

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
Факультет фармацевтичних технологій та менеджменту
Кафедра біотехнології

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

на тему: **«ДОСЛІДЖЕННЯ СПОСОБІВ ОТРИМАННЯ ЗАСОБІВ ДЛЯ
СПОРТИВНОГО ХАРЧУВАННЯ НА ОСНОВІ АМІНОКИСЛОТ З
РОЗГАЛУЖЕНИМ ЛАНЦЮГОМ»**

Виконав: здобувачка вищої освіти групи ПБтм23(1,6д)-01
спеціальності: 162 Біотехнології та біоінженерія
освітньої програми Промислова біотехнологія
Катерина БОРИСОВА

Керівник: доцент закладу вищої освіти
кафедри біотехнології, к. фарм. н., с.н.с. Наталія ДВІНСЬКИХ

Рецензент: начальник сектору технологічних досліджень
відділу фармацевтичної розробки ТОВ «БІОЛІК ФАРМА»
к.фарм.н., с.н.с. Лариса СЕДЕНКО

АНОТАЦІЯ

В роботі досліджено властивості незамінних амінокислот з розгалуженим ланцюгом, напрями їх застосування, проаналізовано способи отримання ВСАА біотехнологічним методом, проаналізовано способи модифікації мікроорганізмів-продуцентів, виявлено основні тенденції ринку продуктів на основі ВСАА в Україні та за рубежом. Виявлено перспективи створення засобів з інкапсульованими ВСАА, які мають потенціал промислового виробництва та застосування для спортивного харчування. Робота складається з вступу, трьох розділів, висновку. Загальний обсяг роботи – 51 стор., кількість таблиць 2, рисунків 12, джерел літератури 35, додатків 1.

Ключові слова: амінокислоти з розгалуженим ланцюгом, генетична модифікація, метаболічна інженерія, інкапсуляція, культивування

ANNOTATION

The work examines the properties of essential aminoacids with a branched chain, directions of their application, analyzes the methods of obtaining BCAA by biotechnological methods, analyzes the methods of modifying producer microorganisms, reveals the main market trends of BCAA-based products in Ukraine and abroad. The prospects for creating products with encapsulated BCAAs, which have the potential for industrial production and use in sports nutrition, are identified. The work consists of an introduction, three sections, a conclusion. Total volume of work 51, number of tables 2, figures 12, sources of literature 35, appendices 1.

Key words: liposomes, phospholipids, extrusion, reverse phase, stability.

ЗМІСТ

Вступ.....	3
Розділ 1 Огляд літератури.....	7
1.1 ВСАА – комплекс незамінних амінокислот з розгалуженим ланцюгом.....	6
1.2 Стан ринку та галузі застосування ВСАА	8
1.3 Використання ВСАА у спортивному харчуванні	16
1.4 Способи отримання ВСАА	20
Висновок до I розділу	23
Розділ 2 Об’єкти та методи досліджень.....	24
2.1. Амінокислоти з розгалуженим ланцюгом	24
2.2. Метаболічні шляхи синтезу ВСАА	28
Висновок до 2 розділу.....	30
Розділ 3 Експериментальна частина.....	31
3.1 Біотехнологічні підходи до виробництва ВСАА	31
3.2 Аналіз продуцентів ВСАА та шляхів їх удосконалення	31
3.3 Оптимізація технологічних процесів мікробного синтезу ВСАА ...	39
3.4 Вибір форми засобу спортивного харчування	44
3.5 Схема технологічного процесу отримання засобу для спортивного харчування на основі амінокислот з розгалуженим ланцюгом.....	46
3.6 Напрями подальших досліджень.....	48
Висновок до 3 розділу	49
Висновки.....	51
Список використаних джерел.....	52
Додаток. Публікації за темою роботи.....	57

ВСТУП

Актуальність теми. Амінокислоти з розгалуженим ланцюгом (BCAA) — лейцин (Leu), ізолейцин (Ile) і валін (Val) — є важливими поживними речовинами, які відіграють значну роль у синтезі білка, регулюванні метаболізму та виробництві енергії. BCAA широко використовуються в кількох галузях промисловості: харчова, фармацевтична, косметична та виробництво кормів для тварин. Основна серед них за обсягами продажів — харчова, вона охоплює спортивне харчування та фітнес, а також функціональну їжу та напої.

Споживання у складі раціонів харчування та дієт, розподіл і катаболізм BCAA розглядаються з урахуванням їх фізіологічних функцій. В останні часи встановлений багатогранний вплив комплексу розгалужених амінокислот на сигнальні шляхи, імунну функцію та прогресування ряду захворювань, їх глибокий вплив на синтез м'язового білка та метаболічний стан. Цей комплексний аналіз служить джерелом для розуміння як основних, так і комплексних ролей BCAA в біологічних системах і їх промислового застосування.

Промисловий синтез BCAA, зокрема з використанням бактеріальних штамів, таких як *Corynebacterium glutamicum*, досліджується сучасними методами, як генна інженерія, спрямована на підвищення виробництва, деталізацію ферментативних та метаболічних процесів і конкретних прекурсорів. Удосконалення штамів-продуцентів BCAA залишається актуальним завданням біотехнології. Комплексний підхід, що поєднує методи генетичної та метаболічної інженерії з оптимізацією умов культивування, дозволяє створювати високопродуктивні промислові штами.

Це є підставою звернути увагу на те, що роль та значення спеціалізованих продуктів харчування, що містять компоненти функціональної дії, зокрема BCAA, у сучасній спортивній практиці постійно зростають. Їх частка у загальному обсязі вироблених і реалізованих харчових

продуктів безперервно збільшується. Такі продукти є неодмінною умовою не тільки для досягнення серйозних результатів у сучасних спортивних змаганнях, а також для підтримки здорового способу життя широких верств населення.

Вітчизняний ринок ВСАА представлений переважно продуктами закордонного виробництва. Така розповсюдженість імпортої продукції пояснюється тим, що вітчизняне виробництво спортивного харчування майже не розвивається, незважаючи на досить значну сировинну та технологічну базу. Тому дослідження з розробки способів отримання продуктів для спортивного харчування на основі амінокислот з розгалуженим ланцюгом є перспективним напрямом та має значення для поповнення вітчизняного ринку актуальними спеціалізованими продуктами, і розвитку біотехнологічного виробництва ВСАА для інших галузей народного господарства.

Метою дослідження є аналіз властивостей амінокислот з розгалуженим ланцюгом, сучасних стратегій оптимізації біотехнологічних методів їх отримання з використанням генетичної та метаболічної інженерії для створення високопродуктивних штамів-продуцентів ВСАА, для розкриття перспектив створення вітчизняних конкурентоспроможних продуктів для спортивного харчування на основі ВСАА.

Завдання дослідження:

- провести аналіз джерел літератури щодо фізіологічних та метаболічних властивостей незамінних амінокислот з розгалуженим ланцюгом, напрямів їх застосування в секторах спортивної підготовки, охорони здоров'я, харчування тощо;
- провести аналіз продуцентів ВСАА, завдань та методів їх удосконалення;
- розглянути технології отримання ВСАА методом мікробного синтезу;
- проаналізувати основні тенденції ринку ВСАА в Україні;
- розглянути форми випуску продуктів на основі ВСАА, зокрема засобів для спортивного харчування;

- визначити найбільш перспективні штами-продуценти та технологічні прийоми отримання ВСАА, їх очистки та отримання продукту в доцільній та зручній для споживання формі;
- запропонувати орієнтовну технологічну схему для організації вітчизняного виробництва препарату для спортивного харчування на основі ВСАА.

Об'єкти дослідження: амінокислоти з розгалуженим ланцюгом лейцин, ізолейцин та валін.

Предметом дослідження є властивості ВСАА, метаболічні шляхи їх синтезу, сучасні технології модифікації продуцентів ВСАА для збільшення їх продуктивності та стійкості, технології культивування та їх оптимізацію, ринок продуктів на основі ВСАА, та їх споживчі форми.

Методи дослідження. Бібліосемантичні методи аналізу інформації з наукових публікацій та інших джерел, структурно-логічний аналіз предмету досліджень, технологічний метод для розробки та моделювання технологічної схеми виробництва продукту на основі ВСАА.

Практичне значення отриманих результатів. Проведений у роботі аналіз сучасних тенденцій у використанні ВСАА в різних галузях, зокрема у спортивному харчуванні, у отриманні високопродуктивних штамів-продуцентів, у проведенні технологічних процесів мікробного синтезу та отриманні продуктів на основі ВСАА, складена технологічна схема виробництва можуть бути використані для організації вітчизняного виробництва препарату для спортивного харчування, для поповнення ринку спеціалізованими продуктами та сприяння розвитку національної біотехнологічної індустрії.

Апробація результатів дослідження і публікації.

Результати досліджень опубліковані в матеріалах конференцій:

1. Двінських Н. Біотехнологічний спосіб отримання ВСАА – комплексу амінокислот з розгалуженим ланцюгом / Двінських Н., Хохленкова Н., Борисова К. // Collection of Scientific Papers with the Proceedings of the 1st

International Scientific and Practical Conference «Innovative Solutions in Science: Balancing Theory and Practice». San Francisco, USA, October 28-30, 2024. - European Open Science Space, 2024. – P. 18-20.

Структура та обсяг кваліфікаційної роботи.

Робота складається з вступу, трьох розділів - огляду літератури, об'єктів та методів дослідження, експериментальної частини, висновку. Загальний обсяг роботи 51 стор., кількість таблиць 2, рисунків 12, джерел літератури 35, додатків 1.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 ВСАА – комплекс незамінних амінокислот з розгалуженим ланцюгом.

ВСАА (англ. branched-chain amino acids) – комплекс незамінних амінокислот з розгалуженим ланцюгом), який складається з L-лейцину, L-ізолейцину та L-валіну. Вони складають близько 35% всіх амінокислот м'язової тканини, беруть участь в анаболізмі та відновленні, мають антикатаболічну дію, забезпечують пластичним матеріалом і служать енергетичним субстратом, метаболізуючись у м'язах. [1-3]

Складові комплексу ВСАА мають схожу будову молекул та досить близькі фізіологічні властивості, але вони мають і певні індивідуальні особливості.

Лейцин сприяє підтримці азотистої рівноваги в організмі, при низькокалорійній дієті забезпечує до 10% енергії, що утворюється при інтенсивних фізичних навантаженнях, прискорює відновлення сполучних тканин та шкіри при спортивних травмах, знижує масу жирових відкладень, підвищує витривалість організму, сприяє зміцненню центральної нервової системи, посилює секрецію інсуліну, який стимулює додатковий синтез білків і гальмує їх непотрібне розщеплення. Лейцин причетний до утворення білка колагену, що забезпечує пружність шкіри, еластичність судин і зв'язок.

Ізолейцин бере участь у синтезі міофібрил м'язів, забезпечує біохімічні процеси утворення гемоглобіну та глікогену, сприяє розщепленню холестерину та полегшує почуття втоми м'язів при перенавантаженнях. Стан дефіциту ізолейцину схожий на гіпоглікемію.

Валін також учасник процесів росту м'язових тканин, але окрім цього покращує координацію м'язів та знижує чутливість до болю, холоду та спеки. Він може бути джерелом енергії в м'язових клітинах і впливати на психічний стан людини. Це обумовлено тим, що валін перешкоджає зниженню рівня серотоніну в головному мозку. [2-4]

Тобто, окрім участі у синтезі білків, кислоти ВСАА виконують і інші важливі функції. В табл. 1.1 відображено вплив на організм кожної з цих незамінних амінокислот. [1-5]

Таблиця 1.1

**Фізіологічна роль амінокислот L-лейцину (Leu), L-ізолейцину (Ile)
та L-валіну (Val)**

Види впливу	Амінокислоти
Нормалізація обміну речовин	Leu, Ile, Val
Підвищення витривалості, працездатності	Leu, Ile, Val
Стимуляція процесів регенерації	Leu, Ile, Val
Участь в синтезі гемоглобіну	Leu, Ile
Участь в енергетичному обміні	Leu, Ile
Регуляція рівня цукру	Leu, Ile
Попередження утворення жирових відкладень і участь в їх розщепленні	Leu, Ile
Зміцнення імунітету	Leu, Ile
Регуляція рівня холестерину	Ile
Поліпшення секреції інсуліну	Leu
Стимуляція вироблення гормону росту (соматотропіну)	Val
Стабілізація психоемоційної сфери, профілактика депресій	Val
Зниження апетиту	Val

Останніми роками з'являється багато наукових публікацій щодо більш глибокого розуміння механізмів фізіологічних і метаболічних функцій ВСАА, які включають дослідження не тільки впливу підвищеної кількості цих амінокислот в їжі та в організмі, а також зниженої кількості та співвідношення Leu, Ile та Val. В цих напрямках з'ясовано:

- як недостатній, так і надмірний рівень ВСАА в дієті впливає ліполіз та ліпогенез;
- ВСАА, особливо ізолейцин, відіграють важливу роль у збільшенні споживання та метаболізування глюкози через активізацію механізмів транспорту глюкози у кишковніку та м'язах. Так, відомо, з одного боку, що ВСАА збільшує секрецію інсуліну, але з іншого, підвищений рівень ВСАА у плазмі призводить до резистентності до інсуліну або цукрового діабету 2 типу. Передбачають такі механізми цього процесу: по-перше, що високий рівень ВСАА активує сигнальні механізми ферментів, які від'єднують рецептор інсуліну від субстрату рецептора інсуліну, або (по-друге) накопичення токсичних метаболітів ВСАА через аномальну їх кількість призводить до порушення функції мітохондрій, що знов-таки пов'язують з інсулінорезистентністю;
- додавання лейцину до кормів покращує якість м'яса сільськогосподарських тварин;
- ВСАА підтримують здоров'я молочної залози, якість молока та росту ембріона;
- ВСАА сприяють транспорту амінокислот у кишечнику та продукуванню муцину;
- ВСАА беруть участь у регуляції вроджених і адаптивних імунних реакцій;

Надмірно високий рівень ВСАА в крові (знижений катаболізм ВСАА) можна використовувати як біомаркер для ранньої діагностики ожиріння, діабету та інших метаболічних захворювань. [1-5]

Багато зусиль дослідників спрямовано на розуміння потенційної ролі ВСАА в виникненні та лікуванні пухлинних захворювань. З'ясовано, що аномальний метаболізм ВСАА впливає на ріст і розвиток пухлини. Збільшення рівню ВСАА пригнічує ріст пухлин, що має потенціал у лікуванні раку. Але ВСАА служать донорами азоту, що необхідний для синтезу біомолекул, таких як білки та нуклеотиди, які використовуються

раковими клітинами для росту. Ця подвійна роль, вплив на ріст або пригнічення пухлини залежить від різних факторів: умов середовища, концентрацій та співвідношення амінокислот з розгалуженим ланцюгом.

Отже, роль ВСАА в цьому напрямі є поки суперечливою, оскільки їх катаболізм здатен сприяти прогресу пухлини залежно від дози. Хоча, керований вплив на ферменти катаболізму ВСАА при використанні дієт, багатих на ВСАА, розглядають як потенційні терапевтичні заходи, впровадження таких підходів має проблеми та обмеження [6]

Щодо механізмів впливу на імунну систему, виявлено, що імунні клітини виробляють ферменти катаболізму ВСАА (декарбоксилазу і дегідрогеназу), а це сприяє росту і проліферації лімфоцитів, дозріванню дендритних клітин і активізуванню Т-клітин, які мають цитотоксичну активність. [6, 7]

Нестача ВСАА в їжі обумовлює вроджену імунну функцію через дефіцит лімфоцитів і білих кров'яних тілець, це зменшує опірність до патогенів. Додавання до раціону ВСАА відновлює фагоцитарну функцію нейтрофілів і активність природних клітин-кілерів навіть у пацієнтів з захворюваннями печінки, наприклад при цирозі. Крім того, ВСАА посилює захисту поверхні слизової оболонки.

