coli* са продуценти на вътреклетъчна пеницилинамидаза. Ензимната хидролиза на антибиотика до 6-АПК може да се осъществи по няколко начина – с интактни клетки, с имобилизирани клетки и с имобилизирана пеницилинамидаза.

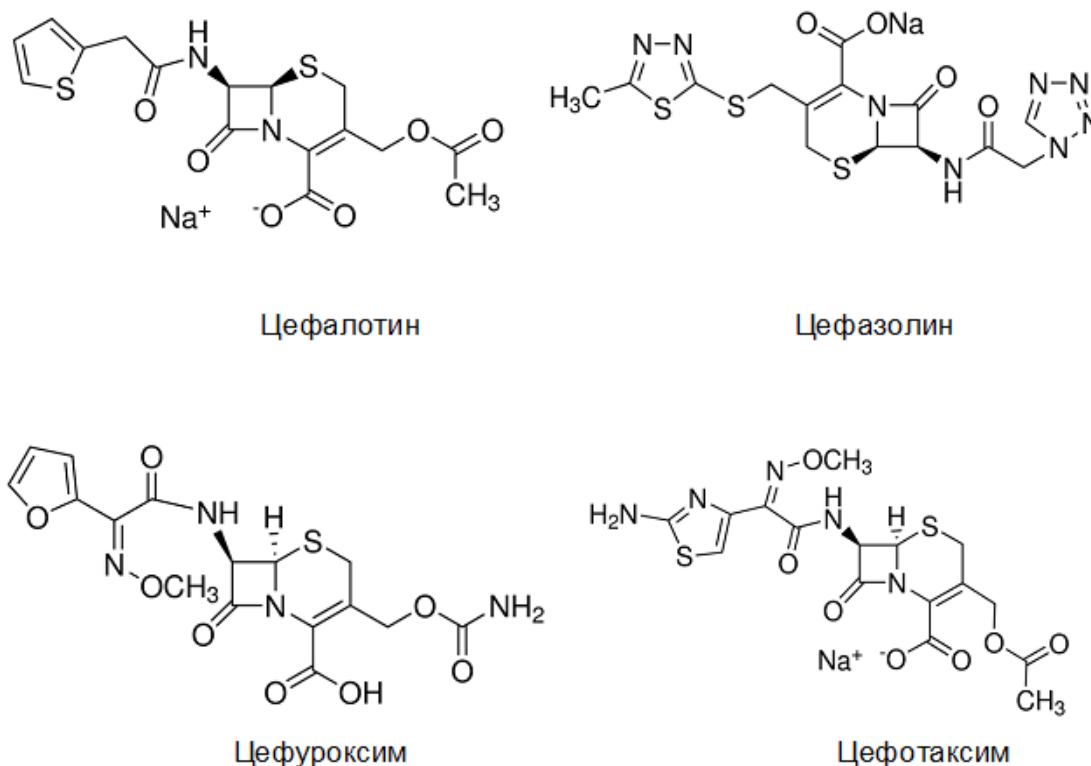
- 1) Биотрансформация с интактни клетки – като източник на ензима се използват клетки на *E.coli* с пеницилинамидазна активност, а на пазара се предлагат и препарати на база лиофилизирани клетки. Недостатък на метода е образуването на микробни протеини, които присъствайки в състава на получените антибиотици могат да предизвикат алергични реакции.
- 2) Биотрансформация с имобилизирана пеницилинамидаза – при този метод се налага клетките първо да бъдат разрушени и едва тогава да се пристъпи към изолиране, пречистване и имобилизация на ензима. Процесът на хидролиза на антибиотика се осъществява в колонни биореактори с непрекъснат режим на действие и възможности за рециркулация на хидролизната смес през колоната. По този начин се получава почти теоретичен добив на 6-АПК. На пазара се предлагат препарати на пеницилинамидаза, имобилизирана чрез ковалентно свързване със сефароза, декстран, полиметакрилатна смола или чрез включване във влакна на триацетатцелулоза.
- 3) Биотрансформация с имобилизирани клетки с пеницилинамидазна активност – процесът е аналогичен на описания в т. 2), като предимствата му се изразяват в това, че не се налага предварително изолиране на ензима от клетките. За имобилизация най-често се прилага включване на клетките в полиакриламиден гел.

Цефалоспорин С

Цефалоспорин С представлява бяло, аморфно оптически активно вещество с абсорбционен максимум при 260 nm. Сравнително устойчив е в кисела среда, но лесно се инактивира в алкална среда. Лесно се разтваря във вода и не се разтваря в органични разтворители. Продуценти на антибиотика са шамове от вида *Cephalosporium acremonium*, реидентифицирани по-късно като

Acetomionium chryzogenum. Промислените продуценти на цефалоспорин С, които понастоящем се използват в производството, са получени чрез фузия на протопласти на хаплоидни рекомбинанти с по-добра споруляция, по-интензивно развитие и продуктивност до 40 g/L културална среда. Механизмът на биосинтез на цефалоспориините е общ с механизма на биосинтез на пеницилините до изопеницилин N. Цефалоспориините са изходни метаболити за синтез на цефамицините, които се получават след метоксилиране при C₇. Биосинтезът на цефалоспориини се регулира чрез въглехидрат катаболитна репресия и новото на неорганичен фосфат в средата. Установено е също, че високите концентрации на L-лизин имат инхибиращо действие, а L-метионинът има стимулиращо действие върху биосинтеза на цефалоспориини. Цефалоспорин С се получава чрез тристепенно дълбочинно аеробно култивиране на високопродуктивни шамове от вида *A. chryzogenum*, като предферментационният етап се осъществява аналогично на този за производството на бензилпеницилин, представен на фиг. 57. Изолирането и пречистването на цефалоспорин С се осъществява съгласно схемата, представена на фиг. 59. За промишленото производство на антибиотика се използва комплексна хранителна среда, композирана от глюкоза, царевично нишесте, соев шрот, соево масло и добавка от метионин, която стимулира продукцията на антибиотика. Култивирането се провежда на два етапа, като през първия (до 90 h) температурата е по-висока (28°C) и аерацията е по-интензивна (1,2 m³/(m³.min)). През втория етап (до 140 h) температурата и аерацията се понижават, съответно на 28°C и 1 m³/(m³.min). рН се поддържа постоянно по време на целия процес на нива около 6,8 – 7,0, защото по този начин се предотвратява образуването на деацетилцефалоспорин С.

Цефалоспорин С не се прилага в клиничната практика, а се използва за получаване на полусинтетични цефалоспориини от I, II и III поколение и цефамицини, по-известните от които са цефалотин, цефалексин, цефазолин, цефамандол, цефуроксим, цефотаксим и др.



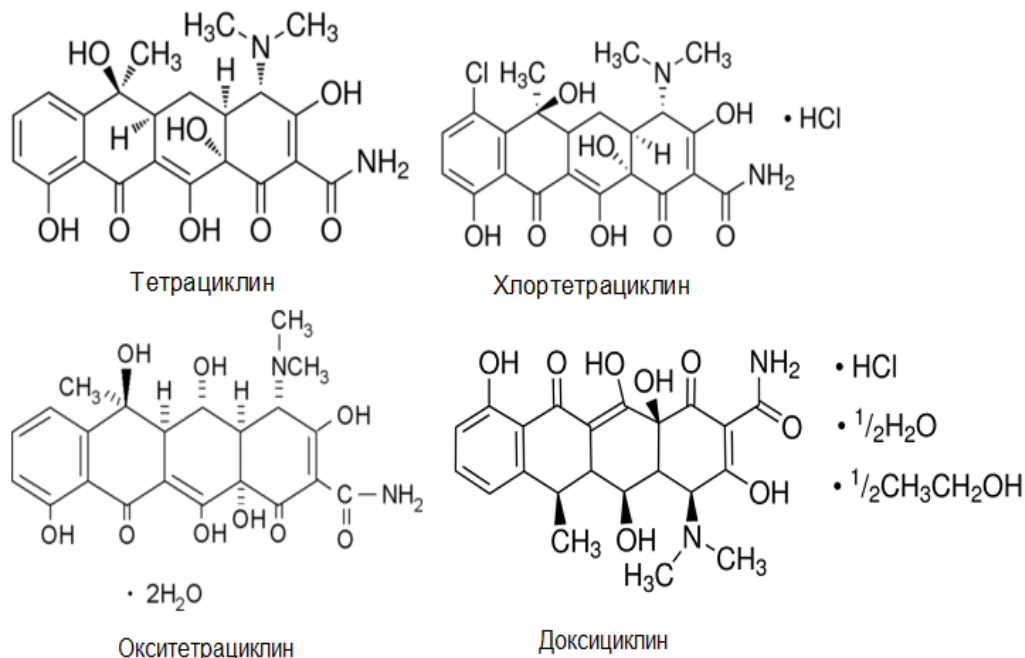
Фиг. 4. Структури на цефалоспориини от II и III поколение

За получаване на 7-аминоцефалоспоронова киселина (7-АЦК) от цефалоспорин С, респективно полусинтетични цефалоспориини дълго време е прилагана основно киселинна хидролиза. Поради използването на вредни за околната среда и токсични за здравето органични разтворители, този метод отстъпва място на ензимната хидролиза. За целта се използват два ензима – D-аминоацил оксидаза и глутарил амидаза. Първият ензим катализира окислителното дезаминиране на страничната верига на цефалоспорин С с образуване на кетокиселина, която се декарбоксилира до глутарилова

странична верига. Ензимът се продуцира от дрожди *Trigonopsis variabilis*. Вторият ензим е открит в щамове *Pseudomonas sp.* и директно откъсва глутарилната странична верига с образуване на 7-АЦК. Двата ензима се получават от рекомбинантни щамове и се прилагат в индустриални условия в имобилизиран вид за биотрансформация на цефалоспорин С в 7-АЦК.

Тетрациклини

Тетрациклините представляват голяма група субституирани полиокси поликарбонилни съединения с октахидронафтаценова структура, които заедно с антрациклините и бензохиноните се отнасят към класа на хионовите антибиотици. Към тази група се отнасят голям брой бисинтетични и полусинтетични антибиотици, които съдържат еднаква система от четири кондензирани ядра. Различават се помежду си по вида на заместителите.



