

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Л.И. МОТАВИНА, З.А. ГАЛИЕВА, Н.В. ГИЗАТОВА, Р.С. ИСХАКОВ,  
А.Я. ГИЗАТОВ, Ю.А. КАРНАУХОВ, И.М. ФАЙЗУЛЛИН, Р.С. ЮСУПОВ

## ОСНОВЫ ПИЩЕВОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ

Учебное пособие



Уфа 2014

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

**Л.И. Мотавина, З.А. Галиева, Н.В. Гизатова, Р.С. Исхаков,  
А.Я. Гизатов, Ю.А. Карнаухов, И.М. Файзуллин, Р.С. Юсупов**

## **ОСНОВЫ ПИЩЕВОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ**

**Учебное пособие**

Допущено Департаментом научно-технологической политики и образования  
Министерства сельского хозяйства Российской Федерации в качестве учебного  
пособия для студентов, аспирантов, магистрантов  
технологических специальностей

Уфа 2014

УДК 664  
ББК 36  
М 54

Допущено Департаментом научно-технологической политики и образования Министерства сельского хозяйства Российской Федерации

Рецензенты: кандидат биологических наук, доцент кафедры фармакологии и токсикологии им. И.Е. Мозгова Р.Ф. Тухфатова (ФГБОУ ВПО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И. Скрябина»); кандидат ветеринарных наук, заместитель директора по диагностической работе А.М. Буканов (ГБУ Башкирская НПВЛ)

Мотавина Л.И., Галиева З.А., Гизатова Н.В., Исхаков Р.С., Гизатов А.Я., Карнаухов Ю.А., Файзуллин И.М., Юсупов Р.С. Основы пищевой биотехнологии: Учебное пособие для аграрных вузов - Уфа: ФГБОУ ВПО Башкирский ГАУ, 2014. - 184 с.

Учебное пособие включает в себя обобщенный материал по изучаемой дисциплине «Основы пищевой биотехнологии» и рекомендовано в качестве учебного пособия для студентов, аспирантов, магистрантов технологических специальностей.

Ил. – 5, табл. – 4, библиогр. назв. – 6

© Мотавина Л.И., 2014 г.  
© Галиева З.А., 2014 г.  
© Гизатова Н.В., 2014 г.  
© Исхаков Р.С., 2014 г.  
© Гизатов А.Я., 2014 г.  
© Карнаухов Ю.А., 2014 г.  
© Файзуллин И.М., 2014 г.  
© Юсупов Р.С., 2014 г.  
© ФГБОУ ВПО Башкирский ГАУ, 2014 г.

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	
1 ЦЕЛИ, ЗАДАЧИ, ОСНОВНЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОБЪЕКТЫ БИОТЕХНОЛОГИИ. ОСОБЕННОСТИ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА	8
1.1 История возникновения и развития биотехнологии	8
1.2 Биотехнологический процесс	11
1.3 Принципы биотехнологии	13
1.4 Техника безопасности в микробиологической лаборатории	15
1.5 Техника микроскопирования	16
2 ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ	19
2.1 Стадии и кинетика роста микроорганизмов	19
2.2 Продукты микробного брожения и метаболизма	21
2.3 Сырье и состав питательных сред для биотехнологического производства	22
2.4 Способы культивирования микроорганизмов	26
2.5 Культивирование животных и растительных клеток	33
3 ОБЩАЯ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ СХЕМА ПРОИЗВОДСТВА ПРОДУКТОВ МИКРОБНОГО СИНТЕЗА	36
3.1 Приготовление питательной среды	36
3.2 Получение посевного материала	37
3.3 Ферментация (культивирование)	39
3.4 Выделение целевого продукта	40
3.5 Очистка целевого продукта	42
4 МИКРОБИОТЕХНОЛОГИЯ	44
4.1 Биологические объекты биотехнологии	44
4.2 Подбор форм микроорганизмов с заданными свойствами	45
4.2.1 Выделение микроорганизмов.	45
4.2.2 Получение накопительных культур.	46
4.2.3 Выделение чистых культур.	46
4.2.4 Определение способности синтезировать целевой продукт	46
4.3 Методы биотехнологии	47
4.3.1 Селекция	47
4.3.2 Генетическая инженерия	48
5 СПОСОБЫ И СИСТЕМЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ	50
5.1 Способы культивирования микроорганизмов	50
5.2 Системы культивирования микроорганизмов	52
5.3 Методы, используемые в биотехнологическом производстве	54
5.4 Концентрирование, обезвоживание, модификация и стабилизация продукта	58
6 ПОЛУЧЕНИЕ БИОМАССЫ МИКРООРГАНИЗМОВ	60
6.1 Получение биомассы микроорганизмов в качестве источника белка	60
6.2 Производство хлебопекарных дрожжей и их экспертиза	65

7	ОХРАНА ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ НА ПРЕДПРИЯТИЯХ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ	69
7.1	Очистка сточных вод	69
7.1.1	Промышленные стоки	69
7.2	Способы очистки сточных вод	72
7.3	Принципиальная технологическая схема очистки сточных вод	74
7.4	Очистка газовоздушных выбросов	76
8	ПРОИЗВОДСТВО И ПРОМЫШЛЕННОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФЕРМЕНТОВ	78
8.1	Значение ферментов, источники их получения	78
8.2	Промышленные ферментные препараты	79
8.3	Факторы, влияющие на биосинтез ферментов	81
8.4	Применение ферментативных препаратов	83
9	ГЕННАЯ ИНЖЕНЕРИЯ БАКТЕРИЙ, ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ И ОБЛАСТИ ЕЁ ПРИМЕНЕНИЯ	89
9.1	Нуклеиновые кислоты и факторы наследственности у живых организмов	89
9.2	Генная инженерия бактерий	90
9.3	Генная инженерия растений	93
9.4	Получение трансгенных растений	94
9.5	Получение трансгенных животных	95
10	ОБЛАСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ	97
10.1	Получение трансгенных растений, устойчивых к вредным насекомым	97
10.2	Перспективы и ограничения в использовании трансгенных растений	98
10.3	Экологические проблемы, связанные с использованием трансгенных растений	101
11	ПИЩЕВАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ ПРОДУКТОВ ИЗ СЫРЬЯ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ	110
11.1	Бродильные производства	110
11.2	Хлебопечение	122
11.3	Применение ферментов при выработке фруктовых соков	123
11.4	Консервированные овощи и другие продукты	124
11.5	Продукты из сои	125
11.6	Микромицеты в производстве продуктов растительного происхождения	126
11.7	Продукты гидролиза крахмала	128
11.8	Перспективы развития пищевой биотехнологии	128
12	ПИЩЕВАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ ПРОДУКТОВ ИЗ СЫРЬЯ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ	131
12.1	Получение молочных продуктов	131

12.2 Биотехнологические процессы в производстве мясных и рыбных продуктов	143
13 БИОТЕХНОЛОГИЯ ПРОИЗВОДСТВА ПРОДУКТОВ ПИТАНИЯ И НАПИТКОВ	151
13.1 Функциональные пищевые продукты	151
13.2 Ферментация овощей	154
13.3 Биотехнологии в производстве чая, кофе	155
13.4 Производство сыра	156
14 ТЕХНОЛОГИЯ ПРОИЗВОДСТВА АЛКОГОЛЬНЫХ НАПИТКОВ, САХАРОЗАМЕНИТЕЛЕЙ	159
14.1 Технология производства алкогольных напитков	159
14.2 Технология производства сахарозаменителей	164
15 ВТОРИЧНОЕ СЫРЬЁ, ИСПОЛЬЗУЕМОЕ В БИОТЕХНОЛОГИЧЕ СКОМ ПРОИЗВОДСТВЕ	167
15.1 Растительное сырьё	167
15.2 Промышленные отходы	170
15.3 Отходы животноводства	175
ПРИЛОЖЕНИЕ	
БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК	



## ВВЕДЕНИЕ

Биотехнология - это производство необходимых человеку продуктов и материалов с помощью живых организмов, культивируемых клеток и биологических процессов. Возможности биотехнологии необычайно велики благодаря тому, что ее методы выгоднее обычных: они используются при оптимальных условиях (температуре и давлении), более производительны, экологически чисты и не требуют химических реактивов, отравляющих среду и др. Объектами биотехнологии служат многочисленные представители групп живых организмов — микроорганизмы (вирусы, бактерии, протисты, дрожжи и др.), растения, животные, а также изолированные из них клетки и субклеточные структуры (органеллы). Биотехнология базируется на протекающих в живых системах физиолого-биохимических процессах, в результате которых осуществляются выделение энергии, синтез и расщепление продуктов метаболизма, формирование химических и структурных компонентов клетки.

Главными направлениями биотехнологии являются:

1) производство с помощью микроорганизмов и культивируемых эукариотических клеток биологически активных соединений (ферментов, витаминов, гормональных препаратов), лекарственных препаратов (антибиотиков, вакцин, сывороток, высокоспецифичных антител и др.), а также белков, аминокислот, используемых в качестве кормовых добавок;

2) применение биологических методов борьбы с загрязнением окружающей среды (биологическая очистка сточных вод, загрязнений почвы и т. и.) и для защиты растений от вредителей и болезней;

3) создание новых полезных штаммов микроорганизмов, сортов растений, пород животных и т. п.

Задачи, методы и достижения биотехнологии. Человечеству необходимо научиться эффективно изменять наследственную природу живых организмов, чтобы обеспечить себя доброкачественной пищей и сырьем и при этом не привести планету к экологической катастрофе. Поэтому не случайно главной зада-



чей селекционеров в наше время стало решение проблемы создания новых форм растений, животных и микроорганизмов, хорошо приспособленных к индустриальным способам производства, устойчиво переносящих неблагоприятные условия, эффективно использующих солнечную энергию и, что особенно важно, позволяющих получать биологически чистую продукцию без чрезмерного загрязнения окружающей среды. Принципиально новыми подходами к решению этой фундаментальной проблемы является использование в селекции генной и клеточной инженерии.

Уже многие годы для решения проблемы загрязнения окружающей среды используются биологические методы, разработанные биотехнологами.

Биотехнология базируется как на традиционных научных дисциплинах (физиология, биохимия, микробиология, медицина, агробиология), так и на рожденных уходящим веком молекулярной биологии и генетике, клеточной и генетической инженерии, кибернетике и информатике. Биотехнология - область знания, позволяющая получать путем управляемого культивирования организмов и (или) их фрагментов (тканей, клеток) полезные для человека продукты - пищу, корма, медицинские препараты, разнообразное сырье, доступные растениям формы азота, средства защиты растений и животных, а также утилизировать (конверсировать) различные органические отходы (промышленные, сельскохозяйственные и коммунальные).

# **1 ЦЕЛИ, ЗАДАЧИ, ОСНОВНЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОБЪЕКТЫ БИОТЕХНОЛОГИИ. ОСОБЕННОСТИ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА**

Биотехнология - это новая, сравнительно недавно получившая широкое развития наука о практическом использовании различных биологических (генов, клеток, тканей, микроорганизмов, растений и животных) с целью получения антибиотиков, ферментов, кормовых белков, биоудобрений, безвирусных растений новых сортов растений и животных, переработки сырья, промышленных и сельскохозяйственных отходов, очистки сточных вод и газовоздушных выбросов и так далее. Успехи, достигнутые в области биотехнологии, стали возможными благодаря бурному развитию таких наук, как биохимия, генетика, цитология, микробиология, молекулярная биология и другие.

## **1.1 История возникновения и развития биотехнологии**

В начале XIX в. Русский академик К.С. Кирхгоф впервые получил жидкий ферментный препарат амилазы из проросшего ячменя и описал ферментный процесс.

В 1857 г. Луи Пастер установил, что микробы играют ключевую роль в процессах брожения, и показал, что в образовании отдельных продуктов участвуют разные виды микроорганизмов. Его исследования послужили основой развития в конце XIX и начале XX вв. бродильного производства органических растворителей (ацетона, бутанола и других), в том числе этилового спирта.

1875 г. Разработан метод получения чистых культур микроорганизмов, гарантирующий содержание в посевном материале клеток только определенного вида (Р. Кох).

В 1893 г. Установлена способность плесневых грибов синтезировать лимонную кислоту (К. Вемер).

1894 г. Создан первый ферментный препарат, полученный из плесневого

гриба, выращенного на влажном рисе (И. Такаmine).

В 1923 г. Было организовано первое микробиологическое промышленное производство лимонной кислоты, а затем молочной, глюконовой и других органических кислот. Наиболее широко используется лимонная кислота – ее применяют при производстве безалкогольных напитков, кондитерских изделий и многих других пищевых продуктов.

1925 г. Установлена возможность искусственного мутагенеза микроорганизмов (грибов) под влиянием рентгеновского облучения (Г.А. Надсон, Г.С. Филиппович).

В 30-е годы в СССР было организовано производство микробиологическим способом технических препаратов ферментов и витаминов (рибофлавина, эргостерина).

Следующий важный этап – организация промышленного производства антибиотиков, основанного на открытии химиотерапевтической активности пенициллина в 1940 г. (Флемминг, Флори и Чейни).

В военные годы (1941-1945 гг.) возросла потребность в дрожжах как источнике белковых веществ. Изучалась способность дрожжей накапливать белоксодержащую биомассу на непищевом сырье (древесные опилки, гороховая, овсяная шелуха). В блокадном Ленинграде, Москве были созданы установки, на которых производили пищевые дрожжи. В военной Германии биомассу дрожжей добавляли в колбасу и супы.

В 1948 г. Советским ученым Букиным с помощью микроорганизмов был получен витамин В<sub>12</sub>, который не способны синтезировать ни растения, ни животные.

В 1961 г. Установлена способность мутантов бактерий к сверхсинтезу аминокислот (С. Киносита, К. Накаяма, С. Китада). В 1961-1975 гг. было налажено промышленное производство микробиологическим путем аминокислот: глутаминовой, лизина и др.

Еще в 60-х годах ряд нефтяных и химических компаний начали исследования и разработки по созданию биотехнологических процессов получения

белка одноклеточных организмов, предназначенного для добавления в пищу животным и людям. Одной из причин этого был недостаток белковой пищи в мире. Наиболее конкурентоспособными оказались процессы на основе метанола и крахмала. На основе углеводородного сырья (жидких и газообразных углеводородов) в 70-х годах в СССР впервые было создано многотоннажное производство кормовых дрожжей.

В конце 60-х годов начали применяться иммобилизованные формы микробных ферментов, которые нашли широкое применение в пищевой промышленности.

В 1972 г. Разработана технология клонирования ДНК (П. Берг).

В 1975 г. С возникновением генной инженерии появилась возможность направленно создавать для промышленности микроорганизмы с заданными свойствами.

В 1981 г. Проведена микрохирургическая трансплантация эмбрионов животных с целью быстрого размножения высокопродуктивных экземпляров (Вилландсон).

***История возникновения и развития биотехнологии включает три этапа.***

**1 этап** – зарождение биотехнологии с древних времен до конца XVIII в. Археологические раскопки показывают, что ряд биотехнологических процессов зародились в древности. На территории древнейших очагов в Месопотамии, Египте сохранились остатки пекарен, пивоваренных заводов, сооруженных 4-6 тысячелетий назад. В 3 тысячелетии до н. э. шумеры изготавливали до двух десятков сортов пива. В Древней Греции и Риме широкое распространение получили виноделие и изготовление сыра. В основе пивоварения и виноделия лежит деятельность дрожжевых грибков, сыроделия – молочнокислых бактерий, сычужного фермента. Получение льняного волокна происходит с разрушением пектиновых веществ микроскопическими грибами и бактериями. Иными сло-

вами, зарождение биотехнологии тесно связано с сельским хозяйством, переработкой растениеводческой и животноводческой продукции.

**2этап** (XIX – первая половина XX в.) – становление биотехнологии как науки. Этот этап связан с началом бурного развития биологических наук: генетики, микробиологии, вирусологии, цитологии, физиологии, эмбриологии. На рубеже XIX и XX вв. в ряде стран создаются первые биогазовые установки, в которых отходы животноводства и растениеводства под действием микроорганизмов превращались в биогаз (метан) и удобрение. В конце 40-х годов XX, века, с организацией крупномасштабного производства антибиотиков стала развиваться микробиологическая промышленность. Антибиотики нашли широкое применение не только в медицине, но и в сельском хозяйстве для лечения животных и растений, в качестве биодобавок в корма. Были созданы высокоэффективные формы с помощью мутаций. Возникли предприятия, на которых с помощью микроорганизмов производились аминокислоты, витамины, органические кислоты, ферменты. В конце 60-х годов получила развитие технология иммобилизованных ферментов.

**3этап** (с середины 70-х годов XX века) – ознаменовался развитием биотехнологии в различных направлениях с помощью методов генной и клеточной инженерии. Формальной датой рождения современной биотехнологии считается 1972г., когда была создана первая рекомбинативная (гибридная) ДНК, путем встраивания в нее чужеродных генов. До этого момента использовались, главным образом, физические и химические мутагены с целью создания форм микроорганизмов, синтезирующих ценные для человека вещества в 5 – 10 раз интенсивнее, по сравнению с исходными штаммами.

## **1.2 Биотехнологический процесс**

**Основная цель биотехнологии** - промышленное использование биологических процессов и агентов на основе получения высокоэффективных форм микроор-

ганизмов, культур клеток и тканей растений и животных с заданными свойствами. Биотехнология возникла на стыке биологических, химических и технических наук.

**Биотехнологический процесс** - включает ряд этапов: подготовку объекта, его культивирование, выделение, очистку, модификацию и использование продуктов.

Первым детально изученным процессом было брожение. Французский ученый Луи Пастер (1822 - 1895) первым показал, что брожение - это жизнь без свободного кислорода или анаэробное дыхание, происходящее при участии дрожжевых грибов. По вопросам бродильного производства - виноделию, пивоварению и получению уксуса - он опубликовал 3 монографии.

Биотехнологические процессы могут быть основаны на **периодическом или непрерывном культивировании**.

Во многих странах мира биотехнологии придается первостепенное значение. Это связано с тем, что **биотехнология имеет ряд существенных преимуществ перед другими видами технологий**, например, химической.

1) Это, прежде всего, низкая энергоемкость. Биотехнологические процессы совершаются при нормальном давлении и температурах 20-40° С.

2) Биотехнологическое производство чаще базируется на использовании стандартного однотипного оборудования. Однотипные ферменты применяются для производства аминокислот, витаминов; ферментов, антибиотиков.

3) Биотехнологические процессы несложно сделать безотходными. Микроорганизмы усваивают самые разнообразные субстраты, поэтому отходы одного какого-то производства можно превращать в ценные продукты с помощью микроорганизмов в ходе другого производства.

4) Безотходность биотехнологических производств делает их экологически наиболее чистыми. Экологическая целесообразность биотехнологических производств определяется также возможностью ликвидации с их помощью биологических отходов - побочных продуктов пищевой, деревообрабатывающей, целлюлозно-бумажной промышленности, в сельском и городском хозяйствах.

5) Исследования в области биотехнологии не требуют крупных капитальных вложений, для их проведения не нужна дорогостоящая аппаратура.

**К первоочередным задачам современной биотехнологии** относятся - создание и широкое освоение:

1) новых биологически активных веществ и лекарственных препаратов для медицины (интерферонов, инсулина, гормонов роста, антител);

2) микробиологических средств защиты растений от болезней и вредителей, бактериальных удобрений и регуляторов роста растений, новых высокопродуктивных и устойчивых к неблагоприятным факторам внешней среды гибридов сельскохозяйственных растений, полученных методами генетической и клеточной инженерии;

3) ценных кормовых добавок и биологически активных веществ (кормового белка, аминокислот, ферментов, витаминов, кормовых антибиотиков) для повышения продуктивности животноводства;

4) новых технологий получения хозяйственно-ценных продуктов для использования в пищевой, химической, микробиологической и других отраслях промышленности;

5) технологий глубокой и эффективной переработки сельскохозяйственных, промышленных и бытовых отходов, использования сточных вод и газовоздушных выбросов для получения биогаза и высококачественных удобрений.

### **1.3 Принципы биотехнологии**

**1 Принцип экономической обоснованности.** Биотехнология внедряется только в те производственные процессы, которые нельзя эффективно и с теми же затратами реализовать средствами традиционной технологии. Аминокислоту лизин можно легко синтезировать химическим путем, но это весьма трудоёмкая процедура, поэтому лизин получают путем микробиологического синтеза.

## **2 Принцип целесообразного уровня технологических разработок.**

Масштаб производства продукта, степень его очистки, уровень автоматизации производства - все это должно прямо определяться соображениями экономической выгоды, сырьевыми и энергетическими ресурсами, уровнем спроса готового продукта. Для получения препаратов медицинского назначения, которые требуются в количестве нескольких сотен граммов в год, целесообразно использовать небольшие биореакторы, крупномасштабное производство здесь себя не оправдывает. В большинстве современных микробиологических производств стремятся к использованию чистых культур микроорганизмов и к полной стерильности оборудования, сред, воздуха, но в некоторых случаях, продукт, удовлетворяющий потребителя (например, биогаз), может быть получен и без чистых культур, растущих в условиях не стерильности.

## **3 Принцип научной обоснованности биотехнологического процесса.**

Научные знания позволяют заранее провести расчет параметров среды, конструкции биореактора и режима его работ.

## **4 Принцип удешевления производства** (максимальное снижение затрат). Как пример - использование в биотехнологических процессах энергии Солнца, естественных биореакторов - природных водоёмов - вместо рукотворных аппаратов, в частности, для получения биомассы одноклеточных водорослей.

Изложенные принципы говорят о **двухединой задаче биотехнологии**: создание оптимальных условий для синтеза целевого продукта клетками биообъекта и в то же время вести производство в максимально экономическом режиме, при минимальных производственных затратах.

## **1.4 Техника безопасности в микробиологической лаборатории**

При работе в микробиологической лаборатории необходимо соблюдать определенные правила поведения. Занятие начинают со знакомства с инструкцией по технике безопасности.



В лабораторию запрещается входить в верхней одежде и класть на столы сумки, портфели и другие личные вещи. В микробиологической лаборатории разрешается работать только в халатах и косынках (шапочках), которые защищают одежду и волосы от контаминации микроорганизмами, а также препятствуют их распространению за пределы лаборатории.

За каждым студентом закрепляется постоянное рабочее место и микроскоп. Рабочее место во время занятий должно поддерживаться в полном порядке.

На всех пробирках и чашках обязательно пишется название микроорганизма, дата его посева, фамилия студента, номер группы.

В ходе работы бактериологические петли и иглы обеззараживаются прокаливанием в пламени горелки до и после отбора микроорганизмов. Приготавливая препарат или производя пересев культур микроорганизмов, выросших в жидкой среде, пользуются не петлей, а пипеткой, в верхний конец которой должен быть вложен кусочек ваты, чтобы не допустить случайного соприкосновения микробного материала с полостью рта. Использованные шпатели, пипетки помещаются в фарфоровые стаканы с дезинфицирующими растворами (1% раствор хлорамина, 3% раствор фенола), спички, фильтровальную бумагу, отработанные препараты помещают в кристаллизатор.

Класть на стол названные предметы категорически запрещается. Все препараты готовят на специальных стеклянных мостиках над кристаллизатором.

В случае попадания исследуемого материала или культуры микроорганизмов на руки, стол, халат или обувь необходимо сообщить об этом преподавателю и под его руководством провести дезинфекцию.

В лаборатории категорически запрещается принимать пищу.

После окончания занятия рабочее место дезинфицируется, использованный материал и другие предметы сдаются лаборанту, моются с мылом руки, помещение проветривают (30-60 мин), облучают УФ - лампами.

Результаты исследований протоколируются.

## 1.5 Техника микроскопирования

Изучение морфологии и строения клеток микроорганизмов, величины которых измеряются микрометрами ( $1 \text{ мкм} = 0,001 \text{ мм}$ ), нанометрами ( $1 \text{ нм} = 0,001 \text{ мкм}$ ), ангстремами ( $1 \text{ \AA} = 0,1 \text{ нм}$ ), возможно только с помощью микроскопов.

Наиболее распространены и удобны для микробиологических исследований прозрачных объектов в проходящем свете микроскопы МБИ-1, МБР-1, БИОЛАМ 70Р (рабочий), С (студенческий), Д (дорожный).

Микроскоп имеет механическую и оптическую части.

Механическая часть микроскопа включает штатив с предметным столиком, тубус, макро- и микрометрические винты. Верхняя часть штатива - тубусодержатель - может перемещаться на 50 мм с помощью механизма, приводимого в действие вращением макрометрического и микрометрического винтов, предназначенных для грубой и тонкой фокусировки препарата. При вращении этих винтов по часовой стрелке тубусодержатель микроскопа опускается, при вращении против часовой стрелки - поднимается. В верхней части тубусодержателя находится револьвер, в отверстия которого ввинчиваются объективы и тубус.

Оптическая часть микроскопа состоит из осветительного аппарата, объектива и окуляра.

Осветительный аппарат состоит из зеркала и конденсора. Зеркало отражает падающий на него свет и направляет его в конденсор. Одна сторона зеркала плоская, и ее используют при любом источнике света и при любом увеличении. Другую, вогнутую, сторону зеркала употребляют при малых увеличениях без конденсора. Конденсор, состоящий из нескольких линз, собирает отраженный от зеркала свет в пучок, направляемый непосредственно на плоскость препарата. Под конденсором имеется ирисовая диафрагма и откидная оправа для светофильтра. Ирисовая диафрагма служит для задержания лишних лучей света и

позволяет при необходимости уменьшить апертуру конденсора (апертура - это “охват” линзы, она характеризуется количеством лучей, попадающих в линзу).

Объектив представляет собой наиболее важную часть микроскопа. Он состоит из системы линз, заключенных в металлическую оправу, которые дают действительное увеличенное обратное изображение. В микроскопах МБР-1, БИОЛАМ используются объективы, дающие увеличение в 8, 40 и 90 раз. Увеличение объектива зависит от фокусного расстояния фронтальной линзы и, следовательно, от ее кривизны. Чем больше кривизна фронтальной линзы, тем короче фокусное расстояние и тем больше увеличение объектива. Поэтому, чем большее увеличение дает объектив, тем ниже его следует опускать над плоскостью препарата. При 8х объективе расстояние между фронтальной линзой объектива и исследуемым объектом равно 8,53 мм, при 40х - 0,4 мм, при 90х- 0,1 мм. Изображение, получаемое при помощи линз, обладает рядом недостатков - aberrаций. Наиболее существенные - сферическая (каждая точка объекта имеет вид кружочка, а не точки, изображение не резкое, размытое) и хроматическая (получаемое изображение приобретает окраску, которую не имеет объект) aberrации. Объективы, у которых aberrации скоррегированы не полностью, называются ахроматами. Они содержат до шести линз и дают изображение наиболее резкое в центре. Более совершенные объективы - апохроматы - могут состоять из 10-12 линз, хроматическая погрешность в них в 10 раз меньше, чем у ахроматов. Планохроматы полностью устраняют искривление поля зрения, их применяют при микрофотографировании.

Окуляр служит для рассмотрения изображения объекта, увеличенного с помощью объектива, и содержит две линзы: глазную (верхнюю) и собирающую (нижнюю). Окуляры могут давать увеличение в 5, 7, 10, 12, 15 и 20 раз, что указано на их оправе.

Увеличение, которое дает микроскоп, определяется произведением увеличения объектива на увеличение окуляра.

Бинокюляры имеют дополнительное увеличение насадки (она предназначена для наблюдения объекта одновременно двумя глазами). Однако общее

увеличение еще не характеризует всех возможностей микроскопа. Увеличенное изображение может оказаться как четким, так и нечетким. Отчетливость получаемого изображения определяется разрешающей способностью микроскопа - минимальным расстоянием между двумя точками, когда они еще не сливаются в одну. Чем больше разрешающая способность микроскопа, тем меньшей величины объект можно увидеть. Повысить ее можно двумя путями: либо освещая объект короткими лучами света, например, УФ, либо увеличивая показатель преломления среды ( $n$ ), граничащей с линзой, с тем, чтобы приблизить его к показателю преломления стекла, на котором находится объект ( $n$  стекла = 1,5).

В целом микроскопический объект может рассматриваться в трех типах системы: сухой - между линзой объектива и объектом находится воздух ( $n = 1$ ); водной - между линзой объектива и объектом находится капля воды ( $n = 1,3$ ) - водная иммерсия; масляной - линза объектива погружается в каплю иммерсионного масла - кедрового, касторового, вазелинового ( $n = 1,52$ ) - масляная иммерсия.

При микроскопии в дневное время можно пользоваться естественным светом, однако, чаще прибегают к источникам искусственного света, которые обеспечивают интенсивное регулируемое освещение (осветители типа ОИ - 19, ОИ - 35). При установке света конденсор должен быть поднят до упора, ирисовая диафрагма открыта; настройка освещения производится с объективом малого увеличения (8x). Объектив опускают на расстояние около 0,8 см от предметного стекла и, вращая зеркало, добиваются равномерного и яркого освещения.

Яркость освещения следует регулировать только изменением накала лампы осветителя или применением светофильтров. Положение зеркала, конденсора и диафрагмы осветителя больше не изменять! Диафрагмой конденсора можно пользоваться только для изменения контрастности изображения.

На предметный столик помещают препарат, закрепляют его боковыми зажимами и изучают сначала с объективом 8x. Для детального изучения препарата пользуются объективом 40x, осуществляя фокусировку только микровинтом. После просмотра препарата переводят револьвер на увеличение 8x и только после этого

снимают препарат с предметного столика. Микроскоп в нерабочем состоянии должен находиться на увеличении  $8\times$ .

### Вопросы для самопроверки

- 1 Какие основные цели и задачи биотехнологии?
- 2 Какова история развития науки?
- 3 Что такое биотехнологический процесс?
- 4 Какие выделяют принципы биотехнологии?
- 5 Правила микроскопирования.

## **2 ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ**

- 1 Стадии и кинетика роста микроорганизмов
- 2 Продукты микробного брожения и метаболизма
- 3 Сырье и состав питательных сред для биотехнологического производства
- 4 Способы культивирования микроорганизмов
- 5 Культивирование животных и растительных клеток

### **2.1 Стадии и кинетика роста микроорганизмов**

Как известно, микроорганизмы, попав в свежую полноценную питательную среду, начинают размножаться не сразу. Этот период называют лаг-фазой - I фаза (рис. 2.1). В этот период культура как бы привыкает к новым условиям обитания. Активируются ферментные системы, если необходимо, синтезируются новые ферментные системы, клетка готовится к синтезу нуклеиновых кислот и других соединений. Продолжительность этой фазы зависит от физиологических особенностей микроорганизмов, состава питательной среды и условий культивирования. Чем эти различия меньше и чем больше посевного материала, тем короче эта фаза.

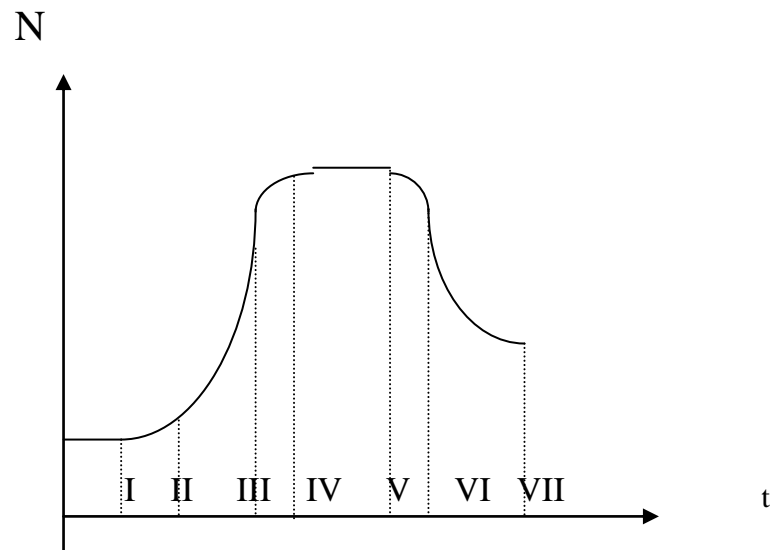


Рис. 2.1 Кривая роста микроорганизмов (зависимость количества клеток от времени культивирования); I , II , III , IV , V , VI , VII – фазы роста

II фаза называется фазой ускоренного роста, она характеризуется началом деления клеток, увеличением общей массы популяции и постоянным увеличением скорости роста культуры; обычно она непродолжительна.

Затем следует логарифмическая, или экспоненциальная фаза роста - III фаза. В этот период отмечается максимальная скорость роста культуры, интервалы между появлением предыдущего и последующего поколения постоянны. Логарифм числа клеток линейно зависит от времени.

Вследствие интенсивного роста и размножения культуры запас необходимых питательных веществ в среде уменьшается. Это является основной причиной снижения скорости роста культуры. Кроме того, в среде накапливаются продукты метаболизма, которые в определенной концентрации могут мешать нормальному протеканию биохимических процессов обмена веществ. Иногда в питательной среде образуется так много клеток, что для новых поколений клеток не хватает пространства, а точнее, поверхности. Скорость роста снижается, уменьшается число делений клеток, наступает IV фаза – фаза замедления или уменьшения скорости роста.

V фаза называется стационарной (фазой линейного роста). Масса и количество всех живых клеток достигает максимума. Количество вновь образовавшихся клеток на этом этапе равно количеству клеток, отмерших и автолизиро-

ванных (разрушенных клеточными ферментами).

В какой-то момент это равновесие нарушается и количество отмерших клеток превышает прирост. Наступает VI фаза – фаза ускорения отмирания.

Завершается цикл роста и развития популяции в замкнутом объеме VII фазой, характеризующейся отмиранием и автолизом микроорганизмов, которая называется фазой отмирания. На этой стадии биомасса клеток значительно уменьшается, так как запасные вещества клетки исчерпываются.

### Кинетика роста микроорганизмов

Для выращивания любой культуры необходимы: 1) жизнеспособный посевной материал; 2) источники энергии и углерода; 3) питательные вещества для синтеза биомассы; 4) отсутствие ингибиторов роста; 5) соответствующие физико-химические условия (температура, pH среды, наличие или отсутствие кислорода и др.).

Если все эти требования выполнены, то скорость роста (увеличения биомассы) одноклеточных микроорганизмов с бинарным делением, размножающихся в условиях хорошо перемешиваемой периодической культуры, будет пропорциональна концентрации микробной массы, то есть:

$$\frac{d x}{d t} = \mu x ,$$

где  $d x / d t$  – скорость роста;  $\mu$  - коэффициент пропорциональности, обычно называемый удельной скоростью роста;  $x$  – концентрация биомассы (на сухой вес). Если  $\mu$  является постоянной величиной, то такой рост культуры микроорганизмов называют экспоненциальным или логарифмическим. Он имеет место тогда, когда состав микробной биомассы и условия окружающей среды остаются постоянными. Это относится и к смешанным культурам, в которых одноклеточные организмы равномерно распределены в культуральной среде.

## **2.2 Продукты микробного брожения и метаболизма**

К продуктам микробного брожения и метаболизма относятся первичные метаболиты, вторичные метаболиты, ферменты и сама клеточная биомасса (так называемые белки одноклеточных микроорганизмов).

**Первичные метаболиты** – это низкомолекулярные соединения (молекулярная масса менее 1500 дальтон), необходимые для роста микробов; одни из них являются строительными блоками макромолекул, другие участвуют в синтезе коферментов. Среди наиболее важных для промышленности метаболитов можно выделить аминокислоты, органические кислоты, пуриновые и пиримидиновые нуклеотиды, витамины и др. Исходными штаммами для промышленных процессов служат природные организмы и культуры с нарушениями регуляции синтеза этих метаболитов, так как обычные микробные клетки не производят избытка первичных метаболитов.

**Вторичные метаболиты** – это низкомолекулярные соединения, образующиеся на более поздних стадиях развития культуры, не требующиеся для роста микроорганизмов. По химическому строению вторичные метаболиты относятся к различным группам соединений. К ним относят антибиотики, алкалоиды, гормоны роста растений, токсины и пигменты.

## **2.3 Сырье и состав питательных сред для биотехнологического производства**

Питательная среда обеспечивает жизнедеятельность, рост, развитие биообъекта, эффективный синтез целевого продукта. Неотъемлемой частью питательной среды является вода, питательные вещества, которые образуют истинные растворы (минеральные соли, аминокислоты, карбоновые кислоты, спирты, альдегиды и т.д.) и коллоидные растворы (белки, липиды, неорганические соединения - гидроксид железа). Отдельные компоненты могут находиться в твердом агрегатном состоянии, могут всплывать, равномерно распределяться



по всему объему в виде взвеси или образовывать придонный слой.

### Сырье для питательных сред в биотехнологическом производстве

Сырье, используемое для получения целевого продукта, должно быть не дефицитным, недорогим, по возможности легко доступным: меласса - побочный продукт производства сахара, компоненты нефти и природного газа, отходы сельского хозяйства, деревообрабатывающей и бумажной промышленности и т.д. Наиболее часто в качестве компонентов питательных сред используются отходы пищевых производств.

Свекловичная меласса – отход производства сахара из свеклы, богата органическими и минеральными веществами, необходимыми для развития микроорганизмов. Она содержит 45-60 % сахарозы, 0,25-2,0 % инвертного сахара, 0,2-3,0 % рафинозы. Кроме того, в мелассе содержатся аминокислоты, органические кислоты и их соли, бетаин, минеральные вещества, а также некоторые витамины. Используется для промышленного производства лимонной кислоты, этанола и других продуктов.

Мелассная барда – отход мелассно-спиртового производства. Химический состав барды зависит от состава исходной мелассы и колеблется в широких пределах. По своему химическому составу мелассная барда является полноценным сырьем для производства кормовых дрожжей, не требующим добавок ростовых веществ, так как содержит достаточное количество витаминов. Содержание сухих веществ в натуральной барде – 8-12 %, в упаренной барде – 53 %.

Зерно-картофельная барда – отход спиртового производства. Содержание растворимых сухих веществ обычно составляет 2,5-3,0 %, в том числе 0,2-0,5 % редуцирующих веществ, имеются источники азота и микроэлементы. Применяется для получения микробного белка.

Отходы пивоварения (пивная дробина и солодовые ростки), а также отходы подработки несоложенного ячменя являются подходящим, однако небольшим источником усвояемых углеводов для получения

микробного белка. Для производства кормовых дрожжей это сырье соответствующим образом гидролизуют и вводят в питательную среду в соотношении 8 : 0,2 : 0,05 (дробина : ростки : отходы ячменя).

Пшеничные отруби – отход мукомольного производства, используется для приготовления питательных сред при твердофазном способе культивирования. Имеют богатый химический состав и могут использоваться в качестве единственного компонента питательной среды. Так как пшеничные отруби являются дорогим продуктом, их смешивают с более дешевыми компонентами: древесными опилками, солодовыми ростками, фруктовыми выжимками и т.д.

