

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
СТАВРОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ

**Сельскохозяйственная, пищевая и
фармакологическая
биотехнология**

Учебное пособие

Ставрополь
2022

УДК 573.6 (075)

ББК 30.16 Я73
В 31

Авторы:

Кандидат биологических наук, доцент базовой кафедры
эпизоотологии и микробиологии ФГБОУ ВО СтГАУ
Веревкина М.Н.

Кандидат ветеринарных наук, доцент кафедры
пищевых технологий и инжиниринга ФГАОУ ВО СКФУ
Поветкин С.Н.

Рецензенты:

Зав. кафедрой паразитологии и ветеринарно-санитарной экспертизы им.
С.Н. Никольского, доктор биологических наук,
доцент *Дилекова О.В.*

Заведующий лабораторией ветеринарной медицины ВНИИОК - филиал
ФГБНУ "Северо-Кавказский ФНАЦ", доктор ветеринарных наук,
профессор В. И. *Колесников*

Сельскохозяйственная, пищевая и фармакологическая
биотехнология: учебное пособие/ М.Н. Веревкина, С.Н. Поветкин. –
Ставрополь, Изд-во «АГРУС», 2022. – 130 с.

Для студентов очной и заочной форм обучения ФГБОУ ВО
Ставропольский государственный аграрный университет факультета
ветеринарной медицины и ФГАОУ ВО Северо-Кавказский федеральный
университет факультета пищевой инженерии и биотехнологий. В
учебном пособии содержится описание основных направлений
биотехнологии – фармакологической, пищевой и сельскохозяйственной.
Рассматривается производство кормового белка, ферментных
препаратов, антибиотиков, инсулина.

Рекомендовано к изданию учебно-методической комиссией факультета
ветеринарной медицины и биотехнологического факультета ФГБОУ ВО
"Ставропольский государственный аграрный университет" (протокол №
13 от 27 июня 2022 г.).

СОДЕРЖАНИЕ

	ВВЕДЕНИЕ	4
Тема 1.	Сельскохозяйственная биотехнология	11
1.1.	Биотехнология в животноводстве и растениеводстве	11
1.2.	Производство кормового белка	21
1.3.	Микробиологические методы производства аминокислот	32
Тема 2.	Пищевая биотехнология	37
2.1.	Производство ферментных препаратов	43
2.2.	Пребиотики, пробиотики, синбиотики	55
2.3.	Пищевые ингредиенты, включая витамины и функциональные смеси	76
Тема 3.	Фармакологическая биотехнология	81
3.1.	Производство антибиотиков	87
3.2.	Производство инсулина	111
3.3.	Стероидные гормоны	118
	ГЛОССАРИЙ	121
	СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	130

В настоящее время биотехнология приобретает все более важную роль в повышении доходности сельского хозяйства. Другими словами, биотехнология – это наука об использовании биологических процессов в технике и промышленном производстве. Название ее происходит от греческих слов «bios» – жизнь, «teken» – искусство, «logos» – слово, учение. Биотехнология создает возможность получения разнообразных веществ и соединений из сравнительно дешевых, доступных и возобновляемых материалов.

В области животноводства это – диагностика, профилактика и лечение заболеваний с использованием техники моноклональных антител; генетическое улучшение пород животных. Биотехнологические методы широко используются для искусственного осеменения. Биотехнология применяется для силосования кормов, позволяя повышать усвоение растительной биомассы; для утилизации отходов животноводческих ферм; для получения экологически чистых органических удобрений на основе переработки отходов растениеводства и животноводства. Некоторые вещества, полученные с помощью микроорганизмов, могут использоваться в виде кормовых добавок, другие – подавляют микрофлору в желудочно-кишечном тракте или стимулируют образование специфических микробных метаболитов.

В области растениеводства это – выведение сортов растений, устойчивых к неблагоприятным факторам; разработка биологических средств борьбы с сорняками, грызунами, фитопатогенными грибами, бактериями и вирусами; получение бактериальных; разработка микробиологических методов рекультивации почв; получение трансгенных растений; переработка отходов и побочных продуктов растениеводства.

Развитие биотехнологии позволяет существенно интенсифицировать производство, повышать эффективность использования природных ресурсов, решать экологические проблемы, создавать новые источники энергии. Возможности биотехнологии при международном сотрудничестве специалистов могут быть направлены на решение мировых кризисных проблем, связанных с восполнением дефицита белка и энергии, предотвращением опасных заболеваний, охраной окружающей среды. Одна из особенностей биотехнологии состоит в том, что она использует технологии производства продуктов на ранних этапах развития микробиологического синтеза. Выявлены существенные потенциальные возможности для усовершенствования традиционных технологий и расширения сфер приложения получаемых продуктов. Например, методом генетической инженерии созданы

уникальные штаммы микроорганизмов для сыроварения. В настоящее время достижения биотехнологии перспективны в следующих отраслях:

- в промышленности (пищевая, фармацевтическая, химическая, нефтегазовая) – использование биосинтеза и биотрансформации новых веществ, на основе сконструированных методами генной инженерии штаммов бактерий и дрожжей с заданными свойствами на основе микробиологического синтеза;
- в экологии – повышение эффективности экологизированной защиты растений, разработка экологически безопасных технологий очистки сточных вод, утилизация отходов агропромышленного комплекса, конструирование экосистем;
- в энергетике – применение новых источников биоэнергии, полученных на основе микробиологического синтеза и моделированных фотосинтетических процессов, биоконверсии биомассы в биогаз;
- в сельском хозяйстве – разработка в области растениеводства трансгенных агрокультур, биологических средств защиты растений, бактериальных удобрений, микробиологических методов рекультивации почв; в области животноводства – создание эффективных кормовых препаратов из растительной, микробной биомассы и отходов сельского хозяйства, репродукция животных на основе эмбриогенетических методов;
- в медицине – разработка медицинских биопрепаратов, моноклональных антител, диагностикумов, вакцин, развитие иммунобиотехнологии в направлении повышения чувствительности и специфичности иммуноанализа заболеваний инфекционной и неинфекционной природы.

Фундаментом современной биотехнологии являются молекулярная биология, микробиология, генетика, биохимия, биофизика, технология, приборостроение. За последние 40-50 лет произошло скачкообразное развитие этих наук, что привело к форменной революции в производстве ветеринарных и медицинских биопрепаратов, созданию трансгенных растений и животных с заданными уникальными свойствами. Подобные исследования являются приоритетными направлениями научно-технического прогресса и в XXI веке займут ведущее место среди всех наук. Наука формировалась и эволюционировала по мере формирования и развития человеческого общества. Ее возникновение, становление и развитие условно можно подразделить на 4 периода.

I. Эмпирический (греч. «эмперикос» – опытный), или доисторический, период – самый длительный, охватывающий примерно

8000 лет, из которых более 6000 лет до нашей эры и около 2000 лет нашей эры. Древние народы того времени интуитивно использовали приемы и способы изготовления хлеба, пива, уксуса, получение кисломолочных продуктов, квашение капусты, силосование, которые теперь мы относим к разряду биотехнологических.

II. Этиологический (греч. «аитиа» – причина) период в развитии биотехнологии охватывает вторую половину XIX века и первую треть XX века (1856-1933 гг.). Он связан с выдающимися исследованиями великого французского ученого Луи Пастера (1822-1895) – основоположника научной микробиологии. Пастер установил микробную природу брожений, доказал возможность жизни в бескислородных условиях, экспериментально опроверг существовавшее тогда представление о самопроизвольном зарождении живых существ, создал научные основы вакцинопрофилактики и вакцинотерапии; предложил метод пастеризации как способ стерилизации. В этот же период занимались наукой его выдающиеся ученики, сотрудники и коллеги: Э. Дюкло, Э. Ру, И.И. Мечников, Р. Кох, Д. Листер, Ш. Китазато, Д.И. Ивановский и др.

В биотехнологии очень важным этапом является приготовление питательных сред для культивирования микроорганизмов и культур клеток. Уже в 1859 г. Л. Пастер приготовил жидкую питательную среду, Р. Коху в 1876 г. удалось вырастить бациллы сибирской язвы в капле водянистой влаги, извлеченной из глаза погибшей коровы. В 80-е гг. XIX столетия Р. Кох предложил метод культивирования бактерий на стерильных ломтиках картофеля, а позднее – на агаризованных питательных средах. И как следствие этого, удалось доказать индивидуальность микроорганизмов и получить их в чистых культурах. Более того, каждый вид мог быть размножен на питательных средах и использован в целях воспроизведения соответствующих процессов (бродильных, окислительных и др.); например, маслянокислые бактерии и вызываемое ими маслянокислое брожение, лактобактерии и молочнокислое брожение, дрожжи-сахаромицеты и спиртовое брожение, уксуснокислые бактерии и окисление эталона до уксусной кислоты и т.д. В этот период было начато изготовление прессованных пищевых дрожжей, а также продуктов обмена бактерий (метаболизма) – ацетона, бутанола, лимонной и молочной кислот. Во Франции приступили к созданию биоустановок для микробиологической очистки сточных вод. Были решены основные задачи по конструированию, созданию и внедрению в практику необходимого оборудования, в том числе главного из них – биореактора (ферментера, аппарата-

культиватора). Это оборудование используют и в настоящее время. Среди научных достижений особо стоит отметить следующие:

- 1868 г. – Ф. Мишер получил «нуклеин» (ДНК) из лейкоцитов;
- 1902 г. – Г. Хаберланд показал возможность культивирования клеток различных тканей растений в простых питательных растворах;
- 1912 г. – Ц. Нейберг раскрыл механизм процессов брожения;
- 1913 г. – Л. Михаэлис и М.Л. Ментен разработали кинетику ферментативных реакций.

III. Биотехнический период (1933-1972 гг.). В 1933 г. А. Клюйвер и А.Х. Перкин опубликовали работу «Методы изучения обмена веществ у плесневых грибов», в которой изложили основные технические приемы, а также подходы к оценке получаемых результатов при глубинном культивировании грибов. Началось внедрение в биотехнологию крупно-масштабного герметизированного оборудования, обеспечивающего проведение процессов в стерильных условиях. Особенно мощный толчок в развитии промышленного биотехнологического оборудования был отмечен в период становления и развития производства антибиотиков (время Второй мировой войны 1939-1945 гг., когда возникла острая необходимость в противомикробных препаратах для лечения больных с инфицированными ранами). Все прогрессивное в области биотехнологических и технических дисциплин, достигнутое к тому времени, нашло свое отражение в биотехнологии. 1937 г. – Кребс открыл цикл трикарбоновых кислот. 1953 г. – Ф. Крик и Дж. Уотсон расшифровали структуру ДНК. Эти факты стали побудительным мотивом для разработки способов крупномасштабного культивирования клеток различного происхождения для получения разнообразных клеточных продуктов и самих клеток для нужд человека, и, прежде всего, пенициллина, стрептомицина, тетрациклинов, декстрана, ряда аминокислот и многих других веществ. К 1950 г. Ж. Моно разработал теоретические основы непрерывного управляемого культивирования микробов, которые развили в своих исследованиях М. Стефенсон, И. Малек, М.Д. Иерусалимский и др. В этот период французский ученый Р. Горте предложил способ долгого культивирования растительных тканей *in vitro* (в стекле) за счет периодического пересаживания их на свежую питательную среду. Это открытие дало новый толчок в работе по культуре ткани, который ознаменовался нарастающим числом новых объектов, успешно введенных в культуру. С открытием в 1955 г. нового класса фитогормонов-цитокининов, в частности кинетина, была получена возможность стимулировать деление клеток, поддерживать

рост каллусной ткани, индуцировать морфогенез. Большой успех в биотехнологии растений в нашей стране достигнут в институте физиологии растений А.А. Курсановым и Р.Г. Бутенко. В этот период появляются биотехнологические процессы, значительно ускорившие процесс воспроизводства животных. В начале XX века был предложен И.И. Ивановым метод искусственного осеменения животных. В 1890 г. английский биолог из Кембриджского университета У. Вальтер провел успешную трансплантацию зиготы у кроликов и получил потомство. Начиная с 1930 г. проводились многочисленные опыты по трансплантации эмбрионов хирургическим путем у лабораторных и сельскохозяйственных животных. В нашей стране наиболее успешно осуществлял трансплантацию эмбрионов овец А.И. Лопырин, свиней – А.В. Квасницкий.

IV. Период биотехнологии – геннотехнический (греч. «гинесис» – происхождение, возникновение, рождение) – начался с 1972 г. В этом году в США П. Берг создал первую рекомбинантную молекулу ДНК, тем самым показав возможность направленных манипуляций с генетическим материалом бактерий. Естественно, что без фундаментальной работы Ф. Крика и Дж. Уотсона (1953 г.) по установлению структуры ДНК, расшифровки генетического кода (М. Ниренберг, С. Очао, Г. Корана, 1962-1966 гг.) было невозможным достигнуть современных результатов в области биотехнологии. Выяснение механизмов функционирования и репликации ДНК, выделение и изучение специфических ферментов привело к формированию строго научного подхода к разработке биотехнических процессов на основе генно-инженерных манипуляций. В 1977 г. Итокура синтезировал ген гормона соматотропина человека, а в 1979 г. – ген инсулина человека. Уже в 1982 г. поступил в продажу человеческий инсулин, продуцируемый клетками кишечной палочки. Наряду с инсулином разработаны следующие генно-инженерные препараты: интерфероны, фактор некротизации опухоли (TNF), интерлейкин-2, соматотропный гормон человека и аналог его соматодомин Ц, α -антитрипсин, гемопоэтин и др.