Фиг. 1. Структури на тетрациклинови антибиотици

Тетрациклините са жълти, кристални, оптически активни вещества, които са неустойчиви под действието на окислителите и кислорода на въздуха. В химично отношение се отнасят като амфотерни съединения и образуват соли с киселини и неразтворими комплекси с двувалентни или поливалентни метали. Най-важните им соли са хидрохлоридите, които са водоразтворими. Тетрациклиновите антибиотици проявяват широкоспектърно бактериостатично действие и са активни спрямо коки, спирохети, рикетсии, хламидии и амеби. Не са активни спрямо бактерии от род *Proteus* и вида *Pseudomonas aeruginosa*. Механизмът на антимикробното им действие се основава на инхибиране на белтъчната биосинтеза при бактериите. Тези антибиотици преминават през OmpF и OmpC пориновите канали и под формата на положително заредени координационни комплекси с йони на двувалентни метали проникват и се натрупват в периплазматичното пространство на клетките. Там комплексите между антибиотика и металните йони се дисоциират и под формата на незаредени слабо лиофилни молекули тетрациклините свободно дифундират през липидния бислой и постъпват в цитоплазмата на клетките. В цитоплазмата настъпва хелатиране на антибиотика с двувалентни метални йони. Счита се, че точно под формата на комплекс с Mg^{2+} тетрациклините се свързват с акцепторния сайт на 30S субчастицата на рибозомата. Съществуват доказателства, че в процеса участва специален протеин S7, а мястото на свързване на антибиотика с рибозомалната субчастица става в участъка, в който се формира от базите G693, A892, U1052, C1045, G1300 и G1338. По този начин тетрациклините възпрепятстват свързването на аминоксил-тРНК комплекс с рибозомата. Установено е още, че тетрациклините инхибират металоензими, като аминоксил-тРНК-синтетаза, като образуват хелатни комплекси с двувалентните метали (Mg^{2+}), намиращи се в активния център на тези ензими. Вероятно по този начин те

пречат и на образуването на аминоксил-тРНК комплекси. Механизмът на биосинтез на тетрациклините е изключително сложен и е установена строга корелация с катаболизма на въглехидратите. Високопродуктивните щамове на тетрациклинови антибиотици се характеризират с ниска скорост на гликолиза, а слабоактивните – с висока. Прибавянето на инхибитори на гликолизата като бензилтиоцианат в количество 0,5 – 3,0 $\mu\text{g/mL}$ води до 50% повишение на добива. Друг основен регулатор на биосинтеза е неорганичният фосфат. Високите концентрации на неорганичен фосфор инхибират ензима глюкозо-6-фосфатдехидрогеназа, който превключва субстратите и енергията от гликолитичната верига към хексозомонофосфатния път. По този начин катаболизъмът на въглехидратите се осъществява основно по пътя на Ембден-Майерхоф-Парнас и продукцията на тетрациклини е незначителна. Обратно – при ниски концентрации на неорганичен фосфор ензимът се активира и блокира гликолитичната верига, като по този начин катаболизъмът на въглехидратите се осъществява по хексозомнофосфатния път и продукцията на тетрациклини е висока. По биотехнологичен път се получават тетрациклин, хлортетрациклин, окситетрациклин, както и полисинтетичните доксициклин и метациклин, които се получават чрез химична модификация на молекулата на окситетрациклина. От различни авторски колективи са изолирани голям брой щамове – продуценти на тетрациклини, отнасящи се към различни видове от род *Streptomyces*. Описани са шам-продуценти на хлортетрациклин и тетрациклин от видовете: *S. aureofaciens*, *S. sayamaensis*, *S. viridifaciens*, *S. feofaciens*, *S. psammoticus*, *S. lusitanus* и редица неидентифицирани *Streptomyces sp.*, а на окситетрациклин – от видовете *S. rimosus*, *S. platensis*, *S. gilvus*, *S. pseudodolysogenicus* и др. С развитието на молекулярните методи за полифазна таксономична идентификация и въз основа на антигенния строеж на щамовете е установено, че болшинството от продуцентите на хлортетрациклин и тетрациклин се отнасят към вида *S. aureofaciens*, а на окситетрациклин – към вида *S. rimosus*. За повишаване продуктивността на щамовете *S. aureofaciens* и *S. rimosus* е прилагана и генетична рекомбинация *in vitro*, но не са получени хибриди с индустриално значение. Чрез трансдукция с подходящи фаги са изолирани щамове с повишена антибиотична продуктивност, които също не са намерили промишлено приложение. Най-подходящи за производството се оказват щамовете *S. aureofaciens* и *S. rimosus* с повишена устойчивост към продуцираните антибиотици, скринирани чрез многократно препосояване на синтетични хранителни среди, съдържащи нарастваща концентрация от съответния антибиотик. Биосинтетичните тетрациклинови антибиотици се получават чрез тристепенно дълбочинно аеробно култивиране в комплексни хранителни среди. В състава на средите като въглероден източник се влагат глицерол, нишесте, растителни масла и липиди, а за получаване на окситетрациклин – малтоза и млечна киселина. От комплексните източници на азот широко приложение намират соевото брашно, соевият, памучният и фъстъченият шрот, царевичен и дрождев екстракт. Дозирането на царевичния екстракт трябва да бъде съобразено със съдържанието на неорганичен фосфат в екстракта, така че фосфорът да бъде в субоптимална концентрация в средата. Посевната и биосинтетичната среда се характеризират с еднакъв качествен състав и се различават само по количественото съдържание на отделните компоненти. Посевната среда е по-слабо концентрирана от биосинтетичната. При производството на хлортетрациклин и тетрациклин в средата се влагат бензилтиоцианат и D-метионин, които увеличават добива от антибиотиците. При производството на тетрациклин задължително се прибавят и инхибитори на реакцията на халогениране като йодиди, тиоцианати и бромиди. Конструирани са обаче и мутантни щамове *S. aureofaciens*, които са с блокирана реакция на халогениране, и продукцията на антибиотика не зависи от наличието на хлориди в средата. Култивирането на продуцентите на хлортетрациклин, тетрациклин и окситетрациклин се осъществява при температура около 28°C, при постоянна стойност на рН около 5,5 – 6,5, степен на аерация около 0,8 $\text{m}^3/(\text{m}^3 \cdot \text{min}^{-1})$. За инокулация на биосинтетичната среда в работния биореактор се използват 10 – 20% (v/v) вегетативен посевен материал. Количеството, възрастта и физиологичното състояние на посевния материал оказват влияние върху ефективността на производствения процес. Краят на стадия култивиране трябва да бъде преди да настъпи фазата на автолиз. Култивирането при производството на хлортетрациклин и тетрациклин е с продължителност около 96 h, а при производството на окситетрациклин – 120 h. За да се увеличи продължителността на продуктивната фаза, в някои случаи след определен момент се прилага подхранване на културата със свежи порции стерилна хранителна среда. Изолирането и пречистването на тетрациклините обикновено започва с предварителна обработка на средата с цел привеждане на антибиотиците в разтворено състояние. От културалната течност тетрацик-

лините могат да се изолират чрез екстракция, йонообменна сорбция и утаяване под формата на комплексни соли с дву- и поливалентни метали при алкални стойности на рН, в присъствие на кватернерни амониеви съединения или в изоелектрична точка 4,0 – 4,5. Екстракционният и йонообменният метод се характеризират с по-висока селективност и паралелно с изолирането може да се постигне и концентриране на антибиотика. Утаяването в изоелектрична точка е по-бързо от утаяването под формата на неразтворими комплексни соли, но е приложимо при по-високи концентрации на антибиотика в културалната течност. Технологичните схеми, основаващи се на утаяване на тетрациклините под формата на соли с алкални метали и следващото им разтваряне под действието на органични или минерални киселини, са по-продължителни и се създават условия за нежелана епимеризация.

Аминогликозидни антибиотици

Всички аминогликозидни антибиотици съдържат в молекулата си цикличен многоатомен aminoalkohol (аминициклитол), който е глюкозидно свързан с аминокзахарен остатък. В зависимост от вида на аминоклихтола аминогликозидните антибиотици се разделят на: производни на стрептамина (стрептомицин), производни на 2-десоксистрептамина (гентамицин, тобрамицин), производни на актинамина (спектиномицин) и др. От аминогликозидните антибиотици по-широко приложение намират биосинтетичните антибиотици стрептомицин, гентамицин, тобрамицин, апрамицин, канамицин и някои техни полусинтетични производни като амикацин. Всички те имат основни свойства, добре се разтварят във вода и не се разтварят в липиди. Проявяват широк антимикробен спектър на действие, а бактерицидният им ефект се дължи на инхибиране на белтъчната биосинтеза на етап елонгация на полипептидната верига. Аминогликозидните антибиотици се асоциират с клетъчната повърхност чрез йонни връзки и дифундират през клетъчната стена в периплазматичното пространство, като процесът е по посока на концентрационния градиент, т.е. протича без разход на енергия. Антибиотикът преодолява цитоплазмената мембрана чрез електротранспортната система и навлиза в цитоплазмата (енергозависима фаза I). В цитоплазмата аминогликозидите се свързват към 30S рибозомната субчастица при нуклеотиди 911 – 915 от 16S рРНК в участък, известен като „регион на точността“. Необратимото свързване на антибиотика с 30S субчастицата в региона на точността води до синтеза на аномален инициращ комплекс, като фиксира 30S/50S рибозомния комплекс към стартовия кодон на иРНК. Това блокира нормалната трансляция на иРНК, индуцира преждевременна терминация на белтъчната биосинтеза и образуването на аномални функционално неактивни късоверижни белтъци. Тези функционално неактивни белтъци се включват в клетъчната мембрана и необратимо нарушават пермеабилитета ѝ. Това благоприятства за по-лесното навлизане на нови порции от антибиотика в клетката и по този начин се засилва бактерицидният ефект на аминогликозидите. Недостатък на аминогликозидните антибиотици е бързата проява на резистентност и високата им ото- и нефротоксичност. Това ограничава приложението на класическите аминогликозиди до резервни антибиотици в терапията на инфекциозните заболявания, причинени от чувствителни микроорганизми, но са получени и полусинтетични аминогликозиди с понижена токсичност.