ВСАА сприяють підвищенню імунітету завдяки вивільненню енергії при катаболізмі, тобто вони є джерелом палива для імунних клітин, дендритних клітин, кишкових імуноглобулінів, сприяють вродженій та адаптивній імунній відповіді, утворенню прозапальних цитокінів. Внутрішньотрахеальне введення Іє виявилось перспективною стратегією нової імунотерапії при інфекційних захворюваннях. Крім того, добавка ВСАА відновлює здатність моноклеарних клітин периферичної крові проліферувати у відповідь на мітогени після тривалого інтенсивного фізичного навантаження, пов'язаного з імуносупресією. [6-8]

Ризик цереброваскулярних та серцево-судинних захворювань (ССЗ), як правило, пов'язують з надмірною вагою або ожирінням. Але не всі люди з

такими ознаками хворіють на ССЗ, а люди з нормальною вагою - хворіють. Розвиток ССЗ пов'язують разом з іншими причинами і з дефектом катаболізму ВСАА. Відоме дослідження, де визначено зв'язок підвищених рівнів ВСАА в сироватці крові, особливо Val і Leu, з підвищеним ризиком ССЗ, причому досліджувалися дорослі і неповнолітні, також худі люди, з надмірною вагою та ожирінням. Це означає, що ВСАА можуть слугувати маркером кардіометаболічного ризику незалежно від статури та індексу маси. Вважається, що раціон, збагачений ВСАА, сприятливо впливає на метаболізм. Але виявилось, що підвищений рівень ВСАА значно корелює з ризиком ССЗ. Це стосувалося і хворих на цукровий діабет, які при таких дієтах можуть мати ризику розвитку ССЗ. Дослідження ефектів та метаболізму сироваткових ВСАА може сприяти новому розумінню атеросклерозу та оцінки ризику ССЗ. [8]

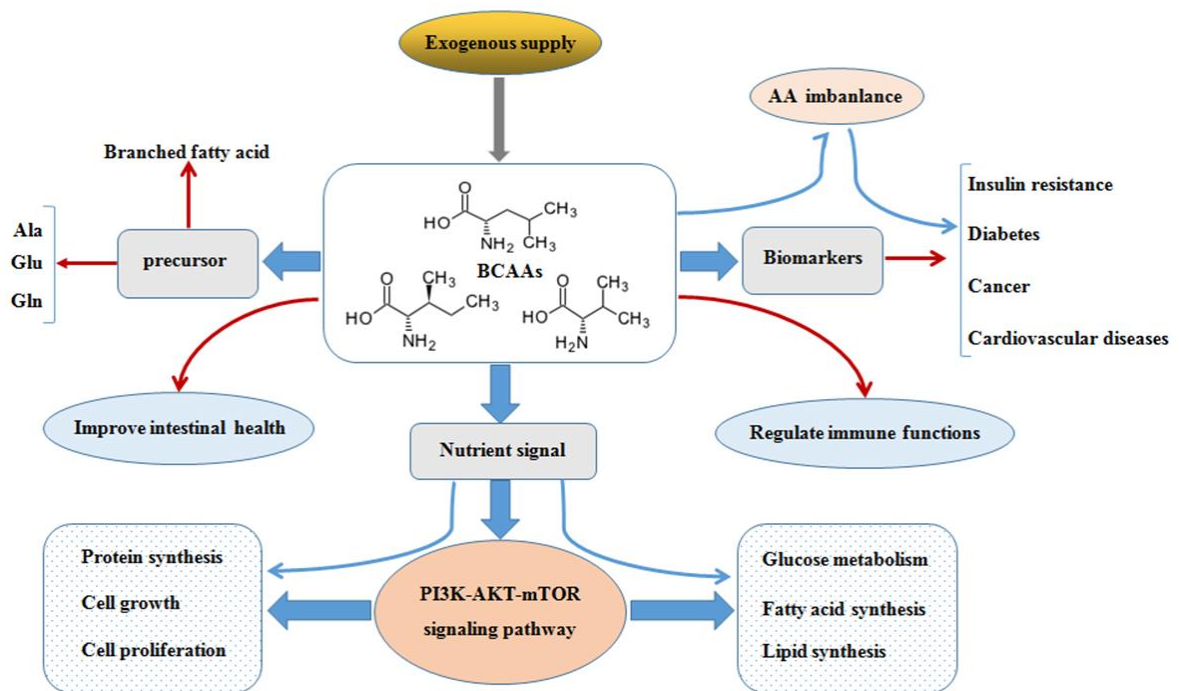


Рис. 1.2. Фізіологічна та метаболічна роль амінокислот ВСАА. [7]

Отже, катаболізм і баланс ВСАА тісно пов'язані зі здоров'ям і захворюваннями. Зрештою, особливо в медицині, надзвичайно важливим буде подальше дослідження та розуміння ролі ВСАА, пов'язаної з патологічними станами, для подальшого покращення здоров'я та благополуччя людей. [1, 5-7]

1.2. Стан ринку та галузі застосування ВСАА.

Розмір ринку ВСАА у 2022 році оцінювався в 1,45 мільярда доларів США та передбачається його ріст на понад 5,8% сукупного середньорічного темпу зростання (CAGR) з 2023 по 2032 рік [10]. За іншими даними, очікують загальний річний темп зростання в 3,80% [11].

Однією з відмічених проблем ринку ВСАА є нестабільність цін на сировину та ріст числа конкурентів-виробників, збільшення рівню нормативних вимог і стандартів безпеки, дотримання яких може бути складним і дорогим процесом, але необхідним через ризик шкоди репутації та юридичних наслідків.

Пандемія COVID-19 мала різноплановий вплив на ринок амінокислот з розгалуженим ланцюгом. З одного боку, інтерес споживачів до харчових добавок з ВСАА зростає через підвищення уваги до здоров'я та імунітету. З другого боку, нестабільність в постачаннях сировини та транспортуванні створювали проблеми для виробників. [10]

Однак, загальна стійкість індустрії здоров'я та фітнесу та адаптивність до викликів дозволили ринку їх витримати, здоров'я є пріоритетом для споживачів у всьому світі. Теперішній стан ринку амінокислот з розгалуженим ланцюгом наведено на рис. 1.3.

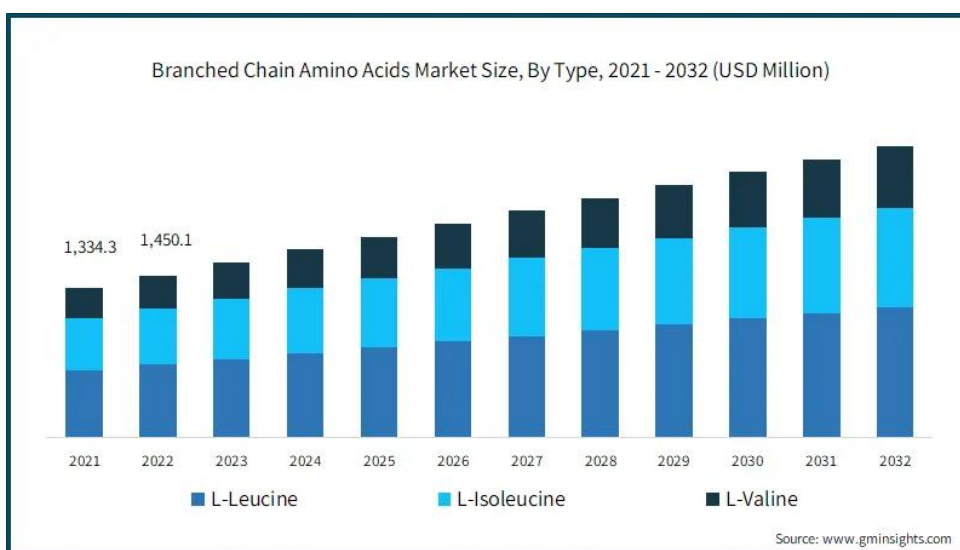


Рис. 1.3. Аналіз ринку амінокислот з розгалуженим ланцюгом за загальним обсягом та за видом ВСАА. [10]

Основні компанії, які є гравцями на світовому ринку амінокислот з розгалуженим ланцюгом, з 21 країни Північної Америки, Європи, Азіатсько-Тихоокеанський регіону, Латинської Америки, Близького Сходу і Африки, наведено на рис. 1.4.

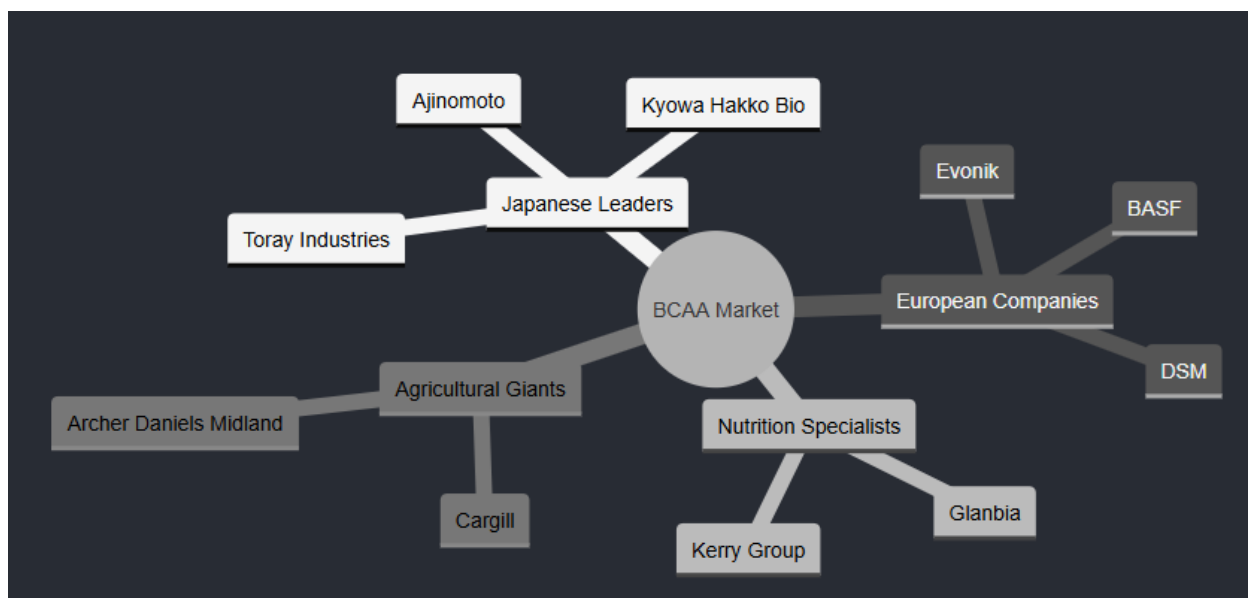


Рис. 1.4. Основні компанії, що працюють у галузі амінокислот з розгалуженим ланцюгом.

Стосовно ринкових часток валіну, лейцину та ізолейцину, вони становлять 48%, 34% та 18% відповідно [9]. За іншими даними, сегмент Leu домінував у 2022 році з обсягом продаж 652,7 мільйона доларів США. Лейцин вважається найважливішим серед ВСАА через його основну роль у стимулюванні процесів відновлення та росту м'язів [10]. Структуру ринку за видом амінокислоти з розгалуженим ланцюгом представлено на рис. 1.5.

У більшості випадків для ініціації синтезу м'язового білка, збільшення енергії та зменшення втоми переважає споживання лейцину, ізолейцину та валіну у співвідношенні 2:1:1 (87,1%) [9]. Рис. 1.5 загалом підтверджує цю тенденцію.

ВСАА широко використовуються в кількох галузях промисловості: харчова, фармацевтична, косметична та виробництво кормів для тварин. Основна серед них за обсягами продажів – харчова, вона охоплює спортивне харчування та фітнес, а також функціональну їжу та напої.

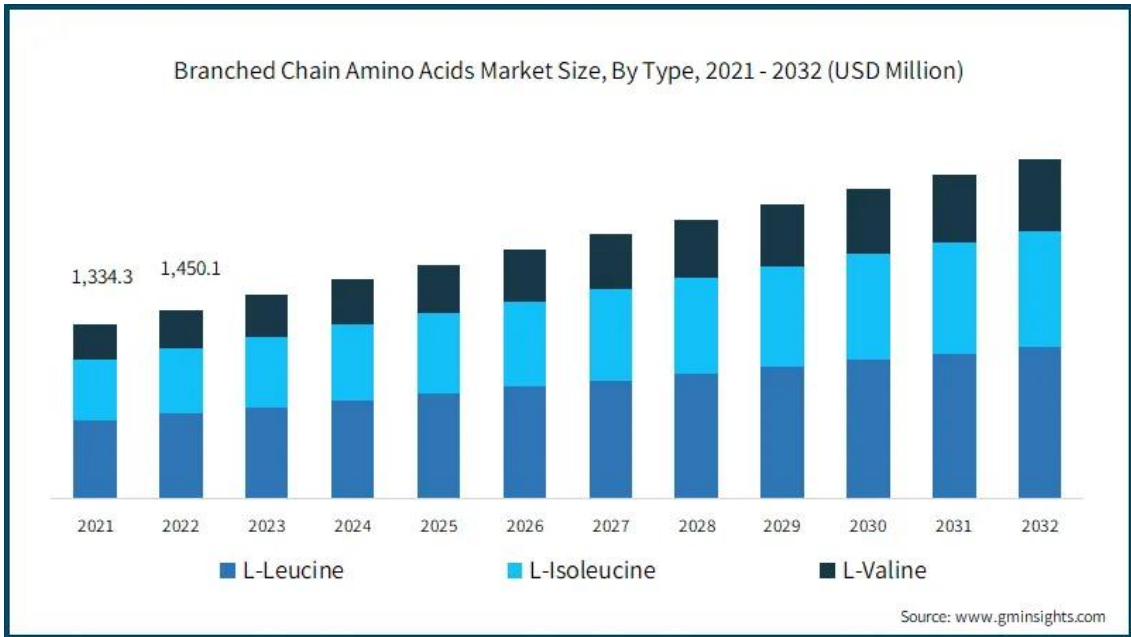


Рис. 1.5. Структура ринку ВСАА за видом амінокислот. [10]

Частка спортивного харчування та фітнесу складає 65% частки ринку ВСАА у 2022 році, оскільки ці продукти, насамперед як дієтичні добавки, користуються великим попитом серед спортсменів, бодібілдерів та поціновувачів фітнесу через їхню роль у стимулюванні синтезу м'язового білка (див. рис. 1.6).

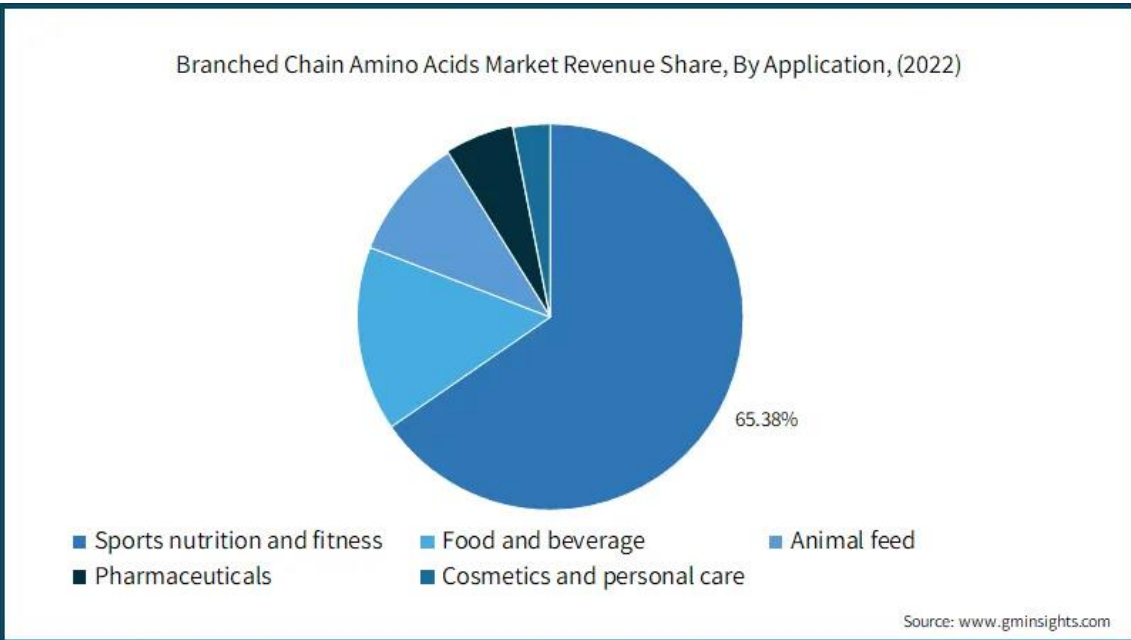


Рис. 1.6. Частка доходу від амінокислот з розгалуженим ланцюгом в залежності від застосування. [10]

Основні тенденції в індустрії спортивного харчування та фітнесу, а також функціональних продуктів харчування та напоїв з додаванням ВСАА включають:

- зростання популярності добавок дієтичних з цими амінокислотами для веганів і вегетаріанців,
- впровадження збагачених Leu, Ile, Val функціональних продуктів харчування та напоїв (наприклад, протеїнові батончики та спортивні напої),
- впровадження інноваційних продуктів на нетрадиційних видах сировини (рослинні ферментовані напої, продукти на основі висушеної молочної сироватки тощо),
- розширення смакової палітри відомих продуктів з ВСАА,
- розширення кола споживачів шляхом підвищення обізнаності про ВСАА у спортивному відновленні та збереженні м'язової маси серед старіючого населення,
- постійне розширення ринку у відповідь на зміну споживчих уподобань і здорового способу життя. [1-4, 8-10]

Застосування продуктів з ВСАА в медицині та фармацевтиці ґрунтується на результатах багатьох досліджень, які довели, що добавки дієтичні та лікарські засоби з додаванням ВСАА корисні для здоров'я кишечника, сприяють його функціонуванню та підвищують стійкість до захворювань. Дефіцит ВСАА може спричинити імунну дисфункцію та збільшити ризик інфекції. Забезпечення доставки ВСАА до організму не тільки знижує ризик цукрового діабету 2 типу, але й ефективно відновлює захисну здатність пацієнтів з цирозом печінки. [11]

Сільськогосподарський сектор ринку ВСАА представлений кормовими добавками. Останніми роками темпи зростання виробництва кормових ВСАА були найбільш значними, оскільки їх використання забезпечує достатнє живлення для проліферації та розвитку клітин тварин, посилення синтезу білка, регулювання якості м'яса. ВСАА є метаболічними регуляторами не

тільки в синтезі білка, але також у метаболізмі ліпідів і глюкози. Вони покращують здоров'я молочної залози, підвищують якість молока та сприяють ранній імплантації та розвитку ембріона. Дослідження є доказами того, що ВСАА може покращувати здоров'я та запобігати інфекційним захворюванням у тварин і людей шляхом регулювання імунної системи. [5,7, 8]

Ще один чинник, за яким ринок ВСАА можна поділити – форма продуктів, а саме: порошок, капсули, таблетки, рідина та жувальні цукерки. Вважають, що сегмент порошкових форм продемонструє величезне збільшення до 2032 року. Пояснити можна тим, що порошок забезпечує більшу гнучкість у дозуванні, зазвичай швидше засвоюється організмом порівняно з капсулами або таблетками. Така особливість є перевагою для тих, хто споживає амінокислоти до, під час або після тренувань для підтримки відновлення м'язів і продуктивності. [1,10]

1.3. Використання ВСАА у спортивному харчуванні.