В 1982 г. американские ученые Пальмитер и Бриксон получили первых трансгенных мышей. А сегодня уже получены сотни трансгенных животных и растений. Большие возможности перед генной инженерией открыло изобретение в 1985 г. К. Мулисом полимеразной цепной реакции, позволившей сделать рутинным процесс синтеза генов. Большой прорыв в клеточной инженерии животных был сделан после разработки Келлером и Милстайном (1975 г.) методики получения моноклональных антител. Стало возможным получать безопасные вакцины (без ДНК возбудителя), а также диагностикумы. Клонирование

(копирование) животных только на основе наследственности одного из родителей было впервые осуществлено Гердоном (в 1962 г.) на лягушках и Вилмутом (1997 г.) – на овцах.

В настоящее время имеются сотни клонированных животных, некоторые – в 3-4 поколениях. С. Вилладсен (Кембридж) разработал микрохирургическую методику деления эмбриона и получения искусственных близнецов, а также способ клонирования эмбрионов для получения большого количества однородных животных. Так, в Англии для производства высококачественного мясного скота разработан дешевый метод получения эмбрионов. Яйцеклетки, полученные от мясных животных, помещают в культуральную среду и оплодотворяют спермой высококлассных мясных быков. После 6-дневного культивирования эмбрионы вводят молочным малоценным или более старым коровам тем же способом, который применяют при искусственном осеменении. Таким дешевым способом производят 75% говядины в Великобритании. В результате комбинации эмбриональных клеток овец и коз в Великобритании, Германии и США получены овцекозы и химеры.

Наиболее важные достижения биотехнологии в IV периоде.

1. Разработка интенсивных процессов (вместо экстенсивных) на основе направленных, фундаментальных исследований (с суперпродуцентами антибиотиков, ферментов, аминокислот, витаминов)

2. Создание различных продуктов, необходимых человеку на основе генно-инженерных технологий.

3. Создание необычных организмов, ранее не существовавших в природе: не клубеньковых растений, несущих ген азотбактерий, которые отвечают за способность фиксировать молекулярный азот из воздуха, в результате чего отпадает необходимость удобрять почву азотсодержащими удобрениями; светящихся растений; получение химер – овцекозы в США, индоутки – в России; помато-гибрида картофеля и томата, клонирование животных.

4. Разработка и внедрение в практику специальной аппаратуры, биотехнологических схем.

5. Автоматизация и компьютеризация биотехнологических оптимальных производственных процессов при максимальном использовании дешевого сырья и минимальном потреблении энергии.

6. Внедрение биотехнологии в воспроизводство животных – трансплантация эмбрионов от донора реципиентам – позволяет получить от выдающихся коров более 100 телят и ускоряет в 2-3 раза селекционный процесс. В целом же применение биотехнологии в народном хозяйстве очень разнообразно.

В Российской Федерации наиболее интенсивные исследования в области биотехнологии и генной инженерии проводятся в филиале института биоорганической химии (ФИБХ) РАН (г. Пущено Московской области), центре «Биоинженерия» РАН и Всероссийском научно-исследовательском институте биотехнологии (ВНИИСХБ) РАН, Всероссийском институте животноводства (ВИЖ). В ФИБХс получены трансгенные растения плодовых, ягодных, декоративных, овощных и злаковых культур. В центре «Биоинженерия» специализируются на получении трансгенного картофеля, устойчивого к колорадскому жуку, вирусам и гербицидам. Во ВНИИСХБе получены трансгенные сорта томата, рапса, устойчивые к фитопатогенам и гербицидам. В ФИБХе получены трансгенные растения табака с геном цекропина, устойчивые к грибным и бактериальным патогенам. В 1993 г. в ВИЖе получены трансгенные овцы с геном химозина (Л.К. Эрнст, Г. Брем, И.В. Прокофьев).

ТЕМА 1. СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ

1.1. Биотехнология в животноводстве и растениеводстве

Биотехнологии в сельском хозяйстве внесли большой вклад в развитие и становление отрасли. Несмотря на то, что биологическая сущность биотехнологических процессов была раскрыта совсем недавно, использование их продолжается на протяжении тысячелетий. С точки зрения современной науки, биотехнология в сельском хозяйстве – это промышленное использование биологических процессов и агентов на основе получения высоко – эффективных форм микроорганизмов, культур клеток и тканей растений и животных с заданными свойствами.

Таким образом, биотехнология является междисциплинарной областью научно-технического прогресса, возникшая на стыке биологических, химических и технических наук. Применение биотехнологических методов и приемов перспективная, но, к сожалению, не всегда реализуемая задача. Сложность использования биотехнологий обусловлена сложностью используемых процессов и объектов. Любой биологический объект – это самодостаточная система, в которой сложно изменить какой-либо элемент, не меняя остальных, нельзя произвольно рекомбинировать их, придавая организму то или иное желаемое свойство.

Сельскохозяйственная биотехнология призвана обслуживать отрасли сельского хозяйства. Она разрабатывает методы и методологии создания и использования генетически модифицированных биологических объектов для интенсификации сельскохозяйственного производства, получения новых видов продуктов различного назначения, охраны окружающей среды и др.

Биотехнология в животноводстве включает диагностику, профилактику и лечение заболеваний с использованием техники моноклональных антител; генетическое улучшение пород животных; биотехнологические методы используются для искусственного осеменения.

Разработанные биопрепараты с успехом используются для лечения инфекционных заболеваний, в качестве кормовых добавок и заменителей цельного молока (ЗЦМ), силосных заквасок и прочее. Так, 1 т кормовых дрожжей позволяет получить 0,4–0,6 т свинины, до 1,5 т мяса птиц, 25–30 тыс. яиц и сэкономить 5–7 т зерна. Это имеет большое народнохозяйственное значение, поскольку 80% площадей сельскохозяйственных угодий в мире отводятся для производства корма скоту и птице.

Микроорганизмы способны накапливать высокий процент

легкоусваиваемого белка (до 90%), витамины, ферменты, микроэлементы и пр. Выращивание микроорганизмов – автоматизированный процесс, не требующий наличия больших площадей под выращивание технических культур. Особую роль в кормопроизводстве выполняют витамины и ферменты, которые способны значительно повысить биодоступность используемых кормов. Используемые силосные закваски способствуют качественному процессу консервации заготавливаемых кормов, препятствуют развитию гнилостной микрофлоры и порче корма.

В настоящее время методы биотехнологии начинают все шире проникать в практику разведения насекомых, рыб, крупного рогатого скота, других домашних животных. Широкое распространение получил метод трансплантации эмбрионов – это биотехнологический метод воспроизводства, заключающийся в получении одного или нескольких эмбрионов из матки племенных животных (называемых донорами) и пересадке их в матку менее ценных животных (реципиентов), где эмбрионы развиваются до родов.

С помощью пересадки эмбрионов можно резко увеличить численность ценного потомства. Метод трансплантации эмбрионов открывает широкие возможности для манипуляций с генетическим материалом. Оказалось, что в оплодотворенную яйцеклетку методов микроинъекции можно ввести чужеродный ген. Например, самке мыши вводилась яйцеклетка с геном, определяющим образование гормона роста. В результате была получена мышь в два раза большего размера. Разработан метод криоконсервирования эмбрионов. Этот метод позволяет: хранить ценный в племенном отношении материал; дает возможность вести международную торговлю ценными формами сельскохозяйственных животных; используется для сохранения наследственного материала животных, находящихся под угрозой исчезновения. Только с развитием биотехнологии и, в частности, генетической инженерии возникли предпосылки для надежды на успех в получении генетически одинаковых копий выдающихся животных, то есть на возможность осуществления клонального размножения эмбрионов, подобно клональному микроразмножению растений.

Процесс заключается в следующем. Если на стадии четырех клеток из эмбриона удалить отдельные клетки и каждую из них снова культивировать до стадии четырех клеток, то получится уже 16 эмбрионов. При повторении процесса четыре раза можно было бы получить 40–96 одинаковых в генетическом отношении эмбрионов. Культивирование этих эмбрионов до стадии, когда их можно заморозить, позволило бы в дальнейшем пересадить их 4 тыс. реципиентов. По сравнению с химической технологией биотехнология

имеет следующие основные преимущества: возможность получения специфичных и уникальных природных веществ, часть из которых (например, белки, ДНК) еще не удастся получать путем химического синтеза; проведение биотехнологических процессов при относительно невысоких температурах и давлениях; микроорганизмы имеют значительно более высокие скорости роста и накопления клеточной массы, чем другие организмы. Например, с помощью микроорганизмов в ферментере объемом 300 м³ за сутки можно выработать 1 т белка (365 т/год). Чтобы такое же количество белка в год выработать с помощью крупного рогатого скота, нужно иметь стадо 30 000 голов. Если же использовать для получения такой скорости производства белка бобовые растения, например, горох, то потребуется иметь поле гороха площадью 5400 га. В качестве сырья в процессах биотехнологии можно использовать дешевые отходы сельского хозяйства и промышленности; биотехнологические процессы по сравнению с химическими обычно более экологичны, имеют меньше вредных отходов, близки к протекающим в природе естественным процессам; как правило, технология и аппаратура в биотехнологических производствах более просты и дешевы. В качестве продуцентов белка кормового и пищевого используются микроорганизмами (дрожжи, бактерии, плесени, одноклеточные водоросли). При этом в качестве субстрата применяются отходы сельского хозяйства – солома, сточные воды. Резервом получения кормового белка является микроскопические водоросли (хлореллы) (с 1 га поверхности водоема – до 16 тонн белка).

Антибиотики. Часто медицинские антибиотики действуют и как ветеринарные препараты. Но государственные органы стараются не использовать медицинские антибиотики для животных. Применение медицинских антибиотиков для лечения животных создает риск действия остаточных концентраций их в мясе на «привыкание» (резистентность) болезнетворных микроорганизмов к этим антибиотикам и в дальнейшем – неэффективность их действия при заболеваниях человека. Поэтому только антибиотики-ветераны, такие, как хлортетрациклин или биомицин, входят в ассортимент кормовых антибиотиков. Кормовые витамины используют для некоторых видов животных. Здесь аналогия с медициной полная. Ростовые гормоны в животноводстве играют гораздо большую роль, чем в медицине. Если в применении к человеку они направлены на немногочисленную популяцию лилипутов, то у животных они ускоряют нарастание мышечной массы при откорме. Это не стероидные гормоны, которые сейчас ограничены в применении, а природные белковые, биосинтез которых налажен с помощью генно-инженерных микроорганизмов-продуцентов. Примерно 50 лет тому назад вещества, ускоряющие рост

животных, относились к области фантастики.

Например, в книге «Патент АВ» рассказывается об ученом, который ввел подобный препарат новорожденному котенку. Этот котенок рос так быстро, что съел сначала своих братьев и сестер, потом маму, потом охотился за собаками и, превратившись по размерам почти в тигра, стал опасным и для всего населения города. Современные ростовые гормоны ускоряют рост до размеров нормальной взрослой особи, не более.

Кормовые аминокислоты. Из 20 аминокислот незаменимыми для человека являются 8: изолейцин, лейцин, лизин, метионин, треонин, триптофан, валин, фенилаланин. Для сельскохозяйственных животных к незаменимым относятся также гистидин и аргинин, а для молодняка птицы – пролин. Эти незаменимые аминокислоты не синтезируются организмом, а вносятся с кормом. При этом соотношение разных аминокислот должно примерно соответствовать соотношению их в белке мяса, яиц, молока животных (в зависимости от направления животноводства), а для человека – в белке женского молока. Если какая-то аминокислота имеет концентрацию гораздо большую, чем нужно по соотношению, прирост массы животного не изменится при кормлении такой смесью. Избыток оказывается «лишним». И наоборот, если концентрация какой-то одной аминокислоты будет меньше нужной по соотношению, то рост животного будет определяться именно этой аминокислотой. В биологии это называют «принципом Либиха» по имени немецкого ученого, сформулировавшего этот принцип. Вернемся к кормам. В белке зерна пшеницы (глютене) много различных аминокислот, но одна из них имеет концентрацию, на 30–40 % меньше нужной по соотношению Либиха. Эта аминокислота – лизин. Если ее добавить к корму, состоящему из зерна пшеницы, в относительно небольшом количестве, то белок станет почти в полтора раза более полноценным, и на таком сбалансированном корме соответственно будет в полтора раза больший рост животного без изменения количества самой пшеницы. Чтобы получить тот же эффект без добавок лизина, нужно впустую израсходовать в полтора раза больше зерна.

Силосные закваски. Для сохранения скошенной травы и увеличения ее питательной ценности в силосные ямы наряду с травой вводят специальные закваски – смесь микроорганизмов, создающую возможность в зимнее время кормить животных даже более ценным, чем исходный, растительным кормом.

Пробиотики. Это полезные микроорганизмы пищеварительного тракта животных, которые в некоторых случаях (для молодняка) добавляют в виде живого биопрепарата в корм. Имеются также попытки в качестве микроорганизмов-пробиотиков добавлять в корм курам,

свиньям микрофлору, выделенную из желудка грызунов, лосей, бобров, умеющих перерабатывать древесину как питательный субстрат. Это позволяет повысить усвояемость грубых кормов животным с односегментным желудком.

В области **растениеводства, биотехнология** занимается выведением сортов растений, устойчивых к неблагоприятным факторам; разработкой биологических средств борьбы с сорняками, грызунами, фитопатогенными грибами, бактериями и вирусами; получением бактериальных удобрений; разработкой микробиологических методов рекультивации почв; получением трансгенных растений; переработкой отходов и побочных продуктов растениеводства.

Возделываемые культуры растений подвержены негативному влиянию ряда факторов – сорняков, грызунов, насекомых-вредителей, нематод, фитопатогенных грибов, бактерий, вирусов, неблагоприятных погодных и климатических условий. Влияние перечисленных факторов способно значительно снизить урожайность возделываемых культур, а значит уменьшить потенциальную прибыль. Так, например, только один колорадский жук и Фитофтора (*Phytophthora*) – возбудитель фитофторозной гнили, способны на 40-50 % снизить урожайность картофеля. Отмечен рост количества заболеваемости растений вирусными инфекциями, которые не только губят урожай, но и способствуют вырождению генофонда.