Стрептомицинът (N-метил- α , L-глюкозамидо- β ,L-стрептозидострептидин) съдържа голям брой –ОН групи в молекулата си, което обуславя добрата му разтворимост във вода. Антибиотикът не се разтваря в метанол, етанол, етер и хлороформ. Индустриални продуценти на антибиотика са щамове от видовете *Streptomyces griseus*, *S. bikiniensis*, *S. raneus*, *S. humidus* и др. Приложение като промишлени продуценти на антибиотика са намерили щамове *S. griseus*, с които е постигнат добив около 15 g/L културална среда. Стрептомицинът се получава чрез тристепенно дълбочинно аеробно култивиране на високопродуктивни щамове *S. griseus* в комплексни хранителни среди. и производствени условия, в инокулатор и междинен биореактор. В състава на биосинтетичните среди интегрираща роля имат въглехидратите, които, освен като въглеродни и енергийни източници, служат и като градивен материал за образуване на тризахаридната молекула на антибиотика. Като въглеродни източници се използват глюкоза, малтоза, но най-вече нишесте и декстрини, защото щамовете проявяват висока амилолитична активност. От комплексните органични източници на азот се използва соево и рибно брашно, царевичен екстракт и слънчогледов шрот, а от неорганичните – амониеви соли и карбамид. Важно условие за успешното провеждане на производствения процес е да се знае, че оптималната рН стойност за разви-

тие на производствената култура е 6,8 – 7,2, а за синтез на стрептомицина – 7,8 – 8,5. Поради това по време на трофофазата в работния биореактор се поддържа стойност на рН, оптимална за развитие на културата, а през идиофазата – стойност на рН, оптимална за синтез на антибиотика. Градиентът на рН се постига чрез автоматично регулиране и подаване на киселина или основа. Подобно на повечето аминокликозидни антибиотици, стрептомицинът се изолира от културалната течност чрез йонообменна сорбция. В производствени условия процесът се осъществява в батерия от последователно свързани йонообменни колони. При насищане на първата колона разтворът се подава за адсорбция към втората колона, а в първата започва процес на десорбция. Паралелното осъществяване на адсорбцията и десорбцията на антибиотика увеличава ефективността на производствения процес. Скоростта на десорбция е около 10 пъти по-ниска от скоростта на адсорбция, което гарантира и възможно най-пълното елуиране на стрептомицина.

Гентамицините представляват тризахариди, производни на 2-дезоксистрептамина, който е глюкозидно свързан с гарозамин и пурпурозамин. Проявява сходни химични свойства със стрептомицина. Притежава основен характер и си взаимодейства с киселини, като образува стабилни соли. Най-широко приложение намира гентамицинсулфатът, който представлява бяло, кристално, оптично активно вещество с много добра разтворимост във вода и практически не се разтваря в метанол, етанол и ацетон. Изолирани и описани са продуценти на гентамицини от видовете *Micromonospora purpurea*, *M. echinospora* и някои неидентифицирани *Micromonospora* sp., но промишлено приложение са намерили главно щамове от вида *M. purpurea*. Технологията за получаването му е аналогична на тази за производство на стрептомицин, като технологичните операции до следферментационния етап са еднакви. Различията касаят главно схемата за изолиране и пречистване.

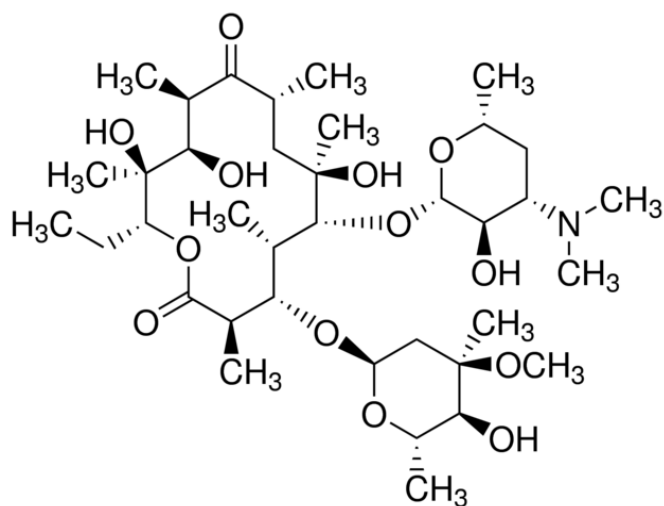
От групата на аминокликозидните антибиотици широко приложение в клиничната практика намира и *канамицинът*, който се синтезира от щамове *Streptomyces canamyceticus*. През 1972 г. чрез химична модификация на канамицин е получен полусинтетичен антибиотик *амикацин*, който проявява активност спрямо бактерии резистентни към канамицин, стрептомицин, гентамицин и др. аминокликозиди. По-късно е осъществена и успешна микробна биотрансформация на канамицин в амикацин с *Bacillus circulans*.

От групата на аминокликозидите по биотехнологичен път се произвежда и *тобрамицин*, който се продуцира от щамове от вида *Streptomyces tenebrarius*.

Макролидите представляват голям клас антибиотици, които съдържат в молекулата си алифатен макроцикличен лактонен пръстен, свързан глюкозидно със захарен или аминокзахарен остатък. По мащаба си на производство макролидните антибиотици заемат второ място след пеницилините. В зависимост от антимикуробния си спектър на действие те се разделят на две групи: антибактериални и противогъбни, като последните са наречени полиени. Макроцикличният лактонен пръстен на антибактериалните макролиди е изграден от 12 до 16 въглеродни атома, съдържа голям брой заместители – CH_3 и $-\text{OH}$ групи, глюкозидно свързан захарен остатък при C_3 и много често и аминокзахарен остатък при C_5 . В зависимост от природата на захарните остатъци макролидните антибиотици проявяват неутрален или основен характер. Антимикуробният спектър на действие на макролидите е сходен с този на пеницилините. Проявяват висока антимикуробна активност спрямо Грам-положителни и някои Грам-отрицателни бактерии. В зависимост от концентрацията действието им е бактериостатично или бактерицидно. Използват се за лечение на инфекции, причинени от: *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Pneumococcus*, *Corynebacterium*, *Legionella*, *Listeria*, *Mycobacterium*, *Helicobacter*, *Haemophilus influenzae*, *Chlamidia*, *Micoplasma* и др. Огромното практическо значение на макролидите се дължи на тяхната ефективност спрямо микроорганизми, устойчиви към пеницилини, тетрациклини и стрептомицин и поради това, че към тях много рядко се развива устойчивост. Механизмът на действието им се основава на инхибиране на белтъчната биосинтеза на етап елонгация на полипептидната верига, като образуват комплекс с 50S субчастицата на рибозомата. Макролидните антибиотици се свързват с пептидилния участък на 50S субчастицата на рибозомата и правят невъзможно преминаването на растящия аминоксил-тРНК комплекс от аминоксилния към пептидилния участък, т.е. възпрепятстват придвижването на рибозомата по дължина на иРНК. По този начин се синтезират късоверижни и функционално неактивни белтъци. От групата на антибактериалните макролиди едни най-широко произвеждани по биотехнологичен път са еритромицин, олеандомицин, авермектин и тилозин.

Еритромицинът е изграден от 16-членен макроциклически лактонен пръстен, наречен еритронолид, който е глюкозидно свързан при C_5 с аминокзахарен остатък дезозамин и с кладиноза (при еритромицин А и В) или микароза (при еритромицин С) при C_3 .

Изолирани и описани са продуценти на еритромицин от видовете *Streptomyces erythreus* (*Saccharopolyspora erythrea*), *S. griseoplanus*, *Micromonospora* sp. и *Arthrobacter* sp. Чрез насочен мутагенез с UV-лъчи, нитрозометилгуанидин и етилтансулфонат, прилагани поотделно или в комбинация, са селектирани высокопродуктивни щамове *S. erythreus* с повишена спорулираща способност, поинтензивен растеж, по-висока антибиотична продукция, поносимост на по-високи концентрации на хранителните вещества и фагоустойчивост. Селектираните мутанти са патентовани и с тях в производствени условия се достига добив от еритромицин 20 g/L културална среда. Механизмът на биосинтез на поликетидните съединения под действието на т.нар. поликетидсинтазна система (PKS). PKS функционира под формата на гигантски многоензимен комплекс, който има множество активни центрове. Биосинтезът на еритромицин се осъществява под действието на PKS, включваща три многоензимни комплекса – DEBS1, DEBS2 и DEBS3, които функционират като гигантски многоензимен комплекс с Мм около 2 MDa. Всеки от трите ензима се състои от по няколко домена, проявяващи специфична ензимна активност, отговорна за синтеза на точно определена част от преминаващата



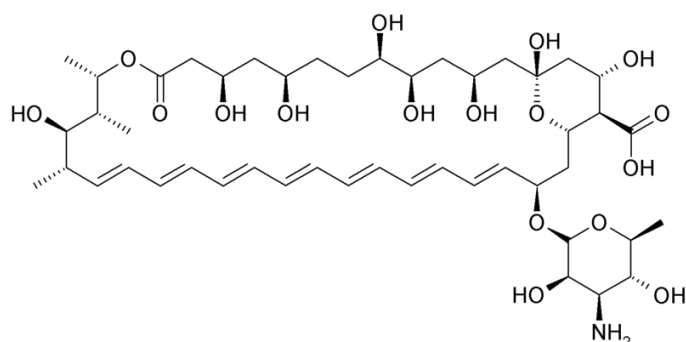
през него поликетидна верига. Растящата поликетидна верига преминава последователно през DEBS1, DEBS2 и DEBS3. Еритромицинът се получава чрез тристепенно дълбочинно аеробно култивиране на високопродуктивни щамове *S. erythreus* в комплексни хранителни среди. Целта на култивирането е да се осигурят условия, при които културата да продуцира преимуществено еритромицин А и в минимални количества еритромицин В и С, които проявяват много по-ниска биологична активност. Видът и концентрацията на въглеродните източници в средата оказват съществено влияние върху добива и компонентния състав на крайния продукт. Използват се главно глюкоза, нишесте, хидрол и царевично брашно. Биосинтезът на еритромицин зависи изцяло от наличието на предшественик в средата какъвто е пропанолът. Установено е, че синтезът на антибиотика се осъществява главно за сметка на внесеня предшественик. Пропанолът се внася в средата на порции след края на трофофазата, за да се избегне инхибиране на развитието на културата. От комплексните органични източници на азот се използва главно соево брашно, защото не е установено царевичният екстракт да стимулира антибиотичната продукция. От неорганичните източници на азот стимулиращо действие проявяват амониевите соли. Неорганичният фосфор в средата трябва да бъде в субоптимални концентрации, защото дори в количества 100 mg% предизвиква двукратно намаление на добива от еритромицин А. Щам-продуцентите на еритромицин са изключително чувствителни към металните йони в средата, които в присъствие на растителни масла и мазнини значително намаляват добива. Някои микроелементи като Co^{2+} стимулират продуктивността на културата. Продуктивността на културата зависи от степента на аерация и рН на средата, които се поддържат постоянни по време на целия процес – съответно около $1\text{ m}^3/(\text{m}^3\cdot\text{min}^{-1})$ и 6,8 – 7,0. Характерна особеност на биотехнологичното производство на еритромицин е степенният режим на температурата през различните фази от развитието на културата. Култивирането в работния биореактор по време на трофофазата – при 33 – 34°C, а по време на идиофазата – при 28 – 29°C. Следферментационният етап започва с предварителна обработка на културалната среда, която има за цел образуването на вътрешен пълнител $Ca_3(PO_4)_2$ и утаяване на белтъците чрез изсолване. След отделяне на твърдата фаза еритромицинът се изолира от културалната течност чрез екстракция. От екстракта еритромицинът може да се получи под формата на база или сол. Солите на еритромицина се използват за производство на инжекционни лекарствени форми, а еритромицин базата – за капсули и таблетки.