Фахівцями-фізіологами було виявлено, а тренерами на практиці підтверджено позитивний вплив на організм спортсменів додаткового споживання ВСАА, які пришвидшували відновлення у періоди інтенсивних тренувань та постнавантажувальних травм за рахунок зниження руйнування м'язового білка. [2-4]

Цей вплив обумовлений тим, що білок м'язів на третину (до 35 %) складається з амінокислот з розгалуженим ланцюгом, тобто вони потрібні організму для нормального функціонування. Важливою є роль Leu в синтезі колагену, необхідного для здоров'я опорно-рухового апарату, роль Val валіну у виробленні гормону соматотропіну, який поряд з тестостероном потрібен для нарощування м'язів.

Підвищені фізичні та емоційні навантаження, які відбуваються не тільки у спорті високих результатів, провокують утворення також інших гормонів - гормонів стресу. При навантаженнях та стресі виробляється у великих кількостях адреналін, а концентрація гормону стресу кортизолу

збільшується під час сну, а до ранку стає піковою. Якщо в такій ситуації організму не вистачає вуглеводів і амінокислот, а саме ВСАА, м'язи починають руйнуватися, щоб забезпечити організм цими речовинами за рахунок власних ресурсів. Таким руйнуванням м'язів загрожує також низькокалорійні дієти, голодування та нерегулярне харчування. ВСАА допомагають швидко заповнити дефіцит найважливіших для м'язів речовин і попереджають м'язовий катаболізм.

Амінокислоти ВСАА позитивно впливають на вироблення ще одного гормону - інсуліну, який забезпечує циркуляцію цукру в крові, а цукор є енергетичним джерелом для клітини м'язових волокон. Тобто, при виробленні інсуліну засвоєння амінокислот відбувається швидше. [2-4]

Є ще один істотний аспект: катаболізм більшості амінокислот та виділення при цьому енергії відбувається в печінці, а Leu, Ile, Val розщеплюються здебільшого в м'язах. Це й є основою того, що саме вони забезпечують «цеглинками» для синтезу білка та енергією ті органи, які найбільше цього потребують при фізичних навантаженнях, недостатньому харчуванні та стресах. Тому ВСАА і позиціонують як цільові амінокислоти для м'язів. [4, 12, 13]

В цілому, найголовнішими для спортсменів є три функції Leu, Ile, Val:

- анаболічна;
- антикатаболічна;
- енергозабезпечуюча.

В світі існує потужна індустрія виробництва харчових продуктів та добавок дієтичних, спрямованих на задоволення потреб спортсменів та інших стейкхолдерів. Це пояснюється тим, що люди в усьому світі, в тому числі і на Україні, все більше прагнуть здорового способу життя, збільшується кількість оздоровчих клубів та фітнес-центрів, що призводить до появи нових споживачів та збільшення обсягів ринку. [2, 12, 13]

Лідерами світового ринку спортивного харчування є такі транснаціональні корпорації, як Glanbia Plc (Ірландія), MusclePharm Corp

(США), The Hut Group Ltd (Великобританія), The Nature's Bounty Co (США), Clif Bar&Co (США), Hormel Foods Corp (США), General Nutrition Centers Inc (США) та ін.

Вітчизняний ринок продуктів спортивного харчування представлений переважно продуктами закордонного виробництва. Згідно з дослідженням Euromonitor International найбільшу частку займає продукція американської компанії «Optimum Nutrition», на другому місці – польська компанія «Олимп». Така розповсюдженість імпортової продукції пояснюється тим, що вітчизняне виробництво спортивного харчування майже не розвивається, незважаючи на досить значну сировинну та технологічну базу. Серед вітчизняних виробників на ринку є компанії: «Вітапак» (ТМ «Power Pro»), «ДелМас» (ТМ «Вансітон»), «EXTREMAL» та «Інтерхім» (ТМ «SMARTPIT»). [4, 12, 14]

В таблиці 1.2 наведено деякі дані аналізу продуктів спортивного харчування на основі ВСАА, що присутні на внутрішньому ринку України.

Таблиця 1.2

Аналіз продуктів на основі ВСАА на ринку України [14-17]

Назва	Склад	Leu:Ile: Val /форма випуску	Виробник
1	2	3	4
EXTRA PURE BCAA 2:1:1	Leu, Ile, Val	2:1:1 / порошок	OstroVit, Польща
Gold Standard BCAA Train Sustain	Leu, Ile, Val, соєвий лецитин, кислоти: лимонна, яблучна, винна, ароматизатор, дріжджі, бета- глюкан (Wellmune®), екстракт <i>Rhodiola Rosea</i> , агенти проти злежування (діоксид кремнію, силікат кальцію), хлориди натрію та калію, оксид магнію, підсолоджувач (сукралоза), аскорбінова кислота	2:1:1 / порошок	Optimum Nutrition, США

Продовження таблиці 1.2

1	2	3	4
BCAA 4:1:1	Leu, Ile, Val, смакові добавки/без добавок	4:1:1/ порошок	GymBeam, Німеччина
BCAA Xtend	Leu, Ile, Val, глютамін, цитрулін малат, суміш електролітів, вітамін B6, лимонна кислота, натуральні і штучні ароматизатори, ацесульфам калію, сукралоза	2:1:1/ порошок	Xtend, Нідерланди
Амінокислоти BCAA 1000 XXL	Leu, Ile, Val, мікрокристалічна целюлоза, кукурудзяний крохмаль, желатин, антизлежувач - діоксид кремнію	2:1:1 / таблетки	ActivLab, Польща
BCAA Ethyl Ester	Stacker BCAA-EE3 Complex (Leu етиловий ефір HCl, Ile етиловий ефір HCl, Val етиловий ефір HCl), капсула Softgel (целюлоза, чорний оксид заліза)	2:1:1 / капсули	Stacker2, США
BCAA Liquid	Leu, Ile, Val, вода, регулятор кислотності лимонна кислота, апельсинова емульсія (аромат, барвники E 104, E 110), консерванти сорбінова кислота і бензоат натрію, підсолоджувачі неогесперидін DC, циклакат натрію, ацесульфам К, сахароза, вітамін B6	1:1,4:3,3 / напій	Nutrend, Чехія
BCAA 8: 1: 1 ZERO	Leu 59%, по 7,4% Ile та Val, кислота лимонна, тартрат калію, підсолоджувач, сіль, барвник, піногасники	8:1:1/ порошок	Bio Tech, USA
BCAA 2-1-1	В 100 г: Leu 50 г, Ile 25 г, Val 24,95 г, сукралоза, барвник натурального походження, вітаміни, мг: PP 5,4, C 18, E 3, B5 1,8, B1 0,42, B6 0,6, мкг: B7 45, B12 0,3, B9 0,6	2:1:1/ порошок	POWER PRO, Україна
Juiced Aminos Universal Nutrition Animal	В 1 цукерці: Leu, Ile, Val (500 мг), L-Глютамін 22,75 мг, L-Таурин 250 мг, морська сіль 25 мг, допоміжні: цукор, мальтодекстрин, лимонна кислота, стеаринова кислота, магнію стеарат, барвник натуральний, сукралоза, ацесульфам К	2:1:1 / жувальні цукерки	ANIMAL OT UNIVERSAL, США

Роль та значення спеціалізованих продуктів харчування, що містять компоненти функціональної дії, зокрема ВСАА, у сучасній спортивній практиці постійно зростають. Їх частка у загальному обсязі вироблених і реалізованих харчових продуктів безперервно збільшується. Такі продукти є неодмінною умовою не тільки для досягнення серйозних результатів у сучасних спортивних змаганнях, а також для підтримки здорового способу життя широких верств населення.

Цілий ряд спеціалізованих продуктів спортивного харчування із вмістом амінокислот з розгалуженим ланцюгом можна повною мірою віднести до об'єктів високих технологій. Вони створюються з урахуванням багаторічних досліджень фахівців різного профілю, здебільшого біотехнологів. У процесі розробки такого продукту часто акумулюється та використовується інформація, накопичена в ході експериментів, що проводились у різних країнах світу.

1.4. Способи отримання ВСАА.

Зростаючий попит на велику кількість ВСАА викликав потребу в більш швидких і ефективних методах виробництва.

Виробництво ВСАА, як і інших амінокислот, може здійснюватися екстрагуванням з гідролізату, хімічним та ферментативним синтезом, а також біосинтетично.

Хімічне синтетичне та ферментативне виробництво ВСАА ускладнюється дороговизною сировини, складними умовами реакцій та загрозою забруднення довкілля відходами. Мікробний синтез є переважною альтернативою отримання ВСАА, оскільки він є екологічно чистим і має високу продуктивність. [1, 8, 11]

Відомо, що лише L-ізомери амінокислот є протеїногенними, тому біотехнологічні процеси мають перевагу над хімічним синтезом для виробництва ВСАА через стереоспецифічність ферментативних реакцій.

Слід зауважити, що ці амінокислоти використовують в комплексі не стільки тому, що вони доповнюють дію одна одної, а тому що при біосинтезі

утворюється саме комплекс подібних за структурою ВСАА. Отримання окремих амінокислот або поділ комплексу ВСАА на складові набагато складніший і дорожчий.

Біосинтетичний шлях ВСАА можна посилити за допомогою різних стратегій, включаючи інгібування зворотного зв'язку, промоторний мутагенез та кофакторну інженерію. [10, 18]

Для задоволення попиту на ВСАА розроблені методи промислового мікробного синтезу, в основному з використанням мутантних штамів бактерій з покращеними виробничими можливостями.

Як продуценти, що використовуються для синтезу цілого ряду амінокислот, таких як лізин, глутамат, треонін, серин тощо, відоме використання виробничих штамів бактерій *Corynebacterium glutamicum*, *Escherichia coli*, *Pantoea ananatis* та інші. [8-11, 18]

C. glutamicum виділяється як одна з головних робочих конячок, яка відіграє ключову роль у промисловому виробництві ВСАА. Ця грампозитивна бактерія ефективно синтезує амінокислоти лейцин, ізолейцин та валін завдяки природнім для неї метаболічним шляхам і ферментам. Завдяки генній інженерії та покращенню штаму його потужність виробництва ВСАА була збільшена, і цей штам тепер відомий своєю довговічністю, толерантністю до несприятливих складних промислових умов, таких як високі концентрації субстрату та низький рН. Це поєднання природної метаболічної здатності, збільшеної регульованим мутагенезом та генетичними маніпуляціями до надмірної продуктивності, стійкості, безпеки та генетичної адаптивності робить його ідеальним для великомасштабного виробництва ВСАА.

Щодо використання *E. coli* як продуцента ВСАА відомо, що загальні шляхи біосинтезу, способи керування процесом та напрями удосконалення виробництва ВСАА дуже схожі з *C. glutamicum*. Ймовірно тому загальний огляд процесу біосинтезу та його особливостей в джерелах літератури в основному стосується робіт зі штамми *C. glutamicum*. [1, 8-11, 18]

Традиційні штами *C. glutamicum* виробляють промислову кількість ВСАА за допомогою випадкового мутагенезу та скринінгу. Однак випадкові мутації в геномі бактерії можуть призвести до фізіологічних змін, інгібування швидкості росту та накопиченню токсичних побічних метаболітів. Бажані властивості, отримані у такий спосіб, не зберігаються у поколіннях, та сверждатність виробляти ВСАА втрачається. Тому розроблювалися інші шляхи для створення стабільно високопродуктивних штамів. [8, 9, 18]

Виходячи зі свого генетичного походження, доброї вивченості та наявності сучасних наборів інструментів та методик маніпулювання генами, *C. glutamicum* є джерелом нових штамів, удосконалених для збільшення виробництва ВСАА.

Усі ВСАА можна виробляти з глюкози як вихідного матеріалу для процесу біосинтезу. Проміжним продуктом є універсальний центральний метаболіт піруват, від якого походять Leu, Ile та Val. Шляхи їх біосинтезу мають спільні ключові ферменти, такі як синтаза ацетогідроксикислоти (AHAS) та інші ферменти.

Відомо багато стратегій отримання удосконалених надпродуцентів ВСАА. Наприклад, фермент AHAS каталізує конденсацію двох молекул пірувату при синтезі Val та Leu та однієї молекули пірувату та 2-кетобутирату у синтезі Ile, тобто цей фермент сприяє одночасному утворенню ВСАА, але їх співвідношення неоднозначне. Природні штами *C. glutamicum* схильні до накопичення Ile. Крім того, активність AHAS зворотно регулюється ВСАА, при їх накопиченні пригнічується. Найпотужнішим інгібітором активності є Val. Створення мутантних штамів з введенням мутацій і у регуляторну, і у каталітичну субодиницю фермента дає можливість полегшення або послаблення інгібування зворотного зв'язку, підйому або зниженню титрів окремих амінокислот. Це, окрім набуття здатності до надсинтезу, може задовольнити потреби споживачів у комплексі

ВСАА певного складу. Так, на ринку найбільший попит на суміш лейцин:ізолейцин:валін 2:1:1. [8, 9, 15-18]

Наведеними керованими мутаціями виробництво ВСАА було дещо покращено, хоча інгібування зворотного зв'язку не було повністю усунено. Тому роботи з модифікації АНАС продовжуються з використанням інших підходів. Наприклад, запропоновано регуляторну субодиницю АНАС *C. glutamicum* замінити регуляторною субодиницею АНАС *Escherichia coli*, яка не має зворотного інгібування валіном і не впливає на активність АНАС. Проведення модифікацій регуляторних і каталітичних субодиниць фермента, в тому числі із застосуванням фрагментів подібних ферментів інших продуцентів, може призвести до отримання нового мутантного штаму-продуцента ВСАА з потужною каталітичною активністю та стійкістю до інгібування зворотного зв'язку. [8, 9, 18]

Отже, продовжується розвиток стратегій метаболічної інженерії для подолання бар'єрів, пов'язаних з біосинтезом ВСАА у промислово значущих штамів-продуцентів, насамперед *C. glutamicum*, для сприяння керованого синтезу ВСАА та задовільнення потреб споживачів.