Молочная сыворотка - отход производства сыров, творога и казеина. В связи с этим различают подсырную, творожную и казеиновую сыворотку. По химическому составу и энергетической ценности данный продукт считают «полумолоком». Молочная сыворотка очень богата различными биологически активными соединениями, ее сухой остаток содержит в среднем 70-80 % лактозы, 7-15 % белковых веществ, 2-8 % жира, 8-10 % минеральных солей. Кроме того, молочная сыворотка имеет в своем составе значительное количество гормонов, органических кислот, витаминов и микроэлементов.

Наличие в молочной сыворотке легко усвояемых многими видами микроорганизмов источников углерода, а также различных ростовых факторов, выдвигает ее в ряд наиболее ценных питательных сред для получения продуктов микробного синтеза, например, для производства белковых препаратов в промышленных масштабах. Большое значение имеет и то обстоятельство, что применение молочной сыворотки не требует специальной сложной подготовки, а культуральная жидкость после выращивания микроорганизмов может быть использована в пищевых и кормовых целях без обработки.

### **Состав питательных сред**

Питательные среды могут иметь неопределенный состав, то есть включать биогенные (растительные, животные, микробные) добавки - мясной экстракт, кукурузную муку, морские водоросли и т.д. Применяют также среды, приготовленные из чистых химических соединений в заранее определенных со-

отношениях - синтетические среды.

В состав практически любой питательной среды входят такие компоненты, как вода, соединения углерода, азота, фосфора и других минеральных веществ, витамины.

Вода. Вода должна отвечать требованиям ГОСТ (чистая, бесцветная, без привкуса, запаха и осадка).

Источники углерода. Легкодоступными считаются сахара: глюкоза, сахароза, лактоза, за ними следуют многоатомные спирты: глицерин, маннит и др. Далее следуют полисахариды: целлюлоза, гемицеллюлоза, крахмал, которые могут быть источниками углерода либо после превращения их в усвояемые микроорганизмами моно- и низкомолекулярные олигосахариды, либо микроорганизмы должны иметь набор ферментов, гидролизующих эти вещества. Таковыми микроорганизмами являются плесневые грибы родов *Aspergillus*, *Penicillium*, бактерии рода *Bacillus* и другие.

На практике встречается большое количество микроорганизмов, которые успешно утилизируют органические кислоты, особенно в анаэробных условиях.

Низкомолекулярные спирты: метанол и этанол - относятся к числу перспективных видов сырья. Многие дрожжи родов *Candida*, *Hansenula* и др. способны ассимилировать этанол. Дрожжи родов *Pichia*, *Candida* и другие, бактерии рода *Flavobacterium* используют в качестве единственного источника углерода метанол.

Некоторые виды микроорганизмов (незначительная часть) используют в качестве источника углерода и энергии углеводороды: n-алканы и некоторые фракции нефти.

Источники азота. Азот может содержаться в форме неорганических солей или кислот. Большинство дрожжей хорошо усваивает аммиачные соли, а также аммиак из водного раствора, потребность в нитратах испытывают только некоторые виды дрожжей. Источником азота могут служить и органические соединения: аминокислоты, мочевины и т.д., которые легко усваиваются микроорганизмами.

Известно, что бактерии более требовательны к источникам азота, чем другие микроорганизмы (грибы, актиномицеты и дрожжи).

Источники фосфора. Фосфор является важнейшим компонентом клетки. Он входит в состав АТФ (аденозинтрифосфата), АДФ, АМФ и тем самым обеспечивает нормальное течение энергетического обмена в клетке, а также синтез белков, нуклеиновых кислот и другие процессы биосинтеза. Фосфор вносят в среду в виде солей фосфорной кислоты.

Источники витаминов и микроэлементов. Потребность микроорганизмов в этих соединениях различна, тем не менее, практически все микроорганизмы лучше растут в присутствии витаминов. Эффективной добавкой к питательным средам оказался кукурузный экстракт благодаря наличию в нем витаминов, аминокислот и минеральных элементов в легко усваиваемых формах. В рецептуры сред включают также дрожжевой автолизат, дрожжевой экстракт, сок картофеля, молочную сыворотку, экстракт солодовых ростков и другие продукты. Микроэлементы в состав питательных сред вводят в микродозах, в противном случае они оказывают ингибирующее действие на микробные клетки.

При составлении питательной среды для конкретного вида микроорганизма подбираются наиболее подходящие источники углерода, азота, фосфора и других веществ.

## **2.4 Способы культивирования микроорганизмов**

**Ферментация (культивирование)** - это вся совокупность последовательных операций от внесения в заранее приготовленную и термостатированную питательную среду посевного материала (инокулята) до завершения процессов роста и биосинтеза вследствие истощения питательных веществ среды.

Известно множество процессов культивирования микроорганизмов. Они различаются:

- ♦ по содержанию кислорода – на аэробные и анаэробные;

- ♦ по количеству ферментеров – на одно-, дву- и многостадийные;
- ♦ по наличию или отсутствию перемешивания – на динамические и статические;
- ♦ по состоянию питательной среды – на поверхностные и глубинные.

При поверхностном культивировании посевной материал высевают на поверхность питательной среды, распределенной небольшим слоем (около 10 см) в металлических кюветах.

При глубинном культивировании погружение клеток микроорганизмов осуществляют за счет постоянного перемешивания в течение всего процесса ферментации. Глубинный способ является более выгодным для промышленности по сравнению с поверхностным способом, так как позволяет осуществлять полную механизацию и автоматизацию процесса, избегать инфицирования технологического процесса посторонней микрофлорой.

Классификация процессов культивирования микроорганизмов по способу действия (периодический, непрерывный и промежуточные) представлена на рисунке 2.2.

1 При периодическом способе культивирования стерильная питательная среда засеивается исходной культурой продуцента, и далее в этой же емкости микроорганизмы при определенных условиях проходят через все стадии роста и развития популяции (кривые роста культуры мы рассмотрели ранее в п. 2.1.). Когда процесс культивирования заканчивается, емкость для выращивания освобождают, и цикл возобновляется, начиная от засева питательной среды исходной культурой продуцента. При таком способе культивирования (его можно назвать «закрытой» системой, когда хотя бы один из компонентов не может поступать в нее или выводиться из нее) скорость роста биомассы всегда должна стремиться к нулю либо из-за недостатка питательных веществ, либо из-за накопления в среде токсических метаболитов. Ранее применялось культивирование на поверхности плотных питательных сред в пробирках, колбах, матрасах, бутылках. Выращиваемая в этих условиях культура гетерогенна (разнородна) в физиологическом отношении, так как клетки на различных участках по-

верхности и в разных слоях находятся в различных условиях и развиваются неодинаково. Этот способ иногда применяется для наращивания биомассы.

В настоящее время в промышленности используют жидкие питательные среды, применение которых позволило избежать недостатков плотных питательных сред и увеличило выход процесса за счет использования больших емкостей для культивирования (ферментеров). Применение жидких питательных сред потребовало перемешивания культуры с целью выравнивания условий роста микробов в разных частях рабочего сосуда и аэрирования (насыщения кислородом). Для этого используются мешалки, качалки, бутыли с барботажем газа.

Периодический способ выращивания микроорганизмов используется для получения посевного материала на некоторых этапах, а также при микробиологическом производстве аминокислот, в производстве вакцин и т.д.



Рисунок 2.2 Классификация процессов культивирования микроорганизмов по способу действия

## 2 Промежуточные способы культивирования

2.1 Продленный периодический процесс, как и периодический, предусматривает одноразовую загрузку и разгрузку ферментера. Однако цикл развития микроорганизмов в продленном периодическом процессе удлиняется либо за счет подпитки (периодического или непрерывного добавления питательной среды), либо за счет длительного удержания клеток в системе (диализная культура). В этом случае продлевается экспоненциальная фаза и фаза линейного роста. Суть процесса диализ заключается в том, что культура развивается в пространстве, ограниченном полупроницаемой мембраной, а продукты метаболизма диффундируют во внешний раствор. Наиболее простой диализный метод – культивирование в целлофановых мешках, погруженных в питательную среду.

2.2 Многоциклическими процессами культивирования называют такие, в которых цикл выращивания культуры повторяется многократно без многократной стерилизации емкости. Многоциклическое культивирование может быть различным. Его можно вести в одном ферментере, многократно повторяя полный цикл развития культуры без перерыва на стерилизацию. Способы, осуществляемые в одном ферментере, называют одностадийными. Возможны и многостадийные многоциклические процессы, основанные на принципе повторного и последовательного периодического культивирования, протекающего в нескольких ферментерах, соединенных в батарею, с целью длительного использования культуры. Один из вариантов такого способа заключается в следующем: культура выращивается в одном биореакторе и в то время, когда она проходит в своем развитии экспоненциальную фазу, из нее берется инокулят (посевной материал) для засева следующего реактора. В первом реакторе культура доращивается до необходимой фазы роста. Когда культура во втором реакторе достигает экспоненциальной фазы, из нее также делается пересев в третий реактор и т.д. Поскольку культура все время пересеивается в экспоненциальной фазе, не происходит ее старения и вырождения. Кроме того, отмечается выигрыш во времени, так как одновременно работают несколько ферментеров.



Многоциклические процессы культивирования микроорганизмов применяются как для получения биомассы, так и для производства продуктов микробного синтеза – антибиотиков, внеклеточных ферментов, аминокислот. Применение данного способа позволяет в несколько раз сократить затраты труда на производство продукта по сравнению с периодическим способом.

2.3 В полунепрерывных системах полная загрузка и разгрузка ферментера осуществляются однократно, однако в процессе роста культуры часть культуральной жидкости сливается, а освободившийся объем заливается свежей питательной средой. Таким образом функционирует сливно-доливная система. Различные варианты полунепрерывных систем используются в производстве дрожжей, водорослей, антибиотиков и лимонной кислоты.

3 При непрерывном способе культивирования микроорганизмы постоянно получают приток свежей стерильной питательной среды, а из аппарата непрерывно отбирается биомасса вместе с образуемыми метаболитами (такой способ культивирования можно назвать «открытой» системой). При непрерывном культивировании микроорганизмы не должны испытывать недостатка в питательном субстрате, так как скорость его притока сбалансирована со скоростью выхода биомассы. Кроме того, культура не отравляется продуктами обмена веществ – в этом большое преимущество непрерывного способа культивирования по сравнению с периодическим, преимущество «открытой» системы по сравнению с «закрытой». Непрерывная ферментация может проходить в гомогенной системе идеального смешения, системе полного вытеснения и ли системе твердожидкостного типа.

3.1 Гомогенные системы идеального смешения. В системе идеального смешения микроорганизмы растут в культуральной среде, постоянной по своему составу, и, следовательно, в каждый данный момент времени находятся в одном и том же физиологическом состоянии, то есть в состоянии установившегося динамического равновесия. По количеству ферментеров гомогенные системы могут быть одностадийными, двухстадийными и многостадийными.

Для получения высоких концентраций биомассы используют одностадий-

ные системы с возвратом клеток, в которых клетки, отделенные от культуральной жидкости с помощью насоса, возвращают обратно в ферментер. Возврат клеток (рециркуляция) имеет важное значение в тех процессах, в которых за время пребывания в ферментере клетки не успевают реализовать свои потенциальные возможности в отношении синтеза целевого продукта.

Многостадийные системы состоят из ряда последовательно соединенных ферментеров – батареи. Применение многостадийных систем позволяет получать культуру при любой скорости роста – от лаг-фазы до экспоненциальной и стационарной. Многостадийное культивирование применяется при получении молочной кислоты, этилового спирта.

Основным аппаратом для выращивания непрерывной гомогенной системы является ферментер идеального смешения с устройством для потока среды и слива культуры, поддерживающим постоянный уровень среды. Такой процесс называют непрерывно-проточным, обеспечивающим одинаковую концентрацию всех продуктов внутри ферментера и в вытекающей жидкости.

Непрерывно-проточное культивирование дает возможность поддерживать постоянные условия роста микроорганизмов за счет лимитирования (ограничения) какого-то одного фактора среды. В случае, когда лимитирующим рост фактором является химический состав питательной среды, процесс называют хемотратным культивированием. В хемотрате (ферментере, где протекает хемотратное культивирование) скорость разбавления питательной среды является постоянной в соответствии с заданной плотностью популяции. Изменяя скорость разбавления, можно получать режимы, обеспечивающие различную скорость роста.

Другой принцип управления процессом – турбидостат. В нем подача питательной среды осуществляется по команде фотоэлектрического элемента, регистрирующего оптическую плотность культуры в ферментере. Скорость разбавления устанавливается автоматически в соответствии с заданной плотностью популяции.

Хотя теоретически взаимосвязь между концентрацией биомассы и скоростью разбавления подчиняется одним и тем же закономерностям в хемотрате и турби-

достате, методы управления процессами различны.

3.2 Системы культивирования полного вытеснения. Открытая система полного вытеснения отличается от системы идеального смешения тем, что культура в ней не перемешивается, а представляет собой поток жидкости через трубку. Наиболее распространенным аппаратом для культивирования в данном случае является трубчатый ферментер. Он может иметь различную форму (прямую, S-образную, спиральную) и устанавливается горизонтально или вертикально. Система полного вытеснения представляет собой пространственный, проточный вариант периодической культуры. Такая культура за время посева до выгрузки проходит через все стадии периодической культуры, то есть фазы роста распределены не во времени, а в пространстве, причем каждой части ферментера в установившемся режиме соответствует определенный отрезок кривой роста. Этот способ культивирования используется для анаэробных процессов. Посев осуществляется непрерывно на входе в ферментер одновременно с подачей среды. Этот принцип может использоваться на стадии брожения при производстве пива.

3.3 Системы твердожидкостного типа. К системам твердожидкостного типа относят многофазные системы, в которых культура растет на границе разных фаз: жидкость – твердая фаза - газ. В этих системах клетки удерживаются путем прилипания к твердой основе – наполнителю и размножаются на нем, образуя пленку биомассы. Типичным примером является производство уксуса в стружечных аппаратах.

В данной системе лимитирующим фактором для аэробных микробов являются кислород и субстрат (питательные вещества). В тонких пленках каждая из прикрепленных в поверхности клеток полностью обеспечена этими веществами и способна расти и размножаться с максимальной экспоненциальной скоростью. По мере того, как клетки образуют более толстую пленку биомассы, рост их ограничивается (верхним слоям не хватает кислорода, нижним – питательных веществ).

Культивирование микроорганизмов, образующих пленку из биомассы, осуществляется в ферментере типа колонки с наполнителем. В качестве наполнителя может использоваться макроноситель (кокс, прутья, стружка, стеклянные шарики

и т.д.) и микроноситель (амберлитовые смолы, частички сефадекса и т.д.). Клетки, культивируемые таким образом, называют иммобилизованными. Использование иммобилизованных клеток имеет несколько преимуществ.

Во-первых, появляется возможность длительной эксплуатации клеток в случае непрерывной ферментации.

Во-вторых, известны примеры повышения устойчивости клеток к действию различных неблагоприятных внешних факторов (температуры, кислотности, концентрации токсичных веществ и других) в результате иммобилизации.

В-третьих, существенно упрощаются процедуры выделения используемых клеток и культуральной жидкости, содержащей целевой продукт.

В-четвертых, благодаря применению иммобилизации обычно снижаются энергозатраты на процесс в целом: за счет уменьшения (а, следовательно, и удешевления) размеров применяемых ферментеров; а также за счет упрощения процедур выделения и очистки конечного продукта.

В промышленной микробиологии системы твердожидкостного типа нашли применение при очистке сточных вод, в производстве органических растворителей и кислот и т.д.

## **2.5 Культивирование животных и растительных клеток**

### Особенности культивирования животных клеток

Животные клетки используются для культивирования вирусов, при производстве вакцин, для получения интерферона и т.д.

Суспензию отдельных клеток получают обработкой размельченной ткани эмбриона пищеварительным ферментом трипсином. Если клеткам в такой суспензии дать осесть на плоскую поверхность в сосуде с питательной средой, то клетки становятся плоскими и делятся, образуя монослой. В обычной методике культивирования пользуются цилиндрическими бутылками, которые медленно вращаются вокруг своей длинной оси. Рост клеток и выход биомассы можно увеличить, добавив к суспензии носитель – микроскопические гранулы из инертного синте-

тического полимера, на которых клетки закрепляются. Деление клеток млекопитающих происходит примерно раз в сутки (для сравнения – клетки дрожжей делятся каждые 1,5-2 ч, а бактериальные клетки – каждые 20-60 мин). Клетки млекопитающих нуждаются в многочисленных питательных веществах, поэтому в питательную среду следует добавлять смесь аминокислот, пуринов и пиримидинов для синтеза белков и нуклеиновых кислот, глюкозу в качестве источника углерода и энергии, витамины и минеральные соли для поддержания необходимого осмотического давления и значения рН, близкого к 7,2. Среда также должна содержать небольшие концентрации антибиотиков для подавления роста бактерий и 5-20 % сыворотки (из крови человека или из плода крупного рогатого скота). Для оптимального роста температуру культуры необходимо поддерживать около 37 °С, так как ниже 36 °С клетки либо делятся крайне медленно, либо не делятся вовсе; при температуре выше 38 °С погибают. Большинство культур клеток млекопитающих, в том числе и клеток человека, удается сохранять неопределенно долгое время замороженными в специальной среде при - 180 °С.

#### Особенности культивирования растительных клеток

Культивирование растительных клеток в крупных масштабах было освоено в 1976 г. японскими исследователями, которым удалось получить растительную биомассу в объеме 20 м<sup>3</sup>. Получение массы растительных клеток обходится намного дороже, чем равное количество бактериальных или дрожжевых клеток. Поэтому ученые стараются избежать разрушения клеток с целью извлечения из них полезных для человека соединений. В связи с этим, растительные клетки иммобилизуют внутри пористых полимеров. Доказано, что в таком состоянии клетки удается поддерживать жизнеспособными в течение нескольких сотен дней. Проблемой остается извлечение метаболитов в том случае, когда они синтезируются внутри клеток, а не выделяются в среду.

Культуры растительных клеток применяют для синтеза различных веществ: алкалоидов и других вторичных метаболитов, фитогормонов (регуляторов роста растений) и т.д.

Использование растительных клеток является перспективным направлением биотехнологии, так как клетки, растущие в культуре, способны синтезировать вещества, которые не обнаруживаются в целом растении.

### Вопросы для самопроверки

- 1 Назовите основные стадии роста микроорганизмов.
- 2 Что необходимо для выращивания любой клеточной культуры?
- 3 Какие продукты микробного брожения и метаболизма Вы знаете?
- 4 Какие соединения - первичными или вторичные метаболиты – необходимы для роста микроорганизмов?
- 5 Перечислите отходы пищевой промышленности, широко используемые в качестве сырья для биотехнологического производства.
- 6 Назовите компоненты, которые обязательно должны присутствовать в питательной среде.
- 7 Для чего в состав питательных сред вводят источники азота и фосфора?
- 8 Что такое ферментация (культивирование)?
- 9 Перечислите способы культивирования микроорганизмов.
- 10 В чем особенности периодического способа ферментации?
- 11 Где применяется данный способ?
- 12 Каковы особенности промежуточных способов культивирования?
- 13 В чем преимущество непрерывного способа культивирования?
- 14 В чем отличие хемостата от турбидостата?
- 15 Что такое иммобилизованные клетки, и каковы преимущества их применения?
- 16 Расскажите об особенностях культивирования животных и растительных клеток.

### **3 ОБЩАЯ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ СХЕМА ПРОИЗВОДСТВА ПРОДУКТОВ МИКРОБНОГО СИНТЕЗА**

Процессы биотехнологических производств разнообразны, но все они имеют пять общих основных стадий, которые могут различаться в зависимости от целевого продукта и способа его получения. Основные стадии следующие: приготовление питательной среды; получение посевного материала; культивирование микроорганизмов; выделение целевого продукта; очистка целевого продукта. Общая биотехнологическая схема производства продуктов микробного синтеза приведена на рисунке 3.1.

#### **3.1 Приготовление питательной среды**

Задача специалиста, оптимизирующего состав среды для конкретного вида микроорганизма, - выбрать такие источники углерода, азота, фосфора и других веществ, которые наиболее оправданы в экономическом и экологическом отношении.

Принцип составления питательных сред. Каждый конкретный вид микроорганизмов, используемых в биотехнологии, строго избирателен к питательным веществам. Потребность микроорганизма в тех или иных соединениях определяется физиологическими особенностями данного вида микроба, но во всех случаях среда должна быть водным раствором этих веществ и обеспечивать в определенном количестве их приток в клетку.

В самом приближенном виде физиологические потребности микроорганизма в питательных веществах можно выявить, определив химический состав микробной клетки. Однако в этом случае не учитываются количество и состав метаболитов, удаленных клеткой во внешнюю среду, и то обстоятельство, что состав клеточного вещества микроорганизма зависит от состава среды обитания и варьирует в достаточно широких пределах. Но все же, первоначальную ориентировку в выборе оптимального состава питательной среды, исходя из состава клеточного

вещества микроба, сделать можно.

Важнейшим условием приготовления питательных сред является соблюдение правил **асептики**. Для обеззараживания питательных сред применяют, как известно, химическое воздействие (дезинфекцию), воздействие температуры и других физических факторов (ультразвука, ультрафиолетовых лучей, ультрафильтрации). Каждый из этих методов весьма избирателен. В биотехнологии широко применяют термические методы обеззараживания питательных сред (автоклавирование, стерилизацию, кипячение и др.). Споры микроорганизмов более устойчивы к высокой температуре, поэтому именно споры бактерий являются лимитирующим фактором, определяющим температурные режимы стерилизации сред.

Для стерилизации воздуха в случае аэробных процессов культивирования используют фильтрование и ультрафиолетовое облучение.

### **3.2 Получение посевного материала**

Поддержание чистой культуры штамма-продуцента - ключевая задача любого биотехнологического производства. Культуры микроорганизмов-продуцентов заводы получают из коллекций в пробирках на агаризованных питательных средах или в ампулах. Чистая культура микроорганизма может постоянно или по мере необходимости использоваться в производстве. При длительном хранении чистых культур могут происходить случайные нерегулируемые мутации. Для избежания мутаций следует не только соблюдать правила хранения и поддержания исходной культуры, но и периодически проводить пересев культуры и проверку ее однородности как по морфологическим, так и по физиологическим признакам.

**Посевным материалом (инокулятом)** называют чистую культуру микроорганизма, которую получают путем ее последовательного пересева из пробирки в колбу, а затем в аппараты увеличивающегося объема до количества, необходимого для промышленного производства. Сначала чистую культуру размножают в лаборатории, затем в цехе чистых культур и инокуляции, далее направляют на культивирование.



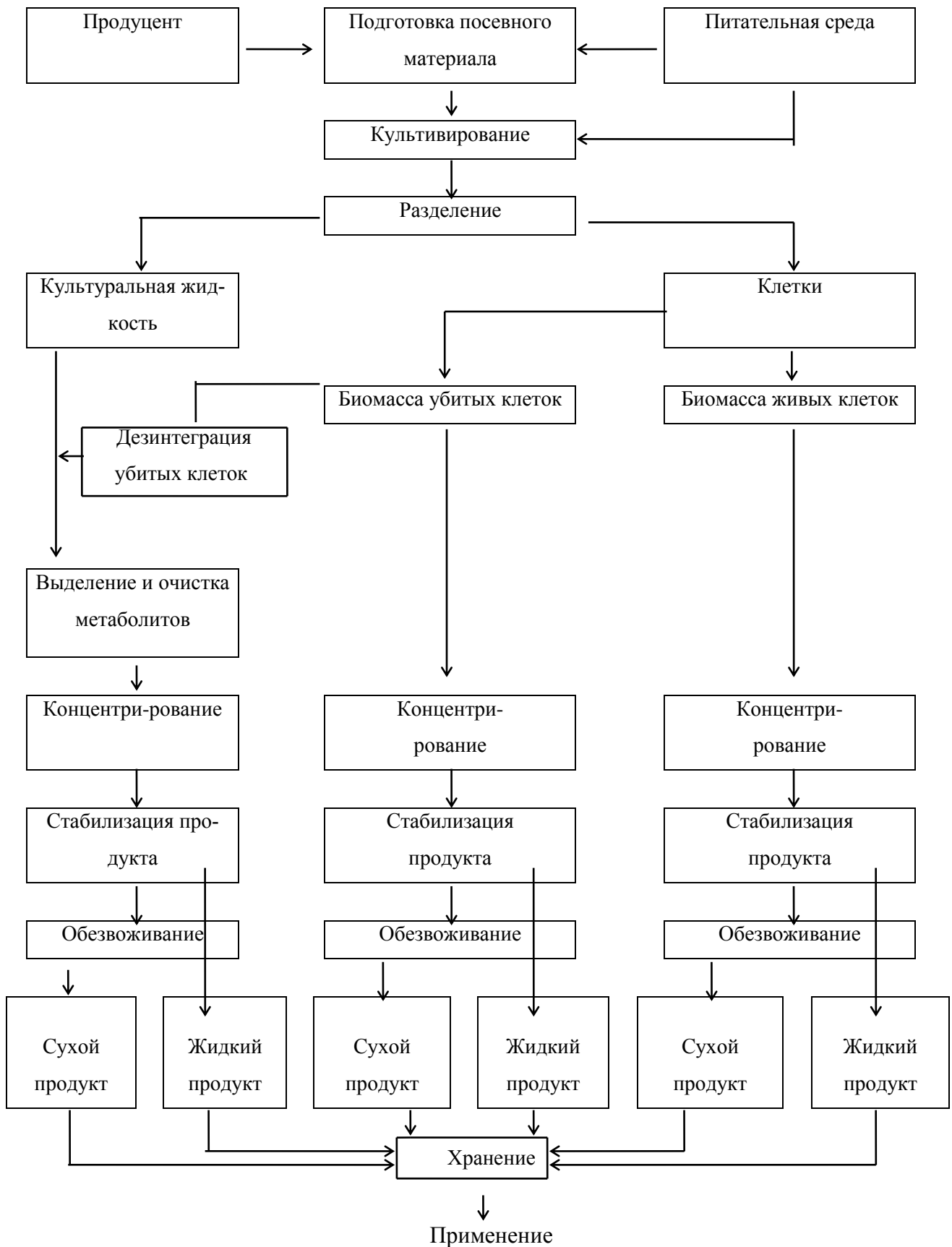


Рисунок 3.1 Принципиальная биотехнологическая схема производства продуктов микробного синтеза

*Приготовление посевного материала состоит из следующих стадий:*

1 Получение культуры микроорганизма в микробиологической лаборатории завода.

2 Выращивание микроорганизмов в малом посевном аппарате.

3 Выращивание микроорганизмов в большом посевном аппарате.

4 Накопление культуры микроорганизмов в малом ферментере.

Передачу чистых культур из одного аппарата в другой осуществляют в конце логарифмической фазы роста. Качество полученного посевного материала контролируют путем микроскопирования.

В биотехнологии широко применяются плесневые грибы, дрожжи, актиномицеты (грамположительные бактерии, не образующие спор), бактерии и водоросли в виде чистых и смешанных культур. В традиционных процессах ферментации предпочтение обычно отдается смешанным культурам, а в большинстве современных ферментационных процессов – монокультурам (чистым культурам), выращиваемых в асептических условиях. Большинство используемых сегодня культур получено из природных источников, однако затем эти культуры были улучшены или путем выращивания в условиях, характерных для данного процесса (для повышения выхода биомассы и первичных метаболитов), или с помощью мутагенеза или генетической инженерии (для производства вторичных метаболитов).

### **3.3 Ферментация (культивирование)**

Это самый важный и продолжительный этап биотехнологического производства. Ферментация представляет собой совокупность последовательных операций от внесения в заранее приготовленную и термостатированную питательную среду посевного материала до завершения процессов роста и биосинтеза вследствие истощения питательных веществ среды. Существует два основных типа ферментаций: получение биомассы микроорганизмов и получение ценных веществ (метаболитов), возникающих в ходе роста или на последующих стадиях развития культуры.

Как говорилось ранее (п. 3.1), для выращивания любой культуры необходимы: жизнеспособный посевной материал; источники энергии и углерода; питательные вещества для синтеза биомассы; отсутствие ингибиторов роста; соответствующие физико-химические условия.

На оптимальной питательной среде при благоприятных значениях pH и температуры, при условии подачи требуемого количества воздуха в среду микроорганизмы быстро начинают расти и размножаться, обеспечивая накопление биомассы продуцента и биологически ценных метаболитов в культуральной жидкости. Способы ферментации мы рассматривали ранее в разделе 2.4.

Для культивирования микроорганизмов в промышленных масштабах применяют **ферментеры (или ферментаторы)** – реакционные емкости, в которых при определенных условиях находятся микроорганизмы. Основное назначение ферментатора – своевременно обеспечить микробные клетки необходимыми питательными веществами и кислородом (при необходимости) и отвести продукты обмена веществ, создать однородный состав среды при условии слабого потока культуральной жидкости (при непрерывном культивировании). Для поддержания кислородного режима ферментатор снабжается устройством подвода воздуха, для лучшего перемешивания среды – мешалками различной конструкции. Для поддержания температуры среды предусмотрены системы охлаждения.

### **3.4 Выделение целевого продукта**

Стадия выделения продукта существенно зависит от того, накапливается продукт в клетках или он выделяется в культуральную жидкость, или же продуктом является сама клеточная масса. Разделение биомассы и культуральной жидкости - сепарация - осуществляется несколькими методами.

Если целевым продуктом является биомасса клеток, применяют следующие методы выделения: отстаивание, фильтрация, флотирование, сепарирование и т.д. (механические способы); выпаривание и сушка (физические способы).

**Фильтрация** – простой и широко применяемый процесс разделения

твердых частиц и жидкости, скорость которого зависит от пористости фильтрующего материала и давления. Фильтрация при помощи вакуумных насосов существенно ускоряет процесс.

**Флотирование** применимо для выделения дрожжевых клеток. Процесс флотирования клеток осуществляется путем вспенивания культуральной жидкости. Вместе с пеной из культуральной жидкости удаляется и основная масса дрожжей.

**Сепарирование** осуществляют в сепараторах, в которых на клетки действует центробежная сила, отбрасывающая клетки к периферии сосуда, а культуральная жидкость будет собираться в центре сепаратора. Этот процесс протекает гораздо быстрее, чем **отстаивание** клеток под действием силы тяжести.

Если целевой продукт содержится в самих клетках, то проводят разрушение клеток - **дезинтеграцию** – физическими, химическими и ферментативными методами.

К физическим методам можно отнести разрушение клеток под действие ультразвука, замораживания-оттаивания, баллистическую дезинтеграцию. Баллистическая дезинтеграция клеток осуществляется в мельницах, куда помещают суспензию клеток и вспомогательные мелющие вещества: песок, стеклянные или полимерные шарики.

К химическим методам дезинтеграции относят разрушение клеток с помощью толуола, бутанола и других химических соединений.

При использовании ферментативной дезинтеграции клеток используют ферменты, способные разрушать определенные структурные компоненты клеточных стенок микроорганизмов. Например, для разрушения бактериальных клеток применяют лизоцимы яиц, бактерий, актиномицетов или грибов. Для разрушения дрожжей и плесневых грибов используются фосфоманназа и бета-глюконаза или применяют автолиз. Автолиз – разрушение клеток дрожжей или плесневых грибов под действием собственных гидролитических ферментов. Для этого суспензию клеток инкубируют при 35-45 °С.

Выделение продукта из культуральной жидкости или гомогената разрушенных клеток проводят путем его осаждения, экстракции, кристаллизации или сорбции.

**Осаждение** в виде нерастворимых солей производят путем добавления химического осадителя в эквимольных количествах. Применяют при получении лимонной, молочной кислоты.

**Экстракция** – добавление к раствору экстрагента (растворителя), который поглощает целевой продукт. Затем эмульсию разделяют и выделяют целевое вещество. Используют при получении витаминов, антибиотиков.

**Кристаллизация** – после предварительной обработки культуральной жидкости и выпаривания при охлаждении осуществляют кристаллизацию. Данный метод выделения и очистки используется при получении глутаминовой, итаконовой и других кислот.

Затем выделенный продукт концентрируют центрифугированием, ультрафильтрацией, выпариванием или обратным осмосом.

**Центрифугирование** – расслоение раствора с частицами бóльшей плотности на осадок и надосадочную жидкость при воздействии центробежной силы.

**Ультрафильтрация** – обработка раствора на мембранных фильтрах с определенным размером пор (то есть разделение веществ на фракции по размерам их молекул). Применяется для ферментов и других белков.

### **3.5 Очистка целевого продукта**

Эта стадия необходима при получении очищенного целевого продукта, например, ферментных препаратов степени очистки более двухкратной. Эта стадия приводит к росту себестоимости получаемого целевого продукта.

Для очистки ферментов применяют избирательную **сорбцию** (связывание) каолином, трифосфатом кальция, гидроксидом алюминия и другими адсорбентами. Таким образом проводят сорбцию либо фермента, либо балластных бел-

ков, которые затем разделяют центрифугированием. Фермент из сорбента отделяют раствором фосфатного буфера.

На последнем этапе продукт отделяют от примесей, концентрируют и стабилизируют. После стабилизации продукта в зависимости от того, каким должен быть конечный продукт: сухим или жидким, его обезвоживают или сразу упаковывают и отправляют на хранение и далее - потребителю.

### Вопросы для самопроверки

1 Перечислите основные стадии биотехнологической схемы получения продуктов микробного синтеза.

2 Как определить физиологические потребности микроорганизмов в питательных веществах?

3 Какие методы применяют для обеззараживания питательных сред в биотехнологическом производстве?

4 Опишите последовательность получения посевного материала для промышленного производства целевого продукта.

5 Основное назначение ферментера.

6 От чего зависит проведение стадии выделения целевого продукта?

7 Какие методы применяют для отделения биомассы клеток от культуральной жидкости?

8 Что такое дезинтеграция, в каких случаях ее осуществляют?

9 Расскажите об основных методах дезинтеграции клеток.

10 В чем отличие сепарирования от центрифугирования?

11 В каких случаях выполняется стадия очистки целевого продукта?

12 Что такое сорбция?

## 4 МИКРОБИОТЕХНОЛОГИЯ

- 1 Биологические объекты биотехнологии.
- 2 Подбор форм микроорганизмов с заданными свойствами.
- 3 Методы биотехнологии.

### 4.1 Биологические объекты биотехнологии

Главным объектом биотехнологического процесса является клетка. В ней синтезируется целевой продукт. По сути, клетка представляет собой миниатюрный химический завод, где ежеминутно синтезируются сотни сложнейших соединений.

Основа современного биотехнологического производства - синтез различных веществ с помощью клеток микроорганизмов. Клетки высших растений и животных еще не нашли широкого применения, ввиду их высокой требовательности к условиям культивирования.

**Начальным этапом биотехнологической разработки** является получение **чистых культур клеток и тканей**. Дальнейшие манипуляции с этими культурами характеризуется единообразием подходов, основанных на классических методах микробиологии. При этом культуры клеток и тканей высших растений и животных уподобляются культурам микроорганизмов.

**Эукариоты и прокариоты.** Большинство микроорганизмов - одноклеточные существа. Микробная клетка отделена от внешней среды клеточной стенкой, а иногда лишь цитоплазматической мембраной и содержит различные субклеточные структуры. Существует два основных типа клеточного строения, которые отличаются друг от друга рядом фундаментальных признаков. Это эукариотические и прокариотические клетки. Микроорганизмов, имеющих истинное ядро, называют эукариотами (эу - от греческого - истинный, кардио - ядро). Микроорганизмы с примитивным ядерным аппаратом относятся к прокариотам (до ядерным).

Среди микроорганизмов **к прокариотам** относятся бактерии, актиномицеты и сине-зеленые водоросли (цианобактерии), **к эукариотам** - прочие водоросли (зеленые, бурые, красные), мицелии (слизевики), низшие грибы - микромицеты (включая дрожжи), простейшие (жгутиконосцы, инфузории и др.).

Их общее свойство - малые размеры, они видны лишь в микроскоп. В настоящее время известно более 100 тыс. видов различных микроорганизмов.

У прокариот не происходят процессы митоза и мейоза. Они размножаются чаще простым делением клетки.

**В эукариотической клетке** имеется ядро, отделенное от окружающей его цитоплазмы двухслойной ядерной мембраной с порами. В ядре находятся 1-2 ядрышка - центры синтеза рибосомальной РНК и хромосомы - основные носители наследственной информации, состоящие из ДНК и белка. При делении хромосомы распределяются между дочерними клетками в результате сложных процессов - митоза и мейоза. Цитоплазма эукариот содержит митохондрии, а у фотосинтезирующих организмов и хлоропласта. Цитоплазматическая мембрана, окружающая клетку, переходит внутри цитоплазмы в эндоплазматическую сеть; имеется также мембранная органелла - аппарат Гольджи.

**Прокариотические клетки** устроены проще. В них нет четкой границы между ядром и цитоплазмой, отсутствует ядерная мембрана. ДНК в этих клетках не образует структур, похожих на хромосомы эукариот. У прокариот не происходят процессы митоза и мейоза. Большинство прокариот не образует внутриклеточных органелл, ограниченных мембранами, нет митохондрий и хлоропластов.

## **4.2 Подбор форм микроорганизмов с заданными свойствами**

Подбор необходимых для культивирования форм микроорганизмов с заданными свойствами включает несколько этапов.

**4.2.1 Выделение микроорганизмов.** Отбираются пробы из мест обитания микроорганизмов (почва, растительные остатки и т.д.). Применительно к углеводородокисляющим микроорганизмам таким местом может быть почва возле



бензоколонок, винные дрожжи обильно встречаются на винограде, анаэробные целлюлозаразлагающие и метанобразующие микроорганизмы в больших количествах обитают в рубце жвачных животных.

**4.2.2 Получение накопительных культур.** Образцы вносят в жидкие питательные среды специального состава, создают благоприятные условия для развития продуцента (температура, pH, источники энергии, углерода, азота и т.д.). Для накопления продуцента холестериноксидазы используют среды с холестерином в качестве единственного источника углерода; углеводородокисляющих микроорганизмов - среды с парафинами; продуцентов протеолитических или липолитических ферментов - среды, содержащие белки или липиды.

**4.2.3 Выделение чистых культур.** На плотные питательные среды засевают образцы проб из накопительных культур. Отдельные клетки микроорганизмов на плотных питательных средах образуют изолированные колонии или клоны, при их пересеве получают чистые культуры, состоящие из клеток одного вида продуцента.

**Другой путь подбора микроорганизмов - из имеющихся коллекций.** Например, продуцентами антибиотиков чаще являются актиномицеты, этанола - дрожжи.

**Клон** - культура, полученная из одной клетки, **чистая культура** - совокупность особей одного вида микроорганизмов, **штаммы** - культуры, выделенные из различных природных сред или из одной среды в разное время.

**4.2.4 Определение способности синтезировать целевой продукт** - главный критерий при отборе продуцентов. Микроорганизмы должны соответствовать следующим требованиям:

- 1) обладать высокой скоростью роста;
- 2) использовать для жизнедеятельности дешевые субстраты;
- 3) быть устойчивыми к заражению посторонней микрофлорой.