Современная биотехнология предлагает ряд решений, способных значительно облегчить решение ряда проблем:

- выведение сортов растений, устойчивых к вредителям и неблагоприятным факторам среды;
- разработка биологических средств борьбы с вредителями, использование их естественных врагов и паразитов, а также токсических продуктов, образуемых живыми организмами;
- повышение продуктивности сельскохозяйственных культур и их пищевой (кормовой) ценности.

Выведение новых сортов растений. Традиционные методы по выведению новых сортов – это селекция на основе гибридизации, спонтанных и индуцированных мутаций. Современная наука шагнула намного дальше и позволяет конструировать генетический код растения для получения необходимых свойств – урожайность, устойчивость к факторам среды и вредителям, накопление тех или иных компонентов. Уже сегодня выведены сорта, способные к фиксации атмосферного азота, устойчивые к действию гербицидов и ряда вредителей. Разработанные технологии клонирования позволяют надеяться на

получение здоровых (без вирусов) растений, тем самым способствуют поддержанию ценного генофонда.

При этом существует ряд спорных методов, связанных с вмешательством в генетический код – получение так называемых ГМО. До сегодняшнего дня нет достоверных данных о безопасности генетически модифицированных организмах. По мнению специалистов ЭкоВсё, использование ГМО в перспективе будет возможно, при этом процесс исследования вновь получаемых организмов должен быть сильно усложнен, мало того – исследовать необходимо каждую генетическую модификацию, даже в рамках одного сорта. Обязательным условием являются исследования о влиянии ГМО на организм в динамике (на протяжении ряда поколений). Еще одним условием получения ГМО является безопасность используемых методов для окружающей среды, т.к. используемые методики и сами ГМО, являясь чужеродным для природы материалом, могут спровоцировать непредсказуемые последствия. Проблема здесь заключается в том, что, попадая в природные условия, ГМО сталкиваются с вирусами, которые в норме являются векторами переноса генетического материала, что может спровоцировать появление новых, непредсказуемых и чрезвычайно опасных генетических мутаций. Таким образом, использование ГМО – это дело далекого будущего. Использование ГМО в России сегодня нецелесообразно ввиду больших резервов земельных ресурсов, возможности применения биологических методов и препаратов, способных значительно повысить урожайность и устранить ряд существующих проблем.

Биологические средства – важная составная часть комплексной программы защиты растений. Эта программа предусматривает проведение защитных мероприятий агротехнического, биологического и химического плана наряду с использованием устойчивых сортов растений. Задачей комплексной программы является поддержание численности вредителей растений на экологически сбалансированном уровне, не наносящем ощутимого вреда культурным растениям.

Применение методов биотехнологии в селекции, семеноводстве

На сегодняшний день рост урожайности сельскохозяйственных культур на 30–40 %, а для кукурузы на 50 % обусловлен успехами селекции. Исследования последних лет убедительно показывают, что методы культуры тканей клеток и протопластов растений играют значительную роль при создании новых образцов растений. Отбором новых форм растений на уровне клетки занимается клеточная селекция, благодаря которой возможно ускорять селекционный процесс, исключать сезонность в работе, увеличивать объем экспериментального

материала, так как при переходе на клеточный уровень можно в одном опыте использовать до десятков миллионов клеток. Методом клеточной селекции были получены растения табака с более крупными листьями и стеблями; созданы формы картофеля, сочетающие высокую урожайность с устойчивостью листьев к фитофторозу. Гибридизация соматических клеток позволяет скрещивать формы и виды растений, для которых скрещивание половым путем невозможно. Методами соматической гибридизации были получены внутривидовые (петунии, дурмана), межвидовые (моркови, дурмана, картофеля), межродовые (томат х картофель, дурман х белладонна и др.) гибриды. Используя методы биотехнологии имеются возможности получать в условиях *in vitro* гаплоиды – растения с уменьшенным вдвое набором хромосом. Использование гаплоидов в селекции позволяет на 3–4 года сократить процесс получения гетерозисных гибридов. Эмбриокультура – выращивание зародыша, извлеченного из семени на искусственной питательной среде. Метод позволяет преодолевать постгамную (после оплодотворения) несовместимости при отдаленной гибридизации. Использование методов генетической инженерии способствует получению трансгенных растений, в геном которых встроены гены других видов, например, сорта табака и др. растений, устойчивые к гербицидам.

Применение методов биотехнологии в семеноводстве

Используя методы культуры изолированных органов и тканей растений, можно получать в большом количестве оздоровленный (безвирусной) посадочный материал. Микрклональное размножение представляет собой массовое бесполое размножение растительных организмов, основанное на использовании метода культуры изолированных органов, тканей и клеток растений. Метод позволяет получать большое количество однородного посадочного материала. Например, одно растение герберы при размножении обычными способами может дать в год до 50–100 растений, а при микрклональном размножении – до 1 млн. ед. посадочного материала. Из одной верхушки побега яблони за 8 месяцев выращивают до 60 тыс. побегов. Из одного растения картофеля можно получить 14–15 тыс. растений в год. Такие технологии особенно актуальны для культур, размножаемых в производстве преимущественно вегетативно (картофель, плодовые, ягодные, декоративные, лесные растения). При длительном вегетативном размножении традиционными способами (черенками, луковичками, усами и т. д.) дочерние растения накапливают вирусную, бактериальную и грибную инфекцию, что снижает качество посадочного материала.

Применение методов биотехнологии для защиты сельскохозяйственных растений.

Основоположником микробиологического метода борьбы с вредными насекомыми является известный французский микробиолог Луи Пастер. В 1874 г. он предложил использовать бактерии против опасного вредителя винограда филлоксеры. Наряду с бактериями для борьбы с вредителями насекомыми применяются вирусы, так как вирусные болезни достаточно широко распространены среди насекомых. Могут быть использованы также биологически активные вещества самих насекомых – феромоны (влияют на обмен веществ других особей того же вида, выделяются в окружающую среду), ювенильный гормон (предотвращает превращение личинки в куколку), гормон линьки и др.

В современном сельскохозяйственном производстве практически невозможно обойтись без гербицидов. И хотя гербициды нового поколения высокоэффективны в низких концентрациях и быстро разрушаются в почве, они не являются селективными и ингибируют рост как сорняков, так и культурных растений. Большинство гербицидов действуют на растения путем инактивации жизненно важных ферментов, связанных с фотосинтезом или другими биосинтетическими путями. Исходя из механизмов действия гербицидов на растения разработано три основных генно-инженерных подхода к созданию гербицидо-устойчивых растений:

- модификация растительного фермента мишени, в результате которой он теряет чувствительность к гербициду;
 - индуцирование повышенного синтеза фермента без нарушения его нормального метаболизма;
 - введение в геном растения фермента, способного деградировать и детоксицировать гербицид в растении.
- При возделывании устойчивой к Раундапу сои большинство фермеров ограничивается лишь одной обработкой посевов этим гербицидом, традиционные же сорта требуют многократной обработки несколькими видами гербицидов. При этом затраты на химические средства защиты значительно сокращаются. Многие насекомые, а также болезни, вызываемые грибной, бактериальной и вирусной инфекцией, наносят большой ущерб сельскохозяйственному производству. Хозяйства вынуждены тратить большие средства на закупку различных химических средств для борьбы с вредителями и патогенами. При этом вносимые химикаты загрязняют окружающую среду, оказывают вредное влияние на млекопитающих и полезных насекомых. Поэтому поиск и создание с помощью генноинженерных методов устойчивых к вредителям и

болезням форм растений сейчас одна из актуальнейших задач.

Известно, что бактерия *Bacillus thuringiensis* синтезирует белковые кристаллические структуры, обладающие сильным инсектицидным действием. Попадая в кишечник насекомых, белок расщепляется под действием протеаз насекомого до активного токсина, который и вызывает гибель насекомого. Известно и уже изолировано много различных Vt генов (cry гены), кодирующих инсектицидные белки, которые очень специфичны для различных видов насекомых. Важно подчеркнуть, что эти белки совершенно нетоксичны для млекопитающих, рыб, беспозвоночных и полезных насекомых. Созданные трансгенные растения баклажана полностью устойчивы к колорадскому жуку. Первый коммерческий сорт картофеля, устойчивого к колорадскому жуку, создан фирмой Монсанто путем введения в геном картофеля, модифицированного Vt гена cry III.

Активно ведутся работы по клонированию генов и созданию трансгенных растений, устойчивых к грибным, бактериальным и вирусным инфекциям.

Применение методов биотехнологии для решения проблемы азотфиксации

Атмосферный азот могут усваивать особые микроорганизмы, называемые азотфиксаторами. К их числу, прежде всего, относятся клубеньковые бактерии. На 1 га посевов бобовых культур фиксируется от 100 до 250 кг атмосферного азота. Часть азота используется бобовыми для синтеза азотсодержащих соединений (аминокислот, нуклеиновых кислот, белков, азотистых оснований) и около 30 % усвоенного азота остается с пожнивными остатками в почве, что обеспечивает ее плодородие. В природе существуют и свободноживущие азотфиксаторы. В 1894 г. С. Н. Виноградский впервые выделил азотофиксирующую бактерию рода *кlostридиум*. Азотобактер еще активнее фиксирует атмосферный азот, а также сине-зеленые водоросли (цианобактерии) (до 50 кг N с 1 га).

Перед учеными поставлена задача – перенести гены азотфиксации из микроорганизмов в небобовые растения для придания им способности к усвоению атмосферного азота. Успешное решение этой проблемы открывает поистине фантастические возможности: пшеница, хлопчатник, подсолнечник, сахарная свекла смогут обходиться без внесения минерального азота, поскольку сами будут обеспечивать свои потребности в этом элементе. Работы в этой области стали возможны благодаря достижениям генетической инженерии. Однако система по переносу генов азотфиксации очень сложна, так как за этот процесс ответственны 17 нифгенов. Тем не менее, этот путь повышения

продуктивности растений имеет перспективу в будущем. Уже делаются попытки ввести гены бобовых растений в зерновые культуры. Более реально на сегодняшний день – это применение бактериальных удобрений, представляющих собой препараты, содержащие почвенные микроорганизмы. Внесение их в почву улучшает корневое питание растений.

В качестве бактериальных удобрений особенно часто используются препараты клубеньковых бактерий. Наиболее перспективная форма таких препаратов – это ризоторфин, представляющий собой простерилизованный гамма-излучением торф, пропитанный клубеньковыми бактериями. Достоверна прибавка урожая зернобобовых культур от обработки семян ризоторфином составила в среднем от 1,5 до 3,5 ц/га, зеленой массы – 18 ц/га, сена – до 7 ц/га. Развитие биотехнологии положительно сказалось на получении бактериального препарата азотобактерина, производимого на основе использования свободноживущего микроорганизма азотобактера. В опытах с кукурузой было установлено, что заражение семян азотобактерином увеличивает урожай на 14–18 ц/га. При этом сбор белка с 1 га возрастает соответственно с 39 до 53 кг (в пересчете на азот).

Применение методов биотехнологии для повышения плодородия почв и продуктивности растений

Быстрый рост народонаселения в мире, сокращение пахотных земель делают все более острыми вопросы производства продуктов питания. Генно-инженерные биотехнологии в сочетании с другими агроприемами способны помочь решить проблемы обеспечения людей продуктами питания в 21 веке. В последние годы большое значение приобретают работы по созданию растений, устойчивых к таким факторам среды, как холод, засуха, засоление почвы, повышенное содержание азота, тяжелых металлов и др. Перспективным в плане улучшения фотосинтетических способностей может быть обмен различными компонентами фотосистем между различными растениями. Возможен обмен или модификация генов, кодирующих карбоксилазу, с целью более интенсивной фиксации CO_2 из воздуха.

1.2. Производство кормового белка

Дрожжевые клетки в качестве источника углерода для роста

способны использовать неразветвленные углеводороды с числом от 10 до 30 углеродных атомов в молекуле. В основном они представлены жидкими фракциями углеводородов нефти с температурой кипения 200–320 °С. Эти фракции углеводородов нефти могут быть получены низкотемпературной кристаллизацией, карбомидной депарафинизацией и адсорбцией на молекулярных ситах (цеолитах). В России первый завод по производству кормовых дрожжей из жидких парафинов нефти вступил в действие в 1971 г. В нашей стране и других странах СНГ из н-парафинов нефти производят большое количество кормовых дрожжей (свыше 1 млн. т). При выращивании дрожжей на н-парафинах нефти в приготовленную из них питательную среду добавляют макро- и микроэлементы, необходимые витамины и аминокислоты. Высушенная дрожжевая масса гранулируется и используется как белково-витаминный концентрат (БВК), содержащий до 50–60% белковых веществ, для кормления сельскохозяйственных животных. Хорошим субстратом для выращивания кормовых дрожжей является молочная сыворотка – производственный отход при переработке молока. В 1 т молочной сыворотки содержится около 10 кг белка и 50 кг лактозы. Разработана эффективная технология выделения из молочной сыворотки белков методом ультрафильтрации низкомолекулярных веществ через мембраны. Эти белки используют для приготовления сухого обезжиренного молока. Жидкие отходы, остающиеся после отделения белков (пермеат), могут быть переработаны путем культивирования дрожжей в обогащенные белками кормовые продукты. В качестве источников углерода дрожжевые клетки могут использовать и низшие спирты — метанол и этанол, получаемые в биотехнологии из природного газа или растительных отходов. Дрожжевая масса, полученная после культивирования дрожжей на спиртах, содержит больше белков (56–62 % от сухой массы) и меньше вредных примесей, чем кормовые дрожжи, выращенные на н-парафинах нефти, такие, как производные бензола, D-аминокислоты, аномальные липиды, токсины и канцерогенные вещества. Кроме того, кормовые дрожжи имеют повышенное содержание нуклеиновых кислот – 3–6% от сухой массы, которые в этой концентрации вредно воздействуют на организм животных. В результате их гидролиза образуется много пуриновых оснований, превращающихся затем в мочевую кислоту и ее соли, которые могут быть причиной мочекаменной болезни, остеохондроза и других заболеваний. Тем не менее, кормовые дрожжи хорошо усваиваются и перевариваются в организме животных, а по содержанию таких аминокислот, как лизин, треонин, валин и лейцин, значительно превышают многие растительные белки. Вместе с тем белки дрожжей частично не сбалансированы по метионину, в них мало цистеина и

селенцистеина. Оптимальная норма добавления Дрожжевой массы в корм сельскохозяйственных животных обычно составляет не более 5–10 % от сухого вещества. Наряду с технологией использования дрожжевых белков в качестве кормовой добавки в рационы сельскохозяйственных животных разработаны технологии получения из них пищевых белков. В некоторых странах пивные и пищевые дрожжи (*Saccharomyces cerevisiae*, *Candida arborea*, *C. utilis*) широко используют в качестве белковых добавок к различным пищевым продуктам. Дрожжевой белок позволяет повысить питательную и витаминную ценность пищевых продуктов, улучшить их вкус и аромат. Так, разработана рецептура приготовления сосисок из мяса индейки с добавлением 25 % белка, дрожжевого хлеба и лапши с частичной заменой муки – до 5 % (США). В результате ферментации дрожжевыми клетками глюкозы, получаемой из кукурузного крахмала, синтезирован белковый продукт мукопротеин, используемый при производстве колбас в качестве замены основного сырья (Великобритания).