Висновок до I розділу

В розділі розглянуто фізіологічні та метаболічні властивості незамінних амінокислот з розгалуженим ланцюгом, напрями їх застосування в секторах спортивної підготовки, охорони здоров'я, харчування та у годівлі тварин. Проаналізовано та структуровано ринок продуктів на основі ВСАА в Україні та за рубежом, виявлено основні тенденції в індустрії спортивного харчування та фітнесу, а також функціональних продуктів харчування та напоїв з додаванням ВСАА. Проаналізовано способи отримання ВСАА біотехнологічним методом та окреслено перспективи робіт в цьому напрямі.

Виявлено, що дослідження з розробки способів отримання засобів для спортивного харчування на основі амінокислот з розгалуженим ланцюгом є перспективним напрямом та має значення для поповнення вітчизняного ринку актуальними спеціалізованими продуктами спортивного харчування.

РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1 Амінокислоти з розгалуженим ланцюгом.

Амінокислоти з розгалуженим ланцюгом (BCAA) — лейцин (Leu), ізолейцин (Ile) і валін (Val) — займають особливу позицію не тільки завдяки своїй фізіологічній дії, а й унікальним структурним властивостям.

Ile, Leu і Val відносять до амінокислот з «розгалуженим ланцюгом» завдяки наявності в їхній структурі аліфатичних бічних ланцюгів з монометильним відгалуженням (рис. 2.1). Val (брутто-формула $C_5H_{11}NO_2$) має таку структуру з п'яти атомів вуглецю. Ile і Leu (брутто-формула $C_6H_{13}NO_2$) мають ідентичний набір атомів у молекулі, але різне просторове їх розташування, тобто мають ізомерні відмінності через знаходження метильної групи, яка є центром розгалуження — або в положенні 4, або у положенні 4.

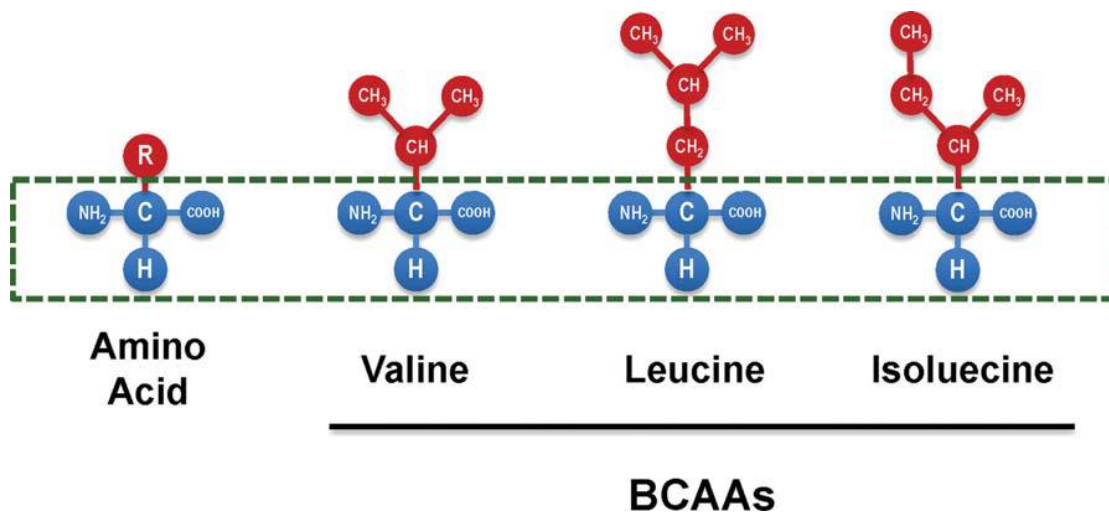


Рис. 2.1. Структура BCAA. [19]

Нами було розглянуто такі особливості, як ізомерія, розчинність, фізико-хімічні властивості, шляхи біосинтезу Ile, Leu і Val, які важливі в контексті технології мікробного синтезу BCAA.

Ізомерія BCAA

BCAA можуть утворювати конституційні та стереоізомери

Конституційні ізомери, або структурні ізомери, — це сполуки, які мають однаковий набір атомів у молекулі, але їх розташування відрізняється.

Таку форму ізомерії демонструють Leu та Ile. Крім того, конституційні ізомери ВСАА – амінокислоти з нерозгалуженим ланцюгом норлейцин і норвалін виявляють зовсім інші метаболічні властивості. Вони не задіяні у синтезі білка і є непротеогенними. Це треба брати до уваги при використанні *E. coli* як продуцента у процесі отримання ВСАА, тому що норлейцин і норвалін можуть утворюватися як побічні продукти метаболізму неправильно включатися в рекомбінантні білки, що буде створювати серйозну проблему для фармацевтичної промисловості. Такі шляхи перетворень та неправильні включення інтенсивно досліджуються. [1, 11, 18]

Наприклад, Гарсія та ін. показали, що вплив глюкози та пірувату у поєднанні з обмеженням кисню призвели до небажаного синтезу норваліну та норлейцину в кишковій паличці, а пізніше продемонстрували, що модулювання експресії генів, залучених у біосинтетичний шлях ВСАА, може зменшити накопичення та, як наслідок, неправильне включення цих речовин. неканонічні ВСАА. Такі дослідження є дуже важливими для розробки нових великомасштабних процесів біосинтезу ВСАА, щоб уникнути проблем із неправильним метаболізмом із самого початку. Завданням є відбір штамів бактерій, які демонструють кращий профіль чистоти продукту, тобто зменшене неправильне включення неканонічних ВСАА, таким чином забезпечуючи вищу якість продукту. [21]

Сtereоізомери, як відомо — це також сполуки, що мають однаковий набір атомів у молекулі, але їх просторове розташування відрізняється. Усі α -амінокислоти, крім гліцину, мають хіральний центр у α -вуглецю. У біологічних системах амінокислоти, що беруть участь у синтезі білків, існують переважно у вигляді L-енантіомери, або S-енантіомерів. Val та Leu мають, таким чином по два енантіомери L-форму та D-форму. А має ще один хіральний вуглець у β -положенні, що обумовлює наявність чотирьох стереоізомерів. А серед них лише L-ізолейцин у 2S,3S-конфігурації є біологічно активним та бере участь у синтезі білка. 2S,3R-Сtereоізомер, який має назву аллоізолейцин (alle), також зустрічається у здорових людей у

невеликих кількостях. Алоізолейцин та ізолейцин є діастереомерами (тобто стереоізомерами, які не є енантіомерами), і це впливає на їх функції в організмі. Так, при вроджених порушеннях метаболізму, таких як хвороба сечі кленового сиропу (MSUD) спостерігається наявність аномальних концентрацій алоізолейцину, що вважають порушенням метаболічних шляхів та характерним симптомом (або патогномонічним) для MSUD. [1, 21, 22]

Схематичне зображення просторової конфігурації BCAA наведено на рис. 2.2.

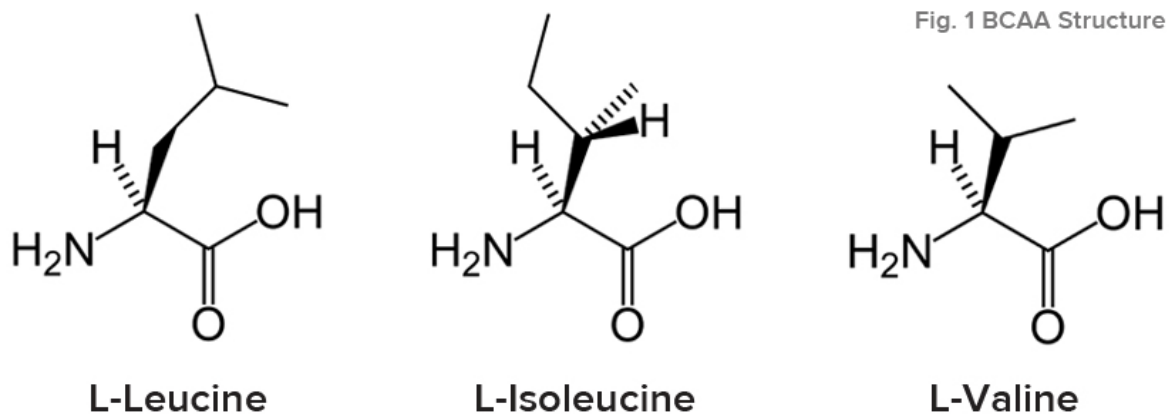


Рис. 2.2. Схематичне зображення просторової конфігурації BCAA. [20]

Розчинність BCAA

Давно відомо, що BCAA є малорозчинними сполуками. Як і у інших амінокислот, їхня розчинність залежить від рН і є найнижчою у воді поблизу їх ізоелектричної точки, коли молекула є електронейтральною або цвіттер-іоном, і є найвищою при кислих або лужних значеннях рН через утворення катіонної або аніонної форми амінокислоти. [1]

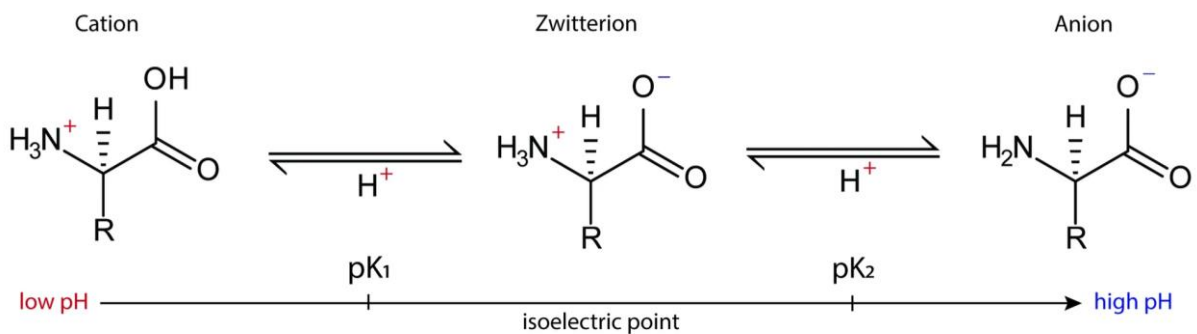


Рис. 2.3. Іонні форми амінокислот та їхні перетворення в залежності від рН. [1]

Розуміння такої залежності розчинності від рН є важливим при розробці технологічного процесу, а саме: процесу приготування, відділення з культуральної рідини та очищення. Не менш важливою характеристикою є розчинність ВСАА при визначенні форми готового продукту. Особливо це стосується дієтичних добавок на основі ВСАА для споживання людьми, зокрема спортсменами, і погана розчинність може обумовлювати виклики при складанні таких продуктів у рідкій формі. Тому більша частина засобів з ВСАА випускається у порошкоподібних формах, капсулах та таблетках. Але, біодоступність амінокислот в нерозчинному стані менше, ніж в розчинному, тому багато досліджень спрямовують на розробку наносуспензій або біополімерів для покращення солюбілізації ВСАА, або отримання похідних Ile, Leu і Val, які були б водорозчинними, а значить, мали кращу біодоступність. [1, 5, 15-17]

В ході анаболічних та катаболічних процесів амінокислоти з розгалуженим ланцюгом утворюються та розкладаються. Кетокислоти та N-лактоїлпохідні Ile та Leu, виявилися для заміни цих амінокислот у складі живильних середовищ в біопроцесах наступного покоління, спрямованих на виробництво моноклональних антитіл. Як альтернатива, стратегії складання живильних середовищ спрямовували на підвищення розчинності Leu, наприклад шляхом розчинення його в розчині аміаку для культивування кишкової палички. [1, 8, 9, 11]

Розуміння розчинності також необхідне для розробки процесів концентрування та очистки від домішок. Величина розчинності визначає початкову кількість речовини, яка може бути розчинена, і кінцеву кількість речовини, що залишається в розчиннику після процесу. Таким чином, дослідження розчинності ВСАА в різних сумішах, в т.ч. органічних розчинниках також не втрачає актуальності. [23-24]

2.2 Метаболічні шляхи синтезу ВСАА.

Для організації біосинтезу ВСАА у промислових умовах необхідно розуміння механізмів утворення цих амінокислот в клітинах продуцентів, що дасть змогу спрямовано конструювати високопродуктивні штами, які могли б стабільно генерувати промислові кількості ВСАА.

На рис. 2.4 представлено шляхи біосинтезу ВСАА у найбільш відомої «робочої конячки» у виробництві амінокислот - *Corynebacterium glutamicum*. Ile, Leu і Val утворюються від двох попередників - центрального метаболіту пірувату та 2-кетомасляної кислоти, яка, в свою чергу, утворюється з L-треоніну. Треонін є продуктом перетворення оксалоацетату, а останній з'являється в процесі гліколізу з проміжного продукту – фосфоенолпірувату. Тому можна сказати, що для утворення ВСАА необхідна глюкоза як вихідний матеріал біосинтезу.

Ключові ферменти синтезу всіх трьох амінокислот такі:

- синтаза ацетогідроксикислоти (AHAS),
- ізомероредуктаза ацетогідроксикислоти (KARI),
- дегідратаза дигідроксикислоти (DHAD)
- амінотрансфераза (BCAT).

Дві молекули пірувату каталізуються ферментом AHAS з утворенням 2-ацетолактату, який є попередником Val. Ацетолактат послідовно каталізується KARI і DHAD з утворенням 2-кето-3-метилбутирату. Амінотрансфераза BCAT далі каталізує перетворення 2-кето-3-метилбутирату до Val. [1]

Ізопропілмалатсинтаза (IPMS) конкурує з BCAT за 2-кето-3-метилбутират, який вона перетворює до 2-ізопропілмалату, додаючи ацетильну групу. Потім фермент α -ізопропілмалатізомераза (IPMI) ізомеризує 2-ізопропілмалат до іншої ізомерної форми. Наступний фермент α -ізопропілмалатдегідрогеназа (IPMDH) каталізує окисне декарбоксилювання і утворює 2-кето-4-метилпентанову кислоту,

попередника Leu. Отримана кетокислота перетворюється за допомогою ферменту BCAT на Leu. [25, 26]

Біосинтез Іле відбувається з іншого попередника – L-треоніну. Якщо слідкувати за його походженням, то схема його утворення така: фосфоенолпіруват або піруват перетворюється на оксалоацетат, який після багатоступінчастого ферментативного процесу утворює L-треонін. Ця амінокислота каталізується треоніндегідратазою/дезаміназою (TD) до 2-кетобутирату (2-кетомасляної кислоти).

Той же фермент АНАС, що задіяний в утворенні Val, каталізує перетворення пірувату та 2-кетомасляної кислоти на 2-ацето-2-гідроксибутират, який далі каталізується KARI і DHAD та утворює 2-кето-3-метилпентанову кислоту, яку фермент BCAT і перетворює на Іле.