Тилозинът е изграден от макроцикличен лактонен пръстен, свързан глюкозидно с мициноза и дизахарида микаминозилмикароза. Антибиотикът проявява слабо алкални свойства и с винена, млечна, фосфорна, глюконова и други киселини образува водоразтворими соли. Най-голямо приложение е намерила солта на тилозина с винената киселина (тилозинтартарат). Продуценти на тилозин са щамове от видовете *Streptomyces fradiae*, *S. hygroscopicus*, *S. rimosus*, но промишлено значение има само щамове *S. fradiae*. Промислените продуценти са селектирани да синтезират преимуществено тилозин (около 80%). Първоначално изолираните продуценти синтезират около 50 µg/mL, но чрез индуциран мутагенез с различни физични и химични фактори са получени щамове с активност 5 – 6 mg/mL. Механизмът на биосинтез на макроцикличния лактонен пръстен на тилозина се подчинява на принципите на синтез на поликетидни съединения, изяснени при еритромицина. Тилозинът се получава чрез тристепенно дълбочинно аеробно култивиране на високопродуктивни щамове *S. fradiae* в комплексни хранителни среди по възприетия начин. В състава на средите се влагат най-често глюкоза, нишесте, слънчогледово и соево масло, соево, рибно и ленено брашно, пептон, казеин и смес от свободни аминокиселини. През първите 24 – 36 h температурата се поддържа около 30°C, а от 36 h до края – 33 – 34°C. рН на средата от началото на култивирането до 36 h се поддържа 6,5 – 6,6. От 36 до 44 h – 6,5 – 6,9, а след 44 h до края на процеса 140 – 160 h – 7,0. През първите часове на култивирането до 36 h аерацията е $1\text{ m}^3/(\text{m}^3\cdot\text{min}^{-1})$, след което плавно се повишава до $1,5\text{ m}^3/(\text{m}^3\cdot\text{min}^{-1})$. Целта на степенното изменение на температурата, рН и аерацията по време на култивирането е да се създадат оптимални условия за продукция на тилозин и да се потисне максимално продукцията на останалите антибиотици от комплекса. Изолирането и пречистването на тилозина става аналогично на еритромицина чрез екстракция с бутилацетат. При реекстракцията с водни разтвори на винена, фосфорна или сярна киселина при охлаждане антибиотикът се провежда от органичната във водната фаза под формата на сол, най-често тилозинтартарат. Реекстрактът се обезцветява с активен въглен и се суши разпръсквателно. Тилозинтартаратът се използва за изготвяне на инжекционни форми за ветеринарномедицински цели. Получаването на тилозин като добавка към фуража на селскостопанс-

ките животни не включва изолиране и пречистване, а директно вакуум концентриране и сушене на културалната среда.

Полиените са макролидни антибиотици с антимикотично действие и са изградени от 20- до 44-членен лактонен пръстен, който съдържа система от 2 до 8 конюгирани двойни връзки и е глюкозидно свързан с аминоксахарен остатък микозамин. При някои полиени, като кандицидина и леворина, лактонът е свързан и с ароматен амин *p*-аминоацетофенон. В зависимост от броя на двойните връзки полиеновите антибиотици биват тетраени, пентаени, хексаени, хептаени и октаени. Системата от спрегнати двойни връзки формира хидрофобната част на антибиотичната молекула, но макроцикличният лактон съдържа и множество хидроксилни групи, които формират хидрофилната част на молекулата. Наличието на аминогрупа и карбоксилна група придава на полиеновите антибиотици амофтерни свойства. Механизмът на антимикробно действие на полиеновите антибиотици се основава на образуването на стабилни комплекси между антибиотика и стеролите в състава на клетъчните мембрани на еукариотните микроорганизми. Това обяснява и липсата на антибактериална активност при полиените. Образованите комплекси формират трансмембранни канали (пори) в мембраната и променят пермеабилитета ѝ по отношение на вода и редица йони, което е свързано с нарушение на нормалните метаболитни процеси в клетките и води до тяхната смърт.

Нистатинът се отнася към групата на тетраеновите полиени и е изграден от нистатинолид, който е глюкозидно свързан с микозамин. Продукенти на нистатина са шамове от вида *Streptomyces noursei*, като синтезираният антибиотик се натрупва в мицела. Чрез индуциран мутагенез с UV-лъчи и многократно пасажирание в среди, съдържащи нистатин, са изолирани високопродуктивни шамове, които се използват при промишленото производство на антибиотика. Полиеновите антибиотици и в частност нистатина се синтезират чрез повтаряща се кондензация на късоверижни карбоксилни киселини под действието на поликетидсинтазна (PKS) ензимна система по механизъм на биосинтез, подобен на синтеза на мастни киселини. Нистатинът се получава чрез тристепенно дълбочинно аеробно култивиране по вече известния начин. В състава на хранителната среда се влагат глюкоза, хидрол, нишесте, соево брашно и растителни масла, които имат стимулиращо действие върху продуктивността на културата. Този ефект се дължи на ненаситените мастни киселини, влизащи в състава на маслата. Култивирането в работния биореактор се провежда при 28°C, рН 7,0 – 7,2 за 96 h. След края на култивирането мицелът се отделя от средата чрез филтрация под вакуум и се суши в сушилня с псевдокипящ слой. От изсушения мицел антибиотикът се изолира чрез екстракция с 2% разтвор на CaCl₂ в метанол. Екстрактът се концентрира под вакуум. След отделяне на примесите нистатинът се утаява с двоен обем студена вода при слабокисела стойност на рН. Образованата утайка от антибиотика се отделя чрез филтрация и се суши под вакуум. Пречистената антибиотична субстанция се използва за изготвяне на готови лекарствени форми с нистатин.



амфотерицин В

Освен нистатин, по биотехнологичен път се произвеждат и хептаеновите антибиотици амфотерицин В, продуциран от *S. nodosus*, и антибиотичите кандицидин и леворин, които имат идентична химична структура и се продуцират съответно от *S. griseus* и *S. levoris*. Технологиите за получаването им се основават на тристепенно дълбочинно аеробно култивиране на продуцентите и екстракция на антибиотика от мицела.

Стратегии за разработване на лекарства

Основни стратегии при разработването на лекарства са рационален дизайн; изолиране и изследване на структурата им; изследване механизма им на действие; установяване на възможности за получаване на нови производни с доказани свойства; контрол за въздействие на лекарственото вещество. Пример за рационален подход при разработване на лекарства са HIV протеазните инхибитори. Кристалната структура на HIV протеазата се използва, за да се проектират синтетични молекули, които плътно се вметват в активния център на ензима и имат важно значение при терапията на пациенти с HIV. Друга стратегия включва строг контрол за въздействие на лекарството. Изследва се всеки нов компонент чрез всички видове тестове за лекарствена активност, без значение за каква цел са предназначени и се установява въздействието на всеки нов компонент. Стратегии за повишаване на липидната разтворимост на лекарствените вещества са свързани с преминаване през клетъчните мембрани в случаи, когато целта на лекарството е локализирана вътреклетъчно. В тези случаи хидрофилно лекарствено вещество може да се приложи като пре-лекарство, в което хидрофилните групи, са „маскирани“ от по-хидрофобни или чрез нейонна дифузия, която при някои лекарствени вещества може да генерира нежелани ефекти. Например в киселинните условия на стомаха ацетилсалициловата киселина ще е протонирана и незаредена, което улеснява нейонната дифузия в клетките на стомашната мукоза. В клетките стойностите на рН са близки до неутралната стойност, което води до депротониране. Дифузията на депротонираната, заредена форма ще е много бавна и ацетилсалициловата киселина ще се натрупа в клетките до концентрации, значително по-високи от тези в стомашния лумен.

Фактори, ограничаващи молекулните маси на лекарствените вещества и целеви молекули на лекарствата

Лекарствата трябва да достигнат целите си в организма, което е свързано с преминаване през мембранни бариери чрез дифузия. Дифузията се затруднява с повишаване на молекулната маса. Повечето лекарства са химически синтезирани или модифицирани. По-големите молекули по-трудно се синтезират и добивът ще е по-нисък. По-ниската молекулна маса е свързана със специфичността на лекарствените вещества т.е. трябва да действат избирателно върху прицелните си молекули, за да бъдат клинично полезни.

Класически пример, който демонстрира какви са целите на лекарствените вещества е ренин-ангиотензиновата система (важна за регулиране на кръвното налягане) (Фиг. 1).



Фигура 1. Ренин-ангиотензиновата система (Palmer M.)