Очень полезными продуктами являются ацидофильно-дрожжевое молоко и творог, сделанный из него. Технология получения творога включает следующие этапы. В цельное молоко с 2 % сахара вносят 3 % суточной культуры дрожжей и выдерживают 14–17 часов при температуре 32–33°C. Полученную закваску добавляют в молоко и выдерживают до свертывания при температуре 33 °C еще 5–6 часов. Такой творог богат витаминами В₁, В₂, С и др. Представители 14 видов дрожжей рода *Candida* утилизируют молочную сыворотку для получения биомассы, богатой витаминами и белком. Способность некоторых видов дрожжей (*Rhodotorula glutinis*) продуцировать каротиноиды нашла применение в производстве пищевых красителей. Колбасные изделия с добавлением микропротеина рекомендованы больным, страдающим диабетом и другими хроническими заболеваниями.

Важный резерв пищевого белка и витаминов – остаточные пивные дрожжи *Saccharomyces carlsbergensis*. Организм человека усваивает свыше 90 % всех питательных веществ, содержащихся в них. В составе этих дрожжей обнаружено около 14 витаминов, причем, на долю витамина В, приходится 10 мг%, витамина В₂ – 3 мг% они характеризуются хорошей сбалансированностью незаменимы; аминокислот, белка (не менее 48 %). Пивные дрожжи могут с успехом применяться при производстве колбас в качестве заменителя казеина; они повышают биологическую и витаминную ценность колбас, улучшают их вкус, аромат и другие показатели. Пивные дрожжи применяют в пищевой промышленности для «ароматизации» мяса, творога и изделий из них. Как правило, биомасса дрожжей при

переработке в пищевой белок тщательно очищают.

Сначала разрушают стенки дрожжевых клеток путем механической, щелочной, кислотной или ферментативной обработки с последующей экстракцией гомогенной дрожжевой массы подходящим органическим растворителем. После такой очистки от органических и минеральных примесей дрожжевой продукт обрабатывают щелочным раствором для растворения белков. Далее белковый раствор, отделенный центрифугированием от оставшейся массы дрожжей, подвергают диализу. Очищенные от низкомолекулярных примесей белки осаждают, высушивают и используют в качестве белковых добавок в различные пищевые продукты: сосиски, паштеты, мясные и кондитерские начинки.

Белки дрожжей применяют также при получении искусственного мяса. Для этого их нагревают с последующим быстрым охлаждением или продавливанием белковой пасты через отверстия малого диаметра. В белковую пасту добавляют полисахариды и другие компоненты. Известно более 30 видов бактерий, которые могут быть применены в качестве источников полноценного кормового белка. Бактериальные белковые концентраты с содержанием сырого белка 60–80% (от сухой массы) – ценные препараты в кормопроизводстве. Следует отметить, что бактерии значительно быстрее, чем дрожжевые клетки, наращивают биомассу и, кроме того, белки бактерий содержат больше цистеина и метионина, что позволяет отнести их в разряд белков с высокой биологической ценностью. Источником углерода при культивировании бактерий могут служить природный и попутный газы, водород, а также спирты – метанол, этанол, пропанол. Чаще всего на газовых питательных средах выращивают бактерии рода *Methylococcus*, способные утилизировать до 85–90% метана в специальных ферментерах. Однако производство кормового белка из газообразных продуктов довольно сложно и дорогостояще. Более широко применяется технология выращивания бактерий на метаноле, который легко получают путем окисления метана. При культивировании на питательной среде с метанолом наиболее часто используют бактерии родов *Methylomonas*, *Pseudomonas*, *Methylophilus*. Масштабное производство кормовых белков на основе использования метанола впервые было организовано в Великобритании. Концерном «Ай-Си-Ай» выпускается кормовой белковый препарат прутин (коммерческое название). В России также разработана технология получения препарата из метанола под названием меприн. В этом препарате содержится до 74 % белков (от сухой массы), до 5 % липидов, 10% минеральных веществ, 10 —13 % нуклеиновых кислот. В настоящее время разрабатывается технология получения кормового белка из этанола на основе

культивирования бактерий рода *Acinetobacter* (препарат эприн). К числу бактерий с высокой интенсивностью синтеза белков следует отнести и водородокисляющие бактерии, способные накапливать в клетках до 80% сырого белка (в расчете на сухую массу). Для их культивирования в составе газовой среды обычно содержится 70–80 % водорода, 20–30 % кислорода и 3–5 % CO_2 . Производство кормового белка на основе использования водородокисляющих бактерий может быть организовано вблизи химических предприятий. Кормовой белок бактериального происхождения добавляют в комбикорма в количестве 2,5–7,5% от белка рациона сельскохозяйственных животных, а при кормлении взрослых свиней – до 15 %

При дефиците белка в рационе в организме животных развиваются глубокие негативные изменения: отрицательный азотистый баланс, гипопроteinемии, нарушения коллоидно-осмотического и водно-солевого обмена, анемии различной формы, нарушения со стороны нервной, эндокринной и сердечно-сосудистой системы, сдвиги обмена веществ, остановка роста, истощение и т.д. Особенно тяжелые нарушения развиваются в молодом возрасте. Весьма опасно не только полное отсутствие белка в пище, но и недостаточное поступление его в организм или поступление некачественного белка. Белок корма должен содержать все аминокислоты, особенно незаменимые, быть по составу близок аминокислотному составу белков организма и легко перевариваться в желудочно-кишечном тракте. Недостаток кормового белка в масштабах планеты по данным ФАО ООН оценивается примерно в 30 млн. т. в год. Коренным образом изменить эту ситуацию возможно лишь биотехнологическим путем. Причем, продуцентами кормового белка могут быть бактерии, дрожжи, микроскопические водоросли, микро- и макробиоты.

Преимущества производства биомассы с помощью микробного синтеза (перед другими источниками белка):

1. высокая скорость накопления биомассы, которая в 500 – 5000 раз выше, чем у растений или животных;
2. микробные клетки накапливают большое количество белка (дрожжи – до 60 %, бактерии – до 75 % по массе);
3. в производстве микробного белка отсутствует многостадийность; 4) процесс биосинтеза протекает в мягких условиях при температуре 30–45°C, pH 3–6 и давлении $\approx 0,1$ МПа;
4. процесс менее трудоемок по сравнению с получением сельскохозяйственной продукции и органическим синтезом белков.

Дрожжи. Их легко выращивать в производственных условиях; они быстро растут и размножаются практически на любых субстратах; устойчивы к контаминантной микрофлоре; содержат белка больше, чем

зерно злаковых культур, несколько уступая лишь по аминокислотному составу протеину молока и рыбной муки; богаты витаминами (тиамин, рибофлавин, пантотеновая кислота, никотиновая кислота, пиридоксин, фолиевая кислота, а также холин, инозит и др.); содержат микроэлементы и значительное количество жира, в котором преобладают ненасыщенные жирные кислоты. Так, 1 кг кормовых дрожжей содержит 1,03–1,16 кормовых единиц. К недостаткам дрожжей относят толстую клеточную стенку и большое количество нуклеиновых кислот.

Бактерии. Для них характерна высокая скорость роста; содержание белка в биомассе составляет 70 - 80 % при значительном количестве метионина; они легко поддаются селекции, что позволяет получать высокопродуктивные штаммы. Их недостатками являются трудная осаждаемость, вследствие малых размеров клеток; значительная чувствительность к инфекциям, особенно фаговым; высокое содержание в биомассе нуклеиновых кислот.

Водоросли. Микроскопические водоросли как фототрофы для образования своей биомассы используют только углекислый газ атмосферы. Так, с 0,1 га поверхности прудов можно получить столько же белка, сколько с 14 га посевов фасоли. В настоящее время особое внимание привлекает сине-зеленая водоросль спирулина (*Spirulina platensis* и *Spirulina maxima*). Биомасса ее соответствует лучшим стандартам пищевого белка, в ней достаточно витаминов А, D, а также группы В. В качестве кормовых добавок применяют также препарат спирустим, изготавливаемый из одноклеточных синезеленых водорослей *Spirulina platensis*, хлореллу. Новой добавкой к рациону является гипергалинная аквакультура (ГАК) Сиваша, которая включает микроводоросли, продукты их переработки, а также цисты, яйца, личинки, куколки и взрослые формы гидробионтов и галофильных насекомых, которые обитают в акватории высокой солености.

Для получения кормового белка используют одноклеточные водоросли *Chlorella* и *Scenedesmus*, синезеленые водоросли из рода *Spirulina*, способные синтезировать белки из диоксида углерода, воды и минеральных веществ за счет энергии солнечного света. Водоросли для своего развития нуждаются в определенных режимах освещения и температуры и в больших объемах воды. Обычно их выращивают в естественных условиях южных регионов в бассейнах открытого типа. Водоросли хлорелла и сценедесмус нуждаются в нейтральной среде, их клетки имеют довольно плотную целлюлозную стенку, вследствие чего они хуже перевариваются в организме животных, чем спирулина, которую выращивают в щелочных озерах (рН 10–11). При выращивании водорослей в культиваторах открытого типа с 1 га водной поверхности

можно получать до 70 т сухой биомассы в год, что превышает выход биомассы при возделывании пшеницы, риса, сои, кукурузы. Содержание белков в клетках *Clorella* и *Scenedesmus* составляет около 55 % (в расчете на сухую массу), а в клетках *Spirulina* – 65 %. Белки водорослей хорошо сбалансированы по содержанию незаменимых аминокислот, за исключением метионина. В клетках водорослей, кроме того, синтезируется довольно много полиненасыщенных жирных кислот и (3-каротина (до 150 мг%). Белковая масса из клеток водорослей поступает в производство в виде суспензии, сухого порошка или пастообразного препарата. Процесс отделения клеток водорослей от массы воды чрезвычайно трудоемкий. Суточная норма суспензии хлореллы при кормлении молодняка крупного рогатого скота – 3–6 л, взрослых животных – 8–10 л. В связи с тем, что биомасса *Spirulina* характеризуется высоким содержанием белков (до 70 % сухой массы), хорошо сбалансированных по аминокислотному составу, ее используют для приготовления продуктов питания и кондитерских изделий. Добавление этой водоросли в корм тутового шелкопряда (листья шелковицы) значительно увеличивает выход шелка и его качество.

Грибы. Важным источником высококачественного белка могут быть как низшие, так и высшие грибы. Высокая питательная ценность плодовых тел высших грибов известна давно. Однако их валовой сбор в природных условиях, естественно, не может удовлетворить все возрастающие потребности в белке. Поэтому были сделаны попытки культивирования в промышленных условиях мицелия макромицетов. Благодаря микромицетам крахмалсодержащая пища обогащается белком и становится подобной мясным продуктам. Однако, по сравнению с эталонным белком, белки грибов лимитированы по сумме аминокислот, содержащих серу (цистеин и метионин). Вместе с тем они богаты лизином – основной аминокислотой, недостающей в белке зерновых культур. Это позволяет на основе зерна и грибной биомассы составлять сбалансированные кормовые смеси. В биомассе многих микроскопических грибов хорошо сбалансированы по аминокислотному составу белки; они включают также витамины и липиды. По своим питательным свойствам белки грибов приближаются к белкам сои и мяса, что позволяет использовать их не только для приготовления кормовых концентратов, но и как добавку в пищу человека. Источником углерода для промышленного выращивания микроскопических грибов служат растительные отходы, содержащие клетчатку, гемицеллюлозы, лигнин, а также торф и навоз. Образцы колбас, выработанные с применением микроскопических грибов, характеризуются высокой степенью перевариваемости белковых веществ *in vitro* за счет активных пепсина и трипсина. Обычно

микробная биомасса добавляется в изделия из рубленого мяса в количестве 5–15%. Такой гриб, как *Penicillium roqueforti*, широко используется при производстве сыров, в частности сыра рокфор; он применяется свыше 100 лет. В Великобритании создан пищевой продукт, основным компонентом которого является белок грибного происхождения (*Ftisarium graminearum*) – микопротеин на дешевом глюкозном сиропе, полученном путем гидролиза пшеничного или кукурузного крахмала. Микопротеин – это аналог мяса, но по сравнению с белками животного происхождения лучшего качества по содержанию белка (44 %), минеральных веществ, витаминов и липидов. Хорошая перевариваемость грибной белковой массы в организме животных, а также низкий уровень содержания нуклеиновых кислот позволяют использовать ее в качестве кормовой добавки в большей концентрации, чем кормовые дрожжи. При кормлении взрослых животных возможна замена в корме 50 % растительного белка на грибной. В зависимости от способа подготовки растительного сырья для культивирования микроскопических грибов применяют и соответствующие технологии их выращивания. Более высокий коэффициент использования сырья достигается при выращивании грибов на гидролизатах растительных отходов и жидких отходах деревообрабатывающей и целлюлозно-бумажной промышленности по сравнению с их культивированием на твердой питательной среде. Содержание белков в грибной массе при использовании метода глубинного культивирования составляет 50–60 % от сухой массы. Для более полного использования сырья практикуется совместное культивирование грибов и бактерий.