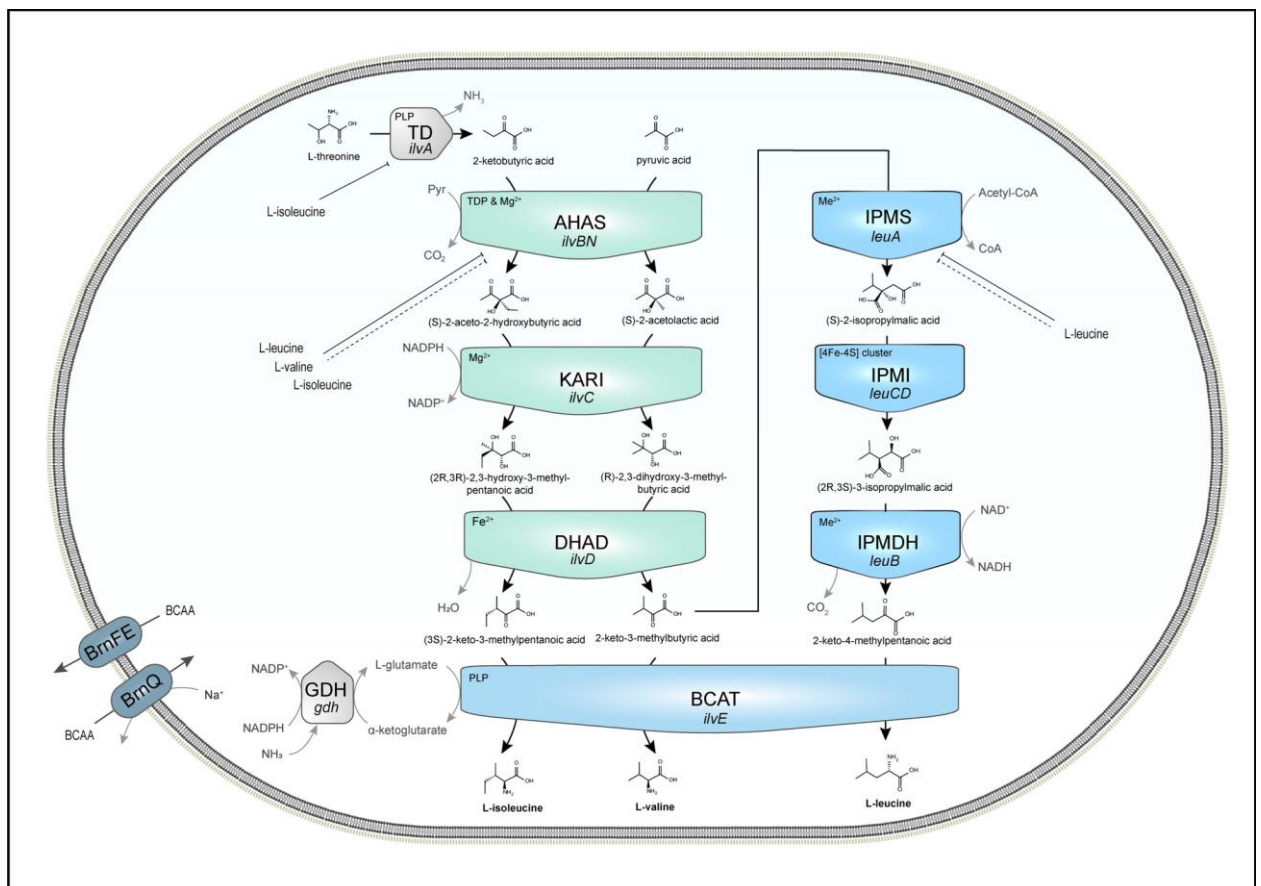


Рис. 2.4. Шляхи біосинтезу Іле, Leu і Val. [1]

Загальним в цих ланцюжках ферментативних перетворень є утворення кетокислот та їх трансамінування за допомогою фермента аміотрансферази з розгалуженим ланцюгом (BCAT). Донором аміногрупи є глутамат, який

регенерується ферментом глутаматдегідрогеназою (GDH) в присутності аміаку та NADPH. [25, 26]

На рис. 2.4 позначено потрапляння та відтік BCAA за допомогою транспортерів BrnQ і BrnFE. Суцільними лініями позначено пригнічення зворотного зв'язку, пунктирними – аттенуація транскрипції.

До особливостей біосинтезу BCAA можна віднести:

- для ферментативних реакцій з AHAAS: утворення діоксиду вуглецю, залежність від кофакторів – тіаміндифосфату та іонів магнію (II). Спостерігається інгібування цього ферменту надлишком Ile або всіх трьох BCAA. Надлишок BCAA також інгібує транскрипцію фермента;
- для ферменту KARI: реакція проходить з відновленням нікотинамідаденіндинуклеотидфосфату у його відновленій формі (NADPH) в присутності іонів магнію (II);
- для DHAD: це залізо-сірчаний кластерний фермент, для каталізування потребує присутності двовалентних іонів (залізо (II));
- BCAT інгібується за механізмом зворотного зв'язку Ile або всьома BCAA, потребує присутності піридоксальфосфату (PLP);
- IPMS потребує як кофактори іони металів (II), чутливий до впливу зворотного зв'язку та піддається ослабленню транскрипції через накопичення Leu;
- IPMI є ферментом кластерного білка [4Fe–4S];
- IPMDH працює, відновлюючи нікотинамідаденіндинуклеотид (NAD +) до НАДН. [1, 9, 11, 18, 25, 26]

Висновок до 2 розділу:

Були розглянуті властивості амінокислот з розгалуженим ланцюгом, які необхідно урахувати при плануванні процесів їхнього біосинтезу за допомогою мікроорганізмів-продуцентів, та подальшої організації післяферментаційних етапів очистки та отримання готового продукту, наприклад, у вигляді засобу для спортивного харчування.

РОЗДІЛ 3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

3.1. Біотехнологічні підходи до виробництва ВСАА.

Біотехнологія використовується у виробництві багатьох продуктів, таких як домашні продукти, страви, ліки та хімічні речовини.

Використання природних речовин, зокрема ВСАА, для виробництва харчових та дієтичних добавок, в тому числі продуктів спортивного харчування, та їхнє природне мікробне виробництво за допомогою ферментативних біотехнологічних підходів набувають все більшого розповсюдження. Біотехнологія відіграє вирішальну роль в оптимізації умов ферментації для максимізації виходу та якості цільових сполук. Переваги мікробного виробництва включають можливість використання відновлюваної сировини, високий вихід продукції та потенціал економічно ефективного великомасштабного виробництва. Таке виробництво є екологічнішим порівняно з хімічним синтезом, оскільки зменшує залежність від нафтохімії та мінімізує відходи. Переваги, безпека та ефективність виробництва мікробних продуктів має вирішальне значення. Розуміння чіткої інформації про наукові дослідження щодо мікробних виробництв може допомогти вирішити завдання щодо промислового отримання будь-яких цільових продуктів, в тому числі амінокислот з розгалуженим ланцюгом, попит на які у харчовій, фармацевтичній та спортивній індустріях неухильно зростає. Тому і розробка ефективних методів їх мікробіологічного синтезу набуває особливої актуальності. [1, 3-8, 10-12, 25-27]

Основні біотехнологічні підходи до отримання мікробних метаболітів можна систематизувати за двома напрямками: оптимізація штамів мікроорганізмів-продуцентів та оптимізація умов культивування.

3.2. Аналіз продуцентів ВСАА та шляхів їх удосконалення.

З літературних джерел відомо використання різних мікроорганізмів - промислових продуцентів як комплексу ВСАА, так і окремо амінокислот з розгалуженим ланцюгом Leu, Ile та Val.

Як батьківські штами мікроорганізму можуть застосовуватися мікроорганізми сімейства ентеробактерій, такі як бактерії *Escherichia*, *Pantoea*, або бактерії роду *Corynebacterium*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Erwinia*, *Salmonella* і *Morganella* тощо. Крім цих, можуть застосовуватися бактерії роду *Brevibacterium*, асимілюючі метанол бактерії, як *Methylophilus* та *Methylobacillus*, які здатні продукувати L-амінокислоти з метанолу. Далі, приклади батьківських штамів включають і дріжджі, що належать до роду *Saccharomyces*, *Candida* тощо.

Saccharomyces cerevisiae та інші дріжджі використовуються для виробництва ВСАА, хоча їх продуктивність нижча порівняно з бактеріальними штамми. Але перевагою їх використання є статус GRAS (Generally Recognized As Safe) та здатність до росту на різноманітних субстратах.

Такі штами можуть природньо мати ген-експортер основних L-амінокислот або можуть не мати, але набути здатність експортувати L-амінокислоти після введення цього гену.

Основними промисловими продуцентами ВСАА є представники роду *Corynebacterium*, зокрема *C. glutamicum*. Також промислово цікавими є певні штами *Escherichia coli*. Ці бактерії-продуценти характеризуються високою продуктивністю та здатністю до надсинтезу амінокислот ВСАА. [8, 9, 11, 18, 25, 26]

Corynebacterium glutamicum є класичним виробником лейцину, ізолейцину та валіну завдяки своїм здатностям до ферментації глюкози та інших субстратів.

Escherichia coli широко використовується в промисловості завдяки її генетичній пластичності. Рекombінантні штами *E. coli*, створені шляхом генетичної інженерії, дозволяють значно збільшити продукцію ВСАА за рахунок перенаправлення метаболічних потоків на біосинтез цільових амінокислот.

Шляхи удосконалення мікроорганізмів для підвищення їх продуктивності можна класифікувати по різному. Один зі способів такий:

1. **Поліпшення штаму.** Включає відбір за допомогою *методів селекції* штамів мікробів та *генетичну їх модифікацію* для посилення виробництва бажаних метаболітів. Це може включати такі методи, як мутагенез, технологія рекомбінантної ДНК або редагування геному для маніпулювання метаболічними шляхами мікроорганізмів. [9, 11, 26]
2. **Метаболічна інженерія:** метаболічна інженерія передбачає маніпулювання метаболічними шляхами мікроорганізмів для перенаправлення їх метаболічного потоку на виробництво специфічних вторинних метаболітів. Цього можна досягти шляхом надмірної експресії ключових ферментів; видалення або зниження регуляції конкуруючих шляхів; або введення генів інших організмів для підвищення продуктивності. [1, 5, 6, 9, 18, 25-27]
3. **Синтетична біологія:** методи синтетичної біології дозволяють проектувати та конструювати нові генетичні схеми в мікроорганізмах для виробництва цільових метаболітів. Цей підхід передбачає поєднання генетичних частин, таких як промотори, регуляторні елементи та ферменти, для створення нових метаболічних шляхів або посилення існуючих. [1, 26-28]
4. **Дослідження генома та біоінформатика:** Дослідження генома передбачає ідентифікацію потенційних кластерів генів цільових метаболітів у геномах мікроорганізмів за допомогою інструментів біоінформатики. Цей підхід допомагає у відкритті нових сполук і полегшує характеристику біосинтетичних шляхів, залучених до їх виробництва. [27, 29-31]

Ці біотехнологічні підходи пропонують великий потенціал для виробництва мікробних цільових метаболітів. Вони дозволяють оптимізувати та нарощувати виробничі процеси отримання біологічно активних сполук з

різними застосуваннями в медицині, сільському господарстві та промисловості.

Нами було розглянуто деякі з цих методів, які використовують у виробництві ВСАА за допомогою ферментативних біотехнологічних процесів.

Генетичні модифікації для підвищення продуктивності штамів

Генетична інженерія є основним методом удосконалення продуцентів ВСАА. Удосконалення штамів здійснюється через:

- Метаболічну інженерію, що спрямована на збільшення потоку вуглецю до біосинтезу амінокислот шляхом надекспресії генів, відповідальних за виробництво ВСАА.
- Елімінацію конкурентних шляхів, що дозволяє зменшити витрати ресурсів на небажані метаболіти.
- Оптимізацію регуляторних механізмів, зокрема шляхом введення мутацій у регуляторні гени, що контролюють біосинтез лейцину, ізолейцину та валіну.

Метаболічна інженерія для підвищення продуктивності штамів

Оптимізація метаболічних шляхів включає:

- Перенаправлення потоків вуглецю;
- Балансування кофакторів;
- Зниження побічного метаболізму;
- Підвищення стійкості до продукту або пригнічення зворотнього зв'язку.

В роботах досліджували вплив мутацій на активність і транскрипцію ключових ферментів синтезу ВСАА, зменшення конкурентного споживання пірувату, наприклад, за допомогою модифікації ферментів циклу трикарбонових кислот (ТСА), зниження доступності Ацетил-КоА, оптимізації окисно-відновного балансу підвищенням внутрішньоклітинних рівнів NADPH. Зміни специфічності ферменту для NADPH на NADH шляхом модифікації KARI та введення NAD^+ -залежної Leu дегідрогенази з

Lysinibacillus sphaericus замість ендогенного ВСАТ для процесу амінування. Покращення постачання кофакторів для найважливіших ферментів, регулювання транспортерів ВСАА з /всередину клітин. Аналіз штамів, що продукують ВСАА, з використанням геноміки, транскриптоміки, протеоміки та метаболоміки для виявлення важливої інформації для подальшої модифікації продуцентів для максимізації виробництва ВСАА. [1, 6, 8, 9, 11, 18, 25-31]

Цей перелік відображає основні напрями досліджень для удосконалення продуцентів ВСАА.

Так, в роботах [30, 31] досліджено два промислові амінокислотні штами *C. glutamicum*, отримані шляхом мутагенезу, для яких генетичні та метаболічні характеристики та ефективний механізм синтезу були неясні. В дослідженні визначено моделі транскрипції генів і рівні внутрішньоклітинних метаболітів мутанта I (*C. glutamicum* CP), що продукує Leu, Ile та L-лейцин, і мутант II (*C. glutamicum* XV), що продукує Val, у порівнянні з штамом дикого типу для розуміння ефективного механізму синтезу цільових ВСАА у цих мутантів. Високий внутрішньоклітинний рівень глюкози та низький внутрішньоклітинний рівень метаболітів у центральному метаболізмі вуглецю означав, що швидкість метаболізму глюкози у двох мутантів була нижчою, ніж у дикого типу. Однак підвищений внутрішньоклітинний рівень пентози та транскрипція генів у пентозофосфатному шляху (PPP) вказали на те, що цей шлях мутантів був більш активним. Крім того, мутанти продемонстрували вищий внутрішньоклітинний рівень NADPH, який є однією з умов метаболізму ВСАА (див. розділ 2). У специфічному шляху для синтезу Leu та Val рівень транскрипції більшості генів був підвищений у мутантів. Однак транскрипція трансамінази C, що кодує ген *Cgl2844*, була знижена в мутанті I, але посилена в мутанті II. Підвищена регуляція *Cgl2844* може сприяти синтезу Val та викликати значне зниження внутрішньоклітинного рівня L-аланіну та L-глутамату у мутанта II. Ці характеристики мутантів дозволяють зрозуміти,

які саме зміни можна зробити для оптимізації метаболічних шляхів виробництва Leu та Val.

Крім того, пропонується нова стратегія реконструкції центрального вуглецевого метаболізму та зменшення споживання пірувату без негативного впливу на ріст клітин шляхом введення мутантного H⁺/цитратного симпортера, отриманого з мутанту I. [30]

Повідомляється про виробництво Leu у стійких до аналогів мутантів, виділених із *Bacillus (Brevibacterium) lactofermentum* за допомогою випадкового мутагенезу, а потім уточненого за допомогою додаткових стадій мутагенезу або шляхом застосування підходів метаболічної інженерії до *C. glutamicum* [27].

Виробництво Ile може здійснюватися шляхом ферментації різними бактеріями, такими як класичні мутанти *C. glutamicum*, *S. marcescens*, *C. glutamicum ssp. Flavum*. Val виробляють сконструйовані бактерії, такі як *C. glutamicum* або *E. coli* [18, 27].

В роботі [29] сконструювали хромосомно модифіковану *Escherichia coli* для ефективного виробництва Val. По-перше, шлях синтезу L-валіну був посилений введенням стійкого до зворотного зв'язку фермента ANAS з *Bacillus subtilis* і надмірної експресії двох інших ферментів у шляху синтезу Val (KARI та DHAD). Для ефективного виведення Val було введено експортер із *Corynebacterium glutamicum* (на рис. 2.4 позначений BrnFE). Далі пул попередника пірувату був збільшений для полегшення процесу поглинання глюкози. Нарешті, щоб покращити баланс окислювально-відновного кофактора, фермент KARI замінили NADH-переважним мутантом, а фермент BCAT замінили лейциндегідрогеназою з *Bacillus subtilis*. Окисно-відновний баланс кофакторів дозволив штаму синтезувати Val в умовах обмеження кисню, значно підвищуючи вихід у присутності глюкози. Двоступенева періодична ферментація остаточного штаму дала в 5-літровому біореакторі найвищий титр і вихід Val, коли-небудь зареєстрований у *E. coli*. Стратегія системної метаболічної інженерії, описана

тут, корисна для майбутньої інженерії штамів *E. coli* для промислового виробництва Val та інших ВСАА.

Крім проведення подібних мутацій, ще одним важливим фактором, що впливає на виробництво ВСАА, є надходження прекурсорів. Прямим попередником синтезу ВСАА, а також є вихідним метаболітом циклу три карбонових кислот (ТСА) є піруват. Потік пірувату в природніх штамх існує у компромісі між синтезом ВСАА та циклом ТСА. Щоб запобігти входженню пірувату в цикл ТСА в штамх, що продукують ВСАА, були розглянуті можливості послаблення або видалення генів, що беруть участь у синтезі органічної кислоти з пірувату (наприклад, *tuзEigltA*). Однак такі генетичні модифікації зазвичай втручаються в метаболічну мережу клітини і, отже, призводять до значного та незворотного негативного впливу на ріст клітин [30]. Ці сконструйовані штамми часто мають пов'язані з цим недоліки в промисловому застосуванні, такі як довший час бродіння та погана адаптація до умов культивування. В *C. glutamicum* XV, цикл ТСА блокується на 2-кетоглутараті для стимулювання більшої кількості пірувату для синтезу ВСАА; однак це сильно впливає на ріст штаму. Альтернативним підходом для компенсації недостатності потоку ТСА може стати безпосереднє використання проміжних метаболітів ТСА. Було показано, що мутація симпортера H^+ /цитрат у *C. glutamicum* CP служила для більш ефективного транспортування позаклітинного цитрату в клітину, і це може бути використано для реконструкції центрального метаболізму вуглецю. Збільшення внутрішньоклітинного цитрату зменшить попит циклу ТСА на піруват і, отже, призведе до збільшення внутрішньоклітинної доступності пірувату.