Ангиотензиногенът е плазмен белтък, който се синтезира в чернодробните клетки. От него се получава ангиотензин I чрез хидролиза от специфична протеаза ренин. Ангиотензин I е по-

слабо активен и е предшественик на ангиотензин II, който е мощен съдосвиващ агент. Превръщането на ангиотензин I в ангиотензин II става чрез хидролиза с ензима ангиотензин конвертаза (ангиотензин превръщащ ензим), който присъства в плазмата. Ангиотензин II действа на G протеинов рецептор – мембранен протеин, който се намира в мускулните клетки. Чрез каскада от биохимични реакции в клетката се предизвиква свиване на кръвоносните съдове и повишаване на кръвното налягане. Повишена активност на ренин-ангиотензиновата система се наблюдава при заболявания на бъбреците. Това е свързано с ненормално високи нива на освободен ренин, който се синтезира в бъбреците. Няколко „точки“ в ренин-ангиотензиновата система са подложени на фармакологично инхибиране. Ренинът е ензим, хидролизиращ специфична пептидна връзка в ангиотензиногеновата полипептидна верига. Инхибитор на ренина е ремикирен, който е ефективен, но има ниска бионаличност след перорален прием и има значение при провеждане на лечение за по-дълъг интервал от време. Допълнително, ремикиренът съдържа пептидни връзки, които могат да се хидролизират от протеази в храносмилателния тракт. Лекарствени вещества като еналаприл, понижаващи ангиотензиновата активност са инхибитори на ензима ангиотензин конвертаза. Тези лекарства имат важна роля при лечение на хипертония. За разлика от ремикирен, еналаприлът има по-малка молекулна маса и само една пептидна връзка, която е по-малко достъпна за протеазите от храносмилателния тракт. Тези характеристики са в корелация с по-високата бионаличност на еналаприл, спрямо ремикирен. Съдосвиващото действие на ангиотензина може да се блокира и директно в мембранный рецептор. Такъв инхибитор е саралазин, който е синтетичен пептид и е ангиотензинов антагонист. Валсартанът има ниска степен на сходство с физиологичния агонист (ангиотензин II). Прилага се перорално и е ангиотензинов рецепторен антагонист. Еналаприл и валсартан са две функционални групи лекарствени вещества, които са ензимни инхибитори и рецепторни блокери.

Лекарствените вещества са позволили характеризирането на различните класове рецептори и тяхната физиологична роля. Агонисти и антагонисти, които са по-селективни от физиологичните медиатори имат голямо практическо приложение. Като клинично значим пример за селективен рецепторен антагонист може да се разгледа H2 хистаминовия рецептор в стомаха, който участва в секрецията на солна киселина. Хистаминът се използва за получаване на аналози, които биха се свързали с рецептора, но без да го активират. Циметидин е първия клинично ефективен H2 рецепторен блокер, който се прилага при терапия на язва. Докато H2 селективните блокери запазват някои структурни сходства с хистамина, то тези сходства в структурата не са характерни за H1 блокерите, които са разработени за лечение на алергични състояния (например сenna хрема) (Фиг. 2).



Фигура 2. H1 и H2 рецепторни антагонисти (Palmer M.)

Метаболизъм на лекарствените вещества – реакции от фаза I и фаза II

Основната причина за ниската бионаличност на лекарствените вещества е метаболитното им инактивиране. Лекарствения метаболитизъм протича в черния дроб и е основен ограничаващ фактор за клиничната ефективност на лекарствените препарати. Всички перорално прилагани лекарства преминават през черния дроб преди навлизане в кръвообръщението, което може да доведе до ниски ефективни нива на съответното прицелно място. В някои случаи метаболитните

продукти са по-активни от изходното лекарствено вещество или имат токсични ефекти, които не са наблюдавани при изходното съединение. Заболявания или едновременна употреба на други лекарства могат да променят значително скоростта на метаболизма и по този начин да повлияят на бионаличността на лекарството. Това води до загуба на желаните ефекти или нежелани странични ефекти. Метаболизма на лекарствата включва реакции, разделени в две фази – реакции от фаза I и реакции от фаза II. Реакции от фаза I превръщат лекарствената молекула в по-хидрофилен метаболит, който може директно да се отдели чрез урината. Реакциите от фаза II включват реакции на свързване на по-хидрофилния метаболит към полярно съединение преди екскреция (Фиг. 3).



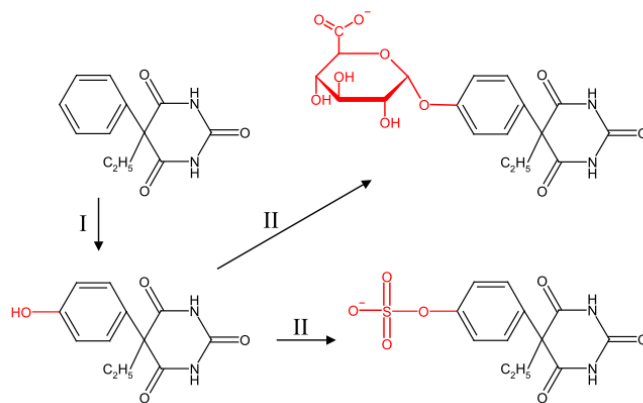
Фигура 3. Чернодробен лекарствен метаболизъм и неговата роля при отделянето на лекарствените вещества – реакции от фаза I и фаза II. (Palmer M.)

Реакциите от фаза II на свързване на лекарствените вещества са:

- свързване с глюкуронова киселина – реакциите се катализират от ензими глюкуронозил трансферази в присъствие на УДФ-глюкуронова киселина; глюкуронатът най-често се прехвърля към хидроксилна или аминоксидна група;
- ацетилиране – катализира се от ацетилтрансферази в присъствие на ацетил-КоА; участват хидроксилна- или аминоксидна група;
- сулфатиране – катализира се от сулфотрансферази които използват 3-фосфоаденозин-5-фосфосулфат, участват основно хидроксилни групи;
- метилиране – метилтрансферазите използват S-аденозилметионин; засягат се хидроксилни-, аминоксидни- и сулфхидрилни групи.
- свързване с глутатион – особено важно е свързването на глутатиона с епоксидите, но може да участват и други групи.

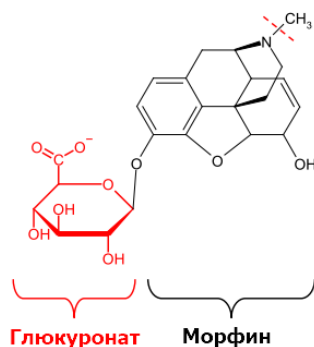
Освен посочените групи за свързване с глюкуроновата киселина, се включват още карбоксилни-, аминоксидни-, хидроксиламинни- и тиолови групи. Това е най-често срещаната реакция на лекарствено свързване. С тази реакция лекарствената молекула придобива отрицателен заряд и хидроксилни групи, които улесняват екскреция. Екскрецията може да се осъществи или чрез урината, или чрез жлъчката. Получените комплексни съединения могат да се хидролизират в дебелото черво от бактерии, способни да метаболизират глюкуронова киселина (продуцират ензима глюкуронидаза). Освободеното лекарство или метаболит може отново да се реабсорбира в червата и да достигне до черния дроб (ентеро-хепатален цикъл), което значително забавя отделянето на лекарството (Фиг. 3).

Като пример се разглежда метаболизма на фенобарбитал, който няма подходящи групи за директно свързване към полярни молекули. Първоначално протича хидроксилиране – реакция от фаза I. Хидроксилирането дава възможност за свързване към глюкуронова киселина или сулфат (фаза II). Всяка от тези модификации ще деактивира молекулата ще съдейства за екскрецията (Фиг. 4).



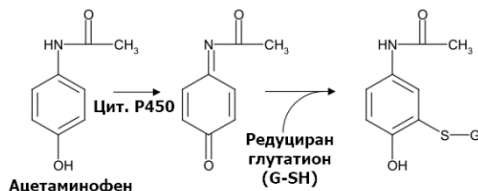
Фигура 4. Метаболизъм на фенобарбитал. (Palmer M.)

Някои лекарствени вещества не преминават през фаза I, а директно се включват в реакции от фаза II. Например морфинът не се включва в реакции от фаза I. Морфинът има две свободни хидроксилни групи към които може да се свърже глюкуронова киселина (фаза II) с участие на ензима УДФ-глюкуронозил трансфераза като се формира гликозидна връзка в полученото комплексно съединение. В допълнение към свързването с глюкуронова киселина, може да се отдели и метиловата група (деметилиране). Карбоксилната киселинна група остава свободна и допринася за хидрофилността на полученото комплексно съединение (Фиг. 5).



Фигура 5. Комплексно съединение между морфин и глюкуронова киселина (Palmer M.)

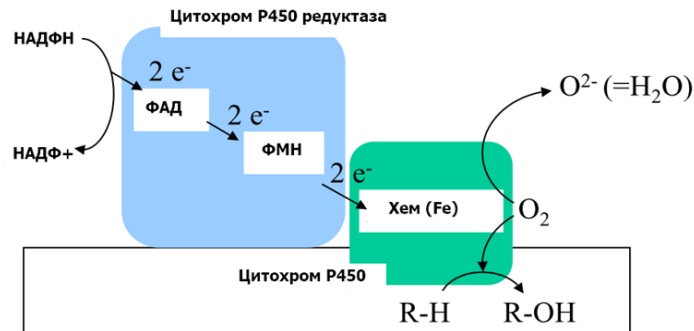
Глутатионът участва като редуктор в клетъчния метаболизъм. Поради наличие на свободна сулфхидрилна група, глутатионът е силен нуклеофил и има съществено значение за детоксикацията на епоксидите. Изчерпването на глутатиона чрез реакции на свързване с лекарствени вещества може да доведе до тежко увреждане на черния дроб. Например метаболизма на ацетаминофен включва първоначално окисление от цитохром P450 (цит. P450) и последващо свързване към редуциран глутатион (Фиг. 6).



Фигура 6. Метаболитен път за отделяне на ацетаминофен. Първоначалното окисление (от цитохром P450 ензима) е последвано от конюгация към редуциран глутатион (G-SH)

Ензими от семейството на цит. P450 участват в реакции от фаза I на лекарствения метаболизъм. В еукариотните клетки тези ензими присъстват в мембраните на ендоплазмения ретикулум, а някои от тях присъстват и в митохондриите. Цитохром P450 работи съвместно с редуктаза,

която го снабдява с електрони от НАДФН. В електронния пренос участват ФАД и ФМН. Пренасят се $2e^-$ до хема (кофактор в активния център на цитохрома). След това цитохромът ги прехвърля към един от двата кислородни атома за получаване на вода. Освободената енергия при окислението на НАДФН се използва в реакции за взаимодействие на втория кислороден атом с органичен субстрат (Фиг. 7). Тези реакции водят до формиране на хидроксилна група, както в случая с фенобарбитала.



Фигура 7. Мембранно-свързана цитохром P450 система (Palmer M.)