Сырьевые источники для синтеза микробного белка весьма значительны и легко доступны. Для получения микробного белка необходим богатый углеродом, но дешевый субстрат.

Парафины нефти (н-парафины). Высокий выход биомассы (до 100 % от массы субстрата) обеспечивается большим содержанием углерода, а качество продукта – степенью чистоты парафинов. Если парафины очищены недостаточно, то дрожжевая биомасса содержит неметаболизируемые компоненты: производные бензола, D-аминокислоты, липиды с нечетным числом углеродных атомов в жирных кислотах, токсины белковой природы. Поэтому парафины нефти должны быть тщательно очищены. Дрожжи, выращенные на н-парафинах, используются в количестве 8–15 % от общего белка рациона для откорма крупного рогатого скота, свиней, овец и бройлеров.

Метанол. Его получают методом микробного синтеза из древесины, соломы, городских отходов. Сложность использования

метанола заключается в том, что молекула его содержит только один атом углерода, тогда как синтез большинства органических соединений осуществляется через двухуглеродные молекулы. Соединения же с нечетным числом атомов углерода, как правило, небезразличны для организма. В качестве продуцента используются бактерии рода *Methylomonas*. Метанол усваивают бактерии, дрожжи, грибы, актиномицеты. Получение белка на метаноле более экономично, чем при использовании н-парафинов. Например, продукт «Прутин» (Англия), содержащий 72 % сырого протеина, используется как высокобелковая добавка к комбикормам в рационах свиней, птицы, пушных зверей и в качестве заменителя молока для телят.

Этанол. Использование этанола как субстрата для микробного синтеза белка снимает проблему очистки биомассы от аномальных продуктов обмена с нечетным числом углеродных атомов. Стоимость производства этанола несколько выше, чем метанола. Разработаны технологические процессы получения белка на природном газе с использованием бактерий *Methylomonas*, усваивающих метан, *Nurmicrobium* и *Pseudomonas*, утилизирующих метанол и др.

Растительная биомасса. Содержит большое количество сахаров (целлюлоза, состоящая из остатков молекулы глюкозы; гемицеллюлозы, состоящие из остатков арабинозы, галактозы, маннозы, фруктозы, ксилозы). На жидкой, содержащей сахара фракции гидролизата, выращивают дрожжи. Для получения кормовых дрожжей используется также послеспиртовая барда, подсолнечная лузга, хлопковая шелуха, отходы производства лубяных волокон (костер льна и конопли), свекловичный жом, отходы картофелекрахмального производства, пивоваренной, плодовоовощной, консервной промышленности и др. В качестве сырья для гидролизной промышленности используется солома злаковых культур, которая обычно протеинизируется, например, дрожжеванием, или усвояемость соломы повышается действием ферментных препаратов (пектофоептидина ГЗх в комплексе с целловиридином ГЗх или глюкавамоорином Пх). Используются способы прямой биоконверсии растительной биомассы с помощью высших и низших грибов. С этой целью используются целлюлозоразрушающие грибы *Chaetomium cellulolyticum*, а также *Aspergillus niger*, *Trichoderma* и др.

Молочная сыворотка. Ежегодно в мире образуется около 200 млн. т молочной сыворотки. Каждая тонна сыворотки содержит 50 кг молочного сахара, до 10 кг высокоценного белка, 1,5 кг жира, а также витамины, микроэлементы и др. Использование сыворотки малоэффективно как для производства кормов, так и для скормливания животных. Это связано с тем, что степень утилизации молочной

сыворотки снижается по мере увеличения ее доли в рационе. Кроме того, при этом возникают расстройства пищеварения, а конверсия белка сыворотки в белок тела животного весьма незначительна. Это касается и сухой сыворотки, так как организм животного усваивает только 20% ее количества из-за неблагоприятного соотношения углеводов, белков и минеральных солей. В этом отношении более рациональным является производство молочно-белковых концентратов. При этом на основе белков сыворотки изготавливают заменители сухого обезжиренного молока, кормовые добавки и др.

Лактоза может быть источником энергии для многих видов микроорганизмов, сырьем для микробного производства белковой биомассы. Для ее получения чаще всего используют дрожжи. Установлено, что коэффициент конверсии белка сыворотки в микробный белок у дрожжей в 20 раз выше, чем степень преобразования его в животный белок. Кроме того, большинство видов дрожжей обогащает сыворотку витаминами. В качестве продуцентов применяют различные штаммы родов *Saccharomyces*, *Kluveromyces fragilis*, *Candida*, *Trichosporon*, *Torulopsis*.

Принципиальная технологическая схема выращивания кормовой биомассы

Чистую культуру в log-стадии переносят в малый посевной аппарат (500 л) с питательной средой, рН которой доводится аммиачной водой или известковым молоком до 5,5–5,8. Сначала в аппарат подают около 40 л среды, разбавляют ее в 4–4,5 раза стерильной водой и при интенсивной аэрации добавляют остальное количество питательной среды (80–100 л), рН среды – 4,5–5,5. Из качалочных колб вносят микробную суспензию объемом 1,5–2 л и производят культивирование до накопления в среде 3,5–4,0 г клеток/л по абсолютно сухому веществ (АСВ). Обычно для этого требуется 15–18 часов. Суспензия из малого посевного аппарата подается в аппарат объемом 4–5 м³, предварительно заполненный питательной средой (≈ 200 л) и стерильной водой (1,2–1,5 м³), включается аэрация и при постоянном доливе (70–75 л/ч) питательной среды и добавления аммиачной воды для поддержания заданного рН проводится культивирование 10–12 часов. Выращивание засевной культуры проводится в ферментаторе объемом 15–20 м³. Аппарат на 10 % по объему заполняется стерильной или кипяченой водой, туда же вводится около 0,5 м³ питательной среды и полностью перекачивается все содержимое предыдущего аппарата (2,5–2,7 м³). Выращивание посевного материала без отбора суспензии продолжается 8–9 часов при интенсивной аэрации и постоянном доливе питательной среды (170–200 л/ч) до накопления в ферментере биомассы в количестве

4–5 г АСВ/л. После этого засевную культуру начинают отбирать на основное производство в количестве 1,3–1,7 м³/ч при одновременном доливе питательной среды. Процесс ферментации длится от 5 до 10 суток, а затем цикл приготовления посевного материала возобновляется. К подготовительным стадиям производства относится приготовление растворов питательных солей и микроэлементов, необходимых для нормального развития микроорганизмов. Этот участок имеет свою технологическую схему. Минеральные компоненты группируют в два раствора, которые параллельно подаются в основной ферментатор: раствор всех микроэлементов (N, P, K), необходимое количество которых составляет 5–70 г/л; раствор микроэлементов (Mg, Mn, Fe, Zn и др.), концентрации которых не превышают 5–10 мг/л.

Технологические потоки из всех подготовительных отделений (компримирование воздуха, хранение и подготовка сырья, получение засевной культуры, приготовление растворов питательных солей и микроэлементов, технологическая вода, аммиачная вода, стерильная культуральная жидкость) поступают на главную стадию производства – стадию ферментации. Основным аппаратом в этом отделении является ферментатор – аппарат полного смешения по жидкой фазе, обеспечивающий рост и развитие популяций микроорганизмов в объеме жидкой фазы; транспорт питательных веществ к клеткам микроорганизмов; отвод от микробных клеток продуктов их обмена; отвод из среды тепла. Затем следуют другие этапы технологической схемы получения кормовой биомассы:

- Сгущение суспензии микроорганизмов. При этом концентрация биомассы повышается до 12–16 % АСВ. Для этого используют сепараторы, а также флокуляцию, коагуляцию, флотацию или декантацию.

- Термообработка суспензии. При нагревании микроорганизмов до температуры 75–85°C в течение 10–40 мин происходит гибель штамма продуцента и практически всей сопутствующей микрофлоры.

- Концентрирование суспензии. Проводят в отделении выпаривания до концентрации 23–25 % АСВ. Для этого используется трехкорпусная вакуум-выпарная установка: I корпус – 90°C, II – 75 и III – 60 °C.

- Сушка. В этом отделении происходит образование готового продукта с влажностью ≈ 10 % (по массе). Для этого используются конвективные сушилки (распылительные, кипящего слоя, ленточные и барабанные).

Грануляция и сушка. Обычно сухая биомасса, содержащая 8–10 % (по массе) влаги представляет собой готовый продукт и после упаковки направляется на склад к потребителю. Если продукт необходимо получить в виде гранул, то сухая и влажная (после выпарки) биомасса в соотношении 1:1 поступает в гранулятор. При этом влажная биомасса налипает на сухие частицы и вся масса влажностью 45–50 % движется в аппарате, формируя гранулы, которые затем подаются в сушилку кипящего слоя. Гранулы подсушиваются до остаточной влажности 8–10 % (по массе) горячим воздухом или топочными газами с температурой 260–300°C;

– Фасовка и упаковка готового продукта. Сухая биомасса поступает в приемный бункер и фасуется в бумажные мешки с клапаном массой 25–30 кг. Эти мешки укладываются на специальные поддоны, которые отвозят их на склад или отгружают потребителю.

1.3. Микробиологические методы производства аминокислот

Производство лизина. По содержанию лизина наименее сбалансированы белки злаковых культур, у которых его дефицит

составляет от 20 до 50 %. На территории России недостаток лизина в кормах не может быть восполнен за счет сои, поэтому в нашей стране производство этой аминокислоты было организовано первым. Для удовлетворения потребностей животноводства в лизине крупнотоннажное производство налажено в Испании, Франции, Японии и США. В клетках микроорганизмов лизин синтезируется из аспарагиновой кислоты и служит конечным продуктом разветвленного метаболического пути биосинтеза, общего для трех аминокислот – лизина, метионина и треонина. Таким образом, в процессе новообразования аминокислот из общего предшественника одновременно с лизином возникают две другие аминокислоты – метионин и треонин.

У типичных продуцентов L-лизина – *Brevibacterium flavum* и *Corynebacterium glutamicum* – фермент аспартаткиназа, открывающий метаболический путь, является аллостерическим белком, чувствительным к ингибированию по принципу обратной связи при совместном и согласованном действии побочных продуктов L-треонина и L-лизина. При накоплении треонина и лизина в избыточной концентрации ингибируется аспартаткиназа и их синтез останавливается, при пониженной концентрации любой из двух аминокислот процесс активизируется. Чтобы добиться образования лизина в больших количествах получают мутанты двух типов. У мутантов первого типа не синтезируется или не функционирует гомосериндегидрогеназа, в результате чего блокируется синтез метионина и треонина. Такие мутанты являются ауксотрофами по гомосерину или треонину (метионину); внутриклеточная концентрация треонина у них существенно снижена, что снимает блокаду с аспартаткиназы. Поэтому при выращивании мутантных штаммов в среде, где присутствуют лимитирующие концентрации метионина и треонина, они способны образовывать избыточные количества лизина. Мутанты второго типа дефектны по структурному гену, детерминирующему конформацию аспартаткиназы. В итоге фермент теряет чувствительность к высоким концентрациям аллостерического ингибитора – лизина. Важный фактор, обеспечивающий в культуральной среде высокие концентрации аминокислоты, синтезированной внутри клетки, – проницаемость клеточных мембран. Проницаемость клеточной мембраны увеличивают либо с помощью мутаций, либо путем изменения состава питательной среды. В последнем случае в культуральной среде создают дефицит биотина (1–5 мкл/л), добавляют пенициллин (2–4 мкг/л), детергенты (твин–40 и твин–60) или производные высших жирных кислот (пальмитаты, стеараты). Биотин контролирует содержание в клеточной мембране фосфолипидов,

а пенициллин нарушает биосинтез клеточных стенок бактерий, что повышает выделение аминокислот в среду. Для культивирования штаммов микроорганизмов при производстве аминокислот как источники углерода наиболее доступны углеводы – глюкоза, сахароза и реже фруктоза и мальтоза. Для снижения стоимости питательной среды в качестве источников углерода используют вторичное сырье: свекловичную мелассу, молочную сыворотку, гидролизаты крахмала, сульфитные щелока. Технология этого процесса совершенствуется в направлении разработки дешевых синтетических питательных сред на основе уксусной кислоты (до 1,5%), пропионовой кислоты, метанола, этанола (до 1 %) и н-парафинов. В качестве источников азота применяют мочевины и соли аммония (сульфаты и фосфаты). Для успешного развития микроорганизмы нуждаются в стимуляторах роста, в качестве которых выступают экстракты кукурузы, дрожжей и солодовых ростков, гидролизаты отрубей и дрожжей, витамины группы В. Кроме того, в питательную среду добавляют необходимые для жизнедеятельности макро- и микроэлементы (Р, Са, Mg, Мп, Fe и др.). На процесс биосинтеза аминокислот существенное влияние оказывает снабжение воздухом, при этом степень аэрации индивидуальна для производства каждой конкретной аминокислоты. Стерильный воздух подается специальными турбинными мешалками. Опыты показали, что лизин появляется в культуральной среде начиная с середины экспоненциальной фазы роста культуры клеток микроорганизма и достигает максимума к ее концу. Поэтому на первой стадии технологического процесса формируют биомассу продуцента, которую выращивают в специальных посевных аппаратах в течение суток (рН 7,0–7,2; температура 28–30°C), а затем подают в производственный ферментер, заполненный питательной средой. Лизин начинает поступать в культуральную жидкость через 25–30 часов после начала ферментации. По завершении процесса ферментации (через 55–72 часа) жидкую фазу отделяют от культуры клеток микроорганизма фильтрованием и используют для выделения из нее лизина. Кроме высокоочищенных препаратов лизина получают иные виды его товарной формы: жидкий концентрат лизина (ЖКЛ), сухой кормовой концентрат лизина (ККЛ) и высококонцентрированные кормовые препараты, характеризующиеся относительно меньшей степенью очистки в сравнении с первым препаратом. Второй по значимости незаменимой аминокислотой для питания человека и животных является метионин, который получают преимущественно путем химического синтеза, что экономически более выгодно в сравнении с микробиологическим способом.