Подібні дослідження описані в роботах [9, 18, 30].

Загалом можна відмітити, що мутанти, які досліджувалися різними вченими у всьому світі, як правило, мають одну або більше з таких характеристик:

- втрата здатності катаболізувати цільовий продукт,

- знижена транскрипційна репресія,
- інгібування зворотного зв'язку цільовим продуктом щодо ключових ферментів,
- висока експортна здатність продукту.

Однак кілька раундів випадкового мутагенезу можуть призвести до накопичення шкідливих або непотрібних мутацій, і ці небажані побічні мутації можуть призвести до ауксотрофії, дефіциту росту або низького споживання цукру, що може прямо чи опосередковано обмежити ефективність цільового продукту синтезу. Оскільки генотип цих штамів часто неясний, важко посилити недоліки росту або виробництва амінокислот шляхом метаболічної інженерії. Крім того, може бути важко ідентифікувати причинні мутації з безлічі мутацій, присутніх у таких штаммах. [27, 30, 31]

Окрім модуляції експресії ендогенних ферментів, безпосередньо залучених до біосинтезу ВСАА, продуцентів генетично модифікують для різних цілей. Наприклад, експресія ферментів, унікальних для синтезу Ile і Leu, таких як TD або IPMS, зменшують до каналу метаболізму до виробництва Val. Надмірна експресія ферментів збільшує їх загальну активність і виробництво ВСАА. Потенціалом для вдосконалення також є транспортні процеси, доступність субстрату та стійкість до інгібування зворотного зв'язку. Видалення носія поглинання BmQ і надмірна експресія експортного носія BmFE збільшують чистий відтік Ile і, таким чином, збільшують титр продукції приблизно на 50% (і навіть на 72 %) у партії з підживленням. Побічною перевагою збільшення витоку є зниження зворотного зв'язку контролю Ile щодо його біосинтезу через зниження внутрішньоклітинних концентрацій.

Стійкість до зворотного зв'язку специфічних ферментів у біосинтетичних шляхах ВСАА посилюють стійкими до зворотного зв'язку мутантними варіантами ферментів, наприклад мутанти IPMS для продукції Leu, мутант TD з підвищеним опором зворотного зв'язку для покращеного виробництва Ile. ANAS є ще одним ферментом, чутливим до контролю

зворотного зв'язку всіма ВСАА. Мутагенез цього ферменту, підвищивши його резистентність до зворотного зв'язку, підвищує виробництво Val. [1, 5-7, 9, 18, 25-31]

Здатність систематично використовувати продуктивні здібності мікроорганізмів і клітин і аналізувати кожен із їхніх окремих генетичних компонентів на генетичному рівні стала можливою лише завдяки прогресу в дослідженні геному. Завдяки ідентифікації ДНК як спадкової молекули та потенціалу цільової генетичної модифікації еволюційне метаболічне різноманіття живої природи тепер може бути особливо використано для промислових процесів. Тоді наука зможе зрозуміти, як природа створює різноманітність і як цю різноманітність можна застосувати до процедур, що застосовуються в промисловому виробництві [27].

3.3. Оптимізація технологічних процесів мікробного синтезу ВСАА.

Удосконалення виробництва ВСАА є важливим напрямом розвитку біотехнології, оскільки це сприяє підвищенню ефективності процесу, зменшенню витрат та покращенню якості кінцевого продукту.

Процеси ферментації продуцентів можна оптимізувати для максимізації виробництва потрібних метаболітів. Це включає:

- *оптимізацію складу живильного середовища* для підвищення доступності поживних речовин, забезпечення їх необхідної кількості та асортименту, для зниження собівартості технології;
- *оптимізацію умов культивування*, таких як температура, рН, рівень кисню та режими аерації та перемішування, стратегії підживлення;
- *вибір стратегії періодичної або безперервної ферментації* для підвищення продуктивності;
- *використання технологій omics*, які є системним біологічним методом аналізу на основі високопродуктивного виявлення та біоінформаційних технологій. Технології *omics* відображають глобальну транскрипцію, трансляцію та метаболізм організмів із багатьох масштабів і допомагають

визначити потреби клітини під час процесу виробництва (рис. 3.1). [1, 27, 32]

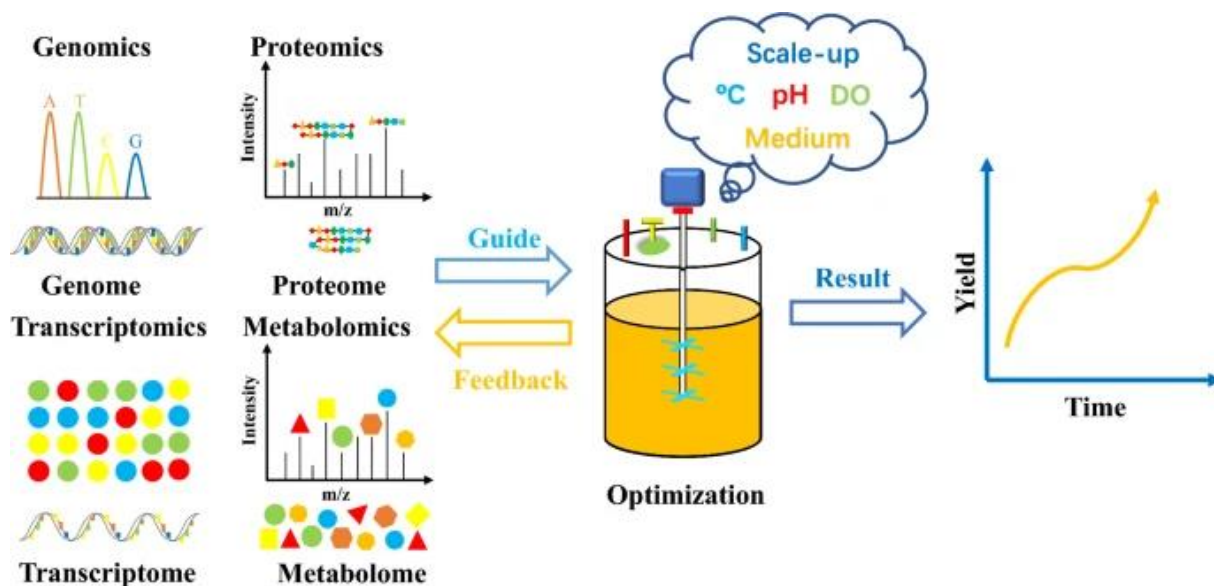


Рис. 3.1 Стратегія оптимізації мікробного виробничого процесу за технологіями omics. [32]

Живильні середовища для культивування продуцентів ВСАА відомі достатньо давно, всі вони містять традиційні компоненти, необхідні для певних видів мікроорганізмів-продуцентів. Більш детально їхні склади описано для кожного штаму з урахуванням їхніх потреб, які залежать від модифікації, якій було піддано мікроорганізм, від структури цільового продукту (комплекс ВСАА, бажане співвідношення в ньому амінокислот, або окремі амінокислоти з розгалуженим ланцюгом), а також ураховують економічні важелі, тобто використання більш дешевих видів сировини.

Наприклад, в роботі [30] для перевірки максимальної продукції штамів використовували напівсинтетичні середовища. Посівні культури культивували в середовищі, що містило (в г/л) 30,0 глюкози, 5,0 дріжджового екстракту, 30 мл кукурудзяного розчину, 2,0 калію фосфату однозаміщеного, 1,0 магнію сульфату гемігідрату. Ферментаційне середовище містило (в г/л) 80,0 глюкози, 2,0 дріжджового екстракту, 30 мл кукурудзяного розчину, 2,0 цитрату натрію, 2,0 г калію фосфату однозаміщеного, 1,0 магнію сульфату гемігідрату, 0,01 заліза (II) сульфату гемігідрату, 0,11 марганцю сульфату моногідрату, 0,01 тіаміну. Під час процесу ферментації рН підтримували на

рівні 7,0, корегування здійснювали розчином гідроксиду амонію 250 мл/л, а концентрацію глюкози в культурі підтримували на рівні не нижче 20 г/л шляхом підживлення глюкозою (800 г/л). При необхідності додавали 50 мМ цитрату натрію. [30]

Важливим аспектом підвищення ефективності виробництва ВСАА є оптимізація умов культивування мікроорганізмів. Використання біореакторних систем з контролем параметрів, таких як рН, температура, аерація та концентрація субстратів, дозволяє збільшити вихід цільових продуктів.

Застосування технологій безперервної ферментації (continuous fermentation) з використанням генно-модифікованих продуцентів дозволяє досягати значно вищих концентрацій ВСАА у культуральному середовищі порівняно з традиційними методами періодичної ферментації. Це сприяє зниженню витрат на виробництво та підвищенню економічної ефективності процесу. [1, 27-29]

Масштабовані процеси бродіння використовуються для культивування продуцентів в контрольованих умовах, забезпечуючи їх необхідними поживними речовинами та оптимальним середовищем для росту. Коли бактерія росте та метаболізує джерело вуглецю, вона виробляє та виділяє амінокислоти ВСАА у ферментаційний бульйон. Потім накопичені амінокислоти можна виділити та очистити для різних цілей, включаючи харчові добавки, продукти для спортивного харчування, фармацевтичні препарати та інші промислові застосування. Специфічні методи екстракції та способи вилучення можуть відрізнятися залежно від типу бактерій, цікавих амінокислот і бажаного рівня чистоти. Амінокислоти ВСАА отримують з культуральної рідини різними загальноприйнятими методами, серед яких:

- *Осадження*: Для концентрування та відділення амінокислот від культуральної рідини (або рідкого екстракту після руйнування клітин) можна використовувати методи осадження. Найпоширенішим підходом є доведення рН розчину до ізоелектричної точки цікавих амінокислот, щоб

вони стали нерозчинними та випали в осад. Амінокислоти, що випали в осад, можна потім відокремити центрифугуванням або фільтруванням.

- *Хроматографія*: методи хроматографії, такі як іонообмінна хроматографія або високоефективна рідинна хроматографія (ВЕРХ), часто використовуються для подальшого очищення та розділення певних амінокислот. Ці методи використовують відмінності в заряді, розмірі або гідрофобності амінокислот, щоб розділити їх на окремі компоненти.
- *Знесолення*: якщо екстраговані амінокислоти містять високий рівень солей або інших домішок, можуть знадобитися етапи знесолення. Цього можна досягти за допомогою діалізу або використання знесолювальних колонок, які видаляють солі та інші малі молекули, залишаючи очищені амінокислоти. [1, 27]

Підбір методів очистки ВСАА залежить від завдань цього процесу, а саме, від того, якої ступені чистоти треба досягати для цільового продукту (для харчового використання, кормового або фармацевтичного, або для обримання окремих кислот ВСАА з різним рівнем чистоти для хімічного або аналітичного використання). Бульйон, збагачений ВСАА та іншими продуктами метаболізму, повинен пройти кілька етапів очищення.

При необхідності розділити ВСАА в промислових масштабах ефективна *селективна кристалізація*, оскільки три ВСАА демонструють унікальну розчинність і кристалізацію в середовищах з різним рН. При рН 1-2 кристалізується Leu, а потім кристалізується Ile за більш суворих умов, як охолодження від 70 °C у присутності концентрованої соляної кислоти. Val отримують із залишкового маточного розчину за допомогою естерифікації та фракційної дистиляції. Були досліджені інші методи, такі як кристалізація під високим тиском. Перевага методу полягає в тому, що під тиском уникається термічне розкладання розчиненої речовини під час кристалізації шляхом нагрівання. У таких процесах кристалізації розчинність при високому тиску є важливою базовою властивістю, що вимагає точної інформації про розчинність.

Методи кристалізації забезпечують бажану конфігурацію кристалів. Як термодинамічні, так і кінетичні фактори відіграють роль у кристалізації, і введення різних умов, таких як розчинники або добавки, може призвести до утворення різноманітних поліморфних структур.

Використання *специфічних комплексів іонів металів* – це окремий шлях для розділення ВСАА. Удосконалено методи, які ґрунтуються на диференціальній розчинності Leu та Ile при утворенні комплексів з міддю в метанолі. Вони засновані на фракційній кристалізації з використанням солей міді або нікелю цих амінокислот при чергуванні відносно низьких та високих рівнів рН у кислотному діапазоні.

Іонообмінна хроматографія є ще одним стовпом у режимі очищення. Використовуючи відмінні заряди ВСАА при різних рівнях рН, ці методи сприяють розділенню їх на основі спорідненості із зарядженою смолою в колонці. Цей метод дає високу ступінь очищення, його часто використовують як стадію полірування, гарантуючи, що продукт вільний від інших забруднень та інших ВСАА.

Подальші процеси, такі як *знебарвлення активованим вугіллям, тонка фільтрація та сушіння*, забезпечують найвищу чистоту кінцевого продукту.

Звичайно, суворі заходи контролю якості та аналітика є найважливішими на цих етапах. Вони необхідні, щоб підтвердити відсутність будь-якого перехресного забруднення ВСАА та переконатися, що кінцевий продукт відповідає запланованим показникам якості та чистоти.

Таким чином, незважаючи на те, що структурна подібність ВСАА створює проблему для їх очищення, поєднання методів кристалізації, іонообмінної хроматографії та ретельної обробки забезпечує ефективне розділення та очищення комплексу ВСАА або кожної амінокислоти, одержуючи продукти найвищої чистоти. [1, 8, 11, 27-29]

3.4. Вибір форми засобу спортивного харчування.

Як було зазначено в розділі 2, продукти спортивного харчування випускаються у таких формах: порошок, капсули, таблетки, рідина та жувальні цукерки. Сегмент порошкових форм при цьому є найбільший. Але нашу увагу привернула така форма порошоків з ВСАА, як мікрокапсульовані порошки.

Сучасні виробники функціональних продуктів, добавок дієтичних, лікарських препаратів постійно запроваджують нові технології виробництва, основним завданням яких є забезпечення безпеки, підвищення ефективності та споживчих характеристик продуктів. Одним з найбільш перспективних методів контролю властивостей біологічно активних речовин є інкапсуляція в оболонку. Технології інкапсуляції мають багату історію і широко застосовуються в хіміко-фармацевтичній промисловості, у хімічній, харчовій промисловості, сільському господарстві та інших галузях. Деякі з цих технологій можна використовувати для отримання твердих порошкоподібних лікарських та інших препаратів.

Інкапсуляція (від лат. *Capsula* - коробка) – це укладення дрібних частинок твердого тіла, їх агрегатів (гранул) або крапель рідини в досить тонку міцну оболонку або в матрицю з різними заданими властивостями, як-то: проникність, температура плавлення, здатність розчинятись або не розчинятись в різних середовищах та ін. У фармацевтичній промисловості є процеси інкапсуляції у великі желатинові капсули (0,5-1,5 см) та процеси мікрокапсуляції, які дозволяють отримати капсули розміром 10^{-1} - 10^{-4} см. Інкапсуляція активних речовин проводиться з метою запобігання нестабільних сполук від впливу шкідливих факторів навколишнього середовища (вітамінів, антибіотиків, ферментів, вакцин, сироваток та ін.); маскування смаку гірких речовин; забезпечення вивільнення активної речовини на певній ділянці шлунково-кишкового тракту (кишкові мікрокапсули); забезпечення тривалої дії препарату, а саме, підтримання певного рівня активного компонента в організмі та його ефективний

профілактичний, функціональний або терапевтичний ефект протягом тривалого часу завдяки повільному вивільненню малих доз активного компонента; поєднання речовин, несумісних між собою, в одному засобі; переведення рідин і газів у псевдотвердий стан, тобто у сипучу масу, що складається з твердокрилих мікрокапсул, наповнених рідкими або газоподібними лікарськими речовинами; полегшення ковтання; удосконалення після обробки, особливо у високошвидкісних лініях пакування.

Деякі загальні характеристики інкапсулюючих агентів полягають у тому, що він нерозчинний і не реагує з матеріалом серцевини, має розчинність у харчовій системі кінцевого продукту та може витримувати високотемпературну обробку. Деякі типові агенти інкапсуляції - це декстрини, камеді, крохмаль, похідні целюлози, полісахариди з вільними карбоксильними групами, такими як альгінова кислота та білки.