Одноклеточные организмы характеризуются более высокими скоростями синтетических процессов, чем высшие растения и животные. Так, корова массой 500 кг в течение одних суток синтезирует около 0,5 кг белка. Такое же количест-

во белка за одни сутки можно получить с помощью 5 г дрожжей. Интерес представляют фотосинтезирующие микроорганизмы, использующие энергию света, способные к усвоению атмосферного азота. Выгодны термофильные микроорганизмы. Их использование снижает дополнительные затраты на стерилизацию промышленного оборудования. Скорость роста и обмен веществ у этих организмов в 1,5-2 раза выше, чем у мезофилов. Синтезирующие ими ферменты устойчивы к нагреванию, действию кислот, органических растворителей.

### **4.3 Методы биотехнологии**

В биотехнологии выделяют 2 метода: 1) Селекция; 2) Генная инженерия. Для получения высокоактивных продуктов используют методы селекции. С помощью селекции получены промышленные штаммы микроорганизмов, синтетическая активность которых превышает активность исходных штаммов в десятки и сотни раз.

#### **4.3.1 Селекция**

**Селекция** - направленный отбор мутантов (организмов, наследственность которых претерпела скачкообразное изменение). Генеральный путь селекции - переход от простого отбора продуцентов к сознательному конструированию их геномов. На каждом из этапов из популяции микроорганизмов отбираются наиболее высокоэффективные клоны. Таким путем за длительное время были отобраны штаммы пивных, винных, пекарских, уксуснокислых дрожжей, пропионовокислых бактерий и др. Применяется ступенчатый отбор: на каждом из этапов из популяции микроорганизмов отбираются наиболее высокоэффективные клоны. Ограниченность метода селекции, основанного на спонтанных мутациях, связана с их низкой частотой, что значительно затрудняет интенсификацию процесса. Изменения в структуре ДНК происходят редко. Ген должен удвоиться в среднем  $10^6$ - $10^8$  раз, чтобы возникла мутация. Примером отбора наиболее продуктивных мутантов при культивировании в непрерывном режиме является отбор дрожжей по признаку устойчивости к этанолу, продукту жизнедеятельности дрожжей. К зна-

чительному ускорению селекции ведет индуцированный мутагенез - резкое увеличение частоты мутаций биообъекта при искусственном повреждении генома. Мутагенным действием обладают ультрафиолетовое, рентгеновское или у-излучение, некоторые химические соединения, вызывающие изменения первичной структуры ДНК. К числу наиболее известных и используемых мутагенов относятся азотистая кислота, алкилирующие агенты и т.д.

Проводят тотальную проверку (**скрининг**) полученных клонов. Отобрав наиболее продуктивные клоны, повторяют обработку тем же или другим мутагеном, вновь отбирают наиболее продуктивный вариант и т.д., т.е. речь идет о ступенчатом отборе по интересующему признаку.

Трудоемкость - основной недостаток метода индуцированного мутагенеза и последующего ступенчатого отбора. Недостатком метода является также отсутствие сведений о характере мутаций, исследователь проводит отбор по конечному результату.

#### **4.3.2 Генетическая инженерия**

Генетическая инженерия – направленная модификация биообъектов в результате введения искусственно созданных генетических программ. **Уровни генетической инженерии:**

1)**генная** – прямое манипулирование рекомбинантными ДНК, включающими отдельные гены;

2)**хромосомная** – манипулирование с группами генов или отдельными хромосомами;

3)**геномная** (клеточная) – перенос всего или большей части генетического материала от одной клетки к другой (клеточная инженерия). В современном понимании генетическая инженерия включает технологию рекомбинантных ДНК.

**Работа в области генетической инженерии включает 4 этапа:** 1) получение нужного гена; 2) встраивание его в вектор, способный к репликации; 3) введение гена с помощью вектора в организм; 4) питание и селекция клеток, которые приобрели желаемый ген.

Генетическая инженерия высших растений осуществляется на клеточном, тканевом и организменном уровне.

Основой клеточной инженерии является гибридизация соматических клеток – слияние неполовых клеток с образованием единого целого. Слияние клеток может быть полным или с введением их отдельных частей (митохондрий, хлоропластов и т.д.).

Соматическая гибридизация позволяет скрещивать генетически отдаленные организмы. Растительные, грибные и бактериальные клетки перед слиянием освобождают от клеточной стенки и получают протопласты. Затем проводят деполяризацию наружных цитоплазматических мембран переменным электрическим или магнитным полем, используют катионы  $\text{Ca}^+$ . Клеточную стенку подвергают ферментативному гидролизу.

#### Вопросы для самопроверки

- 1 Что является объектом биотехнологии?
- 2 Какие существуют типы клеточного строения?
- 3 Какие выделяют этапы роста культуры?
- 4 Что такое селекция и генная инженерия?

## 5 СПОСОБЫ И СИСТЕМЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

1 Способы культивирования микроорганизмов.

2 Системы культивирования микроорганизмов.

3 Методы, используемые в биотехнологическом производстве.

### 5.1 Способы культивирования микроорганизмов

Биотехнологические процессы воспроизводства микроорганизмов могут быть основаны на **периодическом или непрерывном культивировании**.

**Биореактор, ферментер или ферментатор** - это закрытая или открытая емкость, в которой при определенных условиях (давление, температура, концентрация сухих веществ, рН среды и т.д.) протекает на клеточном или молекулярном уровне контролируемая реакция, осуществляемая с помощью микроорганизмов.

**Периодический процесс включает:** а) стерилизацию сред, биореакторов и вспомогательного оборудования; б) загрузку аппарата питательной средой; в) внесение посевного материала (клеток, спор); г) рост культуры, который может совпадать во времени со следующим этапом или предшествовать ему; д) синтез целевого продукта; е) отделение и очистку готового продукта. Речь идет о временной последовательности этапов, по окончании последнего этапа проводится мойка биореактора и его подготовка к новому циклу.

Этап роста культуры включает несколько фаз: а) **лаг-фазу** - сравнительно медленный рост внесенной культуры, осваивающей новую среду обитания в объеме биореактора; б) **экспоненциальную фазу** - бурное деление клеток, сбалансированный рост культуры; в) **фазу замедленного роста**, связанного с исчерпанием питательных субстратов и накоплением токсических продуктов метаболизма; г) **стационарную фазу** - прирост клеток равен их убыли; д) **фазу отмирания** - постепенное снижение числа жизнеспособных клеток.

Биотехнологически ценные продукты синтезируются в экспоненциальную фазу (нуклеотиды, многие ферменты, витамины - так называемые **первичные метаболиты**) или в стационарную фазу роста (антибиотики, красящие вещества и т.д. — так называемые **вторичные метаболиты или идиолиты**).

Широко применяют **периодическое культивирование с подпиткой**: помимо внесения питательного субстрата в реактор до введения в него биообъекта, в процессе культивирования в аппарат добавляют питательные вещества через определенные промежутки времени порциями или непрерывно «по каплям». Иногда дополнительно вносят биообъект.

Существует также **отъемнодоливочное культивирование**, когда часть объема из биореактора время от времени изымается при добавлении эквивалентного объема среды. Это приводит к регулярному омолаживанию культуры и к задержке ее перехода к фазе отмирания. Такой режим культивирования в значительной мере уподобляется непрерывному процессу, поэтому называется также **полунепрерывным культивированием**.

**В непрерывных процессах** биообъект постоянно поддерживается в экспоненциальной фазе роста. Обеспечивается непрерывный приток свежей питательной среды в биореактор и отток из него культуральной жидкости, содержащей клетки и продукты их жизнедеятельности. Фундаментальным принципом непрерывных процессов служит равновесие между приростом биомассы за счет деления клеток и их убылью в результате разбавления свежей средой. Различают хемотратный и турбидостатный режимы непрерывного культивирования.

### ***Глубинный метод культивирования продуцентов ферментов***

Глубинный метод культивирования заключается в выращивании микроорганизмов в жидкой питательной среде. Он технически более совершенен, чем поверхностный, так как легко поддается механизации и автоматизации.

Весь процесс должен проводиться в строго асептических условиях, что с одной стороны, является преимуществом метода, а с другой - составляет наи-

большую техническую трудность, т.к. нарушение асептики часто приводит к прекращению образования фермента.

**Концентрация фермента** в среде при глубинном культивировании обычно значительно ниже, чем в водных экстрактах поверхностной культуры. Фильтраты культуральных жидкостей содержат не более 3% сухих веществ. Это вызывает необходимость предварительного концентрирования фильтратов перед тем, как выделять ферменты любым методом.

### *Поверхностный метод культивирования продуцентов ферментов*

Культура растет на поверхности твердой увлажненной питательной среды. Мицелий полностью обволакивает и прочно скрепляет твердые частицы, клетки получают питание за счет содержащихся в этих средах веществ и используют для дыхания кислород воздуха, поэтому для их нормального обеспечения кислородом приходится применять рыхлые по своей структуре среды с небольшой высотой слоя.

Недостатком метода является необходимость больших площадей для выращивания. Выращивание производственной культуры происходит обычно в неасептических условиях. Однако среда и кюветы должны быть надежно стерилизованы. Перед новой загрузкой должны дезинфицироваться растительные камеры, а также все мелкое оборудование и инвентарь.

Главное преимущество поверхностного метода - более высокая конечная концентрация фермента на единицу массы среды. Например, для осахаривания 100 кг крахмала в спиртовом производстве требуется 5 кг поверхностной культуры плесневых грибов или около 100 кг культуральной жидкости. Поверхностные культуры можно быстро и легко высушить, их легко перевести в товарную форму и транспортировать. Меньше потребность электроэнергии по сравнению с глубинным методом.

## 5.2 Системы культивирования микроорганизмов

*Культивирование микроорганизмов может осуществляться в открытой или закрытой системе.*

**Система называется закрытой**, если ни одна составная часть этой системы после начала процесса в биореакторе не вводится и не выводится. В периодическом процессе в ферментер сначала подают все питательные вещества, водную фазу и посевной материал. Процесс идет в соответствии с кривой роста микроорганизмов с заключительным замиранием реакции, обусловленным недостатком субстрата, накоплением токсических метаболитов, неблагоприятным изменением физико-химических условий окружающей среды (рН, температура, парциальное давление кислорода, вязкость), гибелью и лизисом микроорганизмов. Во время культивирования все параметры непрерывно изменяются.

Развитие управляемых периодических процессов привело к созданию **объемно-доливочной системы**: в процессе культивирования главные компоненты среды добавляют дробно, чем исключают субстратное ингибирование. Никакие жидкие компоненты из среды не отводят.

**Открытые системы работают** в непрерывном потоке. В процессе реакции часть отработанной питательной среды из биореактора удаляют и добавляют новую, что обеспечивает непрерывность процесса. В единицу времени субстрата вводят не больше, чем может переработать культура. Проводят непрерывное культивирование по крайней мере с одной лимитирующей рост концентрацией вещества. Регулирование осуществляют поддержанием концентрации биомассы или продукта на постоянном уровне путем изменения концентрации субстрата (**турбидостат**) или применения строго лимитированной концентрации питательных веществ с соответствующим изменением концентрации клеток или продукта (**хемотрат**).

При получении микробных белковых препаратов часто применяют непрерывное культивирование как более экономичное и легче контролируемое. Концентрация питательных веществ вокруг клетки должна лежать в пределах допус-



тимой области и не способствовать течению побочных реакций, которые могут привести к образованию осадков, осаждающихся и на стенках ферментера.

### 5.3 Методы, используемые в биотехнологическом производстве

**Методы хранения посевного материала.** При промышленном культивировании клеток в биореакторах идет процесс постепенного вытеснения менее приспособленных форм более приспособленными, часто менее продуктивными по отношению к вырабатываемым веществам. Он получил название **автоселекции**. В связи с этим встает проблема длительного хранения клеток без утраты ценных свойств. Это возможно, если резко затормозить все протекающие в них жизненные процессы. Существуют следующие методы хранения.

**1 Лиофильное высушивание** (обезвоживание после замораживания при температуре  $-40\sim-60^{\circ}\text{C}$  и ниже). Применяется в отношении продуцентов антибиотиков. **а) Высушивание на воздухе в стерильной среде** (на почве, бумаге, дисках агар-агара и т.д.). **б) Сохранение спор** (пригоден для спорообразующих бактерий рода *Bacillus*). **в) Криоконсервация** - глубокое замораживание клеток с их последующим хранением в жидком азоте ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) или в парах азота ( $-155^{\circ}\text{C}$ ).

Значительные трудности представляет поддержание сред, оборудования, воздуха в стерильном состоянии. Это необходимо для исключения попадания в биореакторы посторонних микроорганизмов.

Клетки лучше сохраняют свои свойства при создании щадящих условий в биореакторе, приближенных к условиям в лабораторном культиваторе.

**2 Выделение целевого продукта.** Это завершающая стадия биотехнологического процесса. Продукт может накапливаться в клетке или выделяться в культуральную жидкость. Наиболее сложно выделение продукта, накапливающегося в клетках. Для этого клетки необходимо отделить от культуральной жидкости, разрушить, затем целевой продукт очистить от массы компонентов разрушенных клеток.

**Первым этапом** на пути к очистке целевого продукта является отделение биомассы от культуральной жидкости - сепарация.

### **Виды сепарации:**

**1 Флотация.** Если клетки продуцента в биореакторе из-за низкой смачиваемости накапливаются в поверхностных слоях жидкости, то жидкость предварительно вспенивают, затем отделяют ее верхний слой с клетками. Флотаторы различных конструкций сцеживают, откачивают или соскребают пену, состоящую из пузырьков газа с прилипшими к ним клетками. Флотацию широко используют как первый этап отделения дрожжевой массы для осветления культуральной жидкости.

**2 Фильтрация** - задержание биомассы на пористой фильтрующей перегородке. Применяют фильтры однократного или многократного использования: барабанные, дисковые, ленточные, тарельчатые, карусельные, вакуум-фильтры, фильтр-прессы различных конструкций, мембранные фильтры. Диаметр пор может превышать размеры клеток. Иногда биомассу сдувают с поверхности фильтра сжатым воздухом или срезают специальным ножом.

**3 Центрифугирование** - осаждение взвешенных в жидкости частиц с применением центробежной силы. Требует более дорогостоящего оборудования, чем фильтрование. Поэтому оно оправдывает себя, если: а) суспензия фильтруется медленно; б) поставлена задача максимального освобождения культуральной жидкости от содержащихся частиц; в) необходимо наладить непрерывный процесс сепарации в условиях, когда фильтры рассчитаны только на периодическое действие.

Центрифугирование и фильтрация иногда реализуются в комбинации, в фильтрационных центрифугах. Перспективны для осаждения биомассы центрифуги-сепараторы, в которых биомасса оседает на стенках вращаемого цилиндра или на тарелках специальной тарельчатой вставки.

**Вторым этапом** при получении продукта, накапливающегося в клетках, является разрушение клеток, которое проводят физическим, химическим и химико-ферментативными методами.

**Физическое разрушение** проводят ультразвуком, с помощью вращающихся лопастей или вибраторов, встряхиванием со стеклянными бусами, продавливанием под высоким давлением через узкое отверстие, раздавливанием замороженной массы, растиранием в струнке, осмотическим шоком, замораживанием - оттаиванием, сжатием с последующим резким снижением давления. Этим способам дезинтеграции клеток присуща определенная неизбирательность: обработка может отрицательно влиять на качество получаемого продукта. Физические методы позволяют целенаправленно выделять какую-либо одну фракцию внутриклеточного содержимого.

**Химическое и химико-ферментативное разрушение клеток** избирательно, не всегда пригодно. Его проводят обработкой клеток толуолом или бутанолом при промышленном получении дрожжевого автолизата и ряда ферментов. Эффективный лизис клеток вызывают антибиотики полимиксины, тироцидины, новобиоцин, нистатин и другие, некоторые поверхностно-активные вещества, а также глицин.

Разрушенные клеточные стенки отделяют методами сепарации. В большинстве биотехнологических процессов клеточные стенки отбрасывают как балласт, но возможно и промышленное получение компонентов клеточных стенок как целевого продукта.

**Третий этап** - выделение целевого продукта из культуральной жидкости или гомогената разрушенных клеток проводят путем его осаждения, экстракции или адсорбции.

**1 Осаждение растворенных веществ** возможно физическими (нагревание, охлаждение, разбавление или концентрирование раствора) или химическими методами, переводящими отделяемый продукт в малорастворимое состояние. Так, пенициллин переводят в кристаллический осадок в присутствии соединений калия или натрия. Белки осаждают добавлением сульфата аммония, органических растворителей (этанола, ацетона). Нуклеиновые кислоты осаждают с помощью полииминов, основные группы которых вступают во взаимодействие с их фос-

фатными группами. Современной модификацией метода является аффинное осаждение.

**2 Экстракция** – извлечение продукта из твердого (**твердо-жидкофазная**) или жидкого (**жидко-жидкофазная**) образца. К твердо-жидкофазной экстракции относится обливание образца водой с целью извлечения из него растворимых веществ, например солей металлов из руд, подвергнутых бактериальной обработке, или растворимых продуктов из массы субстрата (соломы и т.д.) при твердофазном культивировании. Применяют органические растворители, например, при экстракции клеточной массы ацетоном, переводящим в раствор ряд липидных и белковых компонентов.

Жидко-жидкофазная экстракция – добавление органических растворителей для извлечения из культуральной жидкости антибиотиков, витаминов, каротиноидов, липидов, некоторых гидрофобных белков. Витамин В12 экстрагируют фенолом и его производными (крезол, другие алкилфенолы, галогениды). Используют бензиловый спирт, особенно в щелочных условиях. Фосфолипиды извлекают путем экстракции хлороформом.

Полностью избежать нагревания, губительного для многих ценных веществ, позволяют методы **холодовой экстракции (криоэкстракции)**. Она как бы нивелирует различие между твердым субстратом и культуральной жидкостью, поскольку и то и другое находится в замороженном состоянии. Кристоэкстракция осуществляется растворителями, кипящими при низких температурах и находящимися при комнатной температуре в газообразном состоянии. Кристоэкстракция может использоваться в комбинации с криоконсервацией клеток. Урожай клеток длительное время хранится без потери свойств в условиях глубокого замораживания.

**3 Адсорбция** – частный случай экстракции, при котором экстрагирующим веществом из жидкой или газовой фазы является твердое тело. Хорошими адсорбентами являются древесный уголь, глины с развитой пористой поверхностью. Путем адсорбции из культуральной жидкости выделяют антибиотики и витамины.

К современным методам разделения веществ, основанным на принципах экстракции и адсорбции, относятся хроматография, электрофорез, изотахофорез, электрофокусировка.

#### **5.4 Концентрирование, обезвоживание, модификация и стабилизация продукта**

**Концентрирование** продукта проводят методами обратного осмоса, ультрафильтрации, выпаривания.

Если мембрана пропускает воду, задерживая растворенные в ней вещества, речь идет об **осмосе**.

**Ультрафильтрация** - отделение веществ с помощью мембранных фильтров.

**Наиболее древний метод - выпаривание.** Его недостаток состоит в необходимости нагревания, которое проводят при низком давлении. Используют вакуум-выпарные аппараты. Нагревающим агентом чаще всего служит водяной пар, хотя используют также обогрев жидким теплоносителем или электрообогрев. Пар характеризуется большой теплотой конденсации и облегчает регулировку процесса выпаривания.

**Обезвоживание продукта** - сушка на подносах, на ленточном конвейере с подогревом, подачей газообразного нагревательного агента (воздух, CO<sub>2</sub>, дымовые или топочные газы и др.) в сушильный аппарат, в вакуум - сушильных шкафах, в барабанных и распылительных сушилках.

**Модификация продукта** - перестройка полученных соединений животного, растительного или микробного происхождения с целью придания им специфических свойств, необходимых человеку. Химическая модификация необходима в тех случаях, когда биотехнологический процесс дает лишь «заготовку» целевого продукта.

Модификация - необходимый этап в получении ряда ферментов, гормонов, препаратов медицинского назначения. Например, у бычьего инсулина «отстрига-

ют» аминокислотные остатки, после чего он становится идентичным человеческому гормону.

Стабилизация продукта направлена на сохранение свойств продукта в период его хранения и использования потребителем (добавление наполнителей, модификация и др.). Включает физико-химические воздействия на продукт Сушка повышает устойчивость продукта к внешним воздействиям. Обезвоживание ферментов вызывает их устойчивость к нагреванию.

К стабилизации продуктов, в том числе кормового микробного белка, ведет добавление наполнителей из грибного мицелия, пшеничных отрубей, кукурузной муки, которые сами обладают питательной ценностью.

#### Вопросы для самопроверки

- 1 Что такое биореактор?
- 2 Какие существуют способы культивирования микроорганизмов?
- 3 Что значит открытая и закрытая системы культивирования микроорганизмов?

## **6 ПОЛУЧЕНИЕ БИОМАССЫ МИКРООРГАНИЗМОВ**

Сбалансировать содержание в кормах белка и его аминокислотный состав можно с помощью биомассы микроорганизмов.

### **6.1 Получение биомассы микроорганизмов в качестве источника белка**

Этот белковый источник имеет ряд преимуществ:

- большая скорость роста микроорганизмов (микроорганизмы растут в 500 раз быстрее, чем сельскохозяйственные культуры и в 1000-5000 раз быстрее, чем самые быстрорастущие породы животных);

- высокое содержание белка в биомассе: дрожжи способны накапливать до 40-50 % белка от своей массы, а некоторые бактерии до 60-70 % белка;
- удовлетворительная биологическая ценность белков: по содержанию большинства незаменимых аминокислот (лизина, триптофана и др.) белок многих дрожжей и бактерий соответствует эталону (яичному белку);
- независимость производства от погодных и сезонных условий: биомассу микроорганизмов можно получать круглогодично;
- возможность выращивания биомассы на различных непищевых субстратах и на отходах ряда производств;
- возможность организации производства микробного белка промышленными методами с применением автоматизации.

Использование того или иного продуцента при производстве белковых препаратов определяется составом питательной среды и назначением белка. Требования менее строги, если белок предназначен для кормовых целей и должны быть высокими, если белковые препараты используются в пищу.

Эффективность применения микроорганизма-продуцента для производственных целей определяется, с одной стороны, скоростью его роста, с другой - степенью использования питательных веществ среды. Продуценты белков должны отвечать следующим требованиям:

- ♦ накапливать 40-70 % белка от своей биомассы;
- ♦ максимально усваивать питательные вещества среды;
- ♦ не являться болезнетворными и не выделять в среду токсических продуктов;
- ♦ обладать высокой устойчивостью и выживаемостью в нестерильных условиях выращивания;
- ♦ иметь высокую скорость размножения и роста;
- ♦ легко отделяться от среды.

Промышленные культуры, используемые для биосинтеза белковых веществ, должны отвечать медико-биологическим требованиям.

Преимуществом дрожжей перед другими микроорганизмами является их

технологичность: устойчивость к инфекциям, легкость отделения от среды благодаря крупным размерам клеток по сравнению с бактериями, способность усваивать различные источники углерода, азота и способность расти на простых средах, высокие питательные свойства и приятный запах биомассы. Дрожжевая биомасса представляет собой полноценный белковый продукт с высоким содержанием витаминов, который может найти применение как для кормовых, так и для пищевых целей.

Преимуществом бактерий является высокая скорость роста, большее, чем у других микроорганизмов, содержание белка и незаменимой аминокислоты метионина в биомассе. По составу аминокислот бактериальный белок приближается к животному и поэтому имеет большую ценность в качестве кормового препарата. Однако при использовании бактерий должен быть тщательно изучен состав их липидов, так как у некоторых из них в липидах могут содержаться токсины. Недостатком бактерий являются маленькие размеры клеток и плотность, близкая к плотности воды, что затрудняет их выделение из культуральной жидкости.

Кроме того, биомасса дрожжей и бактерий имеет высокое содержание нуклеиновых кислот (до 12 % и до 16 % соответственно), что ведет к образованию нежелательных продуктов распада в животном организме.

Водоросли, как и все другие микроорганизмы, водоросли являются перспективным источником получения белка. Они легко отделяются от субстрата, медленнее растут, чем дрожжи и поэтому содержат меньше нуклеиновых кислот в биомассе. Общее содержание белка в водорослях может достигать 70 %. Причем эти белки полноценны по аминокислотному составу.

Грибы. Для получения кормового и пищевого белка можно использовать промышленное выращивание различных видов низших и высших грибов. Некоторые виды микроскопических грибов способны накапливать до 50 % белка.

По содержанию незаменимых аминокислот белок грибов приближается к белку животного происхождения, биомасса богата витаминами, особенно, группы В, содержание нуклеиновых кислот низкое (2,5 %), клеточные стенки тонкие и легко перевариваются в желудочно-кишечном тракте животных.



При выращивании микроскопических грибов на жидкой питательной среде, как правило, на первой стадии культивирования происходит интенсивное образование биомассы. В условиях глубинного культивирования в первые 5-6 часов происходят сложные внутриклеточные преобразования в конидиях, они набухают, и появляются первые гифы. Далее идет быстрое развитие и рост мицелиальной массы гриба. Мицелий может формироваться в виде шариков или кашеобразной массы.

### **Промышленное производство микробного белка**

Независимо от вида используемого сырья, технологический процесс производства микробных белковых препаратов состоит из следующих основных стадий (рис. 6.1): подготовка сырья и приготовление питательных сред для выращивания микроорганизмов; культивирование микроорганизмов; выделение биомассы продуцента из культуральной жидкости; плазмолиз клеток; сушка биомассы; фасовка и упаковка готового препарата.

В качестве питательной среды для производства белковых препаратов в промышленных масштабах используют молочную сыворотку. Более подробно химический состав и свойства молочной сыворотки описаны в разделе 2.3. На молочной сыворотке хорошо растут и накапливают значительное количество белка дрожжи *Kluuveromyces* и *Candida*. Большое значение имеет и то обстоятельство, что применение молочной сыворотки не требует специальной сложной подготовки, а культуральная жидкость после выращивания микроорганизмов может быть использована в пищевых и кормовых целях без обработки.

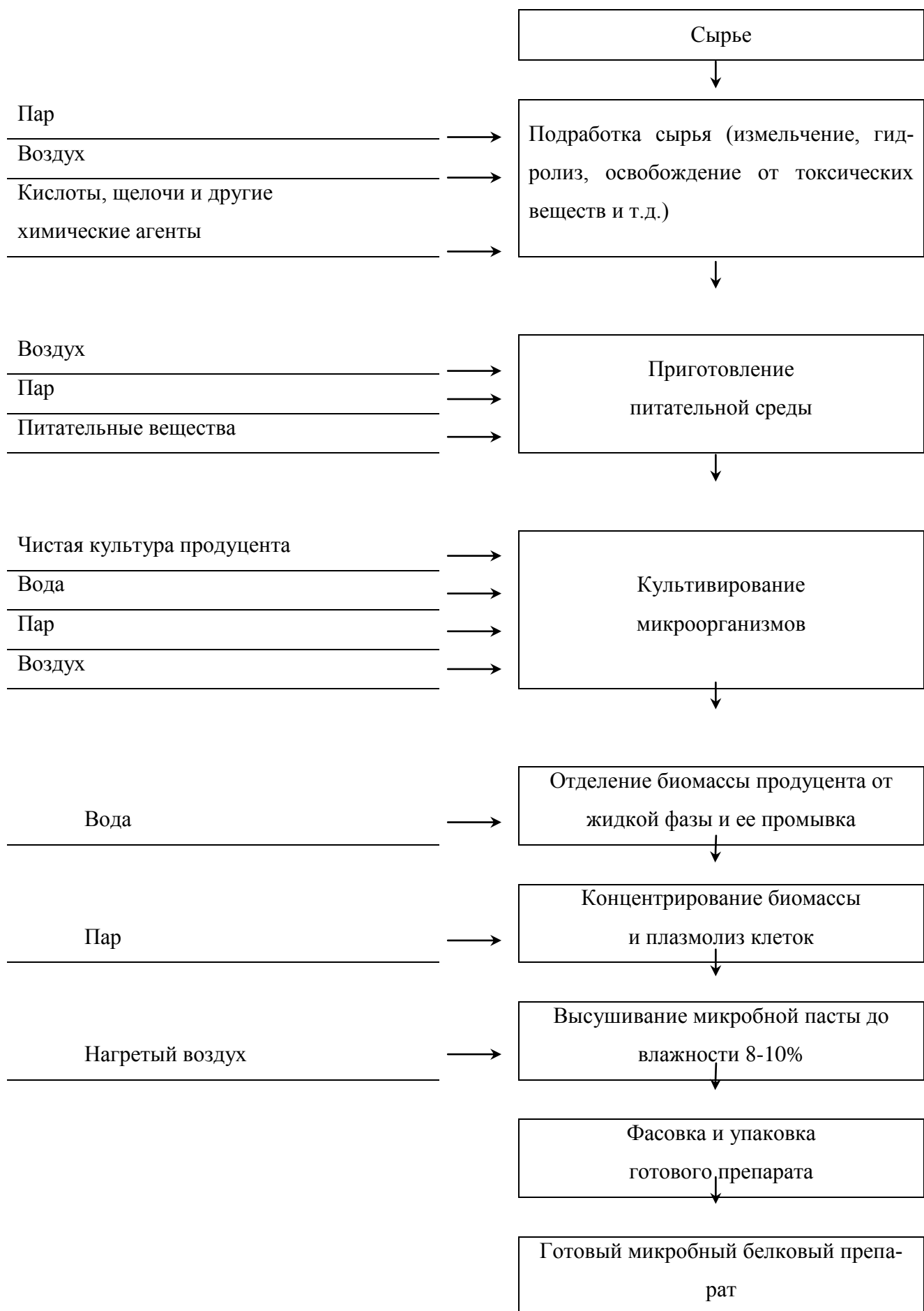


Рисунок 6.1 Основные стадии процесса производства микробных белковых препаратов

При всестороннем исследовании микробной массы, полученной на молочной сыворотке, была выявлена ее высокая технологическая и экономическая эффективность для мясного и молочного животноводства, птицеводства и целого ряда других направлений.

Для получения белка на гидролизатах растительного сырья наиболее часто используют дрожжи рода *Candida*, реже - дрожжи рода *Trichosporon*. Также дрожжи рода *Candida* способны к синтезу белка на сульфитных щелоках и жидких углеводородах. Газообразные углеводороды хорошо потребляются бактериями родов *Mycobacterium* и *Pseudomonas*.

Применение биомассы микроорганизмов в качестве белковой добавки в корма требует всестороннего изучения ее состава и свойств, в частности перевариваемости и усвояемости. Испытанию на токсичность должны подвергаться не только живые клетки, но и продукты их метаболизма, а также готовые белковые продукты. Обязательным условием должно быть отсутствие в них живых клеток штамма-продуцента, чтобы не происходил вторичный рост.

Наиболее эффективным путем использования микробного белка для ликвидации белкового дефицита в питании человека является его применение непосредственно для пищевых целей. Микробный белок используется в пищевой промышленности для изготовления различных продуктов и полуфабрикатов, начиная с 1985 г.

В производстве пищевых продуктов рассматриваются 3 основные формы использования микробного белка:

- 1 Цельная биомасса (без специального разрушения клеточных стенок).
- 2 Частично очищенная биомасса (разрушение клеточных стенок и удаление нежелательных компонентов).
- 3 Выделенные из биомассы белки.

Выделенные белки (**и з о л я т ы**) являются наиболее приемлемыми формами использования белковых препаратов. Однако недостаток их применения связан с тем, что при их выделении используются кислоты и щелочи, высокая температура, давление, что приводит к частичному разрушению аминокислот.

При микробном синтезе белка следует подбирать культуры, у которых состав белка по незаменимым аминокислотам был бы близок к эталону, установленному Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) - яичный белок, белок женского молока.

ВОЗ сделала заключение, что белок микроорганизмов может использоваться в продуктах питания, но допустимое количество нуклеиновых кислот вводимых вместе с микробным белком в диету взрослого человека не должно превышать 2 г в сутки. Испытания на добровольцах показали, что введение микробного белка в пищевой рацион не вызывает отрицательных последствий, но встречается проявление аллергических реакций, желудочные заболевания и т.д.

## **6.2 Производство хлебопекарных дрожжей и их экспертиза**

Дрожжи – постоянный спутник человека, они используются в разных микробиологических процессах. Хлебопекарные дрожжи в России начали выращивать в монастырях еще 14-15 вв. Прессованные дрожжи начали производить в 1972 г. в Германии.

Биомассу дрожжей, как источник пищевого белка, человек применяет только в экстремальных условиях (во время голода или в качестве компонента сухого пайка для альпинистов, мореплавателей). Одной из причин малой популярности дрожжевых блюд является сравнительно толстая клеточная оболочка дрожжей, которая затрудняет их усвоение организмом.

Наши представления о питательной ценности дрожжей постепенно меняются. Человек хорошо овладел искусством выращивания дрожжей в промышленных условиях, биотехнологи освоили технологию выращивания богатой белками биомассы хлебопекарных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* на простых синтетических средах (например, на этиловом спирте микробного или химического происхождения), а химики разработали способы выделения из дрожжевой биомассы очищенных белковых концентратов. Хлебопекарные

дрожжи могут метаболизировать этиловый спирт благодаря наличию в клетках алкогольдегидрогеназы, но рост дрожжей на этаноле имеет множество особенностей. Стимулирующее действие на этанольные дрожжи в синтетической среде оказывают минимальные добавки аминокислот.

При выращивании хлебопекарных дрожжей на синтетической этанольной среде в лабораторном ферментере при непрерывном режиме с добавкой 0,5 % дрожжевого экстракта достигнута концентрация биомассы в пересчете на сухие вещества 8-9 г/л при выходе 70-75 % от использованного субстрата. Вместо дрожжевого экстракта можно применять кукурузный экстракт или депротеинизированный сок картофеля.

### **Промышленное производство хлебопекарных дрожжей**

Обычно для промышленного производства дрожжей используют питательную среду, основным компонентом которой является меласса – отход сахарного производства (свекловичная или из сахарного тростника). Дрожжи выращивают в биореакторах (ферментерах) периодического действия аэробным глубинным способом при pH 4,4-4,5 по так называемому проточному методу. В чистый аппарат вводят 70-80 % теплой воды от необходимого конечного разведения мелассы (1 : 17 – 1 : 30, в зависимости от первоначальной концентрации сахаров), добавляют 10 % мелассы и растворы солей, устанавливают оптимальные pH среды и температуру и начинают умеренную аэрацию (1 об/ (об · мин)). В такую среду вносят посевной материал. В течение 1-го часа среду не добавляют, а в последующие 10 ч ее вводят непрерывным потоком в количествах 5; 6; 7,2; 8,2; 9,2; 10,2; 12,8; 11,0 и 9 % в час от общего количества питательной среды. Аэрация в течение всего процесса ферментации также меняется. В первый и последний час культивирования она меньше (1 : 1), а в период интенсивного размножения дрожжей достигает 1,5 – 2,0 об / (об · мин). В таких условиях дрожжи проходят все стадии развития. В стационарной фазе роста культуру выдерживают до полного прекращения интенсивного почкования.

Во время ферментации незначительно возрастает концентрация среды (от 0,9 до 2,2 по сахариметру) и титруемая кислотность (от 0,3 до 0,8 мл 1 н раствора кислоты на 100 мл среды). В таких условиях выход прессованных дрожжей составляет 150 % от количества использованного сахара (или 37,5 % сухой биомассы).

После ферментации дрожжи отделяют от среды путем центрифугирования или фильтрации на фильтр-прессе, затем биомассу тщательно промывают водой. Товарные дрожжи могут быть сухими и прессованными.

Прессованные дрожжи хранят при пониженной температуре (4-6 °С), так как при комнатной температуре бактерии и микромицеты быстро повреждают дрожжевые клетки. В биомассе дрожжей содержится около 50 % белков, свободные аминокислоты и витамины. Для длительного хранения хлебопекарные дрожжи высушивают до содержания влаги 8-9 %.

### **Экспертиза хлебопекарных дрожжей**

При экспертизе товарных дрожжей определяют: органолептические показатели (внешний вид, цвет, запах и вкус, консистенцию); влажность дрожжей (для прессованных дрожжей, согласно ГОСТ 171-81, массовая доля влаги не должна превышать 75 %); содержание мертвых клеток (не более 5 %); способность дрожжей к размножению (доля почкующихся клеток должна составлять 40-70 % от общего количества); биологическую чистоту (годными для производства считаются дрожжи, содержащие не более 1 % бактерий и не более 0,5 % диких дрожжей); подъемную силу. Подъемная сила дрожжей характеризуется временем, прошедшим с момента внесения теста в форму до подъема теста до 70 мм. Подъемная сила дрожжей должна быть не более 70 мин.

Хлебопекарные дрожжи широко используются в различных отраслях пищевой промышленности: хлебопекарной, пивоваренной, при получении этилового спирта, вин и т.д.

## Вопросы для самопроверки

1. Каковы преимущества микробного белка перед другими источниками?
2. Требования к продуцентам белка.
3. Достоинства и недостатки получения белка с помощью дрожжей, микроскопических грибов, бактерий, водорослей.
4. Основные стадии процесса производства микробных белковых препаратов.
5. Использование молочной сыворотки в качестве питательной среды при производстве белковых препаратов.
6. Основные формы использования микробного белка.
7. Состав питательной среды при промышленном производстве хлебопекарных дрожжей.
8. Какие способы культивирования используются при производстве хлебопекарных дрожжей?
9. В чем суть приточного метода?
10. Отделение биомассы дрожжей от культуральной жидкости.
11. Назовите товарные формы хлебопекарных дрожжей.
12. По каким показателям проводят экспертизу качества хлебопекарных дрожжей?
13. Что такое биологическая чистота дрожжей?
14. Что такое подъемная сила хлебопекарных дрожжей?

## **7 ОХРАНА ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ НА ПРЕДПРИЯТИЯХ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ**

- 1 Очистка сточных вод.
- 2 Очистка газоздушных выбросов.

### **7.1 Очистка сточных вод**

В процессе получения продуктов микробиологического синтеза потребляется большое количество воды, которая загрязняется вредными микроорганизмами, минеральными и органическими компонентами. Загрязняющие вещества находятся в растворенном и нерастворенном состояниях. С целью предотвращения вредного влияния сточных вод на состояние водоемов в нашей стране действуют «Правила охраны поверхностных вод». Очищенные сточные воды не должны содержать возбудителей заболеваний, а также запахов и привкусов, способных передаться рыбе. В сточных водах ограничивается содержание окисляемых микроорганизмами токсических веществ и взвешенных частиц.

Из общего количества органических веществ, содержащихся в исходных, питательных средах, в процессе производства используется 75-80%, остальное уходит с отработанными сточными водами.

#### **7.1.1 Промышленные стоки**

В производственных процессах получения белковых препаратов аминокислот, липидов и биотоплива промышленные стоки делятся на условно чистые и загрязненные.

К условно чистым относятся воды, прошедшие теплообменные аппараты, в них не происходит изменения состава, а только температуры. Остальные производственные стоки относятся к загрязненным. Загрязненные промыш-



ленные стоки характеризуются присутствием органических и неорганических веществ.