Производство триптофана. Триптофан достаточно часто является лимитирующим фактором питания, так как его содержание в традиционных продуктах (рыба, молоко, кормовые дрожжи) в 3 раза ниже, чем в стандартном белке. Подобно лизину триптофан образуется в ходе разветвленного метаболического пути, поэтому для его производства используют ауксотрофных мутантов, у которых блокированы реакции, ведущие к синтезу фенилаланина и тирозина. Однако при выращивании мутантных штаммов в среде с минимальной концентрацией этих аминокислот, не вызывающей регуляторных эффектов, избыточное накопление триптофана в среде не наблюдается, что объясняется особенностью процессов регуляции биосинтеза триптофана у микроорганизмов.

Наряду с другими ароматическими аминокислотами у микроорганизмов (подобно большинству организмов) триптофан образуется из метаболитов углеводного обмена – эритрозо-4-фосфата и фосфоенолпирувата.

В связи с этой особенностью промышленное производство триптофана организовано преимущественно по двухступенчатой схеме. На первом этапе химическим способом синтезируют антраниловую кислоту, которую с помощью энзиматической системы мутантных штаммов дрожжей *Candida utilis* переводят в триптофан. Биомассу дрожжей выращивают при температуре 30°C в среде, содержащей свекловичную мелассу, мочевины и минеральные компоненты. Через сутки в ферментер вводят 5 %-й спиртовой раствор антраниловой кислоты и 50 %-й раствор мочевины, а через 3–4 часа после введения предшественника дополнительно добавляют источник углерода (25 %-й раствор мелассы). Антраниловую кислоту и мочевины подают через каждые 6 часов, а мелассу – через каждые 12 часов. Процесс двухступенчатой ферментации завершается через 144 часа и обеспечивает содержание триптофана в культуральной среде до 6 г/л.

Кроме триптофана микробиологическим способом с использованием предшественников получают гистидин, изолейцин, метионин, серин и треонин. Менее распространены одноступенчатые технологии получения триптофана на основе ауксотрофных мутантов бактерии *Bacillus subtilis*, осуществляемые по схеме, близкой к способу получения лизина. Длительность одноступенчатого процесса 48 часов, а концентрация триптофана в культуральной среде составляет 10 г/л. После сушки культуральной жидкости получают кормовой концентрат триптофана (ККТ), который включает белки, свободный триптофан, витамины B₂, B₂ и РР. Высокоочищенные кристаллические препараты триптофана образуются после дополнительной очистки культуральной жидкости методом ионообменной хроматографии на колонке,

заполненной катионитом (сорбция при pH 1,0; элюция 5%-м раствором гидроксида аммония в смеси с пропанолом-2). Элюаты кристаллизуют; кристаллы отмывают и высушивают. Кристаллический препарат содержит до 99 % триптофана. Характерная особенность процессов получения аминокислот микробиологическим способом, равно как и других биотехнологических производств, – полное использование побочных продуктов, что превращает большинство из них в безотходные и экологически чистые технологии. Например, осадок микроорганизмов-продуцентов и промывные воды, содержащие ценные ингредиенты, такие, как белки, остатки аминокислот, витаминов, минеральных солей и микроэлементов, высушивают и используют в качестве кормовых препаратов.

Получение аргинина, глутаминовой кислоты, глутамина, треонина и пролина микробиологическим способом. Для получения аминокислот – конечных продуктов неразветвленных метаболических путей, например, аргинина, ауксотрофные мутанты не используют. В этом случае применяют мутанты с дефектами регуляции биосинтеза аминокислоты, т.е. регуляторные мутанты. Успешное производство с участием микроорганизмов таких аминокислот, как глутаминовая аминокислота, глутамин и пролин, обеспечивает стимуляция образования аминокислот в ответ на изменение условий внешней среды. Метаболическим предшественником при биосинтезе глутаминовой кислоты служит α -кетоглутаровая кислота, возникающая в цикле Кребса из изолимонной кислоты под действием изоцитратдегидрогеназы. При выращивании бактерий родов *Corynebacterium* или *Brevibacterium* на углеводном сырье (гидролизат крахмала, тростниковая или свекловичная меласса), на этаноле или ацетате и при дефиците биотина в культуральной среде накапливается глутаминовая кислота с концентрацией 30 г/л. Важнейшее условие для образования этой аминокислоты – подавление активности глутаматдегидрогеназы. При высоком содержании в среде биотина и солей аммония обеспечиваются условия для образования пролина, а при значительных концентрациях ионов аммония и ионов цинка в слабокислой среде – для синтеза глутамина.

Вопросы для самоконтроля

1. Каковы последствия недостатка или полного отсутствия белка в рационе животного?
2. Перечислите преимущества производства биомассы с помощью микробного синтеза.

3. Дрожжи и бактерии как нетрадиционные источники белка, их преимущества и недостатки.
4. Какие водоросли можно использовать в качестве кормовых добавок?
5. Грибы как перспективный источник кормового белка.
6. Парафины нефти как сырье для синтеза микробного белка.
7. Спирты как субстрат для микробного синтеза белка.
8. Использование растительной биомассы для культивирования продуцентов белка.
9. Технология выращивания засевной культуры для получения кормовой биомассы.
10. Охарактеризуйте главную стадию (стадию ферментации) и последующие этапы технологической схемы производства кормовой биомассы.

ТЕМА 2. ПИЩЕВАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ

Пищевая биотехнология является новым и перспективным направлением в перерабатывающей промышленности (мясная, молочная, рыбная и др.). Пищевая биотехнология изучает биотехнологический потенциал сырья животного происхождения и

пищевых добавок, в качестве которых используются новые ферментные препараты, продукты микробиологического синтеза, новые виды биологически активных веществ и много компонентные добавки.

Биотехнология пищевая (пищевая биоиндустрия) – раздел биотехнологии, занимающийся разработкой теории и практики создания пищевых продуктов общего, лечебно-профилактического назначения и специальной ориентации.

Классические виды брожения дополняются новыми применениями микробов в химических производствах. Из грибов получают каротиноиды и стероиды. Когда выяснилось, что *Corynebacterium glutamicum* из сахара и соли аммония с большим выходом синтезирует глутаминовую кислоту, были выделены бактерии и разработаны методы, с помощью которых можно в больших масштабах производить многие аминокислоты, нуклеотиды и реактивы для биохимических исследований.

Микроорганизмы используются химиками в качестве катализаторов для осуществления некоторых этапов в длинной цепи реакций синтеза; микробиологические процессы по своей химической специфичности и по выходу продукта превосходят химические реакции; ферменты, применяемые в промышленности, амилазы для гидролиза крахмала, протеиназы для обработки кож, пектиназы для осветления фруктовых соков и другие получают также из культур микроорганизмов. Все это и многое другое показывает огромный потенциал т.н. прикладной микробиологии и биохимии.

К важнейшим отраслям биоиндустрии следует отнести некоторые отрасли пищевой промышленности (широкомасштабное выращивание дрожжей, водорослей и бактерий для получения белков, аминокислот, витаминов, ферментов); сельское хозяйство (клонирование и селекция сортов растений, производство биоинсектицидов, выведение трансгенных животных и растений); фармацевтическую промышленность (разработка вакцин, синтез гормонов, антибиотиков, интерферонов, новых лекарственных препаратов); экологию – защиту окружающей среды и устранение загрязнений (очистка сточных вод, переработка хозяйственных отходов, изготовление компоста и др.). Биотехнология призвана не только совершенствовать традиционные методы, широко используемые в пищевой промышленности при производстве молочнокислых продуктов, сыра, пищевых кислот, алкогольных напитков, но и создавать современные технологии для синтеза полимеров, искусственных приправ, сырья (текстильная промышленность), для получения метанола, этанола, биогаза и водорода, для извлечения некоторых металлов из руд.

Этапы развития пищевой биотехнологии

Историю развития пищевой биотехнологии можно условно разделить на пять этапов:

Древнейший период. В условиях природных катаклизмов – землетрясения, потопа, оледенения, пожары – происходили мутации растений и животных. Люди отбирали лучшие из них и научились сохранять семена и потомство мутагенных животных и растений, таким образом, повышая урожайность и продуктивность.

В 60-х годах 19 века Грегор Мендель открыл законы расщепления признаков и независимого расщепления генов. Он проводил опыты с растениями и животными. Мендель развил теорию доминирования наследственных признаков.

70-е годы 20 века. Мюллер облучил рентгеном мушку дрозофилу и получил бескрылое потомство. Было доказано, что радиация, излучение – сильнейший мутаген (Чернобыль). Мутанты стали с успехом использоваться в растениеводстве для повышения урожайности.

80-е годы – новые растения стали выращивать с помощью культур клеток. В животноводстве были достигнуты большие успехи – самкам вводили гормоны, которые вызвали созревание большого количества яйцеклеток.

90-е годы. Развитие молекулярной биологии. Преодолен барьер видовой, половой несовместимости видов – новые виды животных, а также химеры. Доказана возможность конструирования ДНК.

В последние годы все большее влияние на здоровье населения планеты оказывает качество и структура питания. В 2009 г. опубликованы данные, что ежегодно в мире от недоедания и белково-калорийной недостаточности погибает 15 млн. человек. Структура питания населения России характеризуется продолжающимся снижением потребления наиболее ценных в биологическом отношении пищевых продуктов. Как следствие, на первый план выходят следующие параметры нарушения пищевого статуса.

Пищевая биотехнология – это отраслевая наука, которая на основании знаний микробиологии, биохимии, генетики, генной инженерии использует микроорганизмы и другие бактерии для производства молочнокислых пищевых продуктов и их сертификацию.

Задачи пищевой биотехнологии:

1. Получение пищевых и технологических добавок.
2. Использование биологического потенциала сырья животного происхождения с целью получения новых пищевых компонентов.
3. Получение новых пищевых продуктов белкового происхождения.
4. Широкое использование молочнокислых продуцентов в

пищевой биоиндустрии.

5. Использование генно-модифицированного сырья для производства новых ферментных препаратов пищевого происхождения.

6. Использование для пищевых целей продуктов микробного синтеза.

7. Получение высококачественных продуктов в процессах брожения и ферментации.

8. Создание продуктивных штаммов, микроорганизмов и внедрение новых методов в пищевой биотехнологии.

Пищевой статус и его значение

Дефицит животных белков, достигающий 15–20% от рекомендуемых величин:

1. Выраженный дефицит большинства витаминов, выявляющийся повсеместно у более половины населения 35%);

2. Проблема недостаточности макро– и микроэлементов, таких как кальций, железо, фтор, селен, цинк, медь, йод.

В международном научном обществе существует четкое понимание того, что в связи с ростом народонаселения Земли, которое по прогнозам ученых должно достичь к 2050 г. 9-11 млрд. человек, необходимо удвоение и даже утроение мирового производства сельскохозяйственной продукции, что невозможно без применения трансгенных растений, создание которых многократно ускоряет процесс селекции культурных растений, увеличивает урожайность, удешевляет продукты питания, а также позволяет получить растения с такими свойствами, которые не могут быть получены традиционными методами. Принципы создания трансгенных растений и животных схожи. И в том и в другом случае в ДНК искусственно вносят чужеродные последовательности, которые встраивают, интегрируют генетическую информацию вида.

Путем генной инженерии возможно повышение урожайности на 40 – 50%. За последние 5 лет в мире земельной площади, используемые под трансгенные растения, увеличились с 8 млн. га до 50 млн. га и выше.

Нужно отметить, что ни одна новая технология не была объектом такого пристального внимания ученых всего мира. Это обусловлено тем, что мнения ученых о безопасности генетически модифицированных источников питания расходятся. Нет ни одного научного факта против использования трансгенных продуктов. В тоже время, некоторые специалисты считают, что существует риск выпуска нестабильного вида растений, передача заданных свойств сорнякам,

влияние на биоразнообразие планеты, и главное потенциальная опасность для биологических объектов, для здоровья человека путем переноса встроенного гена в микрофлору кишечника или образования из модифицированных белков под воздействием нормальных ферментов, так называемых минорных компонентов, способных оказывать негативное влияние.

Сейчас ученые всего мира разделились на два лагеря по поводу трансгенных продуктов.

Первые считают, что 1) именно искусственное повышение урожайности поможет избежать голода. 2) искусственные растения способствуют сбережению природных ресурсов, например, пресной воды – выведен вид картофеля, который в случае нехватки воды светится в темноте (ввели ген медузы), это позволит фермерам следить за ходом созревания овоща и более экономно использовать воду при поливе. 3) В США трансгенными культурами засеяно свыше 50 млн. га и для этой продукции требуются рынки сбыта и др. К таким странам относятся США, Канада, Австралия, Мексика, Бразилия, Аргентина, Россия.

Вторые считают, что 1) искусственно созданные растения выйдут из-под контроля человека и быстро вытеснят природные формы, причем навсегда. 2) Эти растения совсем не изучены, требуют к себе осторожного и даже опасливого отношения. 3) Вал такой продукции, которая станет в будущем дешевой, подорвет экономику местных производителей. 4) Как быть с пищевыми запретами? Сможет ли мусульманин есть картофель, который содержит гены свиньи, а постящийся христианин – помидоры с генами коровы?