Однією з істотних сфер використання харчових біорозкладних полімерів є мікроінкапсулювання харчових добавок (таких як вуглеводи, амінокислоти, вітаміни та електроліти) з контрольованим вивільненням. Харчові добавки можуть доставлятися переважно тривалим і розширеним способом для досягнення максимальної спортивної продуктивності та відновлення. [33-35]

Нами запропоновано використання технології інкапсулювання для отримання продукту спортивного харчування з ВСАА, що забезпечить повільне вивільнення ВСАА, однорідність розміру частинок, хорошу текучість, маскування гіркого смаку ВСАА. Дослідження фармакокінетики подібного продукту виявили, що 40% ВСАА виділяється в шлунковий сік за 4 години, та 40% виділяється в кишковий сік ще через 4 години, за 8 годин вивільнюється до 80,2% інкапсульованих амінокислот (див. рис. 3.2).

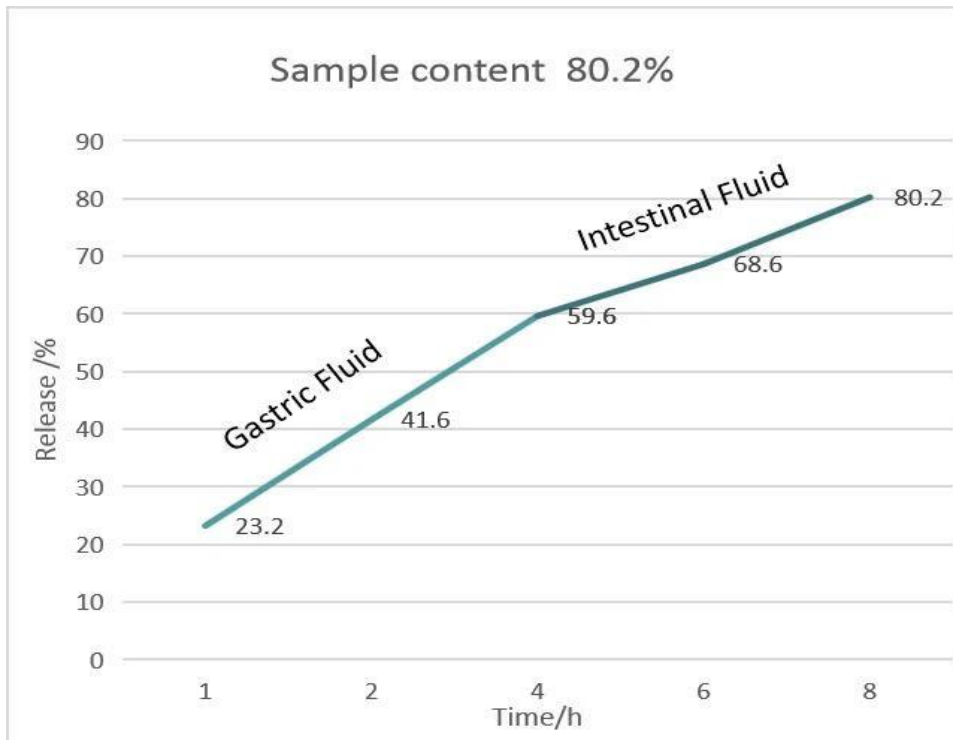


Рис. 3.2. Фармакокінетика вивільнення ВСАА з інкапсульованого стану. [35]

3.5. Схема технологічного процесу отримання засобу для спортивного харчування на основі амінокислот з розгалуженим ланцюгом.

На основі викладеного аналізу підвалин до виробництва засобів на основі амінокислот з розгалуженим ланцюгом нами запропоновано технологічна схема для організації вітчизняного виробництва препарату для спортивного харчування на основі ВСАА у формі інкапсульового порошку (рис. 3.3).

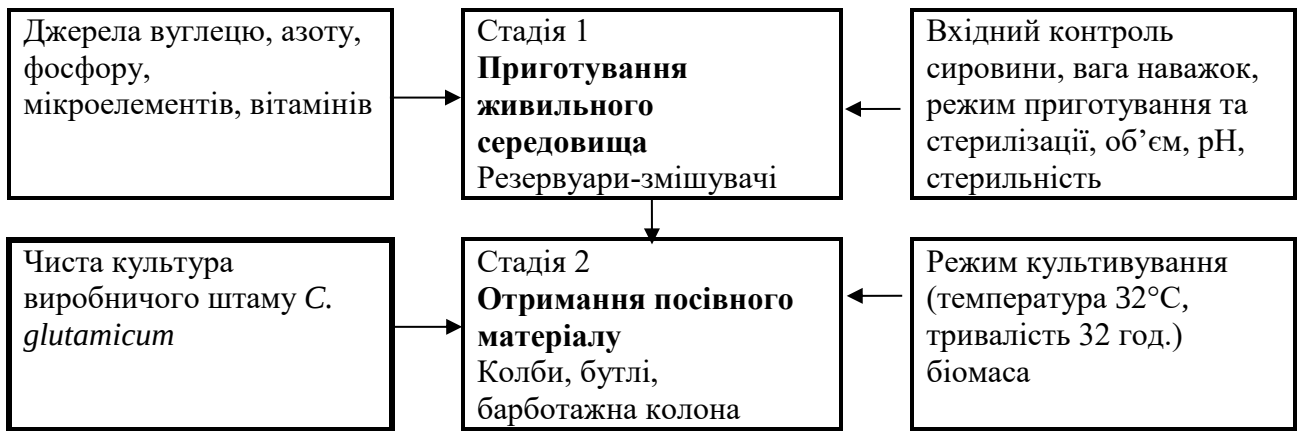
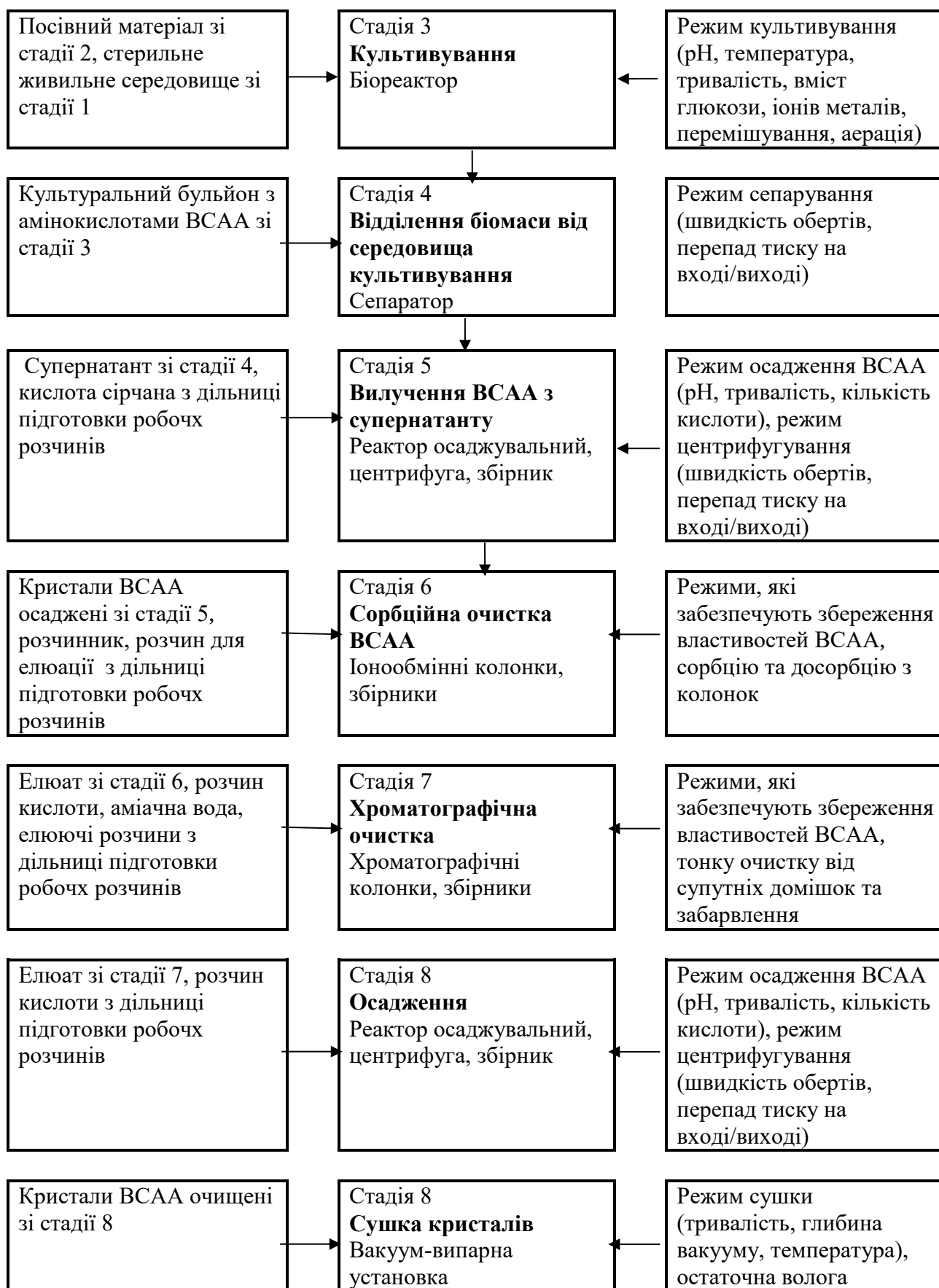


Рис. 3.3. Технологічна схема виробництва препарату для спортивного харчування на основі ВСАА у формі інкапсульового порошку.



Продовження рис. 3.3. Технологічна схема виробництва препарату для спортивного харчування на основі ВСАА у формі інкапсульового порошку.



Продовження рис. 3.3. Технологічна схема виробництва препарату для спортивного харчування на основі ВСАА у формі інкапсульованого порошку.

3.6. Напрями подальших досліджень.

Виклики та перспективи удосконалення

Хоча нинішні методи виробництва ВСАА є достатньо ефективними, існують певні виклики, пов'язані з подальшим удосконаленням процесів. Основними проблемами є:

- Акумуляція токсичних метаболітів, що може знижувати продуктивність мікроорганізмів.
- Стабільність рекомбінантних штамів, яка може зменшуватися через тривале культивування.
- Потреба в нових, більш стійких до стресових умов штамів, які могли б працювати в більш жорстких умовах і використовувати дешевші субстрати.

У майбутньому перспективним напрямом є розробка штамів-продуцентів, здатних синтезувати ВСАА з використанням відходів

сільського господарства або інших відновлюваних ресурсів. Це дозволить знизити собівартість продукції та сприяти розвитку екологічно чистих технологій.

Отже, можна сформулювати такі перспективні напрямки досліджень:

1. Моніторинг досліджень щодо розробки виробничих штамів продуцентів з заданими властивостями, наприклад, підвищеною стійкістю до високих концентрацій продукту для запобігання зворотнього зв'язку та збільшення продуктивності.
2. Застосування метаболічної інженерії для розробки продуцентів суміші ВСАА з заданими співвідношеннями або, навпаки, для отримання окремих амінокислот ВСАА.
3. Створення продуцентів, здатних використовувати дешеві субстрати.
4. Впровадження систем безперервної ферментації.
5. Аналіз досліджень щодо способів вилучення з культуральної рідини та подальшої очистки ВСАА для отримання продукту високої якості.
6. Розширення асортименту продуктів, що містять ВСАА, в тому числі для спортивного харчування.
7. Проведення експериментальних досліджень з розробки технологій отримання вітчизняних продуктів, які містять ВСАА, для широкого кола споживачів та заповнення відповідної ніши промислового сектора є найбільш вагомим напрямком.

Висновок до 3 розділу:

В розділі наведено переваги біотехнологічного способу виробництва ВСАА, аналіз видів продуцентів ВСАА, та визначення найбільш уживаних з них, шляхів та методів їх удосконалення, основними з яких виявлено генетичну модифікацію та метаболічну інженерію, структуровано та проаналізовано стратегічні напрямки оптимізації технологічних процесів мікробного синтезу ВСАА, в тому числі за технологіями omics, обговорені деякі специфічні технологічні особливості процесів, зроблено наголос на методах очистки продукту після ферментації, проаналізовано продукти

спортивного харчування щодо форм випуску, обговорено перспективність технології інкапсуляції для поліпшення властивостей продуктів, отриманих у таких спосіб, запропоновано технологічну схему для організації вітчизняного виробництва препарату для спортивного харчування на основі ВСАА, обговорені перспективні напрямки подальших досліджень.

ВИСНОВКИ

1. ВСАА є важливими біологічно активними речовинами, які широко використовуються в спортивному харчуванні, медицині та фармацевтиці. Удосконалення мікроорганізмів-продуцентів ВСАА через генетичні модифікації та оптимізацію процесів ферментації є ключовими шляхами підвищення ефективності виробництва.
2. В роботі розглянуто фізіологічні та метаболічні властивості незамінних амінокислот з розгалуженим ланцюгом, напрями їх застосування в секторах спортивної підготовки, охорони здоров'я, харчування та у годівлі тварин. Проаналізовано способи отримання ВСАА біотехнологічним методом. Виявлено основні тенденції ринку продуктів на основі ВСАА в Україні та за рубежом.
3. Проаналізовано властивості амінокислот з розгалуженим ланцюгом, які необхідно урахувати при плануванні процесів їхнього біосинтезу, для подальшої організації післяферментаційних етапів очистки та отримання готового продукту високої якості.
4. Проаналізовано продуцентів ВСАА, методи їх удосконалення, основними з яких виявлено генетичну модифікацію та метаболічну інженерію, структуровано напрямки оптимізації технологічних процесів мікробного синтезу ВСАА, проаналізовано продукти спортивного харчування щодо форм випуску, обгрунтовано перспективність технології інкапсуляції, запропоновано технологічну схему для організації вітчизняного виробництва препарату для спортивного харчування на основі ВСАА, обговорені перспективні напрямки подальших досліджень.
5. Дослідження з розробки способів отримання засобів для спортивного харчування на основі ВСАА є перспективним напрямом та має значення для поповнення вітчизняного ринку актуальними спеціалізованими продуктами спортивного харчування.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Reifenberg P., Zimmer A. Branched-chain amino acids: physico-chemical properties, industrial synthesis and role in signaling, metabolism and energy production. *Amino Acids*. 2024. Vol. 56(1). P. 51. DOI: [10.1007/s00726-024-03417-2](https://doi.org/10.1007/s00726-024-03417-2).
2. Основи спортивного харчування : навч.–метод. посіб. / уклад.: П. І. Горюк, А. В. Гакман. Чернівці : Чернівецький нац. ун–т, 2018. 74 с.
3. Чхайло М. Б. Перспективи використання дієтичних добавок у спортивній практиці. *Олімпійський та паралімпійський спорт*. 2023. № 1. С. 33–37.
4. ВСАА. Що це за амінокислоти, для чого ВСАА і як їх приймати. URL: <https://belok.ua/blog/ua/bcaa-shho-cze-za-aminokysloty-dlya-chogo-bcaa-i-yak-yih-pryjmaty/?srsltid=AfmBOor7TrXxQUyLmFS8A6TOCaMBzVycj1rNLz4DrqVHvtlcigAccEch> (дата звернення: 14.10.2024).
5. Novel metabolic and physiological functions of branched chain amino acids: a review / S. Zhang et al. *J. Animal Sci. Biotechnol.* 2017. Vol. 8(1). P. 10. DOI: [10.1186/s40104-016-0139-z](https://doi.org/10.1186/s40104-016-0139-z).
6. Branched-chain amino acids catabolism and cancer progression: focus on therapeutic interventions / Xu Er et al. *Frontiers in Oncology*. 2023. Vol. 13. P. 1220638. DOI: [10.3389/fonc.2023.1220638](https://doi.org/10.3389/fonc.2023.1220638).
7. Branched Chain Amino Acids: Beyond Nutrition Metabolism / C. Nie et al. *Int. J. Mol. Sci.* 2018. Vol. 19. P. 954. DOI: [10.3390/ijms19040954](https://doi.org/10.3390/ijms19040954).
8. Microbial Production of Amino Acids and Their Applications in Health and Nutrition Sectors / A. Agrawal et al. *Microbial Products for Health and Nutrition* / eds. V. Kothari, S. Ray, P. Kumar. Singapore : Springer, 2024. P. 305–331. DOI: [10.1007/978-981-97-4235-6_13](https://doi.org/10.1007/978-981-97-4235-6_13).
9. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for producing branched chain amino acids / S. Yu et al. *Microb. Cell. Fact.* 2021. Vol. 20. P. 230. DOI: [10.1186/s12934-021-01721-0](https://doi.org/10.1186/s12934-021-01721-0).