Загрязненность промышленных стоков и расход кислорода на процесс бактериального окисления органических веществ характеризуются биологическим потреблением кислорода (БПК), выражаемым в миллиграммах  $O_2$  на 1 л анализируемой жидкости: БПК; (при выдерживании пробы в течение пяти суток), БПК<sub>20</sub> (при выдерживании пробы в течение 20 суток; БПК<sub>2П</sub> часто называют полным).

Зная количество содержащихся веществ и их характеристики по БПК, можно вычислить БПК смеси. Но когда в смеси присутствует большое количество веществ или точно не известен ее состав, определить БПК невозможно. Поэтому обычно проводят аналитическое определение БПК, дающее суммарное его значение, и тогда не требуется уточнения химического состава смеси.

В большинстве случаев на заводах по производству кормовых дрожжей, аминокислот, липидов и биотоплива количество загрязнений по БПК<sub>5</sub> и взвешенным веществам в 1,5-2 раза превышает нормально допустимые величины. Качественный состав и загрязненность сточных вод. Основным загрязнителем при производстве кормовых дрожжей и липидов является культуральная жидкость после отделения дрожжей. На нее приходится 30-35% общего объема стоков завода и 70-90% общего количества загрязнений. Качественный состав сточных вод изменяется в зависимости от перерабатываемого сырья, вида вырабатываемой продукции, технологических режимов работы, расхода свежей воды.

Сточные воды гидролизно-дрожжевых заводов имеют коричневый цвет, обусловленный присутствием в них гуминово-лигнинных веществ. Эти стоки отличаются большим содержанием органических веществ, часть которых составляют сахара и органические кислоты, в основном пентозы (ксилоза и арабиноза) и уксусная кислота. В стоках присутствуют и ядовитые примеси - фурфурол, оксиметилфурфурол, формальдегид, гуминово-лигнинные коллоидные вещества, терпены. Помимо них в стоках находятся в небольшом коли-

честве азотистые и фосфорные соединения, а также продукты обмена веществ микроорганизмов - аминокислоты, янтарная, молочная и другие кислоты. Значительная загрязненность, повышенная кислотность и токсичность, высокое биохимическое потребление кислорода характерны для гидролизно-дрожжевых и дрожжевых заводов.

Сточные воды заводов по производству кормовых дрожжей на углеводородах нефти содержат остаточное количество н-парафинов. При работе по технологической схеме с рециркуляцией в них содержатся также повышенные количества ароматических углеводородов, накапливаемых при возврате отработанной культуральной жидкости в ферментер.

Объем и загрязненность сточных вод. Общее количество загрязненных промышленных стоков для дрожжевых заводов производительностью 80 тыс. т дрожжей в год составляет в среднем в зависимости от времени года 45-55 тыс. м<sup>3</sup> в сутки. Основное количество загрязненных стоков составляет отработанная культуральная жидкость - 120-140 м<sup>3</sup> на 1 т сухой массы дрожжей, объем общих стоков - 170-220 м<sup>3</sup> на такую же массу дрожжей. Но в сбрасываемой культуральной жидкости содержатся основные загрязнения: по взвешенным веществам - до 75%, по БПК<sub>5</sub> - до 93-94%.

Количество взвешенных веществ в промышленных сточных водах обычно составляет 100-125 кг на 1 т сухой биомассы, из них только 25 кг приходится на долю минеральных веществ. Основное количество минеральных веществ приходится на гипс, органических - на лигнин.

Шламосодержащие стоки удаляют с территории завода на специально отведенные для этой цели площадки (шламоотвалы), горючие фракции подлежат сжиганию.

Снижения количества загрязнений можно достигнуть при внедрении новых технологических приемов и процессов, например при введении циклов повторного использования сточных вод, в частности использования отработанной культуральной жидкости на разбавление суслу перед выращиванием дрожжей с рециркуляцией на процесс гидролиза, на приготовление растворов

питательных солей и известкового молока. В результате количество отработанной культуральной жидкости уменьшается вдвое.

## 7.2 Способы очистки сточных вод

После сброса очищенных сточных вод содержание взвешенных веществ в водоеме не должно увеличиваться более чем на  $0,25-0,75 \text{ г/м}^3$ , а содержание органических веществ (по БПК<sub>20</sub>) не должно превышать  $3-6 \text{ г/м}^3$  в водоемах для питьевого и культурно-бытового водопользования и  $2 \text{ г/м}^3$  в водоемах рыбохозяйственного значения, в которых, кроме того, содержание растворенного кислорода не должно падать ниже  $4-6 \text{ мг/л}$ .

Способы очистки сточных вод разделяются на механические, физико-химические, биохимические, термические (тепловые).

Механическую очистку осуществляют в песколовках, отстойниках, центрифугах, флотаторах и фильтрах.

Физико-химические методы (коагуляция, флокуляция, электрокоагуляция и сорбция) применяют для очистки сточных вод от коллоидных и растворенных соединений, количество которых в воде после сооружений механической очистки остается практически неизменным.

В качестве коагулянтов наиболее широко используются сульфат алюминия и хлорид железа. При введении коагулянтов в воду они обволакивают взвешенные частицы, полностью меняя их поверхностные свойства и нейтрализуя заряд. Коагулянты вызывают укрупнение частиц загрязнений и образуют хлопья.

В настоящее время минеральные коагулянты заменяют высокомолекулярными флокулянтами органического и неорганического происхождения. Сущность флокуляции заключается в агрегации частиц, при которой контакт частиц происходит через молекулы адсорбированного флокулянта.

Электрохимические методы очистки обладают рядом существенных преимуществ перед реагентными: не увеличивается солевой состав сточных

вод, образуется меньшее количество осадка, упрощается технологическая схема очистки, обеспечивается автоматизация производственных установок, для размещения установок требуются незначительные производственные площади. Недостаток метода - высокие капитальные и эксплуатационные затраты на электродные системы и, образование отложений на них и возникновение взрывоопасных смесей газов. Электрокоагуляцию применяют для удаления из сточных вод тонко диспергированных примесей, для удаления истинно растворенных веществ этот метод не используется.

Очистка с помощью сорбентов. Сорбция - это процесс поглощения твердым телом или жидкостью какого-либо вещества из окружающей среды. В очистке сточных вод чаще используется ее разновидность - адсорбция - поглощение вещества из воды на поверхности или в объеме твердых тел (сорбентов). Сорбентами могут быть частицы углей, почвы и остатки растений. Если соледержащие сточные воды не допускается выпускать в водоем, то их подвергают термическому обезвреживанию. Но термическое обезвреживание осуществляется на установках, работающих под давлением или вакуумом. Получаемый конденсат направляют в системы производственного водоснабжения, а солевые отходы вывозят для захоронения.

Биохимическая очистка является одним из основных методов очистки сточных вод заводов микробиологической промышленности как перед сбросом их в водоем, так и перед повторным использованием в системах оборотного водоснабжения. Считается, что микроорганизмы способны окислять все органические вещества, за исключением тех искусственно синтезированных, которым нет аналогов в природе. Наименее доступными источниками углерода являются вещества, не содержащие атомов кислорода - углеводороды, но они также расщепляются микроорганизмами активного ила. В том числе - входящие в состав ила.

Токсичными для микроорганизмов активного ила могут оказаться ионы тяжелых металлов и некоторые органические вещества. В концентрациях ниже ПДК последние могут усваиваться бактериями и служить источником уг-

лерода и энергии. Биологическую очистку проводят в аэротенках или в биоокислителях с интенсивной аэрацией среды. При этом снижается ВПК, за счет окисления органических веществ и нарастает биомасса микроорганизмов. Очищенные и осветленные сточные воды поступают в водоем и на рециркуляцию в производство, а активный ил, например, производства БВК, являясь источником белка и витаминов, упаковывается в бумажные мешки и направляется к потребителю.

### **7.3 Принципиальная технологическая схема очистки сточных вод**

Наиболее распространенная схема включает первичную и вторичную очистку. Первичная очистка заключается в механическом отделении загрязнений. Вторичная очистка предусматривает очистку сточных вод в системе очистных сооружений (биоокислителях), либо очистку сточных вод в естественных условиях на полях орошения.

Для повышения эффективности действия и снижения ВПК сточных вод вводится биокоагуляция (предварительная аэрация с добавлением ила из вторичных отстойников). Конструктивно предаэратор представляет собой аэротенк- резервуар прямоугольной формы, в котором временно пребывает сточная вода (10-20 минут). При их использовании снижается количество органических веществ в стоках, поступающих на аэротенки, до 15%. Первичные отстойники устанавливаются перед аэротенками, где вода пребывает 1-2 часа. В них накапливается избыточный активный ил, который потом извлекается насосами и подсушивается на иловых площадках до влажности 70-80%. Далее вода поступает в аэротенки..

Аэротенки предназначены для биологической очистки сточных вод, которые попадают в них после первичных отстойников. Работа аэротенков основана на использовании биохимического окисления органических веществ аэробными микроорганизмами, колонии которых образуют так называемый активный ил.

Аэротенк-смеситель представляет собой прямоугольный железобетонный резервуар, состоящий из одной или нескольких секций, с рабочей глубиной от 3 до 6 м. Секции разделены на коридоры, по которым проходит сточная вода. Время пребывания сточных вод в аэротенке зависит от скорости окисления и составляет 8-20 часов.

Вторичные радиальные отстойники служат для осаждения и осветления сточных вод после биологической очистки. Далее воду хлорируют.

Ершовый смеситель предназначен для интенсивного перемешивания воды, прошедшей очистку, с хлорной водой, которая поступает из хлораторной.

Для сгущения активного ила, поступающего со вторичных отстойников, используют гравитационные илоуплотнители. За 10-20 часов активный ил с влажностью 99-99,2% уплотняется до влажности около 97%. Вследствие длительного уплотнения часть ила может загнивать, всплывать и уноситься в водоемы. Необходимо соблюдать режим илоуплотнения.

Сушка уплотненного ила с получением товарного продукта является конечным этапом очистки сточных вод. Для сушки активного ила могут быть использованы барабанные, вальцовые, ленточные и распылительные сушилки.

Для снижения загрязнений в стоках, оставшихся после аэротенков и вторичных отстойников, служат биологические пруды. Продолжительность пребывания в них сточных вод может превышать 10 суток. Глубина прудов составляет 2-3 м. Они занимают большие площади. В биологических прудах развиваются одноклеточные водоросли, которые выделяют метаболиты, обладающие бактерицидным действием по отношению к патогенной микрофлоре. Аналогичные метаболиты выделяются и высшей водной растительностью. Поэтому летом вода, выходящая из биопрудов, не требует хлорирования.

Степень очистки сточных вод в биологических прудах по БПК, изменяется в пределах 78,9%.

Утилизация последрожжевой бражки. 1 кг отработанных культуральных сред содержит 0,3-0,6 кг ценных кормовых дрожжей и других продуктов (в пересчете на СВ). Проводится предварительная биологическая утилизация от-

работанных культуральных сред до их смешения с общими отходами, что увеличивает на 10% основную производительность предприятий.

#### **7.4 Очистка газоздушных выбросов**

На отдельных предприятиях микробиологической промышленности вместе с отработанным воздухом в атмосферу могут выбрасываться большие количества микроорганизмов-продуцентов. Например, на гидролизно-дрожжевом заводе, при обследовании воздуха, выбрасываемого из ферментера, было выявлено от  $16 \cdot 10^3$  до  $316 \cdot 10^3$  клеток микроорганизмов на  $\text{м}^2$ , а на заводе по производству белково-витаминных концентратов - от 200 до  $436 \times 10^3$  клеток на  $1 \text{ м}^3$ .

Большая запыленность воздуха белковыми и другими и другими продуктами микробного синтеза отмечается на стадиях сушки, упаковки и погрузки в вагоны. Значительная запыленность воздуха питательными солями и сырьем (опилки, отруби, мука и др.) имеет место в отделениях и цехах приготовления питательных сред.

Одним из важнейших мероприятий, снижающих выброс микроорганизмов в окружающую среду, является герметизация ферментеров, флотаторов и оборудования узла сепарации. На ряде предприятий дрожжевого профиля высокоэффективная очистка отработанного воздуха из ферментаторов, флотаторов, узла, сушильных установок и упаковочного отделения осуществляется с помощью скрубберов Вентури. Он состоит из трубы Вентури (турбулентный промыватель), предназначенной для коагулирования мелких твердых частиц, инерционного аппарата и центробежного скруббера для отделения газа и укрупненных частиц и капелек жидкости. Запыленный газ подается вентилятором в трубу Вентури и смешивается с водой. Скоагулированные частицы пыли с мелкими капельками воды и газа поступают в инерционный аппарат, где газ частично отделяется от жидкости. Окончательное отделение жидкости от газа осуществляется в центробежном скруббере. Очищенный газ выбрасыва-

ется в атмосферу, а вода с твердыми частицами выводится из инерционного аппарата и скруббера в сборник. Вода из сборника многократно используется для орошения трубы Вентури и может направляться в производство с целью утилизации уловленных частиц. Представляет интерес мокрое улавливание пылевидных частиц концентрата лизина, уносимых с газом из циклонов распылительной сушилки. В этом случае потери лизина на стадии сушки сводятся к минимуму в связи с хорошей растворимостью лизина в воде и возвратом его в производство в концентрированном виде с последующей сушкой на предприятиях, со сравнительно небольшими объемами загрязненных воздушных выбросов. Очистку воздуха до чистого или стерильного состояния можно осуществлять с помощью фильтров грубой и тонкой очистки или путем сжигания. В ряде случаев снижения вредных выбросов в атмосферу можно достичь путем совершенствования технологии.

#### Вопросы для самопроверки

- 1 Назовите основные источники загрязнения воды и качественный состав сточных вод?
- 2 Какие существуют способы очистки сточных вод?
- 3 Что такое азротенк, его назначение?
- 4 Как проводится очистка газовоздушных выбросов?



## 8 ПРОИЗВОДСТВО И ПРОМЫШЛЕННОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФЕРМЕНТОВ

- 1 Значение ферментов, источники их получения
- 2 Промышленные ферментные препараты
- 3 Факторы, влияющие на биосинтез ферментов
- 4 Применение ферментативных препаратов

### 8.1 Значение ферментов, источники их получения

Ферменты (энзимы) - катализаторы белковой природы, образующиеся и функционирующие во всех живых организмах. Ферменты не изменяются и не расходуются в процессе реакции, ускоряют только те реакции, которые могут протекать и без них. Скорость протекания реакции при участии ферментов на несколько порядков выше, чем под влиянием химических катализаторов. Для ферментативных реакций характерен почти 100% выход продуктов. Ферменты обладают узкой специфичностью, действуют только на те же вещества, превращение которых они катализируют. В настоящее время в природе обнаружено свыше 3 тысяч ферментов.

Большинство биотехнологий основано на использовании биокатализаторов, потребность в которых постоянно возрастает. Единственным, неограниченным источником ферментов являются микроорганизмы, из которых можно выделить любые из известных в настоящее время ферментов. Исключение составляет **папаин** (размягчитель мяса), который получают из плодов папайи. Продуктивность штаммов микроорганизмов, производящих ферменты, можно увеличить с помощью мутагенных факторов в 2-5 раз. Пересадкой **плазмид** получают количество ферментов, достигающее 50% массы продуцируемого белка.

Синтезируемые микроорганизмами ферменты подразделяются на внеклеточные и внутриклеточные. К внеклеточным ферментам относятся амила-

за, целлюлаза, лактаза, липаза, пектиназа, протеаза, к внутриклеточным - аспарагиназа, каталаза, инвертаза.

Внеклеточные ферменты получают из культуральной жидкости, предварительно отделанной от микроорганизмов. Для выделения внутриклеточных ферментов разрушают клеточные оболочки с помощью механических, физических, химических (действие кислот, растворителей), ферментативных и биологических методов.

Ферменты применяются в пищевой, фармацевтической, текстильной, кожевенной и других отраслях промышленности, в медицине, сельском хозяйстве, химическом синтезе.

Более широкое технологическое применение ферментов до последнего времени сдерживалось рядом причин, из которых важнейшими являются:

- 1) трудоемкость отделения ферментов от исходных реагентов и продуктов реакции;
- 2) неустойчивость ферментов при хранении, различных воздействиях (тепловых);
- 3) трудоемкость очистки ферментов и получения их в активном виде.

## **8.2 Промышленные ферментные препараты**

Использование микробных ферментов в некоторых отраслях промышленности началось более 70 лет назад. Большую часть, составляют **гидролазы** (реакции гидролиза), так как именно они являются основными в промышленной биотехнологии. От общего количества потребляемых ферментов 99% выпуска приходится на 16 препаратов.

Рассмотрим подробнее некоторые группы ферментов.

К **амилолитическим** ферментам относятся L-амилаза, β-амилаза, глюкоамилаза. Их действие проявляется при гидролизе крахмала и гликогена. Крахмал при гидролизе сначала расщепляется на более простые **полисахариды** - декстрины, а затем - до глюкозы.

Эти ферменты применяются в спиртовой промышленности, хлебопечении.

**Протеолитические** ферменты относятся к гидролазам, образуя группу пептидгидролаз. Их действие заключается в ускорении гидролиза пептидных связей в белках и пептидах. Важная их особенность - выборочный, селективный характер действия на пептидные связи в белковой молекуле. Например, пепсин действует только на связь с ароматическими аминокислотами, трипсин - только на связь между аргинином и лизином. Из них рН 1,5-3,7 имеют кислые протеазы; рН 6,5-7,5 - протеазы; рН > 8,0 - щелочные протеазы.

Применение **протеаз** широкое: мясная промышленность для умягчения мяса, кожевенная промышленность - при обезволивании (удаление волосяного покрова) и размягчении шкур; кинопроизводство - для растворения желатинового слоя на пленках при их регенерации; парфюмерия - при создании добавок в зубную пасту, кремы, лосьоны, промышленность синтетических моющих средств - при применении моющих добавок для удаления загрязнений белковой природы; медицина - при лечении воспалительных процессов, ожогов, тромбозов.

**Пектолитические** ферменты объединены в одну группу по внешнему проявлению своего действия - уменьшению молекулярной массы и снижению вязкости пектиновых веществ (пектин - пектиновые кислоты и протопектин) представителей полисахаридов. Они содержатся во фруктах, корнеплодах, стеблях (лен). Пектиновые вещества имеют молекулярную массу от 20000 до 200000. Все пектиназы делятся на два вида - гидролазы и трансэлиминазы. Применение в текстильной промышленности - вымачивание льна перед его переработкой, в виноделии - осветление вин, уничтожение мутности, в консервировании - при приготовлении фруктовых соков.

**Целлюлолитические** ферменты очень специфичны, их действие проявляется лишь в деполимеризации молекул целлюлозы, обычно они действуют в виде комплекса, который в целом доводит гидролиз целлюлозы до глюкозы. Использование их очень перспективно в гидролизной промышленности - это

получение глюкозы из целлюлозы; в медицинской - выделение лекарственных веществ (стероидов) из растений; в пищевой - улучшение качества растительных масел; в сельском хозяйстве - как добавки в комбикорма для жвачных животных. В мире производится около 530 т протеаз, 350 т глюкоамилазы, 350 т L-амилазы, 70 т глюкоизомеразы.

### **8.3 Факторы, влияющие на биосинтез ферментов**

Существует мнение, что из клеток микроорганизмов можно выделить любые из известных ферментов. Большинство микроорганизмов способно расти на относительно простых и дешевых питательных средах. Преодоление трудностей, связанных с их производством и использованием, связано с получением иммобилизованных ферментов.

Иммобилизация ферментов - это перевод их в нерастворимое состояние с сохранением (частичным или полным) каталитической активности.

Для получения иммобилизованных ферментов обычно применяют следующие методы:

1 Ковалентное присоединение молекул ферментов к водонерастворимому носителю, в качестве которого используют как органические (природные и синтетические) полимеры, так и неорганические материалы. К первым относятся целлюлоза, хитин, агароза, декстрины, бумага, ткани, полистирол, ионообменные смолы и так далее. Ко вторым - пористое стекло, силикагели, силихромы, керамика, металлы и другие.

2 Захват фермента в сетку геля или полимера.

3 Ковалентная сшивка молекул фермента друг с другом или с инертными белками (при помощи би- или полифункционального реагента).

4 Адсорбция фермента на водонерастворимых носителях (часто на ионитах).

5 Микрокапсулирование (захват раствора фермента в полупроницаемые капсулы размером 5-300 мкм). В результате иммобилизации ферменты при-

обретают преимущества гетерогенных катализаторов. Их можно удалять из реакционной смеси и отделять от субстратов и продуктов ферментативной реакции) простой фильтрацией.

Иммобилизованные ферменты более устойчивы к внешним воздействиям, чем растворимые ферменты.

Принцип иммобилизации был применен не только к ферментам, но и к их субстратам - веществам, имеющим избирательное средство к ферментам. Это позволило создать метод выделения и очистки ферментов, основанный на **хроматографии** по сорбции. Облегчилось выделение чистых ферментов.

В последнее время применяют иммобилизованные клетки микроорганизмов, содержащих естественный набор ферментов. Отпадают стадии выделения, очистки и иммобилизации ферментов. Ферменты в микроорганизме находятся в наиболее естественном окружении, что положительно сказывается на их термостабильности и операционной стабильности (продолжительности работы в условиях опыта). Ферменты в составе клеток микроорганизмов долго сохраняют каталитические свойства. Они также являются гетерогенными биокатализаторами со всеми преимуществами их использования в технологических целях.

Иммобилизация клеток обычно проводится их адсорбцией на водонерастворимых носителях (часто на ионообменных смолах), ковалентной сшивкой с помощью **бифункциональных** реагентов (например, **глутарового** альдегида) или захвата их в полимер, как правило, с последующим формованием в виде частиц определенного размера и конфигурации.

Иммобилизация целых клеток микроорганизмов предотвращает их размножение и обычно увеличивает сохранность и срок работы в качестве катализатора по сравнению с необработанными клетками.

Состав и количество синтезируемых клетками ферментов зависит от наследственных свойств данного организма. Под действием мутагенных факторов (ионизирующее и неионизирующее излучения, изотопы, антибиотики, химические соединения, обладающие высокой преобразующей способностью по

отношению к наследственным элементам клетки), получают промышленно ценные штаммы мутантов.

Производительность технологических процессов по каждому ферменту зависит и от питательной среды, имея в виду наличие в ней не только источников углерода, азота, фосфора и других элементов, но и веществ, играющих роль индукторов или **репрессоров** биосинтеза данного конкретного фермента или их групп. Например, фермент липаза почти не синтезируется грибом на среде без индуктора, внесение кашалотового жира усиливает биосинтез фермента в сотни раз. Этот же вид гриба при добавлении в среду крахмала и полном исключении минерального фосфора интенсивно синтезирует другой фермент - **фосфатазу**.

Для интенсификации процесса роста и синтеза ферментов часто добавляют всевозможные вытяжки или экстракты, содержащие дополнительные факторы роста. К ним относятся, прежде всего, аминокислоты. Они легко проникают внутрь клетки и специфически влияют на образование фермента. Механизм их действия заключается в компенсации недостающих свободных внутриклеточных аминокислот, необходимых для синтеза фермента. Факторами роста являются также **пуриновые** основания и их производные, РНК и продукты ее гидролиза. Все рассмотренные факторы должны учитываться при составлении питательных сред для культивирования продуцентов ферментов. В промышленных средах в качестве источников органического углерода и азота чаще всего используют различные сорта крахмала (картофельный, кукурузный, рисовый), кукурузный экстракт, соевую муку и т. д. Микроорганизмы для своего роста могут утилизировать и минеральные соединения азота, которые превращаются в аммиак, необходимый для синтеза сложных азотсодержащих органических соединений.

Оптимальный состав питательной среды для каждого продуцента может быть определен двумя способами: методом эмпирического подбора и с использованием математических методов оптимизации (ЭВМ).

Все технологические процессы производства ферментных препаратов делятся на две принципиально отличные группы: в первом случае ферментация ведется глубинным методом в жидкой питательной среде, во втором используется поверхностная культура, растущая на специально подготовленной рыхлой и увлажненной питательной среде.

#### **8.4 Применение ферментативных препаратов**

Ферменты немикробного происхождения находят применение сравнительно реже в силу различных причин, в частности: низкой Лабильности, дороговизны, сезонности получения и других факторов. Но в ряде случаев, в отсутствие микробного аналога, для коммерческих целей выделяют ферменты растительного и животного происхождения. Примерами таких ферментов могут служить ренин животного происхождения, **фицин** выделенный из инжира, **папаин** и др. Для получения в производственном масштабе ферментов растительного и животного происхождения в последнее время с успехом используют культивирование тканей и отдельных органов. Предположительно этот метод должен значительно удешевить и соответственно увеличить удельную долю коммерческих ферментов растительного происхождения.

Хотя промышленные ферменты иногда реализуются в виде технических препаратов, определенная их часть подвергается экстракции и очистке. При этом решается несколько задач: удаляют токсичные и нежелательные метаболиты и микроорганизмы, стандартизуют активность. Таким образом обеспечивается более высокое качество препарата и его стабильность, также можно придать препарату желаемые аромат и цвет. Главная трудность возникает из-за неоднородного состава культуральных жидкостей, которые часто содержат большие количества коллоидов и имеют высокую вязкость.

По данным 1990 г., на мировом рынке коммерческий оборот от реализации технических ферментных препаратов составил 800 млн. долларов. 80% всех производимых технических ферментов используется в следующих трех

отраслях промышленности: гидролиз крахмала - 40%, производство детергентов - 30%, производство сыра-10%.

Основу промышленной переработки **крахмала** составляет возможность его превращения в сбраживаемые сахара (глюкоза, мальтоза, изомальтоза), концентрированные сахара-сиропы (глюкоза, фруктоза) и низкомолекулярные олигосахариды-декстрины. Эти соединения используются при производстве ряда пищевых продуктов и напитков. Из существующих методов гидролиза крахмала (кислотный, ферментативный) ферментативный обладает рядом несомненных преимуществ.

**Использование ферментов с детергентами.** Все микробные протеазы можно разделить на три класса: сериновые протеазы, металлопротеазы и кислые протеазы. Сериновые и металлопротеазы образуются бактериальными культурами, кислые протеазы образуют микроскопические грибы.

*Сериновые и металлопротеазы.* Эта группа ферментов довольно широко распространена среди бактерий.

Металлопротеазы используются в пивоваренной и спиртовой промышленности. При производстве пива использование протеаз связано с предотвращением образования мути, являющейся результатом выпадения в осадок белковых компонентов пива. Кроме металлопротеаз для этой цели используются растительные ферменты: бромелин и папаин.

При производстве пищевого спирта ячменный солод заменяют несоловдовыми зерновыми. С целью получения сбраживаемых сахаров в среду, предназначенную для сбраживания, добавляют L-амилазу и протеазу.

Кислые протеазы. Ферменты этого типа встречаются у бактерий, но преобладают у высших грибов. Чаще всего эти ферменты, ввиду их способности коагулировать молоко, используются как заменители реннина (фермент получаемый из сычуга молодняка жвачных).

Из культуры *Aspergillus oryzae*, осаждением органическими растворителями получают **такадиастазу**, ферментный препарат, содержащий кислую и нейтральную протеазы, L -амилазу, а также целлюлазы и пекти-



назы. Препарат используется для гидролиза соевого белка, при изготовлении очень популярного в восточных странах соевого соуса.

У свертывающих молоко ферментов коагулирующая активность должна преобладать над протеолитической активностью. Сущность процесса коагуляции заключается в образовании комплекса казеина с ионами  $\text{Ca}^{2+}$ . Сычуг — экстракт желудков телят содержит фермент ренин, который считается наиболее подходящим для этой цели протеолитическим ферментом. Замена дорогостоящего и дефицитного сычужного фермента на дешевый и доступный фермент микробного происхождения является фактором, определяющим дальнейшее развитие сыродельной промышленности.

Грибные протеазы широко используются для деградации клейковины до постоянного уровня. Это позволяет стандартизовать операцию процесса хлебопечения и сократить периоды замешивания и выдержки.

Использование других ферментов (глюкозооксидаза, фруктофуранозидаса, галактозидаза, пектиназы, папаин, трипсин, химотрипсин, а также некоторые протеазы грибного и бактериального происхождения) значительно увеличилось и практически удваивается каждые 10 лет.

В ближайшем будущем значительный рост использования ферментных препаратов связан с возможностью ферментативного гидролиза лигноцеллюлозных субстратов с целью получения сахара для пищевых целей. В этом направлении ведется большая работа: селективно отобрано свыше 200 культур микроскопических грибов, характеризующихся суперсинтезом внеклеточных целлюлаз; получено более 20 бактериальных культур-трансформантов, осуществляющих синтез отдельных компонентов целлюлаз (в основном эндоглюканазы); налажены технологии, позволяющие производить около 50 разных коммерческих препаратов целлюлаз, отличающихся составными целлюлазными активностями, разработаны различные технологии предобработки лигноцеллюлозных материалов, увеличивающие выход глюкозы в результате ферментативного гидролиза и др. Существующее положение вселяет надежду на то, что в ближайшем будущем эта важнейшая проблема будет все-таки реше-

на. В таком случае ожидается массовый выпуск разных типов целлюлаз (термостабильных, действующих в щелочной среде; целлюлаз, обогащенных отдельными компонентами, и др.) в количестве, превосходящем все существующие масштабы современной ферментной индустрии.

Что касается производства ферментных препаратов высокой чистоты, то это магистральное направление всей отрасли, тем более что за последнее десятилетие значительно усовершенствованы методы очистки ферментов в промышленном масштабе. Это способствовало более широкому использованию ферментов в медицине, хотя надо отметить, что число используемых в медицинской практике ферментов высокой степени чистоты не превышает нескольких десятков.

**Иммобилизованные ферменты.** Лет 20-25 тому назад считалось, что использование иммобилизованных ферментов может коренным образом изменить ферментную индустрию, в особенности проблемы, связанные с дороговизной и сложностью выделения ферментов. Иммобилизованные ферменты нашли самое разнообразное использование в медицине, фармацевтической, химической и пищевой промышленности, в аналитических целях, в качестве ферментных электродов для определения концентрации Сахаров, аминокислот и других соединений. Кроме того, возможность использования иммобилизованных ферментов привела к созданию таких новых направлений, как радиоиммунный и ферментативный иммуносорбентный анализ. Однако, несмотря на это, иммобилизованные ферменты не применяются в практических целях в таких масштабах, которые предполагались.

Методы получения и типы иммобилизованных ферментов многократно описаны; кроме того, им посвящен ряд обзоров и многочисленные оригинальные публикации как на русском, так и на английском языках, поэтому, по мнению авторов, нецелесообразно в рамках этой книги детально рассматривать эти вопросы. Ограничимся тем, что лишь отметим те преимущества, которыми обладают иммобилизованные ферменты по сравнению со своими растворимыми аналогами:

-иммобилизованные ферменты легко отделяются от реакционной среды и могут быть использованы повторно;

-ферменты в иммобилизованном состоянии проявляют повышенную стабильность к экстремальным условиям и сохраняют активность в течение более длительного времени;

-использование иммобилизованных ферментов позволяет разрабатывать непрерывные технологии;

-методами иммобилизации возможно создание **мультиферментных** иммобилизованных композиций, это, в свою очередь, позволяет осуществлять последовательные ферментные реакции разных процессов.

Иммобилизованные ферменты характеризуются и некоторыми недостатками. В результате иммобилизации в ряде случаев наблюдается уменьшение удельной активности системы. Происходит это в силу разных причин. Например, ковалентное связывание фермента с носителем может вовлекать во взаимодействие какой-нибудь из аминокислотных остатков, находящийся в непосредственной близости от активного центра. Иммобилизованные ферменты, ввиду фиксации ферментов на носителе, не действуют на неподвижные или нерастворимые субстраты (целлюлоза, ксилан, лигнин и др.).

Еще одним недостатком иммобилизованных ферментов является стоимость иммобилизации, которая может оказаться неприемлемо высокой. Таким образом, при использовании иммобилизованных ферментов приходится решать комплекс вопросов, связанных с экономической обоснованностью их практической реализации.

#### Вопросы для самопроверки

- 1 Какие существуют источники получения ферментов?
- 2 В каких отраслях промышленности применяются ферментативные препараты?
- 3 Что значит иммобилизованные ферменты, как их получают?
- 4 При производстве каких продуктов используются ферменты?

## 9 ГЕННАЯ ИНЖЕНЕРИЯ БАКТЕРИЙ, ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ И ОБЛАСТИ ЕЁ ПРИМЕНЕНИЯ

1 Нуклеиновые кислоты и факторы наследственности у животных организмов.

2 Генная инженерия бактерий.

3 Генная инженерия растений.

4 Получение трансгенных растений.

5 Получение трансгенных животных.

### 9.1 Нуклеиновые кислоты и факторы наследственности у живых Организмов

Важнейшим компонентом всех живых организмов являются нуклеиновые кислоты: рибонуклеиновые и дезоксирибонуклеиновые кислоты. Нуклеиновые кислоты состоят из моносахаридов (рибозы и дезоксирибозы) и пуриновых (аденин, гуанин) и пиримидиновых (цитозин, урацил, тимин) азотистых оснований. В состав **рибонуклеиновой кислоты** входит рибоза, аденин, гуанин, цитозин, урацил, **дезоксирибонуклеиновой** - дезоксирибоза, аденин, гуанин, цитозин, тимин. Нуклеиновые кислоты состоят из компонентов, называемых нуклеотидами. Каждый нуклеотид содержит азотистое основание, моносахариды, фосфорную кислоту. Нуклеотиды образуют полинуклеотидную цепь. Нуклеиновые кислоты (ДНК) могут быть одно- и двухцепочечные. ДНК, за редким исключением, двухцепочечные. РНК, за редким исключением, одноцепочечные. При этом азотистые основания располагаются внутри спирали. С помощью водородных связей они образуют специфические пары

А-Т, Г-Ц - ДНК

А-У, Г-Ц – РНК

Важнейшая функция РНК - участие в процессе синтеза белков в клетке, ДНК - определение специфичности и передача единиц наследственности. РНК -

**информационная** (несет информацию ДНК о первичной структуре белка), **транспортная** (транспортирует аминокислоты в рибосомы), рибосомная (образует рибосомы, собирает белки), ядерная (4-10% от общей). Подавляющая часть ДНК сосредоточена в ядре, в цитоплазме эукариот содержится менее 1 % всей ДНК клетки. ДНК эукариот почти вся находится в хромосомах ядер, лишь небольшое ее количество содержится в митохондриях, а у растений и в плазидах. Суммарный материал хромосом - хроматин. Каждая хромосома состоит из центральной нити (хромонемы), вдоль которой расположены четкообразные структуры (хромомеры). Число хромосом колеблется от одной до 100, чаще 10-50. У эукариот хромосомы всегда парные, по две каждого сорта. Наследственными факторами или единицами наследственности у живых организмов являются гены, которые лежат в хромосомах в линейном порядке. Число генов в одной клетке человека находится в пределах между 5 и 125 тысячами. Бактерии содержат по одной хромосоме в форме замкнутой в виде кольца нити, состоящей из двухцепочной ДНК и не имеющей ядерной оболочки. В цитоплазме многих бактерий кроме хромосомной ДНК содержатся добавочные маленькие кольца ДНК, присутствие которых необязательно. Они получили название плазмид. Плазмиды несут информацию для 2-200 белков. Плазмидная ДНК составляет 1-15% от хромосомной ДНК бактерий. Плазмиды способны автономно размножаться и стабильно наследуются. Некоторые плазмиды способны включаться в хромосому бактерий. В одной клетке бактерий мелких плазмид - несколько десятков, крупных - одна или две.

## **9.2 Генная инженерия бактерий**

Генетическая рекомбинация заключается в обмене генами между двумя хромосомами. Обмен генами и введение в клетку гена, принадлежащего другому виду, можно осуществить посредством генетической рекомбинации. Этот подход был разработан на бактериях, в частности на кишечной палочке, в клетки которой вводили гены животных, человека и добивались их репликации (размножения).

Выделение фрагментов ДНК в хромосомах, несущих гены с необходимыми свойствами, производят с помощью вырабатываемых клетками бактерий ферментов рестрикции (**рестриктаз**). В клетках кишечной палочки и других бактерий были обнаружены ферменты, разрезающие на куски ДНК вирусов и других фагов (там где расположены специфические последовательности нуклеотидов), и тем самым защищающие клетку от разрушения.

**Рестриктазы** распознают в ДНК специфичные для них участки длиной в 4-6 пар нуклеотидов и разрезают обе цепи ДНК посередине этих участков или с некоторым смещением. В первом случае образуются обрывки с ровными (тупыми) концами, во втором - стороны оборванных цепочек ДНК чуть-чуть заходят одна за другую. Такие концы называются липкими, они могут слипаться между собой в силу **комплиментарности**.

Скрепить липкие концы помогает **ДНК-лигаза**, сшивающая фосфодиэфирные связи.

Для кодирования среднего белка из 400 аминокислот нужен участок ДНК длиной 1200 пар нуклеотидов. В России и за рубежом из различных бактерий выделено несколько сотен рестриктаз, разрезающих ДНК в строго определенных местах, там, где фермент прикреплялся. При этом было установлено, что концы фрагментов ДНК, полученные с помощью обработки хромосом одной и той же рестриктазой, способны слипаться между собой в силу комплиментарности. Две совершенно не схожие между собой последовательности ДНК (например, слона и лягушки) образуют одинаковые липкие концы, если эти ДНК обработать одной и той же рестриктазой. В настоящее время известно более 500 рестриктаз, способных рубить ДНК в 120 различных последовательностях. Это дало возможность получать фрагменты ДНК, содержащие желаемые гены. Участки ДНК, разрезаемые рестриктазами, несложно разделить с помощью электрофореза. ДНК, обработанную рестриктазой, вводят в гель агарозы, помещенной в электрическое поле. Под действием электрического поля фрагменты ДНК начинают перемещаться в пористом геле. Короткие фрагменты движутся быстрее, чем длинные, они отделяются друг от друга, не повреждаются и не утрачивают биологических свойств.

Скрепить сцепившиеся липкие концы фрагментов разных ДНК помогает фермент **ДНК-лигаза**. Она сшивает фрагменты с образованием полной структуры двойной спирали ДНК.

Следующей задачей было создание функционально активных, способных реплицироваться гибридных ДНК. С этой целью интересующий фрагмент ДНК включают в состав вектора, с помощью которого он может быть размножен. **Вектор** - это молекула ДНК, способная переносить в клетку чужеродную ДНК любого происхождения и обеспечивать там ее размножение. Клетки, в которые вектор переносит вшитый в него ген, получили название **реципиентов**.

В качестве векторов чаще всего используют плазмиды бактерий. **Главное свойство** плазмид состоит в их способности реплицироваться независимо от хромосомы. По размеру ДНК плазмиды в 100 раз меньше ДНК бактериальной хромосомы. В плазмиде таких размеров все же может разместиться до сотни генов.

Плазмиды повышают устойчивость бактерий к внешним факторам, защищают их от неблагоприятных воздействий.