Ензим от семейството на цит. P450, наречен 3A4 участва в преобразуването на около 60% от лекарствените вещества. Ензимът е наличен в определени базални нива, но активността му значително се повишава от различни лекарствени вещества (фенитоин и фенобарбитал, рифампицин, кетоконазол), които са индуктори за повишен синтез на ензима.

Токсични (странични) и полезни (терапевтични) ефекти на лекарствените вещества

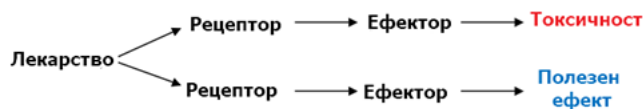
Има три случая за връзка между полезните (терапевтични) и токсични (странични) ефекти на лекарствата:

В първия случай токсичността възниква като продължение на терапевтичния ефект:



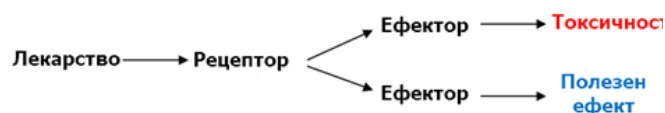
Отнася се за лекарства с нисък терапевтичен индекс (съотношението на токсичната плазмена концентрация спрямо терапевтичната плазмена концентрация). Лекарствата с нисък терапевтичен индекс изискват най-голямо внимание и бдителност по отношение на вариациите в метаболизма и отделянето. Такива вариации могат лесно да доведат до концентрация в организма, която надвишава прага на токсичност или концентрация, която е под минималното количество, необходима за терапевтичен ефект.

Във втория случай терапевтичните и токсични ефекти се задействат едновременно от различни рецептори:



В този случай е необходимо да се селектират лекарствени вещества, които избирателно да действат върху рецепторите, отговорни за терапевтичното действие.

В третия случай лекарството се свързва с един рецептор, а проявата на токсични и терапевтични ефекти се разделя в точките на крайните ефектори:



Например моноаминооксидазата участва в разграждането на адреналин, норадреналин, серотонин и хистамин. Инхибирането на ензима ще има широк обхват от ефекти. За по-добри терапевтични възможности инхибиторите на ензима са заменени с лекарствени вещества, действащи селективно върху рецепторите на различните хормони.

1. Получаване, изолиране и пречистване на ензими.

Причините, които налагат изолиране и пречистване на ензими са: 1) изучаване на тяхната специфичност към различни субстрати, кинетични параметри на катализираните реакции, възможност за регулация на действието им, изясняване на тяхната структура и механизъм на действие; 2) изолиране и пречистване в различна степен, с оглед тяхното прилагане за индустриални и медицински цели.

Общи принципи при работа с ензими

Ензимите са лабилни биомолекули, които лесно се денатурират при условия извън оптималните за тях. Процедурите на тяхното изолиране, характеризиране и прилагане се оптимизират за намаляване на инактивирането им. Въздействия с концентрирани киселини, основи, висока температура и др., разрушават често необратимо активната структура на ензимите. При процедурите на пречистване се поддържат ниски температури (+4 – 0°C). Повечето ензими се инактивират в разтвори с рН < 5 и > 9, с изключение на специфични ензими от екстремофилни организми. Довеждането до желаното рН трябва да става с разредени разтвори на буферизиращи агенти, с което се избягва локална инактивация. Органичните разтворители, в повечето случаи, денатурират ензимите, при стайна температура, освен използвани в ниска концентрация. Фракционирането на ензими, с използване на органични разтворители, като алкохоли и ацетон, трябва да се извършва при много ниска температура.

Отделянето на ензимните утайки, обикновено се провежда чрез центрофугиране с охлаждане. Когато утаяването на пречистващите ензими става с изсолващи агенти, като амониев сулфат, и различието между твърдата и течните фази по относително тегло не е голямо, се предпочита използване на филтрация – през хартиен пулп, селит, супер сел, тангенциална ултрафилтрация през мембрани с дефиниран размер на порите. Пречистващите процедури не трябва да са с продължителност повече от 2 – 3 дни, освен ако няма данни за повишена устойчивост на пречиствания ензим.

Съхраняването на ензимите в активно състояние е важен проблем. В разтвор, ензимът е най-добре да бъде дълбоко замразен (-20, -80°C). Някои ензими са стабилни в присъствие на концентрирани разтвори на соли на алкални и алкалоземни елементи. Изсушаването на ензимите при стайна температура обикновено води до инактивирането им. Разтворите им обикновено се подлагат на лиофилно изсушаване.

Общи принципи при изолиране на ензими

Трябва да се избере единица за дефиниране на ензимната активност. Тази единица зависи от избрания метод за определяне на ензимната активност. Ако методът е спектрофотометричен, за такава единица може да се посочи количество ензим, което предизвиква определено изменение в оптичната плътност за определено време, при избраните условия на опита. Концентрацията на ензима в разтвора се изразява с числото на единиците в 1 mL.

При описване на метода за пречистване на даден ензим е полезно да се състави таблица, която проследява всеки етап от пречистването, ефективността на различните методи на фракциониране, общата степен на пречистване и добив на ензима.

2. Основна биотехнологична схема за производство на ензими

Целта на производството и пречистването на ензими е да се получи максимален добив, основаващ се на процента запазена активност, в сравнение с общата активност, присъстваща в основния екстракт.

Стратегия за пречистване на ензими

Общата стратегия включва 3 важни пункта:

- 1) източник на ензима;
- 2) методи за хомогенизиране;
- 3) методи за разделяне.

Източници на ензими

Фактори, влияещи върху избора на изходен материал за получаване на ензими са:

- 1) Изобилие на ензима в дадения източник. При липса на други фактори, се подбира източник, който съдържа/произвежда ензима от интерес в най-голямо количество. Например, бъбреците са добър източник на алкална фосфатаза. Мускулите са богати на лактат дехидрогеназа. При микроорганизми, продукцията на ензими се повишава чрез генно инженеране, селекция, оптимизиране на средите за култивиране.
- 2) Достъпност на източника. Понякога, изобилен на даден ензим източник е недостъпен по екологични, географски и др. причини.

Методи за хомогенизиране

- 1) Тъкани на бозайници. Отсъстват твърди клетъчни стени, което улеснява разрушаването на повечето животински тъкани и клетки. Тъканта се нарязва на ситно или се смила, след което се обработва с хомогенизатори с тефлонови пестици или ножове, блендери. Извършва се в изотонични разтвори – 300 mM захароза, 150 mM KCl, със същото осмотични налягане като в клетките, което запазва субклетъчните органели, като лизозомите, богати на протеази, които освободени биха хидролизирани другите клетъчни ензими.
- 2) Растителен, плесенен или бактериален материал. Тези организми имат твърди клетъчни стени, което налага предварително надробяване на материала с абразиви – кварцов пясък, стъклени зърна, предварително замразяване на тъканите. Рарушаването на ригидните клетъчни стени може да стане и с обработка с ензими. Напр., третиране на Грам-(+) бактерии с лизозим; третиране на растителни тъкани с целулозолитични ензими. В някои случаи се използва ултразвук. В промишлени условия – прилагане на високо налягане в преса.

Методи за разделяне

Разделяне по размер и маса

1. *Центрофугиране.* Големи ензимни молекули се утаяват при гравитационни полета до 300 000 g, посредством ултрацентрофуги. Скоростта на утаяване на даден ензим зависи от: размер и форма на молекулата му, вискозитет на разтвора. Центрофугирането се ползва широко за отстраняване на утайки и неразтворими остатъци, в диапазон 5000 – 50000 g.

2. *Гелфилтрация.* Разделяне по маса и размер на молекули в средата на пореста хидрофилна матрица. Според размера на порите, молекулите на пробата, навлизащи в тях изминават по-голямо разстояние и се движат по-бавно през частиците на матрицата. Молекулите с размер по-голям от този на порите не навлизат в тях, заобикалят ги и се движат по-бързо през матрицата. Така става разделяне на компонентите в пробата, вкл. ензимите, които изтичат като отделни фракции. Гелфилтрацията се използва за обезсоляване на ензимни препарати, след изсолване с амониев сулфат или други соли – разделяне на високомолекулни ензими от нискомолекулни соли. Във варианта ѝ молекулно-ситова хроматография, гелфилтрацията се използва за фракциониране на смес от белтъци на съставните им фракции, изтичащи с различна скорост, според размера на белтъците в тях. Като матрици за гелфилтрация се използват сферични частици от модифицирания бактериален глюкозен полизахарид декстран – Сефадекс.

3. *Диализа и ултрафилтрация.* Диализна найлонова мембрана, с дефиниран размер на порите, се използва за преграда, задържаща пречистващите ензими, докато пропуска по концентрационния им градиент всички други вещества, съдържащи се в пречистващата проба, чиито размер им позволява преминаване през порите на мембраната. Диализата се използва основно за отстра-

няване на соли, органични разтворители и др. нискомолекулни вещества от разтвори на ензими. При ултрафилтрацията, малки молекули и йони преминават през мембрана с дефиниран размер на порите, под влияние на приложено външно налягане. Това води до концентриране на ензимния разтвор, което улеснява следващите стъпки от пречистването.

Разделяне по електричен заряд

1. *Йонообменна хроматография.* Основава се на привличане между противоположно заредени вещества. Като матрици се използват йонообменни смоли – анионообменници (положително заредени, свързващи отрицателно заредени групи); катионообменници (отрицателно заредени, свързващи положително заредени групи). Пречистваният ензим се внася в колоната при условия благоприятстващо взаимодействие между негови групи и противоположно заредени такива от йонообменника. Ензимът се свързва към сорбента, а повечето други компоненти в пробата изтичат от колоната, несвързани. Десорбцията става чрез промяна на рН, отслабващо електростатичното свързване, или чрез увеличаване на йонната сила на елуирация буфер, съдържащ най-често NaCl. Постига се >10-кратно пречистване на целевите ензими. Методът е подходящ за лабораторни и промишлени условия.