10. Branched Chain Amino Acids Market Size, Forecasts Report 2032. *Global Market Insights Inc.* URL: <https://www.gminsights.com/industry-analysis/branched-chain-amino-acids-market> (Date of access: 05.09.2024).
11. Microbial production of branched chain amino acids: Advances and perspectives / Y. Hao et al. *Bioresource Technology*. 2024. Vol. 397. P. 130502. DOI: 10.1016/j.biortech.2024.130502.
12. Притульська Н. В., Кошельник А. В. Аналіз асортименту дієтичних добавок для відновлення спортсменів. *Мережевий бізнес: становлення, проблеми, інновації* : матеріали VII Міжнар. наук.–практ. інтернет–конф. Полтава : ПУЕТ, 2017. С. 48–51.
13. Пономарьов В. О., Царенко К. В., Булах С. М. Спортивно-педагогічне вдосконалення : метод. рек. до самостійної роботи для здобувачів ступеня вищ. освіти бакалавра спец. «Фізична культура і спорт» освітньо–професійної програми «Спорт». Запоріжжя : Запорізький нац. ун–т, 2024. 86 с.
14. Притульська Н. В., Кошельник А. В. Асортиментна політика виробників спортивного харчування в Україні та світі. *Вісник ЛТЕУ. Технічні науки*. 2018. № 20. С. 41–47.
15. BCAA. Спортивні добавки. URL: <https://gymbeam.ua/ru/bcaa?srsId=AfmBOopRa7Bm2UPtKJ3nFFoEbqFcBy6hv0etkqOCKKDs1t0fo4xw4oyh> (дата звернення: 26.09.2024).
16. Спортивне харчування. Спортивне харчування та одяг для бодібілдингу, фітнесу, пауерліфтингу. URL: <https://mordex.net/ua/sportivnoe-pitanie/> (дата звернення: 06.10.2024).
17. Sporthavka: Магазин спортивного харчування. URL: https://sporthavka.com.ua/?srsId=AfmBOood_jG5ZYx42R5tfpqSQtaeDgGAYeSIoL5b0RacfJKcQNg9bK9v (дата звернення: 06.10.2024).
18. Shimizu K., Matsuoka Y. Feedback regulation and coordination of the main metabolism for bacterial growth and metabolic engineering for amino acid

- fermentation. *Biotechnol. Adv.* 2022. Vol. 55. P. 107887. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2021.107887.
19. Conde M. H. Características nutricionales de los Pacientes con cirrosis hepática : tesis doctoral en Medicina por la Universidad Autónoma de Madrid. Madrid, 2019. 159 p.
 20. Warum ein Verhältnis von 2:1:1 bei BCAAs am besten ist! Fitness News, Medizin, Supplement Review, Nutrition. URL: <https://fitpedia.com/nutrition/supplements/warum-ein-bcaa-verhaeltnis-von-211-wohl-am-besten-ist/> (Date of access: 02.10.2024).
 21. García Á. C., Hauptmann P., Neubauer P. Glucose-Limited Fed-Batch Cultivation Strategy to Mimic Large-Scale Effects in *Escherichia coli* Linked to Accumulation of Non-Canonical Branched-Chain Amino Acids by Combination of Pyruvate Pulses and Dissolved Oxygen Limitation. *Microorganisms*. 2021. Vol. 9, № 6. P. 1110. DOI: [10.3390/microorganisms9061110](https://doi.org/10.3390/microorganisms9061110).
 22. A rapid LC-MS/MS assay for detection and monitoring of underivatized branched-chain amino acids in maple syrup urine disease / H. Piri–Moghadam et al. *J. Mass. Spectrom. Adv. Clin. Lab.* 2022. № 24. P. 107–117. DOI: [10.1016/j.jmsacl.2022.04.003](https://doi.org/10.1016/j.jmsacl.2022.04.003).
 23. Determination of L-valine solubility in 12 monosolvent systems at multiple temperatures from 283.15 to 323.15 K / Y. Wang et al. *J. Chem. Eng. Data*. 2023. Vol. 68, № 8. P. 2136–2145. DOI: [10.1021/acs.jced.3c00302](https://doi.org/10.1021/acs.jced.3c00302).
 24. Solubility Behavior, Hansen Solubility Parameters, and Thermodynamic Modeling of l-Leucine in 12 Monosolvents from 283.15 to 323.15 K / J. Wang et al. *J. Chem. Eng. Data*. 2023. Vol. 68, № 10. P. 2725–2734. DOI: [10.1021/acs.jced.3c00287](https://doi.org/10.1021/acs.jced.3c00287).
 25. The chemical mechanisms of the enzymes in the branched-chain amino acids biosynthetic pathway and their applications / Y–F. Liang et al. *Biochimie*. 2021. № 184. P. 72–87. DOI: [10.1016/j.biochi.2021.02.008](https://doi.org/10.1016/j.biochi.2021.02.008).

26. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for producing branched chain amino acids / S. Yu et al. *Microb. Cell. Fact.* 2021. № 20. P. 230. DOI: [10.1186/s12934-021-01721-0](https://doi.org/10.1186/s12934-021-01721-0).
27. Rusu A. V., Trif M., Rocha J. M. Microbial Secondary Metabolites via Fermentation Approaches for Dietary Supplementation Formulations. *Molecules*. 2023. Vol. 28(16). P. 6020. DOI: [10.3390/molecules28166020](https://doi.org/10.3390/molecules28166020).
28. L-valine production in *Corynebacterium glutamicum* based on systematic metabolic engineering: progress and prospects / J. Liu et al. *Amino Acids*. 2021. Vol. 53. P. 1301–1312. DOI: [10.1007/s00726-021-03066-9](https://doi.org/10.1007/s00726-021-03066-9).
29. High-yield production of L-valine in engineered *Escherichia coli* by a novel two-stage fermentation / Y. Hao et al. *Metab. Eng.* 2020. Vol. 62. P. 198–206. DOI: [10.1016/j.ymben.2020.09.007](https://doi.org/10.1016/j.ymben.2020.09.007).
30. Comparative Genomic and Genetic Functional Analysis of Industrial L-Leucine- and L-Valine-Producing *Corynebacterium glutamicum* Strains / Y. Ma et al. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2018. № 28. P. 1916–1927. DOI: [10.4014/jmb.1805.05013](https://doi.org/10.4014/jmb.1805.05013).
31. Transcriptomic and metabolomics analyses reveal metabolic characteristics of L-leucine- and L-valine-producing *Corynebacterium glutamicum* mutants / Y. Ma et al. *Ann. Microbiol.* 2019. Vol. 69. P. 457–468. DOI: [10.1007/s13213-018-1431-2](https://doi.org/10.1007/s13213-018-1431-2).
32. Current advances for omics-guided process optimization of microbial manufacturing / S. Wan et al. *Bioresour. Bioprocess.* 2023. Vol. 10(1). P. 30. DOI: [10.1186/s40643-023-00647-2](https://doi.org/10.1186/s40643-023-00647-2).
33. Сахно Т. В., Іргібаєва І. С., Барашков М. М. Дослідження біорозкладних полімерів для використання в молочній та харчовій промисловості. *Інноваційні аспекти систем безпеки праці, захисту інтелектуальної власності* : матеріали VII Всеукр. наук.–практ. інтернет–конф., м. Полтава, 24–25 берез. 2022 р. Полтава : ПДАУ, 2022. С. 98–101. URL: <https://repository.pdmu.edu.ua/handle/123456789/20166> (дата звернення: 02.11.2024).

- 34.Інкапсулятори. Donau lab Ukraine. URL: <https://dlu.com.ua/Інкапсулятори> (дата звернення: 02.11.2024).
- 35.China Slow Release BCAA Factory, Manufacturers, Supplier and Producer – Products – Xi'an Healthful Biotechnology Co., Ltd. China Natural Vitamin E, Micro-Encapsulated Powders, Phytosterol Ester, Fat Soluble Vitamins, Omega-3 Powder Factory, Manufacturers, Supplier and Producer – Xi'an Healthful Biotechnology Co., Ltd. URL: <https://www.hsfbiotech.com/solipro-micro-encaplated-solid-powder/sustained-release-bcaa.html> (Date of access: 02.11.2024).

ДОДАТОК

Публікації за темою роботи

eoss-conf.com



**ISSUE
№8**



**EUROPEAN OPEN
SCIENCE SPACE**

COLLECTION OF SCIENTIFIC PAPERS



**1st INTERNATIONAL
SCIENTIFIC
AND PRACTICAL
CONFERENCE**

**INNOVATIVE SOLUTIONS
IN SCIENCE:
BALANCING THEORY
AND PRACTICE**

OCTOBER 28-30, 2024, SAN FRANCISCO, USA



Section: Biology and Microbiology

БІОТЕХНОЛОГІЧНИЙ СПОСІБ ОТРИМАННЯ ВСАА – КОМПЛЕКСУ АМІНОКИСЛОТ З РОЗГАЛУЖЕНИМ ЛАНЦЮГОМ

Двінських Наталія

к.фарм.н., с.н.с.

Хохленкова Наталя

д.фарм.н., проф.

Борисова Катерина

здобувач вищої освіти магістерського рівня

Кафедра біотехнології

Національний фармацевтичний університет, Україна

ВСАА (англ. *branched-chain amino acids*) – комплекс незамінних амінокислот з розгалуженим ланцюгом), який складається з L-лейцину, L-ізолейцину та L-валіну. Вони складають близько 35% всіх амінокислот м'язової тканини, беруть участь в анаболізмі та відновленні, мають антикатаболічну дію, забезпечують пластичним матеріалом і служать енергетичним субстратом, метаболізуючись у м'язах.

Фахівцями-фізіологами було виявлено, а тренерами на практиці підтверджено позитивний вплив на організм спортсменів додаткового споживання ВСАА, які пришвидшували відновлення у періоди інтенсивних тренувань та постравантажувальних травм за рахунок зниження руйнування м'язового білка.

Складові комплексу ВСАА мають схожу будову молекул та досить близькі фізіологічні властивості, але вони мають і певні індивідуальні особливості.

Лейцин сприяє підтримці азотистої рівноваги в організмі, при низькокалорійній дієті забезпечує до 10% енергії, що утворюється при інтенсивних фізичних навантаженнях, прискорює відновлення сполучних тканин та шкіри при спортивних травмах, знижує масу жирових відкладень, підвищує витривалість організму, сприяє зміцненню центральної нервової системи, посилює секрецію інсуліну, який стимулює додатковий синтез білків і гальмує їх непотрібне розщеплення.

Ізолейцин бере участь у синтезі міофібрил м'язів, забезпечує біохімічні процеси утворення гемоглобіну та глікогену, сприяє розщепленню холестерину та полегшує почуття втоми м'язів при перенавантаженнях. Стан дефіциту ізолейцину схожий на гіпоглікемію.

Валін також учасник процесів росту м'язових тканин, але окрім цього покращує координацію м'язів та знижує чутливість до болю, холоду та спеки. Він може бути джерелом енергії в м'язових клітинах і впливати на психічний



стан людини. Це обумовлено тим, що валін перешкоджає зниженню рівня серотоніну в головному мозку.

Виробництво ВСАА, як і інших амінокислот, може здійснюватися екстрагуванням з гідролізату, хімічним та ферментативним синтезом, а також біосинтетично.

Хімічне синтетичне та ферментативне виробництво ВСАА ускладнюється дороговизною сировини, складними умовами реакцій та загрозою забруднення довкілля відходами. Мікробний синтез є переважною альтернативою отримання ВСАА, оскільки він є екологічно чистим і має високу продуктивність.

Відомо, що лише L-ізомери амінокислот є протейногенними, тому біотехнологічні процеси мають перевагу над хімічним синтезом для виробництва ВСАА через стереоспецифічність ферментативних реакцій.

Слід зауважити, що ці амінокислоти використовують в комплексі не стільки тому, що вони доповнюють дію одна одної, а тому що при біосинтезі утворюється саме комплекс подібних за структурою ВСАА. Отримання окремих амінокислот або поділ комплексу ВСАА на складові набагато складніший і дорожчий.

Для задоволення попиту на ВСАА розроблені методи промислового мікробного синтезу, в основному з використанням мутантних штамів бактерій з покращеними виробничими можливостями.

Як продуценти, що використовуються для синтезу цілого ряду амінокислот, таких як лізин, глутамат, треонін, серин тощо, відоме використання виробничих штамів бактерій *Corynebacterium glutamicum*, *Escherichia coli*, *Pantoea ananatis* та інші. *C. glutamicum* виділяється як одна з головних робочих конячок, яка відіграє ключову роль у промисловому виробництві ВСАА. Ця грампозитивна бактерія ефективно синтезує амінокислоти лейцин, ізолейцин та валін завдяки природнім для неї метаболічним шляхам і ферментам. Завдяки генній інженерії та покращенню штаму його потужність виробництва ВСАА була збільшена, і цей штам тепер відомий своєю довговічністю, толерантністю до несприятливих складних промислових умов, таких як високі концентрації субстрату та низький рН. Це поєднання природної метаболічної здатності, збільшеної регульованим мутагенезом та генетичними маніпуляціями до надмірної продуктивності, стійкості, безпеки та генетичної адаптивності робить його ідеальним для великомасштабного виробництва ВСАА.

Щодо використання *E. coli* як продуцента ВСАА відомо, що загальні шляхи біосинтезу, способи керування процесом та напрями удосконалення виробництва ВСАА дуже схожі з *C. glutamicum*. Ймовірно тому загальний огляд процесу біосинтезу та його особливостей в джерелах літератури в основному стосується робіт зі штамми *C. glutamicum*.

Традиційні штами *C. glutamicum* виробляють промислову кількість ВСАА за допомогою випадкового мутагенезу та скринінгу. Однак випадкові мутації в геномі бактерії можуть призвести до фізіологічних змін, інгібування швидкості росту та накопиченню токсичних побічних метаболітів. Бажані властивості,



отримані у такий спосіб, не зберігаються у поколіннях, та свержздатність виробляти ВСАА втрачається. Тому розроблювалися інші шляхи для створення стабільно високопродуктивних штамів.

Виходячи зі свого генетичного походження, доброї вивченості та наявності сучасних наборів інструментів та методик маніпулювання генами, *C. glutamicum* є джерелом нових штамів, удосконалених для збільшення виробництва ВСАА.

Усі ВСАА можна виробляти з глюкози як вихідного матеріалу для процесу біосинтезу. Проміжним продуктом є універсальний центральний метаболіт піруват, від якого походять L-валін, L-лейцин та L-ізолейцин. Шляхи їх біосинтезу мають спільні ключові ферменти, такі як синтаза ацетогідроксикислоти (АНАС) та інші ферменти.

Відомо багато стратегій отримання удосконалених надпродуцентів ВСАА. Наприклад, фермент АНАС каталізує конденсацію двох молекул пірувату при синтезі L-валіну та L-лейцину та однієї молекули пірувату та 2-кетобутирату у синтезі L-ізолейцину, тобто цей фермент сприяє одночасному утворенню ВСАА, але їх співвідношення неоднозначне. Природні штами *C. glutamicum* схильні до накопичення L-ізолейцину. Крім того, активність АНАС зворотно регулюється ВСАА, при їх накопиченні пригнічується. Найпотужнішим інгібітором активності є валін. Створення мутантних штамів з введенням мутацій і у регуляторну, і у каталітичну субодиницю фермента дає можливість полегшення або послаблення інгібування зворотного зв'язку, підйому або зниженню титрів окремих амінокислот. Це, окрім набуття здатності до надсинтезу, може задовольнити потреби споживачів у комплексі ВСАА певного складу. Так, на ринку найбільший попит на суміш лейцин:ізолейцин:валін 2:1:1.

Наведеними керованими мутаціями виробництво ВСАА було дещо покращено, хоча інгібування зворотного зв'язку не було повністю усунено. Тому роботи з модифікації АНАС продовжуються з використанням інших підходів. Наприклад, запропоновано регуляторну субодиницю АНАС *C. glutamicum* замінити регуляторною субодиницею АНАС *Escherichia coli*, яка не має зворотного інгібування валіном і не впливає на активність АНАС. Проведення модифікацій регуляторних і каталітичних субодиниць фермента, в тому числі із застосуванням фрагментів подібних ферментів інших продуцентів, може призвести до отримання нового мутантного штаму-продуцента ВСАА з потужною каталітичною активністю та стійкістю до інгібування зворотного зв'язку.

Отже, продовжується розвиток стратегій метаболічної інженерії для подолання бар'єрів, пов'язаних з біосинтезом ВСАА у промислово значущих штамів-продуцентів, насамперед *C. glutamicum*, для сприяння керованого синтезу ВСАА та задовільнення потреб споживачів.