Выяснилось, что многие мелкие плазмиды содержат по одному участку для нескольких рестриктаз. Каждая такая рестриктаза не разорвет плазмиду на несколько мелких кусков, а лишь разрежет кольцо плазмидной ДНК и переведет ее в линейное состояние. Первая такая плазида была открыта английским ученым **Стэнли Коуэном в 1974 г.**, которую он назвал своим именем. Она самостоятельно размножается. Концы ее способны слипаться между собой или с любыми фрагментами другой ДНК, получаемыми под действием той же рестриктазы. Несет ген устойчивости к тетрациклину и легко обнаруживается при выращивании на среде с антибиотиком.

Следующая проблема - заставить клетку воспринять рекомбинантную ДНК. Объектом первых опытов по генной инженерии была избрана кишечная палочка **E.coli**. Клетки кишечной палочки выдерживают на холоде в растворе кальция, затем подвергают «тепловому шоку». После этого клеточная мембрана становится проницаемой для поступления извне молекул ДНК. В плазмиду была включена группа генов из хромосомы **E.coli**, ответственных за синтез аминокислоты трип-

тофана. Когда в клетки **E.coli** ввели гибридную ДНК, они стали вырабатывать столько ферментов, участвующих в биосинтезе этой аминокислоты, что бактерии превратились в фабрику по производству триптофана.

Помимо плазмид, в качестве векторов стали использовать и ДНК вирусов, размножающихся в клетках бактерий. Клетка, получившая гибридную ДНК, размножившись, образует клон. Это открыло путь для производства различных белков, лекарственных препаратов, гормонов, путем искусственного синтеза их генов и вставки их в клетки с помощью плазмид. Важнейший из них -инсулин, получаемый из поджелудочной железы свиней.

### 9.3 Генная инженерия растений

Перед учеными встала новая задача - как ввести интересующие нас гены в растительную клетку, тем самым получить растения с необходимыми признаками и свойствами. С этой целью были использованы клетки корончатых галлов - опухолей растений, образующихся на прикорневой части стебля у корневой шейки (отсюда название - корончатый), на подземных (яблоня) и надземных (виноград) частях растений, у прививок в месте стыка привоя с подвоем. Корончатые галлы - настоящая злокачественная опухоль. Их клетки способны распространяться по растению от первичного очага и давать начало вторичным опухолям - метастазам. Болезнь поражает свыше 600 видов преимущественно двудольных растений. Возбудителем болезни оказалась бактерия, выделенная из опухоли винограда в 1897 г. – **Agrobacterium tumefaciens (Pseudomonadaceae)**. С этой бактерией связано рождение и становление генной инженерии растений. Если этой бактерией, часто встречающейся в ризосфере, заразить здоровое, не пораненное растение, то в области раны разовьется типичный корончатый галл. Опухолевые клетки растут в культуре быстро, без добавления фитогормонов. Для возникновения опухоли достаточно кратковременного контакта с бактерией, само ее развитие происходит в отсутствие бактерии. Под воздействием бактерии нормальные клетки превращаются в опухолевые, но как это происходит, долго не удавалось выяснить. В 1974



г. было установлено, что патогенные штаммы агробактерии содержат крупную плазмиду (150-200 тыс. пар нуклеотидов), отсутствующую у бактерий патогенных штаммов. Теряют плазмиду при температуре **более 30°C**. Иными словами, фактор, вызывающий образование опухоли, связан у агробактерии с крупными плазмидами. В индуцированных с помощью плазмид опухолях происходит синтез **опинов** (производных аминокислот, в частности аргинина), используемых бактериями для питания. Этот механизм осуществляется посредством переноса плазмидных генов, ответственных за синтез **опинов**, от бактерий к растениям и их последующее существование и проявление в растении без бактерий. Эти гены были выявлены в плазмидах и в опухолевых растительных клетках бактерии. Попадая на ранку подходящего растения, начинают в течение двух часов активно синтезировать целлюлозу, играющую роль связующего жгута. Еще через 4 часа начинается перенос плазмиды из бактерии в клетки растения. Заканчивается он через 2 часа. Теперь присутствие бактерий становится необязательным для развития опухолей. Онкогены плазмиды встраиваются в растительное ядро, что ведет к опухолевой трансформации клетки. Встраивание происходит с помощью обратного действия матричной РНК. Плазмидные онкогены кодируют также синтез фитогормонов (ауксинов, цитокининов), способствующих росту и делению опухолевых клеток.

Гены, которые хотят перенести в растения, вшивают в векторы плазмид **E.coli**, затем гибридные ДНК переносят в агробактерии, а из них в растения. Предназначенный для переноса ген вшивают в участок плазмиды агробактерии, способный внедряться в ядро растительной клетки. Для переноса генов используют также вирусы растений, в частности вирус цветной мозаики капусты. Ряд генов вируса, несущественных для его жизнедеятельности, заменяются на другие гены.

#### **9.4 Получение трансгенных растений**

Указанным выше способом новые гены вводят в растения с помощью агробактерий. Наиболее простой путь введения - заражение пораненных растений с

образованием **корончатогалловых опухолей**. Однако опухолевые клетки не способны к регенерации растений. При заражении растений некоторыми штаммами агробактерий образуются тератомы - опухоли-уродцы, состоящие из смеси дифференцированных клеток, способных дать начало различным частям растений. Если этих уродцев привить к здоровому корню, то можно получить нормальные растения с чужеродными генами, введенными через агробактерию. Однако потомство таких растений утрачивало новый признак. Новый ген, введенный с онкогенами, не мог пройти через мейоз, что обусловлено защитой против опухолевых генов. Повреждение онкогенов приводило к тому, что вставленные гены наследовались в потомстве клетки с освобожденными от онкогенов, но неповрежденными участками ДНК. Участки с вставленным геном и генами опинов стали культивировать на среде с добавлением фитогормонов, образованием каллуса и развитием растения. Лишенная онкогенов т-ДНК не мешает регенерации растительной клетки, способна пройти через мейоз и наследоваться в потомстве. Для переноса генов с агробактериями их выдерживают некоторое время с протопластами растительных клеток. Голые протопласты более проницаемы для крупных молекул, чем одетые клетки. Кроме протопластов можно использовать мезофильные клетки листьев (злаки трудно поддаются протопластированию и регенерации протопластов).

## **9.5 Получение трансгенных животных**

Успехи, достигнутые в выделении генов высших организмов, их рекомбинирование с бактериальными плазмидами, клонирование в бактериях, выяснение последовательности составляющих их нуклеотидов, интеграция рекомбинантной ДНК в живую клетку и экспрессия (размножение) чужеродных генов позволяют говорить о возможности разработки принципиально новой биотехнологии создания животных с нужным геном. Эксперименты показали, что культивируемые клетки высших животных становятся носителями новых наследственных свойств и продуцируют новые для них вещества. Однако методы генетической инженерии

для млекопитающих и особенно сельскохозяйственных животных пока слабо разработаны. Одной из причин этого является то обстоятельство, что до сих пор не найдены эффективные и надежные векторы – плазмиды, которые могли бы вносить нужные гены в клетки животных. Другой и, очевидно, главной причиной является глубокая дифференциация клеток у высших животных. Известно, что из одной растительной культивируемой клетки, в которую удалось внести новый ген, можно получить многоклеточный организм – целое растение, в котором чужеродное ДНК будет присутствовать во всех клетках. Поскольку из соматических клеток высших животных получить целый многоклеточный организм не представляется возможным, этот путь нельзя использовать для переноса генов в многоклеточное животное. Новый подход для направленного изменения генома высших животных основан на введении в зиготу или ранний эмбрион клонированных эукариотических генов в составе бактериальных плазмид. Животных, в геном которых интегрируют чужеродные гены, называют трансгенными.

(Клонирование – это размножение в бактериальной клетке рекомбинантной молекулы ДНК.)

#### Вопросы для самопроверки

- 1 Что такое нуклеиновые кислоты, их функция?
- 2 Что значит рестриктаза, ДНК-лигаза, вектор, реципиент, плаزمида?
- 3 Какова технология получения трансгенных растений и животных?

## 10 ОБЛАСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ

1 Получение трансгенных растений, устойчивых к вредным насекомым.

2 Перспективы и ограничения в использовании трансгенных растений.

3 Экологические проблемы, связанные с использованием трансгенных растений.

### 10.1 Получение трансгенных растений, устойчивых к вредным Насекомым

Из штамма *Bacillus thuringiensis* был выделен ген, кодирующий синтез дельта-эндотоксина. Его вставили в векторную плазмиду и перенесли в кишечную палочку. Дельта-эндотоксин начал синтезироваться в кишечной палочке. Гибридную плазмиду перенесли в штамм агробактерий. Трансгенные растения табака получали методом заражения клеток мезофилла листьев (листовых дисков). Растения стали вырабатывать бактериальный яд и оказались нетронутыми гусеницами. В настоящее время интерес к ядовитым трансгенным растениям растет.

**1.1 Получение растений, устойчивых к гербицидам.** Гены устойчивости к гербицидам обнаружены у сальмонелл, некоторых растений (петуния), синезеленых водорослей.

**1.2 Создание растений, устойчивых к вирусам.** X вирус, обычный на картофеле, включает 5 генов (РНК). Один из них кодирует белок вирусной оболочки. Этот ген вместе с промотором вируса мозаики цветной капусты был включен в вектор и перенесен в табак. Полученные растения оказались устойчивыми к X вирусу. Появившийся в растении вирусный белок препятствует прикреплению вируса к рецепторам клеточной поверхности. Повышает устойчивость к вирусам введение в геном ДНК-копии сателлитной РНК вирусов, препятствующей размножению основной вирусной РНК.

**1.3 Повышение ценности растительного белка.** Перспективно получение форм кукурузы, богатых лизином, поскольку лизин увеличивает прибавку веса животных на 25-50%.

Цистеин и метионин увеличивают рост шерсти у овец на 10-100%. Ген гороха, ответственный за синтез этих аминокислот, вводят в люцерну (бедную цистеином и метионином) и скармливают овцам.

**1.4 Получение растений, устойчивых к засолению.** Устойчивость обеспечивает аминокислота пролин. Ген, ответственный за ее выработку, пересажен от галлобактерий.

**1.5 Создание морозоустойчивых растений** осуществляется пересадкой антифризных генов из рыб.

Также при применении методов генетической инженерии возможно повышение продуктивности масличных культур.

**1.6 Повышение усвояемости растениями атмосферного азота** осуществляется пересадкой генов, ответственных за азотфиксацию (nit-генов) из бактерий **Rhizobium** в растение.

## **10.2 Перспективы и ограничения в использовании трансгенных растений**

**Перспективы работы с трансгенными растениями в различных странах мира.** Как сообщает журнал «Agrow», ссылаясь на данные Международной службы по агробиотехнологии, с 1996 по 1999 гг. площади под трансгенетиками возросли практически в 24 раза, достигнув почти 40 млн.га, без учета Китая. На долю США приходится наибольшая доля площадей под трансгенетиками. В связи с тем, что на распространение трансгенных зерновых культур наложен мораторий, наибольшие площади среди трансгенных культур занимает соя, на долю которой приходится более половины трансгенных культур (54 %), на кукурузу - 28%, на хлопчатник и масличный рапс - по 9%, на картофель, тыкву, папайю - менее 1% (по данным на 1999 г.).

Основные трансгенные культуры, выращиваемые для коммерческих целей, - это устойчивые к гербицидам. В 1999 г. на их долю приходилось около 76% посевов трансгенетиков.

Большинство специалистов считают, что вплоть до 2010 г. основными коммерческими трансгенными культурами останутся кукуруза и хлопчатник, причем 60% посевов кукурузы и 50% хлопчатника займут трансгеники. Табак, устойчивый к гербицидам, вредителям и болезням, пока не вышел на коммерческий рынок, трансгенные зерновые встретили жестокое сопротивление потребителей и значительного числа специалистов из-за своего первостепенного значения для мировой экономики, картофель (по той же причине) еще не принят большинством стран как необходимость. Если учесть, что овощные трансгенные культуры еще находятся в стадии разработки и ближайшее появление их коммерческих плантаций мало вероятно, то ближайшие перспективы расширения площадей под трансгениками не ясны. Неблагоприятное общественное мнение и утверждение, что сорта, устойчивые к гербицидам, могут постепенно терять свои свойства, а к трансгенным культурам, несущим ген В1, вырабатывается устойчивость вредных объектов также снижают прирост площадей, занятых под трансгенными культурами. Прирост площадей под трансгенными культурами в ближайшие годы будет составлять от 25 до 10% с тенденцией к снижению. Европа жестко стоит на позиции ограничений посевов трансгенных культур. В Китае под такими культурами, по разным оценкам, занято от 300 до 500 тыс. га. Предполагается, что в течение ближайших пяти лет эти площади возрастут в 10 раз. В перспективе удельный вес площадей под трансгениками в мировой структуре посевов составит (по отдельным культурам) от 10 до 60%. В зонах рискованного земледелия (Африка, Южная Америка, Юго-Восточная Азия, страны СНГ) трансгенные культуры, устойчивые к абиотическим стрессорам, могут стать альтернативой традиционному растениеводству и способствовать росту производства продуктов питания. В этих же странах трансгеники, устойчивые к вредителям и болезням, могут помочь снять остроту проблемы, связанной с недостатком средств на покупку импортных и рас-

ширение производства своих пестицидов, а также на приобретение химических средств защиты растений товаропроизводителями.

#### **Площади посевов основных трансгенных культур в мире в 2007 г., млн. га**

Культура	Площадь посевов	% к итогу
Соя, устойчивая к гербицидам	23,6	49
В1-кукуруза	9,5	20
Рапс, устойчивый к гербицидам	5,5	11
В1-кукуруза, устойчивая к гербицидам	4,1	8,5
Хлопчатник, устойчивый к гербицидам	2,6	5,4
Кукуруза, устойчивая к гербицидам	2,5	5,2
В1-хлопчатник	2,3	4,8
В1-хлопчатник, устойчивый к гербицидам	1,8	3,7
Всего	47,9	100

В течение последних десяти лет во всем мире было проведено более 15 тысяч полевых испытаний трансгенных растений, в том числе около 7 тысяч в Северной Америке. По прогнозам экономистов, к 2010 г. вложения в исследования по генной инженерии растений в мировом масштабе возрастут до 20 млрд. долларов. Эти исследования дорогостоящие, но по оценкам экономистов, вложения в эту отрасль быстро окупаются.

В России созданием и изучением свойств трансгенных растений занимаются исследовательские группы в Центре «Биоинженерия» РАН, МГУ им. М.В. Ломоносова, Всероссийском НИИ сельскохозяйственной биотехнологии, Всероссийском НИИ фитопатологии, Институте молекулярной биологии и генетики, Всероссийском НИИ картофельного хозяйства и др.

В правовом отношении для проведения работ в области генной инженерии в 1993г. была создана временная межведомственная комиссия для выработки про-

екта законодательных документов, регулирующих генно-инженерную деятельность в России. В работе комиссии принимали участие сотрудники Всероссийского НИИ фитопатологии РАСХН (ВНИИФ). К 1995 г. был подготовлен проект закона, представленный в Правительство и Государственную Думу.

Федеральный закон «О государственном регулировании в области генно-инженерной деятельности» принят Государственной Думой 5 июня 1996 г. и подписан Президентом России Б.Н. Ельциным 5 июля 1996 г. В апреле 1997 г. вышло постановление Правительства Российской Федерации «О межведомственной комиссии по проблемам генно-инженерной деятельности» и тогда же Правительством РФ было утверждено положение о ее работе.

### **10.3 Экологические проблемы, связанные с использованием трансгенных растений**

Сегодня в число трансгенных (генетически модифицированных) растений (ГМР) уже входят две сотни полевых, пастбищных, овощных, древесных, декоративных и лекарственных культур. Для генной инженерии не существует препятствий, которые ограничивают перенос генов при традиционной селекции, основанной на половой гибридизации: источником новых генов могут быть любые организмы - животные, растения или микробы. Более того, генные инженеры могут так изменить строение этих генов, приспособив их к организму новой хозяина, чтобы заставить работать продуктивнее или в строго определенный период развития растения.

Сегодня генная инженерия сельскохозяйственных растений развивается, главным образом, в русле классической селекции. Основные усилия ученых сосредоточены на защите растений от неблагоприятных (биотических и абиотических) факторов, снижении потерь при хранении и улучшении качества продукции растениеводства. В частности, это повышение устойчивости к болезням и вредителям, заморозкам или засолению почвы, удаление нежелательных компонентов



из растительного масла, изменение свойств белка и крахмала в пшеничной муке, улучшение лёжкости и вкуса плодов томата и т.д.

**Генетическая модификация.** Селекционеров привлекает возможность целенаправленного генетического преобразования сельскохозяйственных растений. Так, сорт, хорошо зарекомендовавший себя по большинству хозяйственных характеристик, можно дополнить одним недостающим признаком, например, устойчивости к конкретной болезни.

Кроме того, благодаря генетической модификации растения могут выполнять ранее несвойственную им роль. Они становятся «фабрикой» лекарственных веществ и пищевых добавок или инструментом для «мягкого» введения лекарств, вакцин и необходимых пищевых добавок. Это, например, корнеплоды сахарной свеклы, накапливающие вместо сахарозы низкомолекулярные фруктаны, или бананы, используемые в качестве съедобной вакцины. Благодаря введению генов бактерий высшие растения приобретают способность участвовать в разрушении чужеродных органических соединений (ксенобиотиков), загрязняющих окружающую среду.

Противники генетически модифицированных растений не без оснований напоминают, что создание, испытание и семеноводство трансгенных сортов монополизировано несколькими транснациональными корпорациями, которые в состоянии ограничивать доступ информации о неблагоприятных экологических последствиях широкого применения продуктов из ГМР. Очевидно, потребуются несколько лет для их экологической экспертизы и приспособления к консервативным вкусам потребителей. Последние вправе ожидать, что закон защитит их право выбора между традиционными и генетически модифицированными продуктами питания.

Гарантией против возможных нежелательных последствий генетической модификации растений является законодательное регулирование распространения ГМР и разработка связанных с этим методов оценки экологического риска. Во многих странах уже приняты законы, предотвращающие несанкционированное распространение трансгенного семенного материала и обеспечивающие монито-

ринг трансгенов в посевах, а также маркировку пищевых товаров, изготовленных из продуктов ГМР или с их добавлением. В нашей стране также принят Закон о государственном регулировании в области генно-инженерной деятельности от 05.07.1996 г. и подзаконные акты, регулирующие генно-инженерные работы, полевые испытания трансгенных растений и ввоз генетически модифицированных семян, продуктов питания и кормов.

Специальные исследования показали, что ограниченное поступление трансгенов и белковых компонентов их экспрессии в организм человека с продуктами питания не может иметь тех серьезных последствий, которые дали бы основание для запрещения продуктов питания из ГМР. В то же время ГМР могут существенно оздоровить окружающую среду. Возделывание ГМР, устойчивых к широкому спектру болезней и насекомых-вредителей, сможет существенно снизить, а в дальнейшем и свести к минимуму пестицидную нагрузку на окружающую среду. Растения, ослабленные неблагоприятными погодными условиями, легче поражаются болезнями и вредителями. Поэтому трансгенные сорта, устойчивые к заморозкам, засолению и засухе, в меньшей степени нуждаются в химической защите, и возделывании таких ГМР, что также обеспечит снижение пестицидной нагрузки и на среду обитания.

Борьба с болезнями растений. Болезни растений не только снижают урожай, но и ухудшают качество продукции. При этом некоторые микроорганизмы загрязняют зерно и другую продукцию растениеводства высокотоксичными метаболитами, например, микотоксинами. Вот почему возделывание ГМР, устойчивых к неблагоприятным факторам окружающей среды, позволит повысить экологическую безопасность и качество жизни населения.

ГМР, более эффективно использующие минеральные удобрения, смогут значительно уменьшить загрязнение окружающей среды нитратами и фосфатами.

Труднее оценить экологические последствия широкого применения трансгенных сортов, устойчивых к современным гербицидам сплошного действия (глифосат). Эти гербициды применяются в умеренных дозах, они малотоксичны для человека и животных и нестойки в почве. Посевы ГМР поэтому удастся прак-

тически полностью освободить от сорняков. Однако расширенное применение этих гербицидов может иметь неблагоприятные последствия для дикорастущих растений и окружающей природы в целом.

Наиболее серьезные возражения против ГМР связаны с предположением, что их широкое распространение приведет к появлению и быстрому размножению устойчивых форм сорных растений. Потенциальная угроза горизонтального переноса модифицированных генов устойчивости заслуживает серьезного внимания. Например, рапс может скрещиваться с близкородственными дикорастущими растениями, а его пыльца переносится на расстояние нескольких километров. Скрещивание сорняков того же рода может привести к появлению сорных растений, несущих гены устойчивости к гербицидам.

Столь же реально появление насекомых-вредителей, которые приобрели устойчивость к В1-токсинам, синтезируемым ГМР. Чтобы избежать распространения среди насекомых-вредителей приобретенной устойчивости к токсинам трансгенной природы, необходимо соблюдать несколько правил. Насекомые, питающиеся ГМР, должны получать высокую дозу токсина, что обеспечивает уничтожение большинства вредителей и уменьшение количества особей, потенциально устойчивых к токсину. Необходимо чередовать посевы трансгенных сортов так, чтобы популяции насекомых последовательно сталкивались с токсинами различного механизма действия. Наконец, по соседству с ГМР должны создаваться «заповедники» обычных (нетрансгенных) растений того же вида. При этом гены немногих уцелевших (устойчивых к токсину) вредителей будут «поглощены» при скрещивании генами восприимчивых к токсину насекомых.

Другим неблагоприятным последствием широкого распространения ГМР может стать сокращение генетического разнообразия дикорастущих и особенно культурных растений на нашей планете.

Уменьшение численности фитофагов или подавление фитопатогенов может привести к размножению контролируемых ими видов растений и снижению численности энтомофагов, что изменит структуру агро- и биоценозов.

Число сортов ГМР ограничено, и если они полностью вытеснят местные сорта, это приведет к сокращению сортового разнообразия, что несет угрозу в случае резких изменений погодных условий, при эпифитотиях и инвазиях.

Есть опасность, что в изменившихся условиях трансгенный сорт поведет себя непредсказуемым образом.

ГМР могут уступать традиционным сортам в продуктивности или качестве продукции.

Ежегодный урон от болезней, вредителей, сорняков и порчи продукции растениеводства при хранении так велик, что потерянной при этом во всем мире пищи хватило бы для того, чтобы прокормить население такого континента, как Южная Америка. Вот почему в условиях продолжающегося роста народонаселения вряд ли удастся остановить быстрое распространение конкурентоспособных трансгенных растений. Внедрение в сельскохозяйственную практику устойчивых к фитопатогенам и вредителям трансгенных сортов и гибридов неминуемо приведет компании, работающие на пестицидном рынке, к большим финансовым потерям, поскольку отпадет необходимость в тотальном применении гербицидов и инсектицидов. Сейчас во всем мире на химическую защиту растений от вредителей, возбудителей болезней и сорных растений ежегодно расходуется около 32 млрд. долларов. В этой связи делаются попытки всеми возможными путями, в том числе через средства массовой информации препятствовать продвижению трансгенных культур на перспективные сельскохозяйственные мировые рынки.

Первые испытания трансгеников в России впервые начали проводить во ВНИИФ. Этому предшествовали многолетние испытания в изолированных камерах искусственного климата ВНИИФ трансгенных линий картофеля, созданных в Центре «Биоинженерия» РАН на основе широко районированных отечественных сортов. В геном одного из этих сортов введена генно-инженерная конструкция, кодирующая ген устойчивости к фосфинотрицину (глюфосинату аммония - действующее вещество гербицидов Баста и Ламберти). В геном другого отечественного сорта картофеля были введены, также созданные специалистами Центра, конструкции на основе генов У- вируса. В процессе лабораторных испытаний бы-

ли отобраны трансформанты, обладавшие наиболее высокой устойчивостью в одном случае к гербициду, а в другом - к У- вирусу картофеля. Отобранные линии картофеля испытывались в течение трех лет на изолированных делянках.

**Устойчивость к фитопатогенам.** Учеными ВНИИФ разрабатывается уникальное направление в области генной инженерии. Обычно трансгенные растения обладают узкоспецифической устойчивостью к фитопатогенам (в особенности к фитовирусам): в некоторых случаях включение отдельного фрагмента вируса, выделенного из определенного штамма, индуцирует устойчивость растения к этому вирусному штамму, но не к другому штамму того же вируса. Это снижает практическую ценность трансгенных растений. Поэтому осуществляется поиск белков, способных индуцировать неспецифическую устойчивость растений к фитопатогенам. Несколько лет назад выделены белки, способные индуцировать неспецифическую устойчивость различных растений к грибной и вирусной инфекциям, идентифицированы и клонированы гены этих белков, созданы генно-инженерные конструкции. Начаты работы по переносу этих генно-инженерных конструкций в геном клеток табака и картофеля. Получены результаты, подтверждающие экспрессию целевых генов и индукцию признака устойчивости у трансгенных растений одновременно к нескольким вирусам.

В настоящее время американскими учеными выведены сорта картофеля, устойчивые к колорадскому жуку, и сорта сои, устойчивые к глифосату. Колорадский жук является бичом для основных районов картофелеводства и производства других пасленовых культур в России, США, Канаде и других странах. Производители вынуждены проводить от 4 до 8 обработок дорогостоящими химическими инсектицидами для защиты посадок от этого вредителя. Химические инсектициды к тому же являются в разной степени токсичными для теплокровных животных и человека. Кроме того, при использовании соединений одного химического класса (например, пиретроидов) у вредителей к ним сравнительно быстро возникает резистентность.

Специалисты компании Монсанто перенесли в геном ряда сортов картофеля ген, выделенный из бактерии *Bacillus thuringiensis*, разновидность *tenebrioides* (Bt. f )

Этот ген кодирует синтез белка-эндотоксина, обладающего специфической токсичностью по отношению к определенным группам насекомых, включая колорадского жука. Токсичное действие белка Vt.f обусловлено тем, что он парализует пищеварительную систему жука. Содержание белка-эндотоксина Vt. f в листьях картофеля колеблется от 5,4 до 28,3 мкг/г сырой массы, а в клубнях - от 0,4 до 2,0 мкг/г (менее 0,01% общего содержания белка в клубне).

Токсикологические исследования показали, что белок Vt.f безопасен для человека и нецелевых организмов. Безопасность обусловлена специфичностью его воздействия лишь на чувствительные рецепторные мишени, имеющиеся только у определенных групп насекомых. В почве этот белок сравнительно быстро деградирует. В результате Государственная комиссия по продовольствию и лекарственным США (РПА) исключила белок Vt. f из официального списка потенциально токсичных веществ.

Проведенные во ВНИИФ исследования показали, что ботва трансгенного картофеля, несущего ген Vt.f, активно поедается 28-точечной коровкой (Эпиляхой) без каких-либо отрицательных последствий для вредителя, что подтверждает высокую видоспецифичность действия эндотоксина.

Биоинсектициды. В течение последних 30 лет в сельскохозяйственном производстве России и других стран широко и успешно применяются биоинсектициды, созданные на основе *Bacillus thuringiensis* (Лепидоцид, Динел, Инсектин, Энтеробактерин, Новодор и др.). Одно из основных действующих компонентов этих препаратов - белок Vt.f. Всемирная Организация здравоохранения (ВОЗ), а также государственные регулирующие органы во многих странах (включая Россию) санкционировали использование указанных инсектицидов в качестве безопасного для человека и окружающей среды микробиологического средства защиты растений. Трансгенные сорта картофеля компании Монсанто, представленные на испытание их безопасности, разрешены к использованию в качестве пищевых продуктов в США, Канаде, Японии и в ряде других стран.

Задачи, которые были решены при оценке биобезопасности, представленных компанией Монсанто, сортов трансгенного картофеля, заключались в следующем:

- проверить соответствие генно-инженерных конструкций, внесенных в геном трансгенных сортов, заявленным;

- определить уровень накопления эндотоксина в тканях растений и стабильность сохранения этого уровня в последующих генерациях;

- изучить возможное влияние трансгенных растений на видовой состав ризосферных и эпифитных микроорганизмов;

- провести сравнительную характеристику устойчивости представленных трансгенных сортов к наиболее распространенным возбудителям грибных, бактериальных и вирусных болезней к вредителям сельскохозяйственных культур;

- оценить реакцию трансгенных сортов картофеля на обработку пестицидами согласно принятым в России технологическим регламентам;

- провести сравнительную оценку сохранности клубней;

- изучить возможность возникновения резистентности колорадского жука к эндотоксину **Vt**;

- оценить соответствие хозяйственно полезных признаков, обусловленных введением чужеродных генов в растение-реципиент, заявленным.

Только после тщательного анализа этих данных и по согласованию с соответствующими министерствами и ведомствами будет решаться дальнейшая судьба трансгенных сортов картофеля в России.

**Перспективы генно-инженерной биотехнологии растений.** В настоящее время различные методические приемы генетической инженерии стали составной частью современной молекулярной и клеточной биологии. К основным задачам генно-инженерной биотехнологии растений относятся их генетическая трансформация, экспрессия чужеродных генов и ее регуляция в клетках трансгенных культур.

Три выдающихся достижения физиологии растений создали основу для интеграции технологии рекомбинантных ДНК в генно-инженерную биотехнологию растений. Во-первых, открытие фитогормонов, регулирующих рост и развитие растений. Во-вторых, разработка методов культивирования клеток и тканей растений на средах, содержащих макро- и микроэлементы, сахара, витамины и фитогормоны (эти методы позволяют выращивать клетки, ткани и целые растения в стерильных условиях и проводить их селекцию на специфических средах). В третьих, установление феномена **тотипотентности** («полноценности», информативности) соматических растительных клеток, открывающей путь к регенерации из них целых растений.

В ближайшее время потенциал генно-инженерной биотехнологии растений значительно возрастет благодаря разработке методов генетической трансформации клеточных органелл. Уже достигнуты значительные успехи в создании и развитии методов трансформации хлоропластов высших растений. Дальнейшие успехи генно-инженерной биотехнологии растений будут зависеть от понимания особенностей трансгенной экспрессии. Здесь следует отметить наблюдаемое иногда явление «замолкания» генов и роль метилирования ДНК в этом процессе. В настоящее время можно говорить о зарождающейся ядерной инженерии, направленной на модификацию ядер с помощью чужеродных и рекомбинантных ядерных белков (например, ДНК-метиляз) и специфическую структурную модификацию чужеродных генов. Показано, что трансгенную экспрессию можно повысить на несколько порядков путем присоединения к чужеродным генам нуклеотидных последовательностей, прочно связанных с ядерным матриксом.

#### Вопросы для самопроверки

1. Каковы положительные аспекты получения генномодифицированных растений?
2. Какие возможны негативные последствия выращивания трансгенетиков?



## 11 ПИЩЕВАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ ПРОДУКТОВ ИЗ СЫРЬЯ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Биотехнология - область знания, позволяющая получать путем управляемого культивирования организмов и (или) их фрагментов (тканей, клеток) полезные для человека продукты - пищу, корма, медицинские препараты, разнообразное сырье, доступные растениям формы азота, средства защиты растений и животных

### 11.1 Бродильные производства

Алкобольные напитки получают путем сбраживания сахаросодержащего сырья, в результате которого образуются спирт и углекислый газ. Первыми напитками, полученными на основе спиртового брожения, являются вино и пиво. До появления работ Пастера в конце XIX века о сути происходящих при брожении процессов и их механизмах было известно очень мало. Пастер показал, что брожение осуществляется без доступа воздуха живыми клетками дрожжей, при этом сахар превращается в спирт и углекислый газ. Сбраживание осуществляется дрожжами рода *Saccharomyces*. В одних случаях используется природный сахар (например, содержащийся в винограде, из которого делают вино), в других сахара получают из крахмала (например, при переработке зерновых культур в пивоварении). Наличие свободных сахаров обязательно для спиртового брожения при участии *Saccharomyces*, так как эти виды дрожжей не могут гидролизовать полисахариды.

В производстве спиртных напитков наиболее часто применяют штаммы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* или *Saccharomyces carlsbergensis*. Главное различие между ними заключается в том, что *S. carlsbergensis* могут полностью сбраживать раффинозу, а *S. cerevisiae* к этому не способны.

Требования, предъявляемые к дрожжам при производстве алкогольных напитков, следующие: дрожжи должны обеспечивать полноту сбраживания, высокую его скорость и легко выпадать в осадок.

## Пивоварение

Выбор штамма пивных дрожжей является наиболее важным условием, определяющим свойства пива: его цвет, вкус и аромат, крепость.

В 1880 г. датский ученый Хансен выделил чистые культуры дрожжей и использовал их при производстве пива. Использование индивидуальных штаммов дрожжей в пивоварении сегодня стало нормой. *Saccharomyces cerevisiae* представляют собой дрожжи поверхностного и глубинного брожения: они применяются в производстве эля. *Saccharomyces carlsbergensis* – дрожжи глубинного брожения, их используют в производстве легкого пива. Некоторые пивовары используют дрожжи *Saccharomyces uvarum*.

К числу наиболее важных свойств относят продуктивность, способность формировать осадок, сбраживать мальтотриозу и т.д. Принимаются во внимание и вкусовые свойства получающегося пива, то есть образование веществ, ответственных за их формирование.

Для осуществления спиртового брожения прежде всего необходимо, чтобы в пивоваренном сырье образовался сахар. Традиционным источником нужных для этого полисахаридов всегда был ячмень, но в качестве дополнительных используются и другие виды углеводосодержащего сырья. Ячменный солод и прочие компоненты измельчают и смешивают с водой при температуре до 67 °С. В ходе перемешивания природные ферменты ячменного солода разрушают углеводы зерна. Пивное сусло после гидролиза крахмала содержит мальтозу, глюкозу, мальтотриозу, которые сбраживают сахаромицеты, а также декстрины и мальто-тетраозу, которые не используются пивными дрожжами.

Полученное сусло отделяют от нерастворимых остатков. Добавив хмель, его кипятят в медных котлах. В процессе кипячения прекращается ферментативная активность, осаждаются белки из сусла и экстрагируются вкусовые компоненты хмеля. Для производства пива с определенным содержанием алкоголя сусло после кипячения доводят до нужной плотности. Удельная плотность сусла определяется содержанием экстрагированных сахаров, подлежащих сбраживанию. Затем в сусло засевают штамм пивных дрожжей, которые сбраживают сахара в спирт и угле-

кислый газ (в процессе брожения дрожжевая биомасса увеличивается в пять раз). Ряд других соединений, придающих пиву его особенный вкус, образуются в незначительных количествах. Среди них амиловый, изоамиловый и фенилэтиловый спирты, концентрация которых составляет около нескольких миллиграммов на 1 л, уксусная и масляная кислоты, а также эфиры. По истечении определенного времени брожение заканчивается, дрожжи отделяют от пива и выдерживают его некоторое время для созревания. После фильтрации и других необходимых процедур (пастеризации) пиво готово.

### Перспективы развития пивоварения

Для упрощения технологии пивоварения методами генной инженерии был получен штамм пивных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* с внесенным в ДНК геном бактерии *Bacillus subtilis*, детерминирующим  $\beta$ -глюконазу. Новый штамм не требует предварительного солодования ячменя, так как способен сбраживать крахмал.

Поскольку наиболее популярными являются светлые сорта пива (с низким содержанием углеводов), с помощью методов генетической инженерии исследователи пытаются создать пивные дрожжи, способные сбраживать декстрины.

Так как пиво высокого качества можно получить только при отсутствии в сбраживаемом растворе посторонних микроорганизмов, проводятся исследования в этом направлении. Путем скрещивания дрожжей, имеющих агрессивные свойства, с промышленными пивными дрожжами получен штамм пивных дрожжей, убивающий дикие дрожжи. Селекционеры также пытаются получить штамм пивных дрожжей, уничтожающий бактериальную микрофлору.

Усовершенствовать пивные дрожжи можно также, прививая им способность к **флокуляции** (слипанию) клеток в конце ферментации, что позволяет удалить дрожжи из готового пива. Флокуляция зависит от состава среды, условий культивирования, но одновременно является генетически определяемым свойством, контролируемым генами.

Пивоварение является весьма консервативной отраслью пищевой промышленности. Тем не менее, в данной отрасли постоянно внедряются новые техноло-

гические приемы, позволяющие интенсифицировать производственные процессы. Среди них наибольший интерес представляют непрерывные процессы, например, непрерывное солодование, непрерывное брожение пивного суслу в специальных бродильных колоннах с рециркуляцией пивных дрожжей при использовании флокулирующих штаммов.

Трудоемкий и продолжительный процесс солодования зерна заменяют его обработкой комплексом осаживающих ферментов микробного происхождения и др.

### **Виноделие**

Как показали археологические раскопки, развитие виноделия началось около 5000 лет назад.

Необходимое условие любого бродильного процесса – наличие сахара в сырье. Так, в производстве вина используется сахар виноградного сока. Почти все вино в мире делают из винограда одного вида – *Vitis vinifera*. Сок этого винограда – прекрасное сырье для производства вина. Он богат питательными веществами, служит источником образования приятных аромата и вкуса, содержит много сахара; его природная кислотность подавляет рост нежелательных микроорганизмов.

Виноделие, в отличие от пивоварения, до самого последнего времени было основано на использовании местных дрожжей дикого типа. Единственная обработка, которой подвергали виноград до отжима, - окуривание сернистым газом, чтобы сок не темнел. Кроме того, сернистый газ подавляет деятельность невинных дрожжей; это позволяет винным дрожжам, которые менее чувствительны к нему, осуществлять брожение без помех. В прошлом именно с помощью этих диких дрожжей и осуществляли спиртовое брожение. В тех районах, где виноделием начали заниматься недавно, широко применяются дрожжевые закваски. Связано это с тем, что желаемая микрофлора может и отсутствовать, а инокуляция стандартной культурой дрожжей позволяет получать вина с нужными свойствами. Кроме того, количество используемого сернистого газа ограничено законодатель-

но, и это побуждает применять дрожжевые культуры-закваски. Используются дрожжи-сахаромицеты: *Saccharomyces cerevisiae*, *S. oviformis*, *S. ellipsoideus*. Виноделы не очень-то полагаются на дрожжи дикого типа, если нет уверенности, что конкуренция со стороны не-винных дрожжей не подавлена. Использование заквасок дает ряд преимуществ: сокращается лаг-период размножения дрожжей, образуется продукт с известными свойствами, уменьшается вероятность появления нежелательного вкуса, поскольку в брожении не участвуют дикие не-винные дрожжи. Хересные винные дрожжи (*Saccharomyces oviformis*), способные перекислять спирт в продукты, придающие вину хересный букет, чувствительны к концентрациям спирта выше 15 %. Культивируя исходный штамм дрожжей при постепенном повышении концентрации спирта до 18 %, удалось выделить штамм, способный к образованию хереса в этих условиях.

В будущем использование специально созданных штаммов будет все более расширяться: это гарантирует необходимые вкусовые качества вин. Смешанные закваски позволяют получать продукцию с полным букетом, что невозможно при работе с индивидуальными штаммами.

После завершения спиртового брожения молодое вино хранят в особых условиях, чтобы оно не испортилось. Если вино не предполагается подвергать яблочно-молочнокислородному дображиванию, из него удаляют дрожжи, чтобы прекратить брожение. Затем его обрабатывают сернистым газом, чтобы подавить окислительные процессы, вызывающие его потемнение.