Ферментированные продукты из сырья растительного и животного происхождения: алкогольные напитки; чай; кофе; хлеб; квашеная капуста; мясо и продукты; соевое молоко и др.; рыбные продукты; молочные продукты; различные консервы.

В настоящее время получили распространение два метода использования ферментов в технологии пищевых продуктов: ферментов, содержащихся в самом перерабатываемом сырье, или ферментов, вносимых в перерабатываемый материал.

Первый метод использовался с древнейших времен. Введение ферментов в обрабатываемый материал относится к более позднему периоду: здесь преследуется цель либо обусловить ферментативную реакцию, совершенно необходимую в получении целевого продукта, либо ускорить или дополнить действие уже содержащихся в материале ферментов.

В пищевой промышленности ферменты используются в виде

ферментных препаратов, которые отличаются от ферментов тем, что помимо активного белка они содержат различные балластные вещества. Ферментные препараты готовят из сырья растительного и животного происхождения, содержащего ферменты уже в готовом виде. В настоящее время производство ферментных препаратов ведется на промышленной основе с использованием микроорганизмов – активных продуцентов соответствующих ферментов. Большое число ферментных препаратов вырабатывается из поверхностных и глубинных культур микроскопических грибов, бактерий, дрожжей.

В технологии пищевых продуктов особенно велико значение карбогидраз и протеаз. Технологические операции, приемы в получении продукта в основном определяются действием этих ферментов: они обуславливают выход и качество продукта.

Не было никаких доказательств, что какие-либо ферменты, применяемые в технологии пищевых продуктов, вредны сами по себе, тем более, что в большинстве случаев ферменты в процессе обработки инактивируются. Однако необходимо учитывать возможность образования токсинов во время роста микроорганизмов, используемых для биосинтеза ферментов. Промышленность должна обеспечить гарантии против образования микотоксинов посредством надлежащей селекции штаммов, а против загрязнения патогенными микроорганизмами – посредством обычных микробиологических методов контроля.

Участие микроорганизмов в ферментировании продуктов осуществляется с помощью дрожжей, плесневых грибов, бактерий и их клеток. Целью ферментирования является придание обычной пище питательной ценности, лучшей усвояемости организмом, улучшения внешнего вида, увеличения срока ее хранения. Бактерии, которые добавляют в пищу, размножаясь в ней, выделяют ферменты, которые изменяют, улучшают вкус и запах пищи и делают ее более полезной. Пример. Мечников начал пить ацидофильное молоко в возрасте 60 лет и говорил, если бы он начал его пить раньше, то прожил бы 200 лет. Доказано, что продукты, выделяемые лакто- и бифидобактериями, обновляют микрофлору кишечника животных и человека, вытесняют гнилостные, условно-патогенные и патогенные бактерии и продлевают жизнь.

В настоящее время многие ферментированные продукты производят в промышленном масштабе. Особый интерес проявляется к генетической модификации микроорганизмов, используемых в производстве хлеба и пива. Огромный интерес ученых привлекают дрожжи, несмотря на то, что они хорошо изучены. В отношении дрожжей осуществляются следующие разработки:

Разработки, связанные с генетической модификацией пивных дрожжей:

1. Включение в штаммы промышленных пивных дрожжей генов, кодирующих выработку фермента глюкоамилазы, для того, чтобы отказаться от добавления экзогенных ферментов в процессе пивоварения (солод, хмель).

2. Включение в штаммы промышленных пекарских дрожжей более эффективной системы метаболизма мальтозы с целью сокращения времени на приготовление теста.

3. Включение в штаммы промышленных дрожжей генов, кодирующих синтез белков лекарственного назначения (антител, интерферона, ферментов – пепсина, трипсина) и др.

В молочной промышленности проводятся работы по генетической модификации штаммов молочнокислых бактерий в целях придания им способности вырабатывать антибиотики (бактериоцин) и ароматические вещества (молоко с запахом клубники, малины и др.).

Выпускаемые ферментные препараты представляют собой либо жидкости с концентрацией сухих веществ не менее 50%, либо порошки белого, серого или желтого цвета с определенной стандартной активностью. Ферментные препараты позволяют значительно ускорять технологические процессы, увеличивать выход готовой продукции, повышать ее качество, экономить ценное сельскохозяйственное сырье, улучшать условия труда на производстве.

2.1. Производство ферментных препаратов

Ферменты, применяемые в пищевых производствах, являются продуктами с высокой добавленной стоимостью, в России практически не производятся. Развитие данного направления позволит создать компактный по масштабам, но высокоэффективный сектор,

являющийся с одной стороны базой развития всех направлений пищевой отрасли, направленных на глубокую переработку сырья, с другой стороны, производство пищевых ферментов обладает высоким экспортным потенциалом.

Ферменты сохраняют свои уникальные свойства (эффективность, специфичность действия) вне клеток, поэтому их традиционно широко применяют в практике. Биологические катализаторы нетоксичны, работают в мягких условиях, используют доступное сырье (в том числе и отходы), в связи с чем, их применение в промышленности выгодно с экономической и экологической точек зрения.

По объему производства ферменты занимают третье место после аминокислот и антибиотиков. Из более, чем 2000 известных в настоящее время ферментов в промышленности используется около 30. Основная часть ферментов, поступающих на мировой рынок, приходится на долю гидролаз, из которых 60 % составляют пептидогидролазы (в основном щелочные и нейтральные протеазы), использующиеся в качестве детергентов в производстве синтетических моющих средств, а 30 % – гликозидазы, применяющиеся в производстве кондитерских изделий, фруктовых и овощных соков. Ферменты находят применение в текстильной, кожевенной, целлюлозно-бумажной, медицинской, химической промышленности.

По прогнозам ученых, основным потребителем ферментов в ближайшем будущем остается пищевая промышленность. Главное место среди этих энзимов занимают глюкоизомераза и глюкоамилаза, применяющиеся для приготовления обогащенных фруктозой кукурузных сиропов и составляющие около 50 % рынка пищевых энзиматических препаратов.

Все большее развитие получают технологические процессы с участием сложных энзиматических систем, включающих коферменты. Так, созданы ферментные мембранные реакторы, катализирующие непрерывные процессы с регенерацией НАДН (восстановительное аминирование кетокислот, восстановление α -кетокислот в α -гидроксикислоты). Разработаны системы разделения рацематов посредством стереоспецифического активного транспорта. Например, мембрана, содержащая гексокиназу и фосфатазу, функционирует как насос, избирательно прокачивающий лишь D-глюкозу. Применение сопряженных ферментативных реакций с участием алкогольоксидазы и катал азы дрожжей *Hansenula polymorpha* и формальдегиддисмутаза бактерии *Pseudomonas putida* позволило осуществить окисление метанола в муравьиную кислоту с выходом 88–94%. В промышленности большое будущее имеют ферменты, способные катализировать химические реакции в органической фазе, в частности липазы.

Существенно, что каталитическая активность панкреатической липазы свиньи сохраняется при концентрации воды в реакционной среде, составляющей всего 0,015 %, и при температуре 100°C. Препараты липазы используют для синтеза оптически чистых сложных эфиров и феромонов, применяющихся в парфюмерии и медицине.

Применение ферментов

Название и шифр фермента	Источники фермента	Химический и биотехнологический процессы. Область использования
Амилазы (КФ 3.2.1.1 КФ 3.2.1.2 КФ 3.2.1.3)	Бактерии, грибы (<i>Bacillus</i> sp., <i>Aspergillus niger</i> , <i>A. oryzae</i>)	Гидролиз крахмала до декстринов, мальтозы и глюкозы. Спиртовая, пивоваренная промышленность, хлебопечение, получение патоки, глюкозы
Глюкоизомеразы (КФ 5.3.1.18)	Более 80 видов микроорганизмов (<i>Bacillus</i> sp., <i>Streptomyces albus</i> , <i>S. griseus</i>)	Изомеризация D-глюкозы в D-фруктозу. Кондитерская, ликероводочная, безалкогольная промышленность, хлебопечение
Глюкооксидаза (КФ 1.1.3.4) и каталаза (КФ 1.11.1.6)	<i>Penicillium chrysogenum</i> , <i>P. casei</i> , <i>P. nigricans</i> , <i>P. notatum</i> , <i>P. vitale</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Corynebacterium</i> ssp.)	Удаление кислорода и глюкозы (из яичного порошка, мясных и других продуктов). Виноделие, пивоваренная, консервная, соковая и безалкогольная промышленность
Липазы (КФ 3.1.1.3)	Поджелудочные железы животных, семена растений, микроорганизмы (<i>Candida lipolytica</i> , <i>Streptomyces flavogriseus</i> , <i>Aspergillus</i> ssp., <i>Saccharomyces lipolytica</i>)	Гидролиз жиров и масел. Пищевая, легкая, медицинская промышленность, сельское хозяйство, коммунальное хозяйство, бытовая химия
Пектиназа (КФ 3.2.1.15)	Многие микроорганизмы (<i>Aspergillus</i> ssp., <i>Fusarium</i> ssp., <i>Penicillium</i> ssp. и др.)	Гидролиз галактуронана, осветление вина и фруктовых соков
Пептидогидролазы (КФ 3.4)	Поджелудочные железы и слизистая желудка животных; плоды, побеги, отходы переработки некоторых растений (дынное дерево, инжир, ананас), микроорганизмы (<i>Bacillus</i> ssp., <i>Aspergillus</i> ssp., <i>Penicillium</i> ssp., <i>Streptomyces</i> ssp., <i>Pseudomonas</i> ssp.)	Лизис белка. Получение аминокислот, производство и получение сыра, смягчение мясных и рыбных изделий, выделка кожи, активизация пищеварения. Пивоварение, виноделие, хлебопечение, пищевая промышленность, сельское хозяйство, медицина
Целлюлазы (КФ 3.2.1.4)	Микроорганизмы: <i>Clostridium</i> ssp., <i>Trichoderma reesei</i> , <i>T. viridae</i> , <i>Alternaria tenuis</i> , <i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Fusarium culmorum</i>	Гидролиз целлюлозы до глюкозы. Производство пищевых и кормовых белковых препаратов, этанола, глюкозо-фруктозных сиропов. Спиртовая, пивоваренная, пищевая промышленность, хлебопечение, кормопроизводство
Фруктофуранозидаза (КФ 3.2.1.26)	Микроорганизмы: <i>Aspergillus</i> ssp., <i>Penicillium</i> ssp., <i>Fusarium</i> ssp., <i>Cercospora beticola</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>E. coli</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ,	Инверсия сахарозы. Кондитерская, ликероводочная, безалкогольная промышленность, сиропопроизводство

Для деградации и модификации антропогенных органических соединений, поступающих в окружающую среду, используют ферменты разных классов и в том числе лакказу, лигниназу, тирозиназу, монооксигеназу, диоксигеназу и др. Перспективна для очистки сточных вод новая технология, основанная на использовании реакции пластеинообразования, открытой А.Я. Данилевским в 1886 г. Сущность работ Данилевского состоит в экспериментальном доказательстве обращения протеолиза и возможности синтеза белковоподобных веществ (пластеинов) под действием ряда протеолитических ферментов. Сточные воды содержат аминокислоты и пептиды, концентрация которых возрастает в результате гидролиза белковых компонентов отходов под воздействием пептидогидролаз микроорганизмов. Данная

технология, активно внедряющаяся во Франции, нацелена на производство в промышленных масштабах кормовых белков из аминокислот и пептидов сточных вод.

Ферменты широко используют в медицине, например, в заместительной терапии в составе лечебных препаратов. Пероральное введение фенилаланинаммиаклиазы снижает уровень фенилаланина в крови при фенилкетонурии. Протеолитические ферменты, амилазу и липазу применяют при заболеваниях желудочно-кишечного тракта и печени. В последние годы накопились данные об эффективности применения протеиназ в энзимотерапии злокачественных новообразований. Это объясняется большей проницаемостью мембран раковых клеток для гидролитических ферментов в сравнении с нормальными клетками, благодаря чему опухолевые клетки быстро лизируются при введении смеси протеиназ (препарат «папайотин»), Протеолитические ферменты – плазмин и активирующие его стрептокиназу и урокиназу используют для растворения тромбов в кровеносных сосудах; коллагеназу – для рассасывания рубцовых образований; эластазу – для задержки развития атеросклероза; лизоцим — для лечения конъюнктивитов; дезоксирибонуклеазу из стрептококка (стрептодорназа) – для лечения заболеваний верхних дыхательных путей и роговицы глаза.

Важнейшую область применения ферментов в медицине составляет энзимодиагностика – тестирование патологии того или иного органа человека по уровню активности фермента или соотношению его множественных форм и изоферментов. Так, аспартатаминотрансфераза, изоцитратдегидрогеназа, лактатдегидрогеназа и альдолаза служат для выявления инфаркта миокарда; аланина-минотрансфераза, аспартатаминотрансфераза и лактатдегидрогеназа – для диагностики заболеваний печени; глутамилтрансфераза – для блокировки отторжения органов при их пересадке и т.д.

Таким образом, производство ферментных препаратов занимает одно из ведущих мест в современной биотехнологии и относится к тем ее отраслям, объем продукции которых постоянно растет, а сфера применения неуклонно расширяется. По объему производства ферментов доминируют страны Западной Европы. Резкий рост этой индустрии наблюдается в США и Японии.

Источники ферментов

Ферменты присущи всем живым существам, однако для их выделения используют те природные объекты, в которых содержание искомого энзима составляет не менее 1 %. Для крупномасштабного получения ферментов пригодны только некоторые растительные организмы на определенной фазе их развития (проросшее зерно

различных злаков и бобовых, латекс и сок зеленой массы ряда растений), а также отдельные ткани и органы животных (поджелудочная железа, слизистая оболочка желудочнокишечного тракта, сычуг крупного рогатого скота, семенники половозрелых животных). Практически неограниченный источник ферментов – микроорганизмы (бактерии, грибы, дрожжи), содержащие набор большинства известных в настоящее время энзимов, количество которых можно повысить в десятки и сотни раз методами мутагенеза, селекции и индукции биосинтеза.