2. *Електрофореза на ензими.* Основава се на разлика в скоростите на придвижване на заредени молекули в електрично поле. Скоростта им на движение зависи от знака и размера на заряда им; от молекулната маса и формата на молекулите им. Разделянето на ензимните белтъци става в инертна матрица носител, която е пропита с електролитен буферен разтвор, чиито йони са носителите на заряда в електричното поле. При нативна електрофореза, ензимите в пробата се придвижват и разделят в порестия гел на матрицата по показатели заряд и маса. Движението на молекулите в гела е от (-) към (+) на електричното поле. При денатурираща гел-електрофореза, пробата се обработва с денатуриращи агенти натриев додецилсулфат (придава отрицателен заряд на ензимните белтъци) и редуциращ агент бета-меркаптоетанол, разкъсващ дисулфидните мостове в белтъчните молекули. Като резултат, всички белтъци в пробата се зареждат отрицателно, разпадат се на съставящите ги полипептидни вериги и се разделят през порите на гела само по молекулна маса. Пробите се нанасят в акриламидния гел за електрофореза заедно с багрило бромфенолно синьо, което позволява следене на фронта на движение на електрофорезата и времето на нейното прекратяване. В гнездо на гела се нанася и стандарт – смес от белтъци с известни молекулни маси, които позволяват определяне на молекулната маса на анализиращия ензим, наличие на примеси, полипептиден състав (при четвъртична структура). Електрофорезата има аналитична стойност, за оценка качеството на пречиствания ензим, наличие на примеси, деградация и др. След приключване на електрофорезата, геловите се подлагат на оцветяване с багрила като брилянтено синьо Кумаси, което се свързва по силно с местата в гела, където има белтъци. Последните се визуализират като сини ивици на общия по-бледо син фон на гела.

Разделяне на ензими по различия в тяхната разтворимост

Фактори, влияещи върху разтворимостта на ензимите:

- 1) рН;
- 2) йонна сила;
- 3) диелектрични свойства.

1) Стойността на рН, при която даден белтък има най-ниска разтворимост съвпада с неговата изоелектрична точка (pI) – сумата от положителните и отрицателните му заряди = 0. При тези условия, ензимните белтъци се отблъскват най-малко, агрегират и се утаяват. Ако в пробата има няколко ензима, те могат последователно да бъдат отделени по pI.

2) При високи концентрации неутрални соли (NaCl, амониев сулфат), разтворимостта на белтъците намалява, което води до утаяване на специфична ензимна фракция, а останалите ензими остават в разтвор, докато не се достигне солевата концентрация, при която те се утаяват. Това се нарича изсолване и намира приложение за лабораторно и промишлено пречистване на ензими. Най-използван изсолващ агент е амониевият сулфат, който има ниска цена, висока водоразтворимост и възможност обратимо да денатурира много ензими. Изсолващите агенти се характеризират със степен на насищане. За 100% наситен разтвор се приема този, от който са изсолени в утайка всички белтъци. Ензими да се изсолват при различни степени на насищане и това се използва за тяхното пречистване.

3) Смесващи се с водата органични разтворители (етанол, изопропанол, ацетон, диметилсулфоксид и др.) намаляват разтворимостта на повечето ензими, при което те падат в утайка.

Това е свързано с понижаване на диелектричната константа на средата и ензимите/белтъците в нея – привличането между противоположните заряди в молекулите им расте; създават се йонни двойки от агрегиращи ензимни молекули, които губят водоразтворимостта си и се утаяват.

Разделяне и пречистване на ензими по функционални свойства

Афинитетна хроматография. Вариант на адсорбционната хроматография, при който групи от материала на матрицата имат афинитет за свързване с пречиствания ензим. Тези групи се наричат лиганди. След свързването, придружаващите вещества се отмиват с буфер, а свързаният към лигандите ензим се отделя, чрез промяна на физико-химични показатели, като рН и йонна сила на промиващия буфер. Афинитетната хроматография е единствената хроматографска техника, чрез която в определени случаи, даден ензим може да се пречисти до хомогенно състояние в единствена стъпка.

Стационарната фаза за афинитетна хроматография се излива в колона, през която се пропуска пробата и буферите на мобилната фаза. Матрицата на стационарната фаза, към която са свързани лигандите, трябва да: а) има химическа и физическа устойчивост при условията на разделянето; б) има добри филтуващи свойства; в) няма неспецифична адсорбция на компоненти на пробата. Пример за матрица: Сефароза 4В – модифициран съполимер на сефадекс и агароза. Пример за приложение: пречистване на плазминоген от кръвна плазма; матрица – Сефароза 4В; лиганд – лизинови остатъци, ковалентно свързани с матрицата; добив – 75 – 100%, в една стъпка.

Избор на методи за пречистване на ензими

Основни фактори, обославящи избора: 1) За какви цели ще използва ензимът? Това определя мащабът на производство и степен на пречистване, които ще се търсят за прилагане. 2) Колко време ще отнема времето за производство и пречистване. 3) Цена, наличие и специфика на експлоатация на апаратурата, с която ще се провежда производството и пречистването на дадения ензим.

3. Основна схема за получаване на ензими от растителни източници.

Растителните тъкани съдържат голям брой протеини, в това число ензими, като са необходими специфични условия за тяхното екстрахиране и последващо пречистване. Поради това, не е налична обща методика за извличане на всички растителни протеини.

Мащабът на екстракцията трябва да се планира предварително, за да се съобрази с наличното лабораторно оборудване. За дезинтегриране на големи количества растителен материал, може да е необходим политрон или друго сходно оборудване, докато за малки количества тъкани и стандартен хомогенизатор или просто хапан с пестик биха били достатъчни. Първият проблем, който трябва да се преодолее е разрушаването на целулозните клетъчни стени. Разрушаването може да се постигне с кварцов пясък, добавен заедно е екстрахиращия буфер, последвано от стриване в хапан с пестик; чрез използване на течен азот, за бърза замразяване на материала, преди смилане с блендер.

Вторият проблем е свързан с наличието на специфични компоненти, които могат да деградират на целевите ензими. Към тези компоненти се отнасят фенолни съединения, гликозиди, протеази. Тези проблеми могат да бъдат частично намалени, чрез подбор на тъкани за екстракция (напр. тъкани от млади растения, вместо от стари); избор на подходящи растителни видове. Тъй като голяма част от растителните протеази са от серинов тип, се препоръчва внасянето на протеазния инхибитори в екстракционния буфер.

При растенията, повечето ензими са представени в много малки количества и в комплекс с други протеини. Изключение са някои органи със запасна функция – семена, корени, грудки. Те са сред най-широко изучаваните компоненти с растителен произход, поради тяхната достъпност, лекота на пречистване и тяхната икономическа и хранителна важност.

Един пример за значителен успех представлява екстракцията от растителни тъкани на рибулозо 1,5-бифосфат карбоксилаза/оксигеназа (рубиско) (Е.С. 4.1.39). Рубиско е хексадекамерен ензим с молекулно тегло 500 kDa. Много често представлява повече от 50% от тоталното количество протеин в хлоропластите и е най-разпространеният протеин в растенията.

Растителната тъкан не е най-подходящ изходен материал, от който да бъдат изолирани интактни и функционални клетъчни органели. Листата често са покрити с восъчни кутикули, някои

от тях съдържат кремъчни вещества, както и токсични компоненти, като феноли, протеолитични ензими и високи концентрации органични киселини и соли в клетъчните вакуоли. Механичните методи за изолиране (тези, при които листната маса се смела с механичен хомогенизатор) обикновено са приложими само при ограничен брой растителни видове (грах, спанак и др.), при които листата не съдържат големи количества твърди и здрави тъкани. В останалите случаи е необходимо продължително хомогенизиране, за освобождаване на клетъчните органели от богатите на кремъчни вещества листа, като тези на пшеница или ечемик. В резултат на това, много от органелите се получават в разрушена и неактивна форма. Най-подходящият начин за тяхното изолиране в интактно състояние е използването на протопласти (растителни клетки без клетъчна стена). Има много растителни видове, от чийто листа е невъзможно да бъдат изолирани митохондрии, с използване на наличните техники. Основен фактор, за успеха на изолирането на органели, с използване на посочените методи, е качеството на растителния материал. Поради това, е важно да бъдат оптимизирани и стандартизирани условията на култивиране на растенията, за да се получават повторяеми резултати.

Изолираните органели се увреждат лесно. Детергентите и летливите органични разтворители са увреждащи за органелите, тъй като разрушават богатите им на липиди мембрани. Трябва да се предприемат и мерки за избягване излагането на изолатите на летливи разтворители (особено фенол), тъй като парите им може да са увреждащи за органелите. Няма универсална техника за субклетъчно фракциониране. Във всички случаи, наличните протоколи трябва да бъдат оптимизирани за всеки конкретен случай. Препоръчва се първо прилагане на по-простите механични методи за изолиране на органели и едва ако с тях не бъдат получени желаните резултати, да се премине към подход с получаване на протопласти.

4. Критерии за чистота на ензимите, в зависимост от тяхното приложение

Процедурите за производство и пречистване на даден ензим са в пряка връзка с целите, за които той ще бъде използван – селекция на източник, условия и изисквания на добив, минимален брой стъпки, нужни за получаване на готов продукт ензим, подходящ за дадено приложение (в хранителната индустрия, влагане в комерсиални детергенти, етап от производството на медикаменти, използване като медимент за хуманни и ветеринарни цели, фундаментални изследвания и др.). Всеки един от тези показатели е финансово обвързан и предопределя предприемането на производство на даден ензим, като устойчива форма на биотехнологичен процес.

Основен показател при определяне на чистотата на всеки един ензимен препарат, независимо от приложението му, е специфичната ензимна активност – отношение между активността на дадения ензим в препарата, отнесен към общото количество общ белтък в него: $ASP (U/mg) = U/mL / mg/mL$ общ белтък. Специфичната активност на произвеждания и пречистван ензим се следи на всяка стъпка от производствения процес, включително при стандартизирането на крайния продукт, който често е в суха, лиофилизирана форма, с етикирана ензимна активност в U на mg, g и др. Мерни единици за маса. Колкото по-висока е специфичната активност на даден ензим – толкова по-пречистен до хомогенно състояние е той; по-високо е количеството на целевите ензимни белтъци в препарата, спрямо общото количество белтък в него.

Други методи, с които се преценява съответствието между чистотата на даден ензим и предназначението, за което се цели са: 1) ултрацентрифугиране в градиент на плътността на разтворителя – не е подходящо при ниски концентрации на онечистванията; 2) електрофоретичен анализ на препарата – нативна, денатурираща електрофореза, 2D електрофореза (разделяне на белтъците в пробата първо по изоелектрична точка и след това по молекулна маса); 3) белтъчно секвениране на крайните аминокиселини на пречистения ензим, което доказва наличието му, а силата на сигналите, спрямо общия фон на фореграмата, дава информация за чистотата на изходния препарат. Във всички случаи, е необходимо съчетаването на поне 2 метода (в зависимост от предназначението на ензима) за анализ, за да се получи надежден отговор на това, дали полученият ензимен препарат отговаря на целевите критерии за чистота.