Первосортные вина подвергают выдержке разного рода в зависимости от типа вина, а более дешевые разливают, как правило, в тот же год, когда они были получены. Трудности при выработке дешевых вин обычно связаны с их склонностью к вторичному, яблочно-молочнокислородному брожению, которое развивается со временем розлива. Если вино склонно к такому брожению, его искусственно вызывают до розлива или подавляют. При производстве первосортных красных вин такое брожение даже желательно. Оно составляет естественную часть процесса и происходит при хранении. Этот тип брожения осуществляется молочнокислыми бактериями, в частности *Leuconostoc*, *Lactobacillus* и *Pediococcus*. Оно не идет

при низких значениях pH; создав такие условия, его можно подавить. В белых винах яблочно-молочнокислородное брожение происходит реже, так как pH в них ниже. Для инициации брожения иногда вместо бактерий используют иммобилизованные ферменты.

Некоторые особые сорта вин, например, сотерны, получают при участии гриба *Botrytis cinerea*. Его развитие на ягодах приводит к их обезвоживанию и повышению содержания сахара, что и определяет сладкий вкус вина. Заражение данным грибом должно происходить только перед сбором винограда. Представляет интерес и еще один процесс, называемый углекислотной мацерацией. Красные вина, которые должны созреть к 15 ноября в год сбора винограда, получают особым способом. Виноград не давят, а помещают целиком в бродильные чаны, где держат в атмосфере углекислого газа. Брожение идет либо прямо в ягодах, в анаэробных условиях, либо в соке, выделяющемся в результате разрушения кожицы углекислым газом. Микробиология этого процесса пока не исследована.

В виноделии также используются ферментные препараты, в частности пектолитического действия. Применение пектиназ увеличивает скорость фильтрации сусла, способствует его осветлению и стабилизации. При этом возрастает содержание экстрактивных веществ, витамина С, флавоноидов, обладающих Р-витаминной активностью.

Дальнейшие успехи виноделия будут определяться использованием более эффективных штаммов винных дрожжей и коммерческих препаратов винных заквасок. Это позволит получать вина высокого качества.

С помощью клеточной и генной инженерии создаются высокопродуктивные штаммы винных дрожжей, разрабатываются непрерывные процессы сбраживания сока с использованием иммобилизованных клеток.

### **Получение сидра**

Сброженный яблочный сок имеет название сидр. В технологии производства сидра и вина есть много сходного.

Когда делают сидр, яблоки прежде всего измельчают в кашу и отжимают

сок. Способы подготовки сока перед брожением весьма разнообразны: он может использоваться как без обработки, так и после подавления в нем естественной микрофлоры и замещения ее дрожжами подходящих штаммов микроорганизмов. Чаще всего к яблочному соку, как и при приготовлении виноградных вин, добавляют сернистый газ, чтобы подавить развитие *Kloeckera apiculata* - микроорганизмов, неблагоприятно влияющих на вкус готового сидра. Дальнейшее брожение происходит либо при участии диких дрожжей, либо при добавлении дрожжевой культуры закваски. Так как дикие дрожжи растут медленно, при крупномасштабном производстве сидра к обработанному сернистым газом соку часто добавляют те или иные чистые культуры дрожжей. В основном применяют дрожжи вида *Saccharomyces cidri*. Различные штаммы дрожжей образуют специфические ароматические вещества. Поэтому при производстве сидра, как и в пивоварении, можно использовать разные штаммы дрожжей для придания сидру специфического вкуса. Чтобы получить сидр определенного сорта, добавляемые дрожжи должны преобладать над дикими, быстрее размножаться и определять конечные свойства продукта.

По завершении брожения сидр отделяют от дрожжей и осветляют. Важно, чтобы дрожжи были способны образовывать фермент полигалактуронидазу, необходимую для гидролиза пектинов до галактуроновой кислоты. В противном случае в конце брожения не происходит естественное осветление продукта. Для осветления сидра добавляют полученные из микроскопических грибов ферменты, гидролизующие пектин, в том числе полигалактуронидазу.

## **Спиртопродукты**

### **Микроорганизмы, используемые при получении этанола**

Производство этилового спирта при помощи дрожжей основано на давно устоявшейся технологии. В спиртовом производстве используют пригодные для этих целей штаммы рода *Saccharomyces*. Основную массу вырабатываемого в настоящее время спирта получают при помощи дрожжей рода *S. cerevisiae*, иногда *S. uvarum* (*carlsbergensis*), *S. diastaticus*. Самое главное здесь – подобрать

дрожжи, подходящие для переработки определенного субстрата. Дрожжи *S. cerevisiae* могут расти на глюкозе, фруктозе, мальтозе и мальтотриозе, то есть на простых сахарах. *S. diastaticus* может также использовать декстрины, а виды дрожжей *Kluuveromyces fragilis* и *K. lactis* - лактозу. Крупные спиртовые заводы всегда поддерживают свою собственную культуру дрожжей в специальных средах. Выбор штамма дрожжей при производстве спирта определяется его продуктивностью в особых условиях бродящего сусла. Брожение должно идти активно с образованием спирта в количестве, близком к теоретическому пределу.

Одним из лимитирующих факторов в ферментационном производстве этанола является неспособность микроорганизмов переносить высокие концентрации спирта и вызываемая этим остановка процесса брожения по достижении относительно высокой концентрации спирта. Штаммы дрожжей, используемые в спиртовой промышленности, должны сохранять жизнеспособность вплоть до концентрации этанола 12-15 % (по объему). Кроме того, если в качестве сырья используется зерно, дрожжи должны обладать способностью гидролизовать полисахариды до глюкозы. Это необходимо для полного превращения крахмала в этиловый спирт и углекислый газ.

Ожидается, что работа по созданию новых штаммов дрожжей, устойчивых к еще более высоким концентрациям спирта, будет успешной. Пока углеводы не переведены в форму, усваиваемую дрожжами, брожение не происходит. Добавление гидролизующих крахмал ферментов ускоряет этот процесс. Для этого обычно применяют амилазу из культуральной жидкости штаммов *Bacillus subtilis* и амилоглюкозидазу, выделяемую из культур грибов штаммов *Aspergillus niger* и близких форм. Ферменты используются и при подготовке сусла, и при спиртовом брожении.

### **Получение этилового спирта**

Схема процесса производства этанола приведена на рис. 11.1. Некоторые сорта спирта обычно производят из вполне определенных типов сырья. Так, коньяк, получаемый при перегонке вина, делают из винограда, а шотландский виски –



из ячменного солода. Другие напитки – американский виски, джин и водку, которые обычно делают из зерна (например, кукурузы), можно производить и на основе другого подходящего сырья. Ром обычно получают из мелассы сахарного тростника или свеклы. Когда сырьем служит зерно (например, пшеница или кукуруза), до сбраживания необходимо гидролизовать крахмал до сахаров. Так, виски – это продукт перегонки пива без хмеля. Первые стадии процесса производства виски такие же, что и при приготовлении суслу в пивоварении. Однако, если применяют кукурузу или другие зерновые, то до приготовления суслу непосредственно в бродильных чанах проводят обработку крахмала в зерне ферментами солода.

Если для производства спирта используют мелассу, такие предварительные операции не нужны, поскольку углеводы в ней содержатся в форме, пригодной для сбраживания. Тем не менее, сырье все же приходится подготавливать к процессу: осветлять, подогревать и разводить водой, чтобы получить концентрацию сахара, оптимальную для брожения. После подготовки сырья добавляют культуру подходящих дрожжей и ведут сбраживание.

Образование этилового спирта дрожжами – это анаэробный процесс, но для их размножения нужен кислород. Сам процесс метаболизма, жизнеспособность клеток, их рост, размножение и образование спирта зависят от концентрации субстрата, кислорода и конечного продукта (спирта).

Большую роль в увеличении выхода продукта играет отбор штаммов дрожжей, более устойчивым к повышенным концентрациям как субстрата, так и спирта. Для большинства видов дрожжей оптимальная для их жизнедеятельности температура лежит в пределах от 25 до 33 °С. Проведение процесса при pH 4-5 снижает опасность микробного обсеменения посторонними микроорганизмами.

Если принять, что исходным сырьем является глюкоза, общую схему получения этанола можно представить следующим образом:



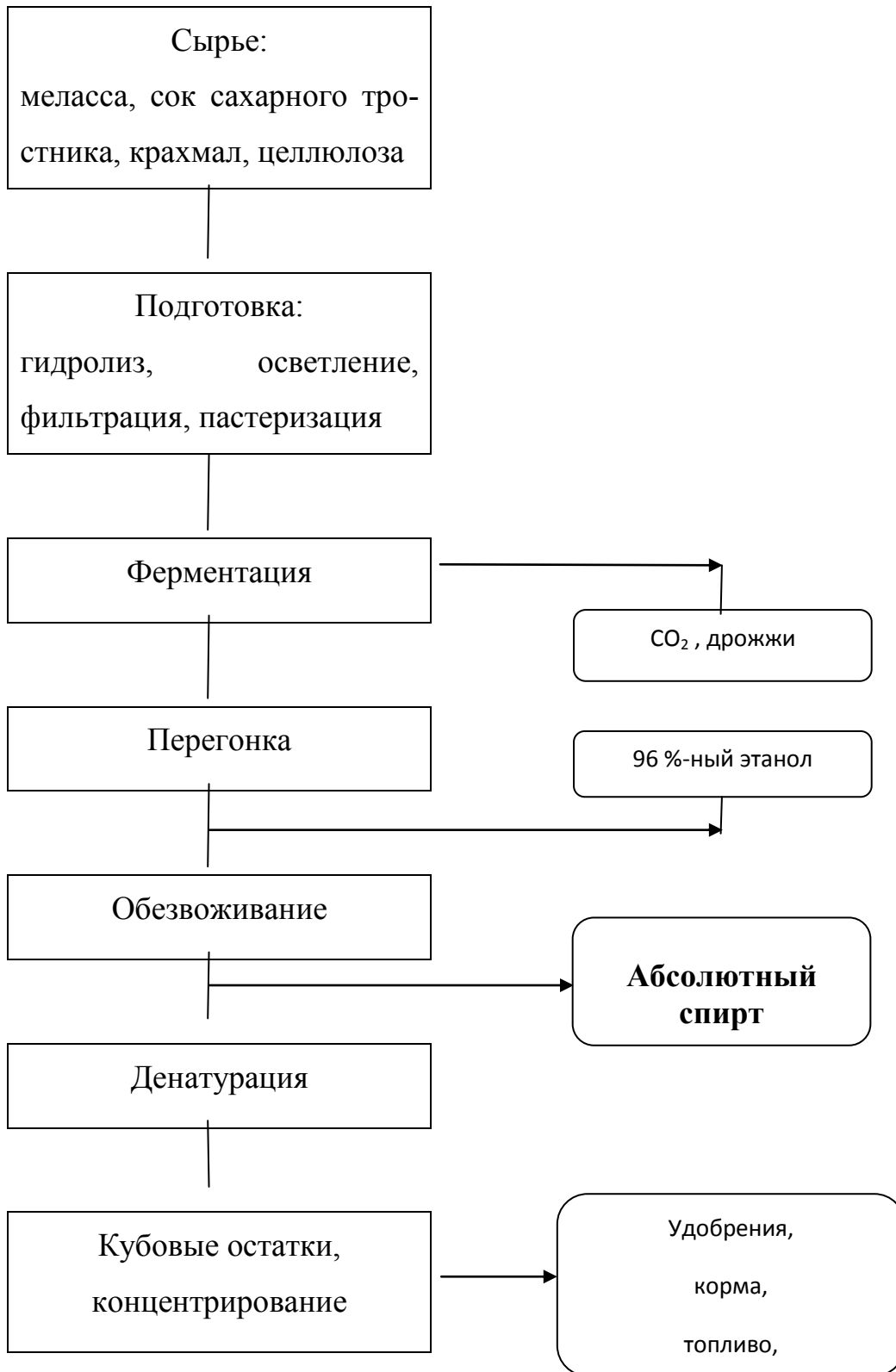


Рисунок 4 Схема процесса производства этанола

Требования к дополнительным источникам питания определяются природой сырья, используемого при подготовке субстрата. Так, если сырьем служит меласса, то необходимо добавлять вещества – источники азота и фосфора, а если в основе лежит высоко очищенный гидролизат крахмала, то может понадобиться добавить незаменимые микроэлементы и витамины.

Существуют три основных способа сбраживания сахаросодержащего сырья: периодический, периодический с повторным использованием клеток и непрерывный. При периодическом процессе субстрат сбраживается после внесения в него свежесброженной закваски, полученной в аэробных условиях. Брожение протекает в анаэробных условиях, и весь оставшийся субстрат превращается при этом в спирт. После завершения брожения дрожжи удаляют, для следующего цикла получения спирта выращивают новую порцию закваски.

При использовании дрожжей по периодической схеме около 5 % сахара расходуется на рост клеток и энергообеспечение синтеза других соединений: уксусной кислоты, сивушных масел, ацетальдегида и др. По этой причине максимальный выход составляет 48 % от субстрата по массе. Следует отметить, что для периодического процесса характерна малая объемная продуктивность: за 36 часов брожения образуется 5 %-ный (вес/объем) раствор спирта, что соответствует образованию в среднем 1,4 г спирта на 1 л за 1 ч. Недостатками периодического процесса также являются длительное сбраживание и неполное использование субстрата.

Эти недостатки можно устранить, применяя периодическую схему с повторным использованием клеток. При этом в конце цикла дрожжевые клетки отделяют от сброженной пульпы и сохраняют для использования в следующем цикле. Путем применения схемы с повторным использованием клеток или непрерывного брожения выход спирта можно повысить до более чем 10 г/л в час. При этом клетки отделяются от барды и используются заново: тем самым поддерживается высокая концентрация клеток в среде.

По завершении сбраживания концентрация спирта в среде составляет 6-12 %. Она зависит от штамма дрожжей и начальной концентрации сахара. Остатки

дрожжей отделяют путем отстаивания или центрифугирования.

Для получения 96 %-ного спирта нужна перегонка. Применяют два способа: кубовый и непрерывной перегонки (патент Коффи, 1830 г.). После этого продукт или отправляют на созревание (например, виски), или проводят завершающие операции и разливают по бутылкам (джин, водка). Для продажи спиртопродукты обычно разводят до стандартной концентрации в них спирта (40 % по объему). При производстве алкогольных напитков (водки, ликероводочных изделий и др.) применяют этиловый спирт высокой степени очистки (**р е к т и ф и к а т**). Технический спирт применяют главным образом как горючее для двигателей внутреннего сгорания. Этанол используют как растворитель, экстрагент и антифриз.

Еще один вид спирта – безводный (абсолютный) – получают при использовании бензола в десятикратном объеме по отношению к объему удаляемой воды.

### **Особенности производства различных видов спиртопродуктов**

При выработке спиртопродуктов разных видов очень важно использовать соответствующий штамм дрожжей. При выработке рома для производства сортов с сильным запахом обычно применяют штаммы дрожжей *Schizosaccharomyces*, а с менее интенсивным – быстродействующие дрожжи *Saccharomyces*. Отметим, что процесс образования спирта ускоряется бактериями *Clostridium saccharobutyricum*. Самый лучший ром получают в том случае, когда соотношение бактерий к дрожжам составляет 1:5. Культуру бактерий вносят, когда концентрация спирта достигает 3,5-4,5 %, а сахара – 6 %.

Производство сакэ, или рисовой водки (Япония), похоже скорее на пивоварение, чем на виноделие, поскольку сбраживаемым углеводом является крахмал. Последний превращается в сбраживаемые сахара под действием *Aspergillus oryzae*, споры которого смешивают с размолотым и сваренным на пару рисом и инкубируют пять-шесть дней при 35° С. Полученный продукт смешивают с распаренным рисом и засевают штаммом *Saccharomyces cerevisiae* (мото). Брожение продолжается не менее трех недель. Приготовление сакэ – сложный и труднорегулируемый процесс, требующий освоения различных способов брожения (в по-

лутвердом и затопленном состоянии) и последовательного регулирования микробных популяций: сначала плесневых грибов (*Aspergillus oryzae*), затем бактерий (*Lactobacillus* и *Leuconostoc* spp.) и наконец дрожжей (*S. cerevisiae*). К концу брожения сакэ содержит не менее 20 % спирта по объему. Концентрация спирта перед выходом в торговую сеть доводится обычно до 16 % по объему.

## 11.2 Хлебопечение

В различных странах мира используются самые разнообразные технологии хлебопечения.

Биотехнологические процессы в хлебопечении связаны с использованием хлебопекарных дрожжей, других заквасок, вызывающих брожение, а также некоторых ферментных препаратов.

Для производства хлеба в основном применяют дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*. Обычно их выращивают в ферментерах периодического действия на мелассе – отходе сахарного производства. Реже используют дрожжи вида *Candida milleri*. Дозировка прессованных дрожжей при производстве хлебобулочных изделий обычно составляет 1,0-1,5 % к массе муки. При производстве хлеба ферментационный процесс осуществляется в пастообразной среде (опара, тесто). Мука содержит ферменты (амилазу и протеазу), которые обеспечивают частичный гидролиз крахмала и белков муки, создавая благоприятный субстрат для роста дрожжей. В муке также содержится много молочнокислых бактерий, которые создают в тесте кислую среду, способствуя росту дрожжей. Условия аэрации в тесте плохие, поэтому развитие дрожжей ограничено, но молочнокислые бактерии в таких условиях размножаются достаточно интенсивно. В целях интенсификации процесса брожения в тесто можно добавить сахарозу или солодовый экстракт. В дрожжах, выращенных на мелассе, много инвертазы. В биомассе дрожжей около 50 % белков, свободные аминокислоты и витамины (рибофлавин, пиридоксин, тиамин, фолиевая кислота и др.), то есть дрожжи обогащают хлеб ценными веществами.

В Германии и США из ржаной муки выпекают хлеб «с кислинкой». Основа технологии здесь та же, что и при выпечке хлеба из пшеничной муки, но при замесе ржаной муки и воды добавляют опару, заквашенную смешанной культурой лактобацилл. Содержащаяся в этой закваске (опаре) кислота и придает хлебу особый вкус.

### **11.3 Применение ферментов при выработке фруктовых соков**

Применение ферментов, полученных из микроорганизмов – один из главных путей, которые биотехнологи используют и будут использовать для интенсификации технологических процессов в пищевой промышленности. Наибольшие успехи были достигнуты при производстве фруктовых соков: здесь используют такие ферменты, как пектиназы, целлюлазы, гемицеллюлазы, амилазы и протеиназы. Эти ферменты применяются не только в давно освоенных производствах; с их помощью удалось расширить ассортимент и добиться большего выхода продукции из сырья.

Ведущее место в производстве соков принадлежит пектиназам. В 1 л виноградного сока содержится 0,2-0,4 г пектина, еще больше его в яблочном и виноградном соках. При хранении сока пектин оседает. Освобождение сока от пектина обязательно при изготовлении сиропов путем упаривания, так как присутствие пектина может вызвать желеобразование. Обработка соков пектолитическими ферментами снижает содержание пектина до 50 мг/л. Пектолитические ферментные препараты хорошо зарекомендовали себя при получении гомогенных пюре для детского и диетического питания.

Ферменты используются на следующих основных стадиях переработки фруктов:

- 1 Обработка мезги: разрушение мякоти при выработке фруктовой кашицы или нектаров; увеличение выхода сока; лучшее отделение веществ, ответственных за цвет и вкус.

- 2 Обработка сока: уменьшение вязкости; облегчение изготовления концен-

тратов; упрощение процедур осветления, фильтрования и стабилизации сока.

Выбор ферментов и способов их применения для получения наилучших результатов при выработке соков производится с учетом следующих факторов: активности фермента; условий (температуры и продолжительности) обработки; необходимости гидролиза пектиновых веществ; механизма осветления.

#### **11.4 Консервированные овощи и другие продукты**

Как и в случаях многих других разновидностей пищевого сырья, необходимость сохранения овощей для употребления их в течение всего года привела к возникновению ряда новых пищевых продуктов. Брожение в данном случае способствует сохранению питательных компонентов продукта, которые без консервирования подвергаются разрушению вследствие порчи.

Для консервирования овощей их пропитывают рассолом, в котором они подвергаются брожению. Первая стадия – рост в рассоле аэробной микрофлоры на поверхности овощей. Затем в процесс включаются молочнокислые бактерии рода *Lactobacillus* и дрожжи, относящиеся к родам *Saccharomyces* и *Torulopsis*. К результату брожения образуются молочная и уксусная кислоты. В дальнейшем дрожжи вытесняют молочнокислые бактерии. Брожение завершается, когда использованы все сбраживаемые углеводы овощей. Однако некоторые виды дрожжей, относящиеся к родам *Candida*, *Debaryomyces* и *Pichia*, продолжают расти на поверхности рассола. Это может привести к чрезмерному образованию кислоты, приводящему к ухудшению вкуса продукта, и последующей порче.

В современной технике консервирования овощей используют микробные штаммы, в частности, штаммы молочнокислых бактерий, подвергшиеся селекции. Пастеризация на последней стадии консервирования уничтожает микроорганизмы и гарантирует качество продукта.

Кислую капусту готовят из свежей измельченной капусты. После добавления соли на первых стадиях брожения доминируют бактерии *Leuconostoc mesenteroides*, которые в анаэробных условиях превращают сахара в молочную и ук-

сусную кислоты, этиловый спирт, маннитол, эфиры и CO<sub>2</sub>. В дальнейшем образование молочной кислоты из сахаров и маннитола осуществляется при участии *Lactobacillus plantarum*. Разложение маннитола – важный этап, так как он придает продукту горький вкус. Хотя при получении кислой капусты условия сбраживания в какой-то степени контролируются, применять закваски нет необходимости, так как никаких преимуществ они не дают.

Пикули делают из миниатюрных засоленных огурцов. Конечный продукт получают путем полного или частичного сбраживания, либо без такой обработки. При брожении важную роль опять-таки играют молочнокислые бактерии, осуществляющие ферментацию сахаров. Соли обычно добавляют немного, и рассол с самого начала подкисляют уксусной кислотой. Если к нему добавляют укроп и другие пряности, то получают укропные пикули.

Оливки перерабатывают путем засолки и обработки щелоком. Когда консервируют зеленые плоды, молочнокислое брожение осуществляется *Leuconostoc mesenteroides*, а затем *Lactobacillus plantarum* и продолжается от шести до десяти месяцев. Спелые оливки либо не сбраживают вовсе, либо сбраживают недолго. И в том, и в другом случае большое значение имеет обработка щелоком, так как при этом удаляется олеuropeин (гликозид, имеющий горький вкус).

Кофе и какао. Микроорганизмы играют важную роль и на определенных стадиях выработки некоторых других продуктов, особенно кофе и какао. При замачивании плодов на них развиваются молочнокислые бактерии и дрожжи, что способствует отделению кожуры от зерен; влияние микробов на качество конечного продукта незначительно. При производстве растворимого кофе применяют ферментные препараты микробного происхождения целлюлолитического действия.

### **11.5 Продукты из сои**

Соя принадлежит к числу главных пищевых культур в странах Азии, особенно в Китае и Японии. В восточной кухне она служит главным поставщиком белка и масла. На основе соевых бобов на Востоке вырабатывают множество тра-



диционных пищевых продуктов (смотри п. 9.6.).

Соевый соус готовят на основе кашицы из набухших и отваренных бобов сои. В нее вносят закваску, содержащую различные микроорганизмы, главным образом, *Aspergillus orizae* (оризе). В ходе выдержки в течение 3-5 сут при температуре 25-30 °С грибок активно разрастается на поверхности. Затем в смесь добавляют соль (до 20 %) и оставляют ее созревать на 0,5-2 года при низкой температуре. В настоящее время применяют чистые культуры *Aspergillus orizae*, поэтому срок выдержки сокращается до одного-трех месяцев. Кроме плесневого гриба для получения соевого соуса применяют бактерии *Pediococcus soyaе*, дрожжи *Saccharomyces rouxii* и некоторых видов дрожжей рода *Torulopsis*. Их специально добавляют в соевую смесь в виде исходных чистых культур или они размножаются из уже имеющихся в смеси клеток. В результате брожения смесь насыщается молочной и другими кислотами и этанолом. По окончании процесса жидкость сливают с соевой массы или отделяют под прессом и получают соевый соус. Остающийся при этом шрот скармливают домашним животным.

Помимо ускорения процесса путем использования чистых культур разработаны и сугубо химические способы получения соевых гидролизатов. Так готовят несброженный соевый соус.

Соевые бобы могут стать тем сырьем, из которого на основе традиций восточной кухни можно будет получать новые продукты способом ферментации. В этих случаях перерабатываются целые бобы, однако с помощью биотехнологии получены новые продукты из белков сои. Их вырабатывают путем контролируемого гидролиза белков сои ферментами микроорганизмов. Например, растворимый гидролизат белков сои в качестве заменителя мяса лучше, чем блюда из соевых бобов. В странах, где население получает с пищей недостаточно белка, им обогащают безалкогольные напитки.

## **11.6 Микромицеты в производстве продуктов растительного происхождения**

Мицелий микроскопических грибов уже давно используется в питании че-

ловека. В пище жителей Юго-Восточной Азии, стран Востока в рационе доминируют крахмал, другие углеводы и не хватает белка. Для обогащения крахмалосодержащих продуктов белками и придания им вкуса мяса в этих странах с древних времен на растительных продуктах выращивают специально подобранные и естественным путем селекционированные виды плесневых грибов. На основе соевых бобов на Востоке вырабатывают множество традиционных пищевых продуктов, их особый вкус определяется деятельностью микроорганизмов. Это, главным образом, грибы, в частности представители рода *Aspergillus*.

Характерным элементом восточной кухни является продукт под общим названием темпе (или темпех). В Индонезии темпе представляет собой плотную лепешку, изготовленную из соевых бобов, арахиса или кокосовых орехов. Арахисовые или соевые лепешки употребляют в пищу обросшими плесневыми грибами рода *Rhizopus*. Арахисовое темпе содержит до 50 % белковых веществ и по вкусу напоминает мясные изделия.

Производство темпе занимает 2-3 дня. Сначала соевые бобы на 12 ч погружают в воду и лущат. Затем их кипятят в течение получаса, чтобы разрушить ингибиторы трипсина (протеолитического фермента) желудочного сока и гормона роста (эти два ингибитора делают сырые соевые бобы несъедобными для человека). После этого бобы несколько раз промывают и высушивают. Затем производят посев спорами плесневого гриба *Rhizopus oligosporus*. Традиционно посев производят остатками от предыдущей порции темпе. Брожение продолжается 36-38 ч при температуре 31 °С. В процессе брожения в продукте возрастает содержание белка и свободных аминокислот, рН возрастает с 5,0 до 7,6. Продукт естественным образом обогащается витаминами: рибофлавином (В<sub>2</sub>), цианкобаламином (В<sub>12</sub>), никотиновой кислотой (РР). В итоге получается светло-коричневая лепешка, состоящая из бобового пюре и мицелия микроскопического гриба. Данный продукт, в отличие от исходного сырья (соевых бобов), является высокопитательным и легкоусваиваемым. Темпе употребляют в пищу непосредственно после изготовления или после обжарки в кокосовом масле.

Японская кухня славится продуктом под названием натэ или мисо. Его по-

лучают из обросших плесневым грибом *Aspergillus orizae* соевых бобов. Продукт имеет характерный острый вкус. В Китае аналогичным способом изготавливают сырообразный деликатес суфу (красный творог), используя для этого соевые бобы и некоторые виды плесневых грибов рода *Mucor*. Еще один китайский продукт – ангкак, при приготовлении которого рис засеивается плесневым грибом *Monascus purpureus* с целью улучшения вкуса продукта, а также для того, чтобы придать ему красный цвет.

### 11.7 Продукты гидролиза крахмала

Способы производства кукурузного, пшеничного и картофельного крахмала были неоднократно и подробно описаны. Гидролиз этих разновидностей крахмала в промышленном масштабе осуществляется разными способами: только кислотой, кислотой и ферментами, и только ферментами.

В середине 60-х годов на смену кислотному и кислотно-ферментативному процессам пришел ферментативный способ переработки крахмала, основанный на последовательном применении  $\alpha$ -амилазы *Bacillus subtilis* (амлосубтилин) и амилоглюкозидазы *Aspergillus orizae* (амилоризин) или *A. niger* (амилосубтилин). Главное его преимущество связано с увеличением скорости процесса, уменьшением уровня загрязнения продуктами реверсии, получением продукта с высоким декстрозным эквивалентом (ДЭ). Величина ДЭ гидролизата (в используемой шкале глюкоза - декстроза - соответствует 100 ед.) отражает глубину гидролиза крахмала, для которого ДЭ считается равным нулю.

Следующим важным шагом было внедрение в производство термостабильных  $\alpha$ -амилаз, главным образом из *B. licheniformis*, позволяющих после обработки аминоглюкозидазой получать продукцию с ДЭ, близким к 100.

Высокотемпературное ожигение крахмала сегодня стало обычным промышленным процессом, но следующий этап, осахаривание, до сих пор осуществляется при участии «обычной» глюкоамилазы *A. niger* путем одноразовой обработки.

## 11.8 Перспективы развития пищевой биотехнологии

Пищевая биотехнология является перспективной отраслью биотехнологии. Если в биотехнологии вообще развиваются такие направления, как создание новых методов тестирования загрязнения окружающей среды; очистка окружающей среды (воды, почвы и т.д.) от загрязнителей с помощью микроорганизмов; получение новых медицинских препаратов (вакцин, антибиотиков, ферментов и др.); производство химических веществ и соединений, используемых в практической деятельности человека (в составе синтетических моющих средств и других продуктов); получение новых штаммов - продуцентов веществ и соединений, полезных для человека, и многие другие, то для пищевой биотехнологии перспективны следующие направления развития.

✓ Создание новых штаммов микроорганизмов, используемых в качестве заквасок в молочной промышленности, в виноделии, пивоварении.

✓ Разработка новых штаммов - продуцентов веществ и соединений, применяемых в пищевой промышленности (органических кислот, пищевых добавок, компонентов биологически активных добавок и др.).

✓ Получение с помощью микроорганизмов ферментов для разных отраслей пищевой промышленности – молочной (сыры), пивоваренной, безалкогольной, мясной (сыровяленые и сырокопченые колбасы, мясные изделия), пищевых концентратов и т.д.

✓ Использование отходов пищевой промышленности (молочной, сахарной и др.), а также других отраслей промышленности (химической, целлюлозно-бумажной) в качестве основных компонентов питательных сред для культивирования микроорганизмов.

Таким образом, развитие пищевой биотехнологии определяется не только совершенствованием, повышением эффективности традиционных биотехнологических процессов, но и разработкой совершенно новых процессов производства пищевых продуктов.

В связи с возможной нехваткой продовольствия в отдаленном будущем пер-

спективно получение белковой биомассы с помощью микроорганизмов-продуцентов (дрожжей, микроскопических грибов, бактерий). Преимущества данного направления: большая скорость роста микроорганизмов и синтеза целевого продукта; использование небольших (по сравнению с засевными) площадей; возможности создания новых высокопродуктивных штаммов с помощью селекции, мутаций, генной инженерии; возможность получать белковые препараты разной степени очистки.

С помощью более умелого использования микроорганизмов в пищевой промышленности, усовершенствования технологических процессов, в частности внедрения новых методов в технологии брожения, можно повысить выход и качество выпускаемой продукции и расширить ассортимент продовольственных товаров.

#### Вопросы для самопроверки

- 1 Какие виды микроорганизмов используются в производстве алкогольных напитков?
- 2 Расскажите о биотехнологических процессах и перспективах развития пивоварения.
- 3 Какие требования предъявляются к микроорганизмам, используемым при получении спиртопродуктов?
- 4 Перечислите основное сырье и стадии процесса производства этанола.
- 5 Биотехнологические процессы в хлебопечении.
- 6 На каких стадиях производства фруктовых соков применяют ферментные препараты?
- 7 Какие биотехнологические процессы используются для получения консервированных плодов и овощей?
- 8 Расскажите о преимуществах ферментативного способа переработки крахмала.
- 9 Какие продукты готовят из сои?
- 10 Биотехнологические процессы в получении соевого соуса.

- 11 Каким образом микроскопические грибы используются в питании?
- 12 Перечислите перспективные направления пищевой биотехнологии.

## **12 ПИЩЕВАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ ПРОДУКТОВ ИЗ СЫРЬЯ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ**

Развитие пищевой биотехнологии определяется не только совершенствованием, повышением эффективности традиционных биотехнологических процессов, но и разработкой совершенно новых процессов производства пищевых продуктов.

### **12.1 Получение молочных продуктов**

#### Применение заквасок в производстве кисломолочных продуктов

**Закваска** – основной источник внесения желаемой микрофлоры в молоко при производстве кисломолочных продуктов. Закваска является чистой посевной культурой микроорганизмов. При внесении закваски молоко обогащается микрофлорой, производящей сквашивание молока и способствующей накоплению вкусовых и ароматических веществ.

Для заквашивания молока и сливок издавна применяли простоквашу или сливки высокого качества. В качестве естественных заквасок использовали пахту, сквашенные сливки или кислое молоко. Они не гарантировали получение продукта высокого качества, так как содержали различные микроорганизмы и часто загрязнялись посторонней микрофлорой, вызывающей порчу продукта. Бактериальные закваски в промышленном масштабе впервые стали применять в маслоделии в конце прошлого столетия.

В молочной промышленности используются закваски, полученные из чистых культур микроорганизмов, которые готовят в специальных лабораториях. Состав микрофлоры подбирают таким образом, чтобы обеспечить для каждого вида продукта свойственный ему запах, вкус, консистенцию.

В молочной промышленности применяют в основном жидкие закваски и за-

кваски, высушенные способом сублимационной сушки; сухие, жидкие и подвергнутые глубокому замораживанию бактериальные концентраты, бактериальные препараты. Срок хранения сухих заквасок, бактериальных препаратов и концентратов составляет 3-4 месяца, жидких заквасок – 10 суток (в условиях холодильника).

#### Основные правила приготовления заквасок

Закваску готовят на цельном или обезжиренном молоке хорошего качества, которое стерилизуют при температуре 121 °С с выдержкой 15-20 минут (при приготовлении лабораторной закваски) или пастеризуют при 92-95 °С с выдержкой 20-30 минут (при приготовлении производственной закваски). Сразу после термической обработки молоко охлаждают до температуры заквашивания и вносят в него закваску в количестве 1-3 % в зависимости от условий производства. В результате биохимических процессов в молоке происходит образование белого сгустка, частично расщепляются белки молока, формируется вкус и аромат продукта. При приготовлении лабораторной закваски проводят несколько последовательных пересевов каждые сутки в возрастающие объемы (1:10) до доведения объема, необходимого в производстве.

После каждого пересева и перед выпуском в производство закваску контролируют по органолептическим, химическим и микробиологическим показателям.

#### Пороки заквасок

В заквасках могут быть различные пороки. Так, в заквасках, состоящих из мезофильных молочнокислых стрептококков, одним из наиболее распространенных пороков является развитие термоустойчивых молочнокислых палочек. Он возникает в результате нарушения режимов пастеризации, неэффективного охлаждения готовой закваски.

Закваски для масла и сыра нередко имеют сниженную способность к образованию аромата, что может быть связано с качеством исходной закваски, содержащей недостаточное количество ароматобразующих стрептококков; качеством молока; нарушением температурного режима сквашивания; недостаточной продолжительностью созревания.

Снижение качества заквасок может быть связано с развитием бактериофагов, наличием в молоке ингибирующих веществ. Иногда в закваске для сметаны, реже – для творога, появляется тягучесть. В случае появления этого порока данную закваску заменяют закваской из другой партии и тщательно следят, чтобы не снижалась температура сквашивания.

В заквасках, состоящих из термофильных молочнокислых стрептококков, чаще всего наблюдается развитие термоустойчивых молочнокислых палочек, а также возникновение излишней тягучести.

В многокомпонентных заквасках пороки, как правило, обусловлены нарушением условий культивирования кефирных грибков. Одним из наиболее распространенных пороков является ослизнение кефирных грибков и появление тягучести в грибковой закваске уксуснокислых бактерий. Распространен порок, выражающийся в снижении активности кефирной закваски. Он возникает в результате накопления в закваске молочнокислых палочек, которые, повышая кислотность, подавляют развитие молочнокислых стрептококков - активных кислотообразователей.

Чрезмерное увеличение дозы вносимой закваски приводит к повышению кислотности молока и получаемого продукта. Недостаточное внесение заквасочных культур может приводить к нарушению биохимических процессов в сырной массе, и активизации посторонней, технически вредной микрофлоры, что в результате увеличивает вероятность появления горечи, нечистоты и других пороков вкуса и запаха.

При переработке молока с механической загрязненностью, применении молока с низкой первоначальной кислотностью, слабом молочнокислом процессе увеличивают дозы вносимых заквасочных культур. Однако чрезмерное увеличение дозы вносимой закваски не способствует увеличению объема действующей микрофлоры, а приводит к повышению кислотности молока и получаемого продукта. Недостаточное внесение заквасочных культур может приводить к нарушению биохимических процессов в сырной массе, а отсутствие конкуренции – к активизации посторонней, технически вредной микрофлоры, что в результате уве-



личивает вероятность появления горечи, нечистоты и других пороков вкуса и запаха.

### Классификация кисломолочных продуктов в зависимости от используемой закваски

В зависимости от состава микрофлоры заквасок и способа приготовления кисломолочные продукты делят на следующие группы:

- ♦ Вырабатываемые с использованием многокомпонентных заквасок (кефир, кумыс). Микрофлора этой группы продуктов состоит из молочнокислых бактерий (одного или нескольких видов), дрожжей и нередко уксуснокислых бактерий. Дрожжи и уксуснокислые бактерии придают продуктам специфические вкус и аромат. При производстве кефира применяют естественную симбиотическую закваску – кефирные грибки, состоящие из молочнокислых бактерий *Lactobacillus*, дрожжей *Saccharomyces kefir* и некоторых видов стрептококков. Кумыс получают из кобыльего молока с помощью молочнокислых бактерий (*Lactobacillus casei* и др.), стрептококков и дрожжей, сбраживающих лактозу. Сквашивание молока при использовании таких заквасок проводят при 20-22 °С в течение 10-12 часов.

- ♦ Вырабатываемые с использованием мезофильных молочнокислых стрептококков (творог, сметана, простокваша обыкновенная). Основными представителями микрофлоры таких продуктов являются молочнокислые стрептококки: *Streptococcus lactis*, *Streptococcus acetoinicus*, *Streptococcus cremoris*, *Streptococcus diacetylactis*. Сквашивание молока происходит через 6-8 часов при 30 °С.

- ♦ Изготавливаемые с применением термофильных молочнокислых бактерий (ряженка, варенец, йогурт, простокваша Южная, Мечниковская). Для приготовления этих кисломолочных продуктов используют смесь молочнокислых бактерий (10:1) *Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus bulgaricus* (болгарская палочка). Заквашивание молока этими бактериями проводят при 40-42 °С в течение трех часов.