Технология культивирования микроорганизмов – продуцентов ферментов

В зависимости от источника технология получения ферментных препаратов имеет свои особенности. При извлечении ферментов из растительного сырья и животных тканей технология сводится к экстракции энзимов и очистке их от сопутствующих балластных веществ. Технология ферментных препаратов микробного происхождения более сложная, так как дополнительно включает этапы культивирования микроорганизмов – продуцентов ферментов, в том числе этапы получения посевного материала и производственной культуры соответствующего микроорганизма.

Для производства посевного материала используют исходный штамм продуцентов, получаемый из лабораторных чистых культур, который выращивают разными способами на предварительно стерилизованной твердой или жидкой питательной среде до определенного возраста. Посевной материал консервируют (высушиванием или хранением при низких температурах) вплоть до дальнейшего использования. Производственные культуры продуцента получают, выращивая посевной материал микроорганизмов как на поверхности твердых или жидких сред, так и в глубине жидких питательных сред.

Поверхностный метод выращивания продуцентов, предложенный И.Такаmine еще в 1894 г., состоит в культивировании микроорганизмов на поверхности увлажненных стерилизованных отрубей, размещенных в кюветах, к которым иногда добавляют солодовые ростки, древесные опилки, свекловичный жом. Инкубацию микроорганизмов ведут в специальном термостатируемом цехе при постепенном контроле в нем температуры, влажности и подачи воздуха.

В последние 15 лет для выращивания продуцентов ферментов; чаще используют более экономный – глубинный метод культивирования. В промышленных условиях для этих целей применяют ферментеры из нержавеющей стали, снабженные

приспособлениями для перемешивания и подачи в жидкую питательную среду стерильного воздуха. Сначала ферментер заполняют питательной средой, автоклавируют, а затем засевают чистой культурой, подаваемой из специального генератора. Для предотвращения инфекции в ферментере поддерживают повышенное давление наряду с оптимальными значениями pH, температуры, редокспотенциала и другими условиями культивирования (рис.1).

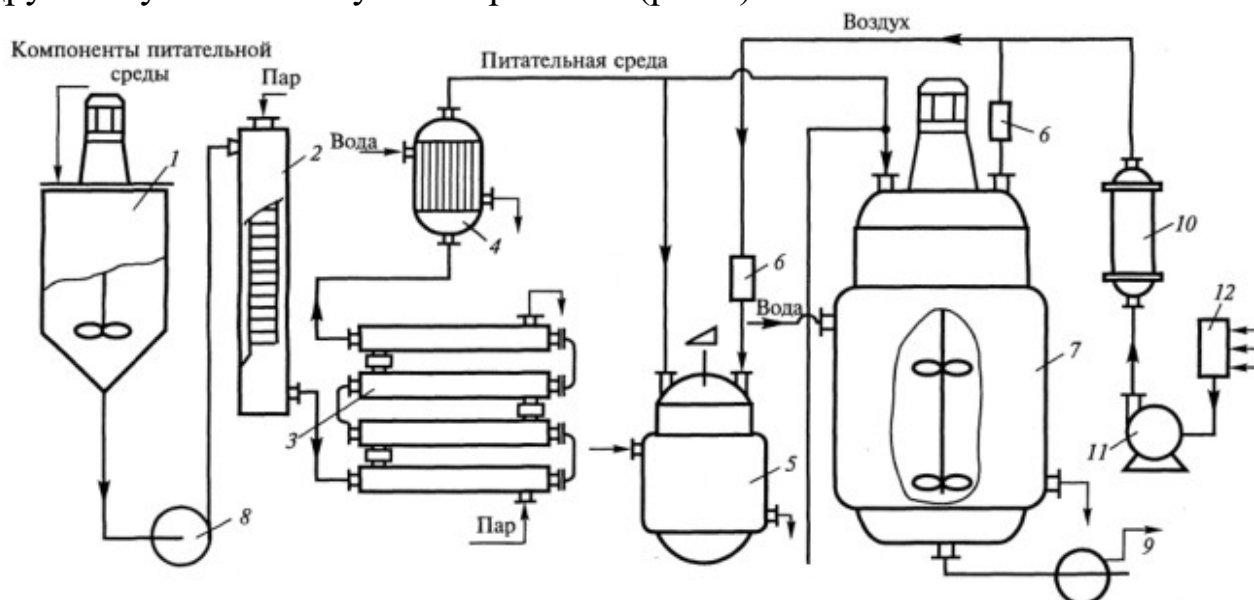


Рис.1. Технологическая схема глубинного культивирования микроорганизмов

1 – смеситель питательной среды; 2 – стерилизатор в непрерывном режиме потока питательной среды; 3,4 – теплообменники; 5 – посевные аппараты; 6,10,12 – фильтры для очистки воздуха; 7 – ферментер; 8, 9 – насосы; 11 – компрессор

В настоящее время наиболее прогрессивным признан проточный метод культивирования микроорганизмов, который обеспечивает непрерывную подачу в ферментер как питательной среды, так и посевного материала. Размножение микроорганизмов и биосинтез фермента регулируют при использовании этого метода по мере поступления питательной смеси в ферментер. Такой ферментер представляет собой вращающийся трубкообразный реактор, через один конец которого в него поступает питательная среда и культура микроорганизмов, а из другого – выводятся ферменты, продукты жизнедеятельности и бактериальная масса. Основное достоинство метода – возможность длительное время поддерживать в автоматическом режиме рост культуры микроорганизма. Например, культура ацетонобутиловых бактерий находилась в таком реакторе в

состоянии непрерывного размножения в течение 200 суток (И.Д.Иерусалимский с соавтр., 1986).

Важнейшим фактором эффективности технологии ферментных препаратов является качество питательной среды. Основное требование к качеству питательной среды состоит в полноценности ее состава, обеспечивающей рост продуцента и биосинтез целевого фермента. Микроорганизмы нуждаются прежде всего в соединениях, содержащих углерод, азот, водород и кислород. К ним относятся органические вещества, соли аммония и вода. Кроме того, в состав питательной среды должны быть включены минеральные соединения, содержащие Mg, Ca, P, S, Fe, K и другие макро- и микроэлементы, витамины, ростовые вещества (биотин, инозит) и пр. Питательные среды в зависимости от состава делятся на синтетические и комплексные. Синтетическими считают те среды, которые состоят из определенного по качественному и количественному составу набора индивидуальных веществ. В комплексные среды входят различные природные продукты, часто отходы пищевых производств. К их числу относятся различные жмыхи, барда спиртовых заводов, картофельная мезга, кукурузный экстракт, меласса, отруби и прочие продукты. Благодаря использованию отходов комплексные питательные среды доступны, дешевы и обеспечивают безотходность биотехнологических производств.

Технология выделения и очистки ферментных препаратов

Выделение и очистка фермента как из культуры микроорганизма (выращенного любым способом), так и из других природных источников весьма трудоемкая и дорогостоящая процедура, поэтому, если фермент можно использовать в виде неочищенного препарата, его не очищают. В промышленности широко применяют коммерческие препараты ферментов, чистота которых составляет всего 0,1 % (т.е. 99,9 % составляют примеси). К таким отраслям относятся спиртовая, кожевенная, текстильная промышленность, а также сельское хозяйство, производство бытовой химии. Например, ферментный препарат, употребляемый в пивоварении, представляет собой высушенную биомассу плесневых грибов. В большинстве отраслей пищевой промышленности, практике научных исследований и особенно в медицине используют только очищенные препараты ферментов, частично или полностью освобожденные от балластных веществ и полностью охарактеризованные в отношении их специфичности и физико-химических свойств. Исходным материалом для получения препаратов ферментов служат: биомасса продуцента, фильтрат культуральной жидкости, экстракт из культуры микроорганизма или из

тканей и органов растений и животных, из которых готовят препараты различной степени очистки.

Неочищенные ферментные препараты получают путем высушивания в мягком режиме культуры микроорганизмов вместе с остатками питательной среды. Такие препараты получают и путем упаривания экстракта из культуры продуцента, выращенного поверхностным способом, или из фильтрата культуральной жидкости (в случае глубинного выращивания микроорганизмов). Распространен также метод ацетоновых порошков, состоящий в осаждении и быстром обезвоживании при температуре не выше -10°C тканей или вытяжек из них, содержащих ферменты. Технические препараты ферментов представляют собой либо высушенные до порошкообразного состояния продукты, либо жидкие концентраты, обычно характеризующиеся 50 % содержанием сухой массы веществ.

Для успешного выделения ферментов из клеточного содержимого необходимо очень тонкое измельчение исходного материала вплоть до разрушения субклеточных структур: лизосом, митохондрий, ядер и др., которые имеют в своем составе многие индивидуальные ферменты. Для этого используют специальные мельницы и гомогенизаторы, а также ультразвук, метод попеременного замораживания и оттаивания ткани. Для высвобождения ферментов из мембранных структур клетки к гомогенатам добавляют небольшие количества детергентов (твин, тритон X-100) или обрабатывают их энзимами – лизоцимом, целлюлазой, лецитиназой С.

Особое внимание при выделении ферментов уделяют проведению всех операций в условиях, исключающих денатурацию белка (нейтральные значения pH, стабилизирующие добавки в виде белков, солей и специальных соединений). Пример, иллюстрирующий получение частично очищенного препарата (3-галактозидазы из мутанта *E. coli*, представлен на рис.2.

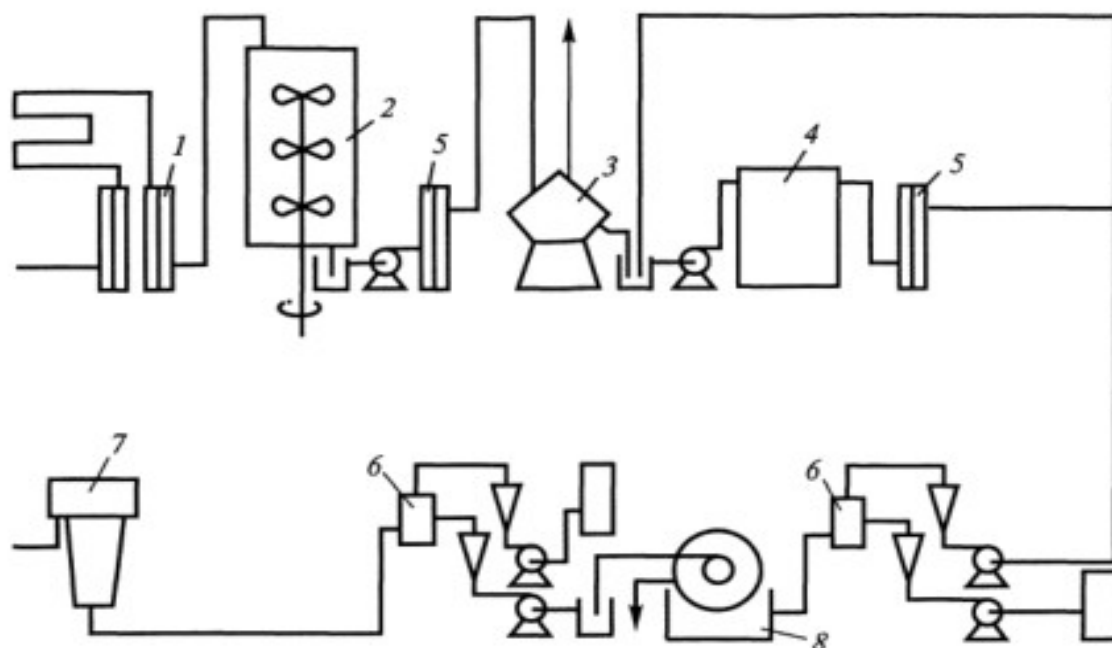
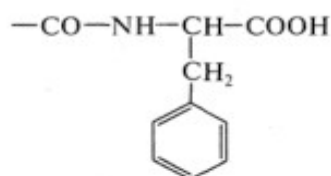


Рис.2. Технологическая схема непрерывного получения β -галактозидазы из клеток *E.coli* ML308

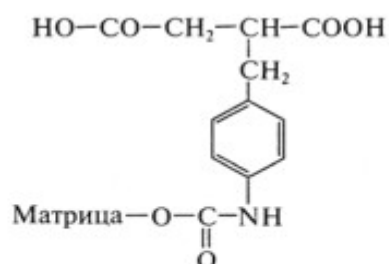
1 – стерилизатор среды; 2 – ферментер; 3,7 – центрифуги; 4 – гомогенизатор; 5 – теплообменник; 6 – смесительные камеры; 8 – ротационный вакуум-фильтр

Схема очистки включает отделение клеток микроорганизма по выходе их из ферментера от культуральной жидкости посредством центрифугирования и последующее разрушение клеток в гомогенизаторе высокого давления. Для освобождения белков от нуклеиновых кислот полученный гомогенат обрабатывают сульфатом марганца до конечной концентрации этой соли в смеси, равной 0,05 М. Осадок нуклеиновых кислот отделяется с помощью ротационной вакуум-фильтрации, а в образовавшийся фильтрат добавляют сульфат аммония до 45 % от его насыщения. Возникший осадок белков, содержащий бета-галактозидазу, собирают с помощью центрифугирования или вакуум-фильтрации. Вся процедура очистки энзима от момента подачи бактерий в систему до момента получения осадка (β -галактозидазы) занимает всего 1 час.

В зависимости от свойств выделяемого фермента и сопутствующих ему балластных веществ, при получении очищенных препаратов ферментов комбинируют различные приемы и методы, такие, как термическое фракционирование, осаждение органическими растворителями, солями и тяжелыми металлами, фильтрация на молекулярных ситах, ионообменная хроматография, электрофорез, изоэлектрофокусирование.