ЛИТЕРАТУРА

- Василева, Т., Илиев, И., Биволарски, В., Ръководство по ензимология, УИ „Паисий Хилендарски“, Пловдив, 2015.
- Виестур, У. Э, Кристансонс, М. Ж., Былинкина, Е. С. Култивирование микроорганизмов, Пищевая промышленность, Москва, 1980.
- Влахов, С. Биотехнологични производства, Акад. изд. „Марин Дринов“, София, 2004.
- Гаргова, С., Кръстанов, А., Промислена ензимология, Изд. ВИХВП, Пловдив, 1997.
- Грачёва И. М., Иванова Л. А., Биотехнология биологически активных веществ, Изд. НПО „Элварь“, Москва, 2006.
- Егоров Н. С., Основы учения об антибиотиков, Изд. „Наука“, Москва, 2004.
- Димитрова-Дюлгерова И.. Фармакогнозия – учебно помагало. УИ „Паисий Хилендарски“, 2018.
- Иванова, Е., Стайкова, Т., Андреевко, Е. *Генетика с биологични основи на поведението и психогенетика*. УИ ПУ „Паисий Хилендарски, Пловдив, 2011.
- Иванова, Е., Стайкова, Т., Ирикова, Т. *Генетика на човека*. УИ ПУ „Паисий Хилендарски, Пловдив, 2001.
- Илиев, И., Василева, Т., Ензимология, УИ „Паисий Хилендарски“, Пловдив, 2014.
- Кирчева, М. Екологични биотехнологии, УИ „Паисий Хилендарски“, Пловдив, 2002.
- Кирияков, И. К. Систематика на растенията. УИ „Паисий Хилендарски“, Пловдив, 1999.
- Кожухарова Л. Й., Технология на антибиотиците – ръководство за лабораторни упражнения, Акад. изд. УХТ, Пловдив, 1995.
- Кожухарова, Л. Й., Гаргова, С. А., Бахчеванска, С. Т. Биотехнологични производства, Акад. изд. УХТ, Пловдив, 2000.
- Костадинова П., И. Велчева, К. Кузмова. Основы на екологията. Изд. АУ, Пловдив, 2006.
- Костадинова, С. Микробен метаболизъм. УИ „Паисий Хилендарски, Пловдив, 2001.
- Кръстева, М., Приложна ензимология, Изд. „Звезди“, София, 1998.
- Младенов Р., Чешмеджиев И., Димитрова И., Белкинова Д., Тенева, И., Радукова Ц., Стоянов П. „Фармацевтична ботаника I част“. УИ „Паисий Хилендарски“, Пловдив, 2018
- Младенов Р., Чешмеджиев И., Димитрова-Дюлгерова И., Белкинова Д., Тенева И., Радукова Ц., Стоянов П. Фармацевтична ботаника II част. УИ „Паисий Хилендарски“, Пловдив, 2017.
- Младенова Ц., Гюзелева Д., Тодоров К., Стоянов П. Учебно помагало по Систематика на растенията (Фармацевтична ботаника II част). УИ „Паисий Хилендарски“, Пловдив, 2025.
- Петровски, С., Антибактериални антибиотици (Клинично приложение и антибиотична устойчивост), Акад. изд. „Марин Дринов“, София, 2004.
- Тодорова, Н. Ферментационни антибиотици, Акад. изд. ХТМУ, София, 2005.
- Христов, М. Биотехнология на лекарствените вещества, Антибиотик АД, Разград, 1995.
- Яхубян Г. Регулация на генната експресия при еукариоти: Транскрипция и Транскрипционен контрол. УИ „Паисий Хилендарски“, Пловдив, 2025.
- Яхубян Г., Основы на молекулярната биология, УИ „Паисий Хилендарски“, Пловдив, 2025.
- Abbas A., Lichtman A., Pillai S. *Cellular and Molecular Immunology*. 10th ed., Elsevier, Philadelphia, USA, 2021.
- Alberts B., Hopkin K., Johnson A., Morgan D., Roberts K. *Essential Cell Biology*. 6th ed., W. W. Norton & Company, New York, USA, 2023.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. *Molecular biology of the cell* (7th ed.). W. W. Norton & Company, New York, USA, 2022
- Bhattacharjee, D. Human chromosome structure, aberrations and technique. In K. N. Saraswathy & B. Murry (Eds.), *Genes, health and anthropology* Concept Publishing Company, USA, 2023.
- Brautaset, T., O. N. Sekurova, H. Sleeta, T. E. Ellingsen, A. Storm, S. Valla, S. Zotchev. Biosynthesis of the polyene antibiotic nystatin in *Streptomyces noursei* ATCC 11455: analysis of the biosynthetic pathway, *Chemistry and Biology*, vol. 7, 395 – 403, 2000.
- Cohen, G. *Microbial Biochemistry*, 3th Ed., Springer, 2014.
- Cooper G.M. *The Cell – A Molecular Approach*. 8th ed. Sinauer Associates, Inc., Oxford University Press, 2019.
- Cooper, G. M., & Hausman, R. E. *The cell: A molecular approach* (9th ed.). Oxford University Press, UK, 2021.

- Demain, A.L. *Biotechnology for beginners*. Springer Academic Press, Germany, 2006.
- Donald Voet, Judith G. Voet, Charlotte W. Pratt, *Fundamentals of Biochemistry: Life at the Molecular Level*, 5th ed., John Wiley & Sons, Inc., New York, USA, 2016.
- Glazer, A. & H. Nikado, *Microbial biotechnology. Fundamentals of applied microbiology*. 2nd edition., Cambridge University Press, New York, USA, 2007.
- Glick B., Pasternak J., Patten C. *Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA*. 6th ed. Wiley, Hoboken, 2022.
- Hugo, W. B. & A. D. Russell, *Pharmaceutical microbiology*. 6th edition., Blackwell Science, UK, 1998.
- Henkin T. M., Peters J. M. *Snyder & Champness Molecular Genetics of Bacteria*. 5th ed. Wiley, Hoboken, 2020.
- Kassem, H., Girolami, F., & Sanoudou, D. *Molecular genetics made simple. Global Cardiology Science and Practice*, 2012.
- Kim, B., Gadd, G. *Bacterial Physiology and Metabolism*. Cambridge University Press, 2008.
- Lancini, G., F. Parenti, G. G. Gallo, *Antibiotics. A multidisciplinary approach*. Pleum Press, USA, 1995.
- Larone, D. H., L. F. Westblade, E. M. Bird, S. R. Lockhart, G. W. Procop, T. J. Walsh, *Larone's Medically Important Fungi: A Guide to Identification*, John Wiley & Sons, Inc, USA, 2023.
- Lee, Y. K., *Microbial biotechnology: Principles and applications*, World Scientific Press, USA, 2003.
- Lu R. M., Hwang Y. C., Liu I.J. et al. Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases. *J Biomed Sci* 27, 1. <https://doi.org/10.1186/s12929-019-0592-z>, 2020.
- Madigan, M., Martinko, M., Bender, K., Buckley, D., Stahl, D. *Brock Biology of Microorganisms*, 14th Ed., Pearson, 2017.
- Martens, J. H., H. Barg, M.J. Warren, D. Jahn, *Microbial production of vitamin B12*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 58, 275 – 285, 2002.
- Mitra S., Tomar P.C. Hybridoma technology; advancements, clinical significance, and future aspects. *J Genet Eng Biotechnol*. 19(1):159. doi: 10.1186/s43141-021-00264-6, 2021.
- Moses, V., R. E. Cape, D. Spiingham, *Biotechnology. The science and the business*, CRC Press, USA, 1999.
- Odum E. P., G.W. Barrett. 2004. *Fundamentals of Ecology*, Fifth edition, Cengage Learning Publ.
- Poole, R. (Ed.). *Advances in Microbial Physiology*. Elsevier, 2012.
- Willey, J., Sherwood, L., Woolverton, Cr. *Prescott's Microbiology* 11th Ed., McGraw-Hill Education, 2019.
- Ratlegden, C. and B. Kristiansen, *Basic biotechnology*, Cambridge University Press, UK, 2006.
- Rodionov, D. A., A. G. Viteschak, A. A. Mironov, M. S. Gelfand, *Comparative genomics of the vitamin B12 metabolism and regulation in procariotes*, *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, 41148 –41159, 2003.
- Rhem, H. J., G. Reed, *Biotechnology: a comprehensive treatise in 12 Volumes*, VCH, Germany, 2004.
- Scheper, T., R. Faurie and J. Thommel, *Advances in biochemical engineering/biotechnology. Molecular biotechnology of fungal β -lactam antibiotics and related peptide synthases*, Springer Verlag, Germany, 2004.
- Scheper T., and A. Feichter, *Advances in biochemical engineering/biotechnology. History of modern biotechnology*, Springer Verlag, Germany, 2003.
- Smith, J. E., *Biotechnology*. Cambridge University Press, UK, 2006.
- Strohl, W. R., *Biotechnology of antibiotics*. Marcel Dekker, Inc., USA, 1997.
- Survase, Sh. A., Bajaj I. B., Singhal R. S., *Biotechnological production of vitamins*, *Food Technology and Biotechnology*, vol.44, 381 – 396, 2006.
- Walsh, Ch., *Antibiotics. Action, origins, resistance*, ASM Press, USA, 2003.
- Walsh, G., *Pharmaceutical biotechnology. Concepts and applications*, John Wiley & Sons Ltd., UK, 2007.
- Zempleni, J., R. B. Rucker, D. B. McCormick, J. W. Suttie, *Handbook of vitamins*. 4th edition., CRC Press, 2007.
- Zugasti, I., Espinosa-Aroca, L., Fidy, K. et al. CAR-T cell therapy for cancer: current challenges and future directions. *Sig Transduct Target Ther* 10, 210. <https://doi.org/10.1038/s41392-025-02269-w>, 2025.

Авторски колектив

ПОМАГАЛО
за подготовка за държавен изпит
за студентите от специалност
„Фармацевтични биотехнологии“

Българска, първо издание

Предпечатна подготовка: Гергана Георгиева

Пловдив, 2026

ISBN 978-619-281-167-9 (web)