- ♦ Вырабатываемые с применением термофильных и мезофильных молоч-

нокислых бактерий (любительская сметана, сметана с пониженным содержанием жира, напитки «Любительский» «Юбилейный», «Русский»). Основными представителями микрофлоры таких продуктов являются мезофильные и термофильные молочнокислые стрептококки. Температура сквашивания молока при использовании смешанных заквасок - 33-38 °С.

♦ Приготавливаемые с использованием ацидофильных бактерий и бифидобактерий: ацидофильное молоко, ацидофилин, бифидопродукты – продукты лечебно-профилактического питания. В состав микрофлоры этих продуктов входят: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus* с добавлением кефирной закваски; *Bifidobacterium bifidum* и др.

#### Процессы, протекающие при ферментации молока

Технологический процесс изготовления кисломолочных продуктов сводится в общих чертах к тому, чтобы, во-первых, в исходном сыром молоке подавить или уничтожить постороннюю микрофлору, а во-вторых, после пастеризации и охлаждения молока предоставить «избранным» видам полезных микроорганизмов наиболее благоприятные условия для развития и, благодаря этому, получить готовый продукт с характерными для него свойствами.

Рассмотрим более подробно процессы ферментации (сквашивания) молока. В пищевой промышленности ферментацию применяют для получения большого ассортимента кисломолочных продуктов. Главным процессом является молочно-кислое брожение, вызываемое стрептококками и молочнокислыми бактериями, при котором лактоза (молочный сахар) превращается в молочную кислоту. Путем использования иных реакций, которые сопутствуют главному процессу или идут при последующей обработке, получают такие продукты переработки молока, как пахта, сметана, йогурт и сыр. Свойства конечного продукта зависят при этом от характера и интенсивности реакции ферментации. Те реакции, которые сопутствуют основному процессу образования молочной кислоты, обычно и определяют особые свойства продуктов. Так, именно вторичные реакции ферментации, идущие

щие при созревании сыров, определяют вкус отдельных их сортов. В некоторых таких реакциях принимают участие пептиды, аминокислоты и жирные кислоты, присутствующие в продуктах.

В молоке при ферментации могут протекать шесть основных реакций; в результате образуется молочная, пропионовая или лимонная кислота, спирт, масляная кислота или же происходит колиформное газообразование. Как сказано выше, главная из этих реакций – молочнокислое брожение. На нем основаны все способы сквашивания молока. Лактоза молока гидролизуется при этом с образованием галактозы и глюкозы. Обычно галактоза превращается в глюкозу еще до сквашивания. Имеющиеся в молоке бактерии преобразуют глюкозу в молочную кислоту. Образование сгустка казеина происходит в изоэлектрической точке этого белка ( $pH = 4,6$ ) под действием молочной кислоты. Этот процесс лежит в основе сыроварения.

При производстве швейцарского сыра ключевую роль играет маслянокислое брожение с образованием углекислого газа. Именно оно обуславливает своеобразный вкус (букет) этих сыров и образование глазков. Характерный вкус пахты, сметаны и сливочного сыра формируется в результате лимоннокислого брожения. Он складывается из составляющих вкусов диацетила, пропионовой и уксусной кислот и других, близких к ним, соединений.

Молочные продукты, полученные на основе спиртового брожения, мало известны в Европе и Америке. Такой тип брожения нашел применение при переработке молока в России, но при производстве других продуктов он считается нежелательным. Обычно рост вызывающих его дрожжей (*Torula*) стараются подавить. Нежелательны также маслянокислое брожение и колиформное газообразование.

Различные процессы ферментации молока проводят сегодня в контролируемых условиях. В течение тысячелетий они осуществлялись при участии бактерий, изначально присутствующих в молоке. В наше время для этого используют разнообразные закваски, позволяющие получать молочные продукты нужного качества и типа. Цеховые и заводские микробиологические лаборатории, а также

отраслевые научно-исследовательские институты постоянно следят за чистотой и качеством заквасок.

### Микроорганизмы, входящие в состав заквасок, используемых для получения кисломолочных продуктов

Применяющиеся в производстве кисломолочных продуктов культуры живых бактерий могут являться одним штаммом определенного вида (культуры моноштаммов), либо несколькими штаммами и/ или видами (смешанные культуры). Коммерческие культуры-закваски состоят из бактерий, образующих молочную кислоту и пахучие вещества (то есть условно делятся на 2 категории – кислотообразующую и ароматообразующую). В табл. 12.1. перечислены некоторые виды бактерий, используемых при производстве молочных продуктов методом ферментации, указана их роль в этих процессах, а также получаемые продукты. Выбор и состав используемых комбинаций из этих штаммов и видов бактерий определяются желаемыми свойствами и условиями получения продуктов, например, скоростью образования молочной кислоты.

Например, *Streptococcus lactis* - энергичный кислотообразователь, сбраживает глюкозу по гомоферментативному типу, то есть накапливает в результате брожения преимущественно молочную кислоту (предельная кислотность в молоке – 100-120 °Т). Оптимальная температура + 30 °С, не растет при 45 °С, некоторые штаммы растут при 41 °С. Растет при концентрации поваренной соли до 5,5 %.

*Streptococcus cremoris* также относится к гомоферментативной кислотообразующей микрофлоре закваски, однако имеет некоторые особенности. В результате жизнедеятельности клеток этого вида образуется более нежный сгусток, способный при обработке удерживать больше сыворотки, чем желательное, например, при получении сыра (может получиться сыр с более нежной консистенцией). Микроорганизмы данного вида сильно ингибируются при температуре 40 °С. Недостатком является большая чувствительность к поваренной соли и присутствию ингибирующих веществ в молоке.

Таблица 12.1 Функциональная роль некоторых бактерий, используемых при переработке молока

Культура	Функция	Область применения
Propionibacterium P. shermatii P. petersonii	Образование вкуса, образование глазков	Производство швейцарского сыра
Lactobacillus L. casei L. helveticus L. lactis L. bulgaricus	Образование кислоты	Созревание, закваска швейцарского сыра, производство сыров типа швейцарского Производство йогурта
Leuconostoc L. dextranicum L. citrovorum	Образование вкусовых веществ из лимонной кислоты (главным образом, диацетила)	Производство сметаны, сливочного масла, заквасок
Streptococcus S. thermophilus S. lactis S. cremoris	Образование кислоты	Производство йогурта и швейцарского сыра, закваски для сыров

*Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis* – представитель гетероферментативных молочнокислых микроорганизмов (предельная активная кислотность 4,7-5,0 ед. рН). Оптимальная температура + 20-26 °С, некоторые штаммы растут при 37 °С, пределы роста + 10-36 °С. Растет при концентрации поваренной соли 3,0 %. При сбраживании этими микроорганизмами молочного сахара образуется не только молочная кислота, но и значительное количество летучих жирных кислот, углекислого газа, ацетоина, диацетила, обеспечивающих формирование аромата и рисунка в сырах. аромата и рисунка в сырах.

*Streptococcus thermophilus* – гомоферментативный молочнокислый стрептококк умеренной кислотообразующей способности (предельная активная кислотность равна 4,0-4,5 ед.). Оптимальная температура + 40-45 °С, некоторые штаммы растут при 50 °С, но никогда не растут при 53 °С, нижний предел роста 20 °С. Может выдерживать нагревание при 65 °С в течение 30 минут.

*Lactobacillus helveticus* – сбраживает лактозу по гомоферментативному типу, очень сильный кислотообразователь (предельная кислотность в молоке – 300-350 °Т – более 2 % молочной кислоты). Оптимальная температура + 40-42 °С, не растет при 15 °С, max + 50-53 °С.

*Lactobacillus lactis* – гомоферментативный микроорганизм, более слабый кислотообразователь (до 300 °Т – около 1,6 % молочной кислоты). Оптимальная температура + 40-43 °С, не растет при 15 °С, max + 50-52 °С.

*Lactobacillus plantarum* - гомоферментативная молочнокислая палочка, обладает очень слабой кислотообразующей способностью (предельная кислотность в молоке – 140-150 °Т ). Некоторые штаммы не свертывают, а только подкисляют молоко. Оптимальная температура + 30-35 °С, не растет при 45 °С, пределы +15-40 °С.

*Lactobacillus fermentum* - гетероферментативная молочнокислая палочка. Практически не свертывает молоко. Оптимальная температура + 30-35 °С, не растет при 15 °С, растет при 45 °С.

Интенсивные исследования в области селекции микроорганизмов с использованием методов генной инженерии позволили разработать стандартизованные чистые культуры с четко определенными свойствами. Разрабатывают концентрированные культуры, использование которых не требует наличия заквасочного помещения и заквасочного оборудования на предприятии, специально обученного обслуживающего персонала. При производстве сметаны, творога или сыра такие концентраты вносят непосредственно в ванну или резервуар с молоком, сливками или нормализованной смесью.

### Йогурт

Это один из древнейших продуктов, получаемых путем ферментации. После термообработки молоко заквашивают добавлением 2-3 % закваски йогурта. Температура при брожении поддерживается около 40 °С. Главную роль здесь играют бактерии *Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus bulgaricus*. Для получения желаемой консистенции продукта, вкуса и запаха эти организмы должны содержаться в культуре приблизительно в равных количествах.

Кислоту в начале заквашивания образует в основном *Streptococcus thermophilus*. Смешанные закваски нужно часто обновлять, поскольку повторные пере-seвы неблагоприятно сказываются на соотношении видов и штаммов бактерий: в них начинает доминировать *Lactobacillus bulgaricus*.

Своим характерным вкусом йогурт обязан молочной кислоте, получаемой из лактозы молока, и ацетальдегиду. Оба этих вещества вырабатывают *Lactobacillus bulgaricus*.

### Сброженная пахта

Сброженный продукт получают из свежей пахты, а чаще из снятого молока путем добавления закваски, используемой при производстве масла. Эта закваска представляет собой смесь молочнокислых стрептококков (*Streptococcus lactis* или *Streptococcus cremoris*) и образующих ароматические вещества бактерий (*Leuconostoc citrovorum* и *Leuconostoc dextranicum*). И те, и другие микроорганизмы нужны для формирования полноценного вкуса и запаха пахты; стрептококки при этом доминируют. Роль молочнокислых стрептококков в закваске заключается в образовании молочной кислоты (она дает желаемый кисловатый вкус), свертывании молока и снижении pH до значений, при которых образующие ароматические вещества бактерии синтезируют наибольшее количество летучих кислот.

### Сметана

Ее готовят почти так же, как сброженную пахту. К пастеризованным сливкам добавляют 0,5-1 % закваски, используемой при производстве масла (молочнокислые бактерии). Далее продукт выдерживают, пока концентрация кислоты не достигнет 0,6 %.

### Бифидопродукты

Бифидопродукты представляют группу продуктов лечебно-профилактической направленности и относятся эубиотикам (биологически активным добавкам, обеспечивающим нормальный состав и функциональную активность микрофлоры кишечника). В большинстве бифидопродуктов ис-

пользуются бактерии вида *Bifidobacterium bifidum*.

Ассортимент бифидопродуктов:

- бифидокефир – вырабатывается на цельном или обезжиренном молоке с использованием кефирного грибка и закваски бифидобактерий или бактериального концентрата бифидобактерий;

- бифидойогурт или биоогурт – вырабатывается на цельном молоке с использованием заквасок на ацидофильной или болгарской палочках, термостойком стрептококке и обогащением закваской бифидобактерий или бактериальным концентратом бифидобактерий;

- бифидосметана или биосметана – вырабатывается на сливках с использованием заквасок на молочнокислых бактериях и обогащением закваской или бактериальным концентратом бифидобактерий;

- бифилин – вырабатывается из натурального коровьего молока путем сквашивания чистой культурой бифидобактерий, способных подавлять условно-патогенную микрофлору кишечника.

#### Диетические свойства кисломолочных продуктов

Кисломолочные продукты являются продуктами массового потребления, хотя обладают диетическими, а иногда и лечебными свойствами. Еще в конце 19 в. И.И. Мечников обратил внимание на важность нормальной деятельности микрофлоры, а в случае нарушения – на необходимость ее восстановления с помощью молочнокислых бактерий *Lactobacillus acidophilus*, предотвращающих развитие чужеродных микробов. Диетическими свойствами также обладают бактерии рода *Bifidobacterium*.

Некоторые продукты жизнедеятельности микроорганизмов обладают биологической активностью: например, витамины, антибиотики. Кисломолочные продукты, воздействуя на секреторную функцию желудка, возбуждают аппетит и способствуют быстрому выделению ферментов, которые ускоряют процесс переваривания пищи, нормализуют деятельность кишечника и благоприятно воздействуют на нервную систему. Диетические свойства кисломолочных продуктов, кроме того, объясняются их легкой усвояемостью за счет



частичного распада белков молока.

### Приготовление сыра

Сыр готовят из творога, полученного в результате свертывания казеина цельного или обезжиренного молока. Свертывание казеина происходит под влиянием микробных ферментов и молочной кислоты или с помощью сычужного фермента. В свертывании принимают участие молочнокислые бактерии *Streptococcus lactis*, *S. cremoris*, *S. diacetylactis*, *Leuconostoc citrovorum*. В результате свертывания белка кальций отделяется от казеина, последний выпадает в виде хлопьев водонерастворимой казеиновой кислоты. Для изготовления различных видов сыра используют овечье, козье, коровье или кобылье молоко. В зависимости от технологии сыроварения сыворотку полностью или частично отделяют от творога на фильтр-прессе. Творог засевают культурами микроорганизмов в соответствии с сортом получаемого сыра. При его созревании под влиянием выделяемых микроорганизмами ферментов химический состав и физические свойства творога существенно меняются. Большое разнообразие сортов сыра объясняется природой и свойствами микробных культур, служащих исходными культурами при свертывании молока, температурой изготовления и наличием или отсутствием вторичной микрофлоры, растущей на сыре. Некоторые виды сыров специально заражают спорами плесневого гриба *Penicillium roquefortii*. Рост плесени в мякоти сыра придает ему характерный вкус и аромат (Датский голубой, Горгонзола, Рокфор и др.) Острый привкус сыра Рокфор также обусловлен действием микробной липазы – фермента, расщепляющего жиры молока с образованием жирных кислот (капроновой, каприновой, каприловой и др.). Другой сорт сыра с плесенью – Камамбер – получают с помощью гриба *Penicillium camambertii*, готовят по той же технологии.

Созревание сыра длится от нескольких недель до нескольких месяцев (для сыра Чеддер – 8 мес.). В первые недели созревания число микроорганизмов в массе сыра увеличивается и достигает нескольких сотен миллионов на 1 г сыра, потом число живых бактерий и дрожжей снижается. Сыр должен со-

зреть при пониженной температуре (для сыра Рокфор – не выше 9 °С).

### Коровье масло

Из молочных продуктов проще всего получать коровье масло. В зависимости от сорта производимого масла используют сливки с концентрацией жира от 30-32 до 40 %. При их сбивании эмульсия масла в воде превращается в эмульсию воды в масле.

При производстве масла для улучшения вкуса и лучшей сохранности используют особые культуры бактерий. Улучшение вкуса было достигнуто путем создания специальных штаммов бактерий, отобранных по способности синтезировать нужные вещества, влияющие на вкус. Первыми для этой цели были использованы штаммы *Streptococcus lactis* и близких видов, а затем – смешанные культуры, включающие *Streptococcus lactis*, *Leuconostoc citrovorum* и *L. dextransicum*.

Помимо улучшения вкуса таким путем удается устранить и некоторые нежелательные привкусы. Перспективный способ доработки масла основан на добавлении липаз (ферментов, расщепляющих липиды). Внедрение его позволит пускать масло в продажу непосредственно из маслобойки.

### Новые продукты

Известно, что некоторые люди не переносят лактозу; для них можно выпускать молоко, обработанное  $\beta$ -галактозидазой – ферментом, который уменьшает содержание лактозы. Для этой цели нужно разработать недорогой промышленный способ производства такого молока.  $\beta$ -галактозидазу получают из дрожжей, плесневых грибов и бактерий.

## **12.2 Биотехнологические процессы в производстве мясных и рыбных продуктов**

### Использование микроорганизмов при производстве мясопродуктов

Технология производства многих современных мясопродуктов обязательно включает в себя молочнокислое брожение. В сырокопченых колбасах и

в рассолах для окороков, грудинки, корейки молочнокислые бактерии подавляют рост гнилостных микроорганизмов и участвуют в формировании вкуса и аромата готового продукта. В мясопродукты, требующие бактериальной ферментации, обычно добавляют закваску, содержащую специально отобранные штаммы стрептококков, лактобацилл и педиококков. В этом случае на упаковке должно быть указано, что в состав продукта входят бактериальные культуры.

### Применение ферментных препаратов

С целью размягчения мяса, облегчения его обработки широко применяются ферментные препараты протеолитического действия. Использование ферментных препаратов в промышленных масштабах связано с технологическими задачами равномерного распределения ферментов при внесении их в мясо. Применяются следующие способы обработки мяса протеолитическими ферментами:

- ♦ прижизненное введение препарата путем инъекций;
- ♦ внутримышечное шприцевание мясной туши;
- ♦ обработка поверхности мяса путем разбрызгивания раствора фермента или нанесения порошкообразных препаратов на поверхность мяса;
- ♦ погружение мяса в раствор ферментов после механического рыхления;
- ♦ восстановление дегидратированного сублимацией мяса в растворе ферментов.

Каждый из этих способов имеет свои преимущества и недостатки.

1 Введение раствора ферментного препарата через кровеносную систему путем инъекций в организм животного при жизни. Прижизненное введение препарата обеспечивает его равномерное распределение и хороший размягчающий эффект, сокращает время созревания, увеличивает количество мяса, пригодного для жарения. Вместе с тем, следует отметить, что при введении достаточно высоких доз препарата возникает анафилактический шок и нарушение нормальных функций организма.

2      Обработка поверхности мяса путем разбрызгивания раствора фермента или нанесения порошкообразных препаратов на поверхность мяса. Способ имеет ограниченное применение ввиду неравномерного преобразования белковых структур: мясо на поверхности размягчается слишком сильно, а внутри – недостаточно.

3      Внутримышечное шприцевание мясной туши. Наибольший эффект получен при введении препаратов ферментов в мышечную ткань многократными уколами. При этом эффективность способа значительно повышается при введении ферментов под давлением вместе со стерильным вакуумом или азотом. Газы, разрыхляя структуру мышечной ткани, способствуют лучшему распределению фермента между клетками. Используется еще один способ – безыгольный - введение препаратов в мясо под сверхвысоким давлением ( $200 \cdot 10^5$  Па).

4      Погружение мяса в раствор ферментов после механического рыхления. Простое погружение мяса в ферментный раствор малоэффективно, поскольку в данном случае наибольшим изменениям подвергается лишь поверхность мяса (наступает полный лизис структур мышечной ткани), в то время как в глубоких слоях изменения минимальны. Сочетание предварительного механического рыхления с последующим погружением мяса в раствор ферментов, а также «массирование» мяса в ферментном растворе дают хорошее качество мяса и малые потери влаги при его обработке.

5      Хорошие результаты дает восстановление дегидратированного (обезвоженного) сублимацией мяса в водном растворе размягчающего препарата. При этом создаются условия для контакта фермента не только с поверхностью мяса, но и с внутренними структурами путем проникновения раствора в хорошо развитую систему пор и капилляров. В процессе регидратации мяса обеспечивается равномерный по всему объему контакт фермента с основными белковыми структурами. В результате этого достигается максимальное размягчение мяса при минимальном расходе фермента. Положительное действие на мягчение мяса оказывает поваренная соль.

Используемые протеолитические ферментные препараты должны отвечать определенным требованиям:

- ✓ иметь высокий температурный оптимум действия;
- ✓ осуществлять эффективный гидролиз в кислотно-нейтральной области рН;
- ✓ обладать специфичностью к гидролизу миозина и особенно белков внутримышечной соединительной ткани – коллагена и эластина (то есть иметь сходность действия с катепсинами, коллагеназой и эластазой);
- ✓ быть безвредными для организма человека.

Для обработки мышечной ткани применяют ферментные препараты животного, растительного и микробного происхождения. Из ферментов животного происхождения высокой коллагеназной и эластазной активностью обладает фермент панкреатин, получаемый из поджелудочной железы свиньи. Иногда его применяют в смеси с ферментами трипсином, химотрипсином, пепсином. Однако ферменты животного происхождения имеют весьма ограниченные сырьевые источники.

Среди группы ферментов растительного происхождения для обработки мышечной ткани используют папаин, фицин, бромелаин и другие. Например, папаин применяют как размягчитель жесткого мяса. Он используется при созревании мяса, изготовлении полуфабрикатов, получении гидролизатов. Следует отметить, что эти протеазы также не могут полностью удовлетворить запросы промышленности ввиду дефицита сырья для их получения, малого выхода при переработке растений, а, следовательно, высокой стоимости.

Протеиназы микробного происхождения имеют ряд преимуществ по сравнению с другими источниками: неограниченность сырьевой базы, относительно простая технология получения, невысокая стоимость и др. Кроме того, микробные протеиназы, как правило, способны к более глубокой деструкции белков, в том числе многих фибриллярных, а также обладают широким спектром действия на различные субстраты. Продуценты ферментов протеолитического действия рассматривались в п. 11.5.

Искусственно внесенные в сырье препараты протеаз обеспечивают эффект преобразования белковых структур, аналогичный автолитическому. Однако процессы созревания мяса под их влиянием протекают в 3-5 раз интенсивнее и заканчиваются в более короткий срок. При этом интенсивность и глубина превращений белковых структур зависит от дозировки препаратов, физико-химических условий, продолжительности обработки. Ферментная обработка сырья придает мясу нежную консистенцию, нужные вкус и аромат.

#### Источники белка различного происхождения

В связи с дефицитом белка животного происхождения, а также с целью снижения себестоимости колбасных изделий, используются другие источники белка, частично заменяющие животный белок. Это растительные белки, молочные белки, белки микробного происхождения и белки крови.

Почти во всех странах, где достаточно развита мясная индустрия, широко используется источник белка на основе растений. Функциональные свойства и пищевая ценность в сочетании с экономической эффективностью выдвигают растительные белки на одно из первых мест в ряду заменителей мяса и белковых ингредиентов при производстве мясных продуктов. При этом к растительным белковым добавкам предъявляются следующие требования: сохранение пищевой ценности продуктов; повышение стойкости при хранении или улучшение органолептических свойств; обеспечение необходимыми ингредиентами продуктов, изготавливаемых для потребителей со специфическими запросами; применение при условии, что добавка не маскирует недоброкачественность сырья или низкий санитарно-технический уровень производства.

Растительные белковые препараты в настоящее время используют не только в качестве добавок, способствующих повышению выхода традиционных мясных продуктов, но и качестве основного компонента комбинированных мясных изделий. Особое место отводится соевым белковым препаратам. Основными исходными продуктами являются: обезжиренная соевая мука, содержащая 50 % белка; соевые концентраты с содержанием белка 70 %; соевые

изоляты с 90 %-ным содержанием белка. Помимо сои белковые препараты изготавливают из гороха, подсолнечника, кукурузы, хлопчатника и других культур. Подобно сое, на их основе получают муку, концентраты, изоляты с высоким содержанием белка.

Для производства низкокалорийных мясопродуктов применяют овощные добавки, которые не получили широкого распространения в нашей стране. При замене овощными компонентами равного количества говяжьего фарша калорийность продукта снижается в 5-6 раз. Введение овощных добавок и их смесей позволяет сэкономить основное сырье и улучшить качество (усвояемость) продукта. Успешно используются в рецептурах фаршевых продуктов и консервов овощные добавки из свеклы, моркови, картофеля, тыквы и др.

При производстве колбасных изделий широко используются молочные белки, которые имеют высокую биологическую ценность и функциональные свойства. В частности, широко применяются: пищевой казеин, казеинаты, копреципитаты в растворимой и нерастворимой формах, сывороточные и молочно-белковые концентраты. Эти продукты получают при переработке молока и выделении белков каким-либо способом. По аминокислотному составу эти продукты значительно превышают многие другие белковые препараты. В отличие от растительных, молочные белки легко расщепляются под действием ферментов ЖКТ и образуют при этом аминокислоты и пептиды, быстро всасывающиеся в кровь. В отличие от мясных, молочные белки не содержат пуриновых оснований, избыток которых в организме может ухудшать обмен веществ. Разработанная в последние годы технологии получения гидролизатов белков обезжиренного молока и сыворотки с использованием протеаз микробного и животного происхождения позволяет получать широкую гамму продуктов-полуфабрикатов, имеющих высокую пищевую ценность, сбалансированный аминокислотный состав.

Большое внимание уделяется перспективам использования продуктов микробного синтеза, особенно белкам биомассы дрожжей и одноклеточных организмов, выращенных на нефтяных субстратах. Белки пивных дрожжей

повышают биологическую ценность мясопродуктов, так как увеличивают общее содержание белков, минеральных веществ, витаминов группы В. Благодаря частичному автолизу клеток, они придают продуктам приятный специфический вкус и запах за счет содержащихся в них свободных аминокислот и других веществ. Их использование целесообразно не только с целью экономии основного сырья, но и для «маскировки» вкуса и запаха немясных компонентов в продукте, например, сои, других растительных и овощных белковых добавок.

#### Использование вторичных продуктов переработки животного сырья

При переработке сельскохозяйственных животных образуется перечень вторичных продуктов, богатых ценным белком: кровь и ее производные, кость, хрящ, сухожилия, шкуры, мездра, рога, копыта и т.д. Из перечисленных отходов на пищевые цели находит применение кровь (как источник белка). Остальные продукты применяются недостаточно для пищевых и кормовых целей, хотя имеют высокую биологическую ценность. Несмотря на высокое содержание незаменимых аминокислот, в исходном виде это сырье представляет лишь потенциальный источник белка ввиду слабой доступности к гидролизу со стороны пищеварительных ферментов (низкая перевариваемость и усвоение), а также невыраженных функциональных свойств (плохая растворимость и эмульгирующая способность, жесткость и т.д.). Наиболее эффективным средством решения данной проблемы является биотехнология, а именно использование ферментов. Особенно здесь полезны ферменты микроорганизмов, способные расщеплять труднодоступные белки животных, главным образом кератин, коллаген, эластин. Ферментация сырья позволяет улучшить пищевые свойства, функциональность и биологическую ценность продуктов.

#### Вопросы для самопроверки

1 Что такое закваска, и как готовят лабораторную и производственную закваски для кисломолочных продуктов?

2 Какие бывают формы заквасок и условия их хранения?



- 3 Расскажите о пороках заквасок.
- 4 Как классифицируют кисломолочные продукты в зависимости от состава микрофлоры заквасок?
- 5 Перечислите реакции, протекающие в молоке при сквашивании.
- 6 Какие микроорганизмы входят в состав заквасок для получения кисломолочных продуктов?
- 7 Состав заквасок для получения таких продуктов, как йогурт, сметана, пахта.
- 8 Ассортимент бифидопродуктов.
- 9 Расскажите о применении ферментов и живых микроорганизмов в сыроделии.
- 10 Получение коровьего масла.
- 11 Назовите способы обработки мяса ферментными препаратами.
- 12 В чем преимущества и недостатки каждого способа?
- 13 Перечислите требования, которые предъявляют к ферментным препаратам, применяемым при переработке мяса.
- 14 Белки из каких источников вводят в состав мясных продуктов?
- 15 Расскажите о возможностях использования вторичных продуктов переработки животного сырья.

## **13 БИОТЕХНОЛОГИЯ ПРОИЗВОДСТВА ПРОДУКТОВ ПИТАНИЯ И НАПИТКОВ**

Биотехнология - область знания, позволяющая получать путем управляемого культивирования организмов и (или) их фрагментов (тканей, клеток) полезные для человека продукты - пищу, корма, медицинские препараты, разнообразное сырье, доступные растениям формы азота, средства защиты растений и животных

### **13.1 Функциональные пищевые продукты**

Со временем становится все более очевидным, что существует самая тесная связь между продуктами питания и здоровьем человека. Неоднократно было доказано, что пищевые продукты или их отдельные компоненты могут быть единственной причиной многих патологий. Новые технологические подходы к производству пищевых продуктов дают возможность связать научные новшества массового производства пищевых продуктов с возможностью получения полноценной и здоровой пищи. Тесная взаимосвязь между здоровьем и пищевыми продуктами дала начало новому течению в производстве пищевых продуктов - "функциональной пище". Идея употребления здоровой пищи не нова. В 1950-х гг. была предложена идея пересмотра состава пищевых продуктов. Помимо этого, революционный лозунг 1960-х гг. "Назад к природе!" - вызвал значительные изменения в составе ингредиентов пищевых продуктов. Значительно уменьшилось содержание жиров, холестерина, сахара и соли. Снизился калорийный уровень пищевых продуктов. Подобным принципом руководствовались организации, производящие пищевые продукты до 1980-х гг. Сегодня подход к пищевым продуктам опять претерпел изменения. По современным представлениям, пища должна быть не только здоровой, но и функциональной, что подразумевает ее целенаправленное влияние на организм.

По мировым масштабам Япония является лидером по производству функциональных пищевых продуктов. В этой стране производство пищевых продуктов

строго контролируется, хотя выпуском их заняты больше сотни специализированных компаний. Интересно, что более 70% производимой продукции — напитки, а остальное — продукты разного вида. Использование функциональной пищи служит двум целям: в нужном количестве дать организму метаболически необходимые пищевые компоненты и защитить его от возможных заболеваний. Поскольку в производстве новых пищевых продуктов используются только нетоксичные и непатогенные натуральные компоненты, становится необходимым изыскание соответствующих источников для их массового производства. Роль биотехнологии заключается в получении экологически чистой функциональной пищи или корма в массовом количестве. С помощью биотехнологии (ферментативный катализ, культивирование микроорганизмов, культивирование растительных и животных клеток) возможно быстрое решение проблемы как массового производства пищевых продуктов, так и получения различных функционально важных ингредиентов.

Первыми продуктами, приготовленными с помощью микробных ферментов, были, по всей вероятности, пиво и сыр. Ферменты микроорганизмов или технологии, основанные на использовании самых микроорганизмов, представляют важнейший сектор современной пищевой промышленности. Сегодня производство пищевых продуктов является самой распространенной сферой промышленности и по обороту составляет 20-25% бюджета практически любой страны. Производство высококачественной продукции определяется многими факторами, среди которых важнейшими являются качество семян, порода животных, качественные показатели селективно подобранных многолетних растений и др. Стабильный коммерческий оборот пищевых продуктов в первую очередь связан с качеством сельскохозяйственной продукции. Связь между сельским хозяйством и потребителем продукции осуществляется через пищевую промышленность. Задача последней — произвести из сельскохозяйственного сырья продукты с высокой пищевой ценностью, привлекательные внешне, с хорошим вкусом и ароматом.

По оценке специалистов, исследования (в том числе и патенты), связанные с получением новых пищевых продуктов, не превышают 2% от себестоимости про-

дукции. Как правило, продукция производится в большом объеме и, исходя из интересов потребителя, имеет низкую цену. Современные методы биотехнологии дают возможность массового производства отдельных пищевых компонентов, например таких, как пищевые органические и аминокислоты, которые широко применяются при производстве продуктов и напитков. Эти продукты имеют среднюю цену. Дорогостоящие пищевые компоненты, производимые в меньшем количестве, это: белки высокой чистоты и белки исключительного аминокислотного профиля, биологически активные пищевые добавки, заменители сахара, ароматизаторы и др.

Предполагается, что в ближайшем будущем пищевая промышленность найдет свое развитие в увеличении урожайности растений, повышении продуктивности микроорганизмов и животных. Этого можно достичь с помощью всех способов (классическая селекция, мутагенез, клеточная и генная инженерия) и без унификации увеличится производственный потенциал отрасли, улучшится качество продуктов питания, будет обеспечена их высокая экологическая чистота. Значительные изменения ожидаются в результате внедрения генной инженерии в технологию производства пищевых продуктов. Использование трансгенных высокоурожайных, стойких к заболеваниям и быстрорастущих растений, микроорганизмов и животных может дать начало новым направлениям отрасли. Современная биотехнология тесно связана со всеми отраслями пищевой промышленности, начиная с качественного улучшения организмов, участвующих в технологических процессах, и кончая качеством пищевых продуктов. Ожидается активное вмешательство биотехнологии в процессы, которые связаны с брожением. Пищевые продукты (хлеб, сыр, кефир, йогурт), напитки (вино, пиво, коньяк, бренди, виски, sake, водка), овощные соленья (полученные ферментативным путем) в результате многочисленных биохимических реакций превращаются в легкоусвояемые пищевые компоненты с улучшенными вкусовыми качествами и высокой стойкостью к микробным загрязнителям. Если к этому добавить и современные возможности, связанные с такими процессами, как культивирование микроорганизмов в гигантских реакторах (500-1000 м<sup>3</sup>), мембранная фильтрация, производственная сепара-

ция, селективная лучевая обработка продуктов и современная, основанная на ферментных превращениях, биохимическая инженерия, станет ясно, что продиктованная временем модернизация отрасли уже начата и все больше ускоряет темпы.

Превращения, происходящие в процессе производства пищевых продуктов, представляют собой естественные биологические процессы и протекают с помощью ферментов. С другой стороны, для ускорения или усовершенствования технологических процессов в реакционную среду искусственно вводят ферменты.

### **13.2 Ферментация овощей**

В одном из древнейших методов консервирования овощей, основанном на действии ферментов, используется рассол, в котором присутствуют молочнокислые бактерии. Роль консервантов здесь выполняют поваренная соль и молочная кислота. Во многих странах этот метод применяют в производственных масштабах. В частности, капуста, огурцы, другие овощи и маслины консервируются в рассоле с помощью брожения. Иногда овощи требуют предварительной обработки. Например, до помещения маслин в 18%-й рассол их обрабатывают гидроксидом натрия для удаления терпкого вкуса, вызванного присутствием глюкозида - олеорупеина.

В рассоле овощи подвергаются последовательному воздействию разных микроорганизмов. На начальном этапе благодаря наличию кислорода в ферментационной среде развивается аэробная микрофлора. Несмотря на это, довольно быстро развиваются молочнокислые бактерии и дрожжи, в результате образуются молочная и уксусная кислоты. На последней стадии брожения создаются более благоприятные условия для преимущественного развития дрожжей. Брожение заканчивается при исчерпании сбраживаемых углеводов. Для регулирования процесса брожения вместо спонтанно размножающейся микрофлоры стали использовать чистые культуры — бактерии молочнокислого брожения. Точное соблюде-

ние температуры (7,5 °С) и концентрации соли (2,25%) дает возможность получить соленые (отброженные) овощи высокого качества.

В результате брожения овощи обогащаются метаболитами, которые придают им соответствующий вкус и аромат. В то же время при брожении пища обогащается белковыми соединениями. География пищевых продуктов, полученных молочнокислым брожением, имеет явную ориентацию на Восток, например, соленая рыба - чисто восточная еда.

### **13.3 Биотехнологии в производстве чая, кофе**

В странах Восточной Азии, Африки и Латинской Америки безалкогольные ферментированные напитки готовят из чайных и кофейных растений. В восточных странах с незапамятных времен чай использовали в качестве бодрящего напитка, однако технология производства чая была разработана лишь в XX в. Разнообразие чайного продукта зависит от вида растений и технологии переработки листа. Известны три технологии приготовления чая - черного, зеленого и находящегося между ними по степени окисленности дубильных веществ желтый чай. Готовый чай по степени ферментации делится на следующие категории:

- неферментированный чай, в котором степень окисления дубильных веществ (катехинов) не превышает 12%;
- слабоферментированный чай, степень окисления дубильных веществ - до 12-30%;
- ферментированный чай, степень окисления дубильных веществ - в пределах 35-40%.

Каждая категория готовой продукции по степени окисления, в свою очередь, делится на более мелкие группы. Неферментированный - это зеленый чай. Для инактивации окислительных ферментов сырье фиксируют водяным паром и горячим влажным воздухом. В результате на следующих стадиях переработки в чайном листе не происходят процессы ферментативного окисления.

Чай второй категории - слабоферментированный, подвергается частичной ферментации; к нему относятся: желтый, оолонг (красный) и черный чай.

Если во время производства зеленого чая основной задачей является сохранение катехинов в нативном состоянии, то во время производства ферментированного черного чая стараются максимально окислить комплекс катехинов в чайном листе. Черный чай, приготовленный по указанной технологии, характеризуется интенсивным настоем и специфическим ароматом.

Для получения черного чая свежесобранные листья подвергают следующим технологическим операциям: завяливанию, скручиванию, ферментации и сушке. Завяливание является важным технологическим этапом, при котором происходят основные биохимические изменения в чайном листе, определяющие вкус и образование ароматических соединений во время процесса скручивания и ферментации. Во время скручивания чайного листа повреждается структура и нарушается целостность клетки, в результате обеспечивается контакт окислительных ферментов и их субстратов. В чайном листе ферментация осуществляется за счет эндогенных ферментов. Этим производство чая отличается от многих других процессов пищевой промышленности, где ферменты добавляют искусственно. В технологическом цикле производства чая ферментация является центральным процессом, от которого в значительной степени зависит качество готовой продукции.

Что касается технологии получения растворимого **кофе**, то здесь мало что изучено. Технологическая схема производства кофе такова: с помощью воды осуществляется экстракция плода, после чего переработанный остаток отделяется от раствора и происходит его природная ферментация, в которой принимают участие бактерии и дрожжи. Этот процесс имеет большое значение в формировании вкуса и аромата готового продукта. В целом процесс производства кофе носит эмпирический характер и основан на слабой научной базе. Несмотря на это, качество кофе всегда соответствует коммерческим требованиям. Производство и потребление кофе во всем мире достигло невиданных масштабов. В настоящее время в странах Латинской Америки и США интенсивно разрабатываются научные основы технологии производства кофе.

## 13.4 Производство сыра

Молоко было, одним из первых продуктов, претерпевших микробиологическую переработку естественным образом. Это происходит за счет того, что в молоке легко размножаются бактерии и оно скисает. В этом процессе один из основных этапов - превращение молочного сахара - лактозы в молочную кислоту. На протяжении тысячелетий усовершенствовался процесс спонтанного скисания молока, результатом чего явилась разработка технологии получения сыра и других продуктов молочнокислого брожения.

Для производства сыра в молоко вносят культуру бактерий, род и вид которых зависит от типа производимого сыра.

Размножение молочнокислых бактерий при скисании молока - это важный технологический процесс, так как они подавляют размножение других бактерий и тем самым обуславливают требуемые вкусовые качества и аромат сыра. Молочнокислые бактерии положительно влияют на желудочно-кишечную микрофлору. После внесения бактерий молоко инкубируют при определенной температуре и в результате оно скисает. Для углубления этого процесса — гидролиза белка, искусственно вносят протеолитический фермент, называемый сычужным ферментом или ренином. Ренин образуется в сычуге - в четвертом отделении желудка ягненка или теленка, вскормленных молоком. С возрастом организм животных вместо сычужного фермента вырабатывает другие протеолитические ферменты, с другой субстратной специфичностью, не вызывающие образования сыра.

Производство сычужного фермента в мировом масштабе составляет 25 млн. л. Несмотря на это, сычужный фермент является дефицитным и лимитирующим компонентом в технологии производства сыра.

В результате многочисленных поисков получен протеолитический фермент микробного происхождения с аналогичной сычужному ферменту субстратной специфичностью. Этот фермент частично восполнил дефицит сычужного фермента. Другая значительная биотехнологическая новизна заключается в клонирова-



нии гена ренина в одну из культур мицелиальных грибов. Это позволило получить абсолютный аналог сычужного фермента.

Для промышленных целей сычужный фермент получают из животных организмов (ягнят, телят, поросят) и из культур грибов.

По данным на 1998 г., аналог ренина, выделенный из грибов, удовлетворяет потребность в этом ферменте на одну треть. Микробный фермент широко используется в США и Франции - странах с большими традициями производства сыра.

Сразу же после внесения в молоко фермента, выделенного из животных или микроорганизмов, происходит ограниченный протеолиз казеина. Коагулированный казеин образует гелеподобную массу и соединяется с жиром, после чего сыроворотку фильтруют, отжимают остаточную воду и высушивают завертыванием в ткань. Следующим этапом технологии является созревание сыра. Производство сыра из молока — дегидратационный процесс, при котором происходит концентрирование казеина и жира в 6-12 раз. В процессе созревания некоторых сыров практикуется искусственное размножение микроорганизмов (бактерии и грибы) для придания сыру специфического вкуса и аромата.

Приблизительно 100 лет тому назад производство сыра достигло такого уровня и коммерческих масштабов, что производители перестали доверять процессу спонтанного размножения молочнокислых бактерий и начали применять чистые бактериальные культуры. Многообразие бактерий вызвало значительное расширение ассортимента сыров.

Вкус, аромат и качество разных сортов сыра определяют следующие факторы: разновидность молока (козье, коровье, овечье), температура приготовления сыра, наличие вторичной микрофлоры.

Если первичная микрофлора - молочнокислые бактерии осуществляют формирование сыра как продукта, то вторичная микрофлора (бактерии, грибы) придают аромат и свойства, определяющие специфический вкус сыра.

Из молока можно получить и другие продукты брожения. Из них можно выделить кислые продукты: йогурт - аналог грузинского мацони. Традиционно

йогурт получают ферментацией в молоке **болгарской палочки и термофильного стрептокока**.

Сметану, кумыс, кефир, видя (распространенный напиток в Финляндии) и другие продукты получают из пастеризованного молока, обработанного молочнокислыми бактериями.

#### Вопросы для самопроверки

- 1 Дайте понятие функциональные пищевые продукты?
- 2 При производстве каких продуктов питания применяются методы биотехнологии?

## **14 ТЕХНОЛОГИЯ ПРОИЗВОДСТВА АЛКОГОЛЬНЫХ НАПИТКОВ, САХАРОЗАМЕНИТЕЛЕЙ**

- 1 Технология производства алкогольных напитков.
- 2 Технология производства сахарозаменителей.

### **14.1 Технология производства алкогольных напитков**

Биотехнологические подходы приобретают все большее значение в производстве напитков. Алкогольные напитки могут быть классифицированы по разным признакам; очевидно, наиболее целесообразной является их классификация по технологическим параметрам на ферментированные и неферментированные; по содержанию алкоголя - концентрированные, дистиллированные и неконцентрированные. Процесс ферментации (брожения) подразумевает не только образование спирта. В этом процессе в пределах метаболических возможностей дрожжей происходит последовательное преобразование подавляющего числа соединений бродящей среды. С помощью методов современной биотехнологии удастся

расширить метаболические возможности организмов, участвующих в брожении, отсюда очевидна роль биотехнологии в производстве алкогольных напитков.

Большинство алкогольных напитков получено переработкой злаков или другого крахмалсодержащего сырья. В Скандинавских странах, России, Голландии, Германии, Польше и др. традиционно популярно производство пива и крепких напитков из злаков. В южных странах - Испании, Италии, Франции, Греции, Югославии, Грузии - более традиционным считается получение напитков на основе переработки винограда. Все более популярным становится получение напитков разной крепости из фруктов (яблоко, слива, шелковица, персик, плоды тропических и субтропических растений) и меда.

Необыкновенное разнообразие алкогольных напитков вызвано несколькими причинами. Из них наиболее значительной является различие в климатических условиях регионов, в которых производят напитки.

Производство и коммерция алкогольных напитков представляет собой стабильный бизнес еще со средних веков. Исходя из этого, любое новшество в таких консервативных областях, как производство вина, бренди (коньяк), виски, водки и др., сталкивается с большими сложностями. Следует отметить, что в серьезную международную проблему превратилось производство фальсифицированных алкогольных напитков. К сожалению, пока не удалось создать единую международную контролируемую систему, которая строго запретила бы использование некачественных спиртов, содержащих, помимо этилового, и некоторые другие высшие спирты.

Для получения алкогольных напитков применяются растительные субстраты моно-, ди- и олигосахариды и полисахариды (крахмал, целлюлоза, в редких случаях гемицеллюлоза).

Полисахариды нуждаются в предварительном гидролизе. Последний осуществляется соответствующими ферментами (амилазами, целлюлазами, гемицеллюлазами) или, реже, концентрированными неорганическими кислотами (для технических целей).

Целлюлозе- и гемицеллюлозосодержащее древесное сырье считается непригодным для получения пищевого этилового спирта. Этиловый спирт, полученный таким путем, даже несмотря на высокий уровень дистилляции, пригоден лишь для технических целей.

После соответствующей обработки субстратов (гидролиз полисахаридов), в водный раствор сахара вносят дрожжевую культуру. Для проведения процесса брожения, как правило, используют культуры сахаромисетов.

Сахаромисеты интенсивно усваивают различные моносахариды: глюкозу, фруктозу, галактозу; дисахариды: сахарозу, мальтозу, сбраживая их в этиловый спирт.

Установлено, что сахаромисеты, по сравнению с другим дрожжами, проявляют высокую толерантность к этиловому спирту. По окончании процесса брожения этиловый спирт накапливается в количестве 14-16%. Интересно, что в бродящей среде такая концентрация спирта подавляет размножение дрожжей; к этому моменту отличительным качеством среды является повышение кислотности за счет вновь образовавшихся органических кислот. Именно такое сочетание определяет биологические качества сброженного водного раствора спирта, что отличает его от раствора чистого спирта той же концентрации.

Следующим процессом технологического цикла является дистилляция. Этот процесс с соответствующим аппаратным оформлением хорошо изучен и подробно описан. Дистилляция представляет собой концентрирование этилового спирта и выделение чистой фракции, что значительно образом определяет качество алкогольных напитков.

Иногда с целью улучшения органолептических качеств готовых напитков прибегают к настаиванию концентрированного этилового спирта на разных ароматических веществах.

Как правило, концентрация спирта в крепких напитках колеблется в пределах 20-50%. При производстве тонирующих напитков и ликеров используют ароматические соединения, выделенные из цветов, листьев и плодов растений, а также полученные синтетическим путем **Вино**. Может показаться необычным, но

технология производства вина, по сравнению с технологией производства пива является более простой. Этот процесс почти не изменился на протяжении 5 000 лет. Предполагают, что вино - напиток ближневосточный и европейский, в этих районах распространены разные сорта винограда. До сегодняшнего дня география виноделия охватывает все в этой области традиционно известные страны: Францию, Италию Испанию, Германию, Грецию, Венгрию, Молдову, Россию, Украину и Закавказье, где по распространенности эндемных сортов винограда и технологий производства вина ведущее положение занимает Грузия. Значительно возросло число стран, производящих вино, к ним добавились Австралия, Китай, США, Чили, Аргентина, Израиль, Южно-Африканская Республика. В этих странах климатические условия и почва позволяют выращивать высококачественные сорта винограда. На протяжении столетий собирают урожай из белых и красных, селективно подобранных сортов винограда и выжимают сок, содержащий 15-25% сахара. Красное вино получают прессованием черного винограда и ферментацией всей виноградной массы. Розовое - добавлением кожицы красного винограда в сок белого.

Еще не так давно брожение виноградного сока происходило спонтанно, за счет естественной микрофлоры.

Сегодня подход к процессу спиртового брожения существенно изменился. Для стабильного производства высококачественного вина необходимо осуществлять брожение чистыми культурами дрожжей, заранее выделенными, желателно адаптированными к местным условиям. Для этого к виноградному соку добавляют одну из чистых культур бактерий. Брожение проводится в определенных условиях: в специальных сосудах большой емкости, при температуре 7°-14 °С. О завершении брожения судят по разным параметрам. Среди них важнейшими являются: остаточный сахар, количество этилового спирта, глицерина, летучих кислот. После окончания брожения процентное содержание этилового спирта в разных типах вин составляет 10—14%. Кроме этого, во время брожения часто происходит спонтанное, бактериальное брожение, при котором первичная яблочная кислота превращается в молочную. По окончании брожения молодое вино для старения переливают в резервуары больших размеров, часто дубовые. При хранении вина темпера-

тура снижается и образуется осадок. Как правило, этот процесс сопровождается химическими изменениями бродящей массы.

Как уже было отмечено, технология производства вина является одной из самых консервативных отраслей пищевой промышленности. Несмотря на это, в некоторых странах с целью масштабного производства вина применяют метод непрерывного культивирования. Согласно этой технологии, в чаны (сосуды для брожения) непрерывно добавляют виноградный сок, откуда в равном объеме вытекает молодое вино. Несмотря на определенные преимущества, этот метод не нашел широкого применения.

Большое количество литературы посвящено полезным свойствам вина. Как было установлено, в вине содержится до 700 метаболитов, имеющих разную химическую природу, в частности антиоксиданты и пептиды, пищевые органические кислоты, алкалоиды, стероидные гормоны, широкий спектр фенольных соединений, углеводы и др., например, исследования последних десяти лет подтвердили тот факт, что воздействие фенольных соединений на живой организм имеет многостороннее значение. Их роль в обмене веществ подтверждает особую значимость этих соединений. Фенольные соединения вина активно используются для лечения таких заболеваний, как цинга, авитаминоз, плеврит, перитонит, эндокардит, лучевая болезнь, глаукома, гипертония, ревматизм, атеросклероз и др. Таким образом, виноградное вино можно рассматривать как низко алкогольный напиток, обладающий уникальными лечебными свойствами, умеренное применение которого может принести большую пользу здоровью человека.

С применением технологии рекомбинантной ДНК получены дрожжевые культуры с расширенным метаболическим спектром. Некоторые из них применяются только в конкретных случаях (сбраживание лактозы, целлобиозы, пентоз). В перспективе для приготовления экологически чистых вин целесообразно создать такие формы дрожжей, которые кроме своей главной функции (брожение) будут способны усваивать и превращать те химикаты, которые предусмотрены агротехническими мероприятиями и часто попадают в ягоды винограда, а затем и в вино.

**Пиво.** Известно, что в растворе, содержащем сахаристые вещества, быстро развиваются микроорганизмы. Этот факт стал основой многих производственных технологий. Археологическими исследованиями в разных частях земного шара установлено, что сбраживание экстрактов злаковых культур применяли еще 6000 лет тому назад. Основными потребителями пива еще 15-20 лет тому назад считались страны Европы, США и Австралия; на сегодняшний день положение значительно изменилось. Пиво стало предметом повседневного потребления в Китае, Индии (из риса), в арабских странах. Значительно возросло потребление пива в Центральной и Южной Африке, Южной Америке (из сорго). Сегодня пиво пьют практически во всех странах. Это дало толчок невиданному развитию производства пива. За последние 10 лет спрос на пиво возрос больше, чем на любой другой напиток. По новейшим данным, производство пива в мировом масштабе превысило 1 млн. гектолитров. По мнению специалистов, эта тенденция будет продолжаться не менее двух десятилетий.

Пиво получают из злаковых, содержащих крахмал чаще всего для этой цели используют ячмень. Пиво производится по следующей технологической схеме.

Сухой ячмень замачивают в воде для получения всходов, содержащих ферменты (амилаза и протеаза). Амилаза способствует разложению крахмала на олигодекстрины, чем в основном определяется вязкость пива и характерная способность к пенообразованию, протеаза катализирует гидролиз белков до аминокислот, которые необходимы для размножения дрожжей и формирования специфического аромата пива. После прорастания ростки солода дробят и помещают в воду при температуре 60°-65 °С. В результате инкубирования в этих условиях ростки теряют способность к дальнейшему росту (отмирают), а ферменты (амилаза, протеаза) сохраняют свою активность. Водный раствор ростков солода наливают в чан с субстратом и настаивают в течение нескольких часов. За это время протекают основные ферментативные процессы, при которых происходит гидролиз крахмала и белков. Водный раствор, или, как его называют, пивное сусло, отделяют от осадка и варят с хмелем для придания аромата и антисептических свойств, харак-

терных для пива. После этого хмель удаляют фильтрацией и полученный раствор готов для сбраживания.

Ферментация или брожение протекает в специальном сосуде - биореакторе, где к раствору добавляется чистая культура дрожжей. Если можно внести какую-нибудь биотехнологическую новизну в эту ставшую классической технологию — это в первую очередь касается культуры дрожжей. С этой целью традиционно использовали селективно отобранные в течение сотен лет дрожжи.

## **14.2 Технология производства сахарозаменителей**

Употребление сахарозы или любого другого натурального сахара даже при рациональном подходе в ряде случаев вызывает развитие атеросклероза, диабет, прибавление в весе и ряд других патологий. Поэтому большое внимание уделяется изысканию эквивалентных вкусовых сахарозаменителей не сахаристой природы. Соединения, обладающие сладким вкусом, могут быть разделены на две группы: природные органические соединения - белки, дипептиды и другие натуральные соединения и вещества, полученные путем химического синтеза.

Как правило, при выборе сахарозаменителей большое внимание уделяется их способности включаться в метаболизм, калорийности, безопасности для здоровья человека, а также себестоимости и технологии получения. На сегодняшний день в научной литературе описано большое количество сахарозаменителей, но по разным причинам реально в практике применяется только их небольшая часть.

К натуральным сладким соединениям относятся моносахариды и низкомолекулярные олигосахариды, продукты гидролиза крахмала и частичной изомеризации - смесь глюкозы и фруктозы, а также соединения неуглеводного типа.

В пересчете на сахарозу, использование сахарозаменителей в США и Западной Европе составляет 55-56 кг в год на душу населения.

Сахарозаменитель сахарин, получаемый химическим синтезом и в течение нескольких десятков лет интенсивно используемый в кондитерской промышленности, сегодня полностью вытеснен новыми натуральными, низкокалорийными



сахарозаменителями, например, метилированным дипептидом аспартамом, производимым биотехнологическим методом. Аспартам (торговое название "Нутрисвит") широко применяется в производстве диетических напитков.

При синтезе аспартама аминокислота фенилаланин является самым дорогим компонентом, ее в большом количестве получают путем культивирования соответствующего продуцента. Токсикологические исследования в течение десяти лет предшествовали применению аспартама в производстве пищевых продуктов.

Среди большого числа других сахарозаменителей заслуживает внимания стевиозид, содержащийся в растении *Stevia rebaudiana*, распространенном в Южной Америке. Это растение культивируется на Черноморском побережье, дает хороший урожай в виде сладких листьев. Широкое использование стевиозида в пищевой промышленности пока ограничено ввиду сложности его получения в чистом виде.

Сахарозаменители другого типа — флавонол-7-глюкозиды -содержат цитрусовые растения. В результате незначительной химической модификации этих соединений образуются дигидрохалконы, которые намного слаще сахара. Наибольший интерес среди этих соединений представляют нарингениндигидрохалкон, неогесперединдигидрохалкон и гесперединдигидрохалкон-4-β-D-глюкозид. Последние два соединения в 300 раз слаще сахарозы. Что касается нарингениндигидрохалкона, характеризующегося незначительной токсичностью, то это соединение в 2000 раз слаще сахарозы. В США нарингениндигидрохалкон выпускается в промышленных масштабах.

Хорошим сырьем для получения неогесперединдигидрохалкон-4-β-глюкозида является цитрусовый отжим, накапливающийся при переработке цитрусовых (получение сока).

Тауматин - соединение белкового происхождения. В промышленных масштабах тауматин получают экстракцией из плодов этого растения. Из всех известных сегодня сахарозаменителей это соединение - самое сладкое.

Сахарозаменители используются в производстве разных напитков (алкогольных и безалкогольных), варений, джемов, пирожных, конфет, жевательных резинок и других сладких продуктов.

С уверенностью можно констатировать, что производство и продажа сахарозаменителей в ближайшем будущем (10 лет) будут увеличиваться, на это указывают данные последних лет (годовой рост потребления составляет 8-9%).

Кроме того, биотехнологические процессы применяются в хлебопечении, производстве пищевых органических кислот (уксусная, лимонная кислота), вкусовых добавок (араматизаторы), в выращивании грибов, а также в других отраслях пищевой промышленности.

#### Вопросы для самопроверки

1. Какова технологическая схема производства алкогольных напитков?
2. Какие существуют сахарозаменители, их преимущества перед сахаром?

### **15 ВТОРИЧНОЕ СЫРЬЁ, ИСПОЛЬЗУЕМОЕ В БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОМ ПРОИЗВОДСТВЕ**

- 1 Растительное сырьё
- 2 Промышленные отходы
- 3 Отходы животноводства

Для выращивания микроорганизмов могут использоваться различные виды сырья: отходы древесного и сельскохозяйственного растительного сырья, сульфитные щелоки, жидкие и газообразные углеводороды, метиловый и этиловый спирты, отходы сельского хозяйства, пищевой, рыбной и мясоперерабатывающей промышленности. К используемым отходам сельского хозяйства, плодо- и лесоперерабатывающей промышленности относятся: хлопковая и рисовая шелуха, кукурузная кочерыжка, подсолнечная лузга, гузапай (стебли хлопчатника), солома,

оболочка какао-бобов, скорлупа кокосовых орехов, кожура фруктов, овощей, ли-  
стья. жмых, мякина, выжимка плодов и овощей, капустная и картофельная мезга,  
навоз, кора, хвоя, опилки, древесное волокно, листья, щепа, ветки, обрезки древе-  
сины, городские отходы, старая бумага, картон, сточные воды.

Различный состав сырья, неодинаковые количественные и качественные ха-  
рактеристики источников углерода, азота и других необходимых для жизнедея-  
тельности микроорганизмов соединений дают разный выход биомассы микроор-  
ганизмов из 1 кг абсолютно сухого сырья (в кг): отходы древесного и сельскохо-  
зяйственного сырья 0,18-0,22, сульфитные щелоки 0,01-0,02, н-парафины 0,80-  
1,00, газообразные углеводороды 0,80-1,00, метанол 0,40-0,45, этанол 0,45-0,50,  
свекловичная меласса 0,22-0,26, молочная сыворотка 0,02-0,03.

### **15.1 Растительное сырье**

Растительное сырье - древесные отходы лесного хозяйства и побочные про-  
дукты земледелия, составляют традиционную углеводную базу для биотехноло-  
гических процессов.

Составными частями растительной массы являются углеводы в виде целлю-  
лозы, гемицеллюлозы, пентозанов, крахмала, сахаров, пектина, а также масла,  
жиры, воски, нуклеиновые кислоты, лигнин, хитин, смолы, белковые вещества,  
витамины, соли и т.д.

**Древесное сырье.** Представляет собой многолетние растительные ткани,  
содержащие целлюлозу, лигнин, пентозаны, гемицеллюлозы и др. вещества..

**Целлюлоза** - наиболее важный субстрат для получения белка. Раститель-  
ные, особенно древесные отходы содержат около 5% целлюлозы, что в мировом  
масштабе превышает 2 млн. т. в год. Это весьма перспективное сырье, но микроб-  
ная клетка способна утилизировать только продукт деградации целлюлозы -  
глюкозу или пентозы и органические кислоты, образующиеся при гидролизе ге-  
мицеллюлозных субстратов и пентозанов. Поэтому древесное сырье подвергают  
предварительной обработке: измельчают и гидролизуют. Полисахариды древеси-

ны при высоких температурах в присутствии кислот или щелочей переходят в низкомолекулярные усвояемые микроорганизмами соединения, но процесс требует значительных энергетических затрат и ведет к образованию нежелательных побочных продуктов. Кроме того, древесина - продукт дефицитный, так как в мире ее больше используется, чем воссоздается.

**Растительные отходы сельского хозяйства.** Кукурузная кочерыжка, подсолнечная лузга, рисовая и хлопковая шелуха, солома, стебли хлопчатника (гузипай) и др.

**Хлопковая шелуха** представляет собой твердую оболочку семян хлопчатника, покрытую короткими волокнами хлопка. Это отход хлопкоочистительных и маслособойных заводов. Состав хлопковой шелухи зависит от сорта хлопчатника. Она содержит 36-48% целлюлозы, 20-31% - лигнина и 21-28% пентозанов.

Средний выход шелухи при шелушении хлопковых семян 31,4% их массы, что составляет в нашей стране 1,2 млн. т в год. При получении кормовых дрожжей хлопковую шелуху гидролизуют кислотой.

**Кукурузная кочерыжка** - это стержень, остающийся после отделения кукурузных зерен от початков. Выход кочерыжки - 25-35% массы початков. Состав стержней (в % к массе стержней): вода 8, сырой протеин 2,8, сырой жир 0,7, безазотистые экстрактивные вещества 54,7, сырая клетчатка 32,8, зола 1.

По кормовой ценности перемолотые стержни могут быть приравнены к сену или яровой соломе. Но в чистом виде для корма они не используются: в них мало белка, витаминов, минеральных веществ, особенно кальция, фосфора, йода и кобальта. Кукурузная кочерыжка - это сырье для получения кормовых дрожжей на гидролизных заводах.

**Подсолнечная лузга** - отход при производстве масла из семян подсолнечника. Выход ее составляет 30-40% массы семян подсолнечника. Лузга содержит 1,4% богатого углеродом пигмента фитомелана, 23,6-28 пентозанов, 52-66 клетчатки, 24,8-29,6 лигнина, 31-42,4% целлюлозы и является ценным сырьем для получения кормовых дрожжей, гидролизного спирта, фурфурола и других продуктов. Для выращивания кормовых дрожжей используют пентозогексозные гидро-

лизаты лузги после удаления из них фурфурола. На 1 т кормовых дрожжей расходуется 6,7 т лузги, выход дрожжей составляет около 150 кг.

**Рисовая шелуха** - сырье для гидролизного производства и получения кормовых дрожжей. Она содержит 18% легко-, 29% трудногидролизуемых полисахаридов. Общий выход РВ 50-58%. **Гузапай** (стебли хлопчатника), так же как камыш и солома служит сырьем для гидролизного производства. **Верховой мало-разложившийся торф** также используется в качестве сырья для производства кормовых дрожжей. Его состав близок к составу растений. Это сходство тем больше, чем меньше степень разложения торфа. Верховой торф со степенью разложения 15-20% содержит 25-27% легко- и 9-13% трудногидролизуемых полисахаридов, 0,7-0,4% азотсодержащих соединений, основная часть которых входит в состав гуминовых веществ, 7-10% аминокислот. **Морские водоросли** в Японии предложено использовать комплексно. При кислотном гидролизе водорослей образуются альгиновая кислота, витамины пигменты и белки, на гидролизатах возможно культивирование микроорганизмов - продуцентов белка. При обработке щелочью получают маннит, йод, калий, фукоидин. Сами водоросли после промывки и сушки могут служить для пищевых целей или основой питательной среды для микроорганизмов - продуцентов белка. Отходы этих процессов используют для получения метана, а вторичные отходы - как удобрение при выращивании морских растений, чем замыкается цикл.

## 15.2 Промышленные отходы

Отходы **пивоварения** - хороший, но небольшой источник углеводов: пивная дробина, солодовые ростки, отходы подработки несоложенного ячменя. Для получения кормовых дрожжей эти отходы гидролизуют и вводят в среду в соотношении 8:0,2:0,5 (дробина: ростки: отходы ячменя)

К отходам **картофелекрахмального производства**, используемым в качестве сырья для выращивания микроорганизмов, относят клеточный сок картофеля и соковые воды, промывные воды после гидросмыва крахмала и мезга.

**Клеточный сок картофеля** содержит 6% сухих веществ, его объем доходит до 50% к массе перерабатываемого картофеля и составляет около 1,3 млн. п. год. Клеточный сок картофеля содержит аминокислоты, оксид калия, фосфорную кислоту, соединения кальция и магния. Уровень использования клеточного сока картофеля в настоящее время составляет около 33%.

**Картофельная мезга** содержит (в % к массе сухих веществ): крахмал 50, клетчатку 25. Растворимые углеводы 2,5, минеральные вещества 6,2, сырой протеин 6 и прочие вещества 10,3. Влага в мезге 86-87%, что делает ее малотранспортабельной. Концентрация клетчатки и крахмала в этом виде сырья низка, гидролиз его экономически не оправдан.

На этом сырье культивируют микроорганизмы, обладающие гидролитическим комплексом ферментов и использующие при росте биополимеры. **Отходы, не требующие специальных методов обработки.** К ним относятся меласса, последрожжевая барда спиртовых заводов, молочная сыворотка. **Свекловичная меласса** - отход производства сахара из свеклы (выход 3,5-5% к массе свеклы), богата органическими и минеральными веществами, необходимыми для развития микроорганизмов. Она содержит 45-50% сахарозы, 0,25-2,0 - инвертного сахара, 0,2-3,0% рафинозы. Из азотистых веществ в мелассе содержатся бетаин, пирролидонкарбоновая, глутаминовая, аспарагиновая кислоты, лейцин, изолейцин, аланин, валин, из органических кислот - молочная, муравьиная, уксусная, масляная, лимонная. В малых количествах в ней содержатся кобальт, железо, свинец, бор, цинк, кремний, серебро, йод, марганец, молибден. Свекловичная меласса представляет собой дорогое и дефицитное сырье и в производстве кормовых дрожжей используется редко.

**Мелассная барда** является отходом производства этанола на мелассе и содержит 6-12% сухих веществ. Это полноценное сырье для производства кормовых дрожжей. В настоящее время для производства кормовых дрожжей используется более 70% первичной послеспиртовой мелассной барды.

**Зерновая и картофельная барда** - отход спиртового производства. Состав зерновой и картофельной барды различен. Зерновая барда содержит 3,2-4,1% су-

хих веществ, картофельная - 6,7-8%. В сухих веществах картофельной барды меньше протеина, чем в зерновой (18,7-19,5% против 26,8-27,5), меньше жиров (3,1% против 5,9-7,5). Картофельная барда богаче зерновой по содержанию углеводов (56,2-58,5 % против 40-41,8). Больше в ней и минеральных веществ. Для получения кормовых дрожжей используется 14,6% получаемой в настоящее время зернокартофельной барды.

**Барда ацетоно-бутилового производства** содержит до 0,7-1,0% РВ, азотистые вещества, минеральные соли и стимуляторы роста. В ней присутствует немного (0,07-0,30 г/л) бутанола, что требует адаптации к нему микроорганизмов.

**Молочная сыворотка** - сырье для получения белковых препаратов. В сыворотке содержатся (в % СВ): лактоза 70-80, белковые вещества 7-15, жир 2-8, минеральные соли 8-10. Кроме того, молочная сыворотка имеет в своем составе значительное количество витаминов, гормонов, органических кислот, микро- и ультрамикроэлементов.

**Отходы консервной промышленности.** В нашей стране ежегодно в консервы перерабатывается 4 млн. т овощей и плодов. При этом образуется 700-800 тыс. т отходов и вторичных продуктов, которые могут использоваться в качестве сырья при приготовлении питательных сред для производства кормовых дрожжей. Отходы отличаются по химическому составу не только в зависимости от вида сырья, но и от степени зрелости, условий хранения, вида изготавливаемой продукции.

**Томаты** в основном идут на производство концентрированных томатопродуктов и томатного сока. В первом случае общее количество отходов составляет 4-5% к массе сырья. Количество пульпы в отходах составляет 51-78%, семян - 6-14, кожицы - 6-13, сосудистых волокон - 1-3, связанной воды - 8-15%.

При производстве томатного сока отжимают около 65% сока и мякоти к массе сырья. Остальные 35%, идущие в отходы, состоят на 88% из мякоти и сока и на 12% из кожицы и семян. На растворимую часть в отходах приходится 2,5-5%. Рациональным способом хранения и использования отходов томатного производства является их высушивание и получение из них муки.

Отходы переработки **зеленого горошка** - это ботва и створки. Выход зерен горошка составляет 15-20% скошенной массы. Отходы содержат до 40% безазотистых экстрактивных веществ, до 11% минеральных веществ и другие соединения. Отходы могут использоваться для получения микробных белковых препаратов.

Отходы **переработки капусты, моркови, свеклы и других овощей** - это ботва, очистки, испорченные овощи и т.п. Ежегодно этих отходов получают около 100 тыс. т. Отходы составляют от массы перерабатываемых овощей (в %): капуста 22,5, морковь 17-20, свекла 24-29 и т.д. Эти отходы используются для получения микробных белковых препаратов.

Отходы **овощесушильного производства** подразделяют на твердые и жидкие. К твердым относят мелкие некондиционные клубни картофеля, снятую при очистке кожицу, глазки, мелкие частицы, получаемые при сушке, инспекции и фасовке, к жидким - промывные воды, получаемые при бланшировании, варке и других операциях, а также мезгу. Отходы при переработке картофеля составляют 25-45% всех отходов овощесушильного производства. Это прекрасное сырье для производства белковых препаратов и крахмала.

Отходы **переработки плодов** состоят из выжимок, получаемых при прессовании, остающихся при варке компотов варенья, джемов и т.д. Эти отходы являются полноценной средой для выращивания микроорганизмов. При переработке яблок отходы составляют около 30-34%. При приготовлении сока ю винограда образуется до 18% виноградных выжимок, состоящих на 43-45% и кожицы с остатками мякоти, на 22-32% из семян и на 24-26% из гребней. Выжимки содержат примерно 5% сахара и используются как компонент питательной среды при производстве кормовых дрожжей.

При выработке соков и компотов из citrusовых образуется около 60% отходов к общей массе плодов. В них содержится ряд ценных веществ: эфирное масло (1,2%), пектиновых веществ (1,5-2%) и гесперидин (1,2-1,5%).

В США из отходов производства соков из citrusовых получают эфирные масла и гесперидин. Оставшиеся выжимки измельчают, обрабатывают известью



до рН 6, затем аммиаком и прессуют. Фильтрат используют в качестве питательной среды для дрожжей.

Отходы **винодельческой промышленности** - это гребни, виноградные выжимки, семена, дрожжевые осадки. Смоченные суслон гребни содержат 1-1,5% сахара, до 2,54% минеральных веществ, азотистые вещества.

Виноградные выжимки содержат 4-10% сахара, азотистые, пектиновые, дубильные вещества, жиры, клетчатку, до 1,2-3,6% минеральных веществ и могут использоваться в составе сред для выращивания дрожжей. Ежегодный объем виноградных выжимок в стране около 2,6 млн. т.

Дрожжевой осадок составляет 3-8% объема вина и содержит (в % на сухое вещество): минеральные вещества 5-10, углеводы 25-50, азот 5-17, белковые вещества 30-75 и жиры 2-5. Из дрожжевого осадка получают этанол, высшие спирты, альдегиды и кормовые дрожжи.

### **Отходы молокоперерабатывающих предприятий**

При сепарировании молока, производстве сметаны, сливочного масла, натуральных сыров, творога и молочного белка по традиционной технологии получают побочные продукты – обезжиренное молоко, пахту и молочную сыворотку.

Обезжиренное молоко, пахта и молочная сыворотка, относящиеся к вторичным ресурсам молочного подкомплекса АПК, должны использоваться полностью и рационально. В сочетании с цельным молоком и сливками вторичные сырьевые ресурсы формируют комплекс который можно назвать термином «молочное сырье».

Применение новых физико-химических и биологических методов, молекулярно-ситовой фильтрации и криотехнологии позволяет направленно разделять и концентрировать компоненты молока с исключением побочных продуктов.

При производстве 1 т сливочного масла получают до 20 т обезжиренного молока и 1,5 т пахты; при производстве 1 т сыра и творога – до 9 т молочной сыворотки. В обезжиренное молоко, пахту и сыворотку переходит от 50 до 75% сухих веществ молока. Обезжиренное молоко и пахта содержат практически весь

белковый, углеводный и минеральный комплекс молока и частично молочный жир. В молочную сыворотку переходит углеводный комплекс, сывороточные белки и минеральные соли.

Пищевая ценность вторичного молочного сырья, как и молока, очень высокая, хорошая усвояемость, оптимальное соотношение питательных веществ, биологическая и физиологическая совместимость. Энергетическая ценность обезжиренного молока и пахты составляет 5,8, а молочной сыворотки – 36% от цельного молока, что следует учитывать при организации промышленной переработки.

Кроме получения вторичных продуктов, переработка молока связана с неизбежными потерями сырья, которые в целом по отрасли составляют миллионы тонн (в пересчете на молоко). Также к отходам относятся аполоски от мытья молочного оборудования и даже отбросы (сепарационная слизь). Кроме того необходимо учитывать отходы образующиеся в результате потребленных молочных продуктов, их хранения, упаковывания и реализации. Принципы безотходных технологий были сформулированы ООН.

Практическая реализация этих принципов возможна в отрасли при соблюдении следующих принципов:

- разработка безотходных технологий производства новых продуктов с полным использованием всех компонентов молока;

- разработка альтернативных вариантов технологий различных продуктов питания, кормовых средств, медицинских препаратов и полуфабрикатов из всех видов основного и побочного сырья;

- энергосбережение, минимальные затраты труда и средств при переработке молока и отходов молочной промышленности;

- оценив уровень эффективности применения технологий переработки молока, можно рассчитать стоимость полученной продукции из 1 т молочного сырья, степень использования сухих веществ и отдельных компонентов молока.

Решение проблемы безотходности молочного дела на современном уровне возможно только за счет организации промышленной переработке вторичных сырьевых ресурсов (сыворотка, пахта и т.д.), а также рационального использова-

ния готовой продукции. Получаемые отходы должны перерабатываться с применением биотехнологических технологий как в пищевую так и в кормовую продукцию без остатка.

### **15.3 Отходы животноводства**

К отходам животноводства относят навоз и стоки животноводческих ферм. Различают подстилочный, твердый навоз (влажность 75-80%); бесподстилочный, который делится на полужидкий (смесь экскрементов с мочой, влажность до 90%) и жидкий - навоз с примесью воды (влажность 90-93%); навозные стоки -навоз, разбавленный водой (влажность более 93%). С выделениями крупного рогатого скота, свиней, кур, при богатейшем содержании выводится до 30-40% питательных веществ, получаемых животными с кормами. В основном органическое вещество экскрементов представлено структурными веществами с высоким содержанием углерода (целлюлоза, лигнин, пентозаны).

Объем питательных элементов во всех стоках животноводческих ферм нашей страны в год эквивалентен 2,2 млн. т. азота, 1 млн. т. фосфора и 1 млн. т. калия. Это в 4 раза превышает количество загрязнений от сточных вод пищевой промышленности и хозяйственно-бытовых стоков объемом 11,8 млн. м<sup>3</sup> в год. В настоящее время одним из перспективных способов утилизации стоков животноводческих ферм является культивирование микроорганизмов на питательных средах из этих отходов с получением кормовой и технической биомассы.

#### **Вопросы для самопроверки**

- 1 Какие существуют отходы растениеводства и животноводства?
- 2 Какие существуют промышленные отходы?
- 3 Где и для чего можно применять отходы?

## Список терминов

Термин	Значение
Автоселекция	Процесс постепенного вытеснения менее приспособленных форм микроорганизмов более приспособленными
Аэротенк-смеситель	Резервуар для очистки сточных вод
Барда	Отход производства спирта
Биореактор	Закрытая или открытая емкость, в которой при определенных условиях протекает на клеточном уровне контролируемая реакция, осуществляемая с помощью микроорганизмов
Вектор	Молекула ДНК, способная переносить в клетку чужеродную ДНК любого происхождения и обеспечить там ее размножение
ДНК-лигаза	Фермент «сшивающий» участки молекулы ДНК
Иммобилизация	Перевод ферментов в нерастворимое состояние
Клонирование	Размножение в бактериальной клетке рекомбинантной молекулы ДНК
Криоконсервация	Глубокое замораживание клеток
Лаг-фаза	Медленный рост культуры
Лиофильное высушивание	Обезвоживание после замораживания
Лузга	Отход при производстве масла из семян подсолнечника
Меласса	Отход производства сахара
Мезга	Отход производства крахмала, соков и т.д.
Модификация продукта	Перестройка полученных соединений животного, растительного или микробного происхождения с целью придания им специфических свойств
Папаин	Фермент получаемый из продуктов папай
Плаزمид	Добавочные кольца молекулы ДНК бактерий
Рестриктаза	Фермент разрезающий молекулу ДНК
Реципиент	Клетка, в которую переносят чужеродный ген
Скрининг	Проверка полученных клонов
Тотипотентность	Полноценность, информативность
Ультрафильтрация	Отделение веществ с помощью мембранных фильтров
Ферменты	Катализаторы белковой природы
Шелуха	Твердая оболочка семян

## Библиографический список

- 1 Войнов, Н.А. Современные проблемы и методы биотехнологии [Текст] / Н.А. Войнов. - Изд-во: СФУ, 2009. - 271 с.
- 2 Егорова, Т.А. Основы биотехнологии [Текст] / С.М. Клунова, Е.А. Живухина. - М.: Академия, 2006. - 208 с.
- 3 Кислухина, О.И. Биотехнологические основы переработки растительного сырья [Текст] / Кюдулас О.И/. – Каунас: Технология, 2007. – 183 с.
- 4 Клунова, С.М. Биотехнология [Текст] / Т.А. Егорова, Е.А. Живухина. – М.: Академия, 2010. - 256 с.
- 5 Липунов, И.Н. Основы микробиологии и биотехнологии [Текст] / И.Г. Первова - Изд-во: УГЛТУ, 2008. - 221 с
- 6 Мотавина, Л. И. Основы пищевой биотехнологии: базовые лекции по курсу [Электронный ресурс] / Л. И. Мотавина. - Уфа: [б. и.], 2013. - 65 с.

Людмила Ивановна Мотавина, Зульфия Асхатовна Галиева,  
Наталья Владимировна Гизатова, Ришат Сальманович Исхаков,  
Альберт Якупович Гизатов, Юрий Алексеевич Карнауков,  
Ильдар Мунавирович Файзуллин, Риф Сагдатуллович Юсупов

Учебное пособие  
*Основы пищевой биотехнологии*

Подписано в печать \_\_\_\_\_ 2014 г.  
Формат 60x84. Бумага типографская. Гарнитура Таймс.  
Усл. печ. л. \_\_\_\_\_. Усл. изд. л. \_\_\_\_\_. Тираж \_\_\_\_\_ экз. Заказ № \_\_\_\_\_.  
Адрес издательства и типографии: 450001, г. Уфа, ул. 50 лет Октября, 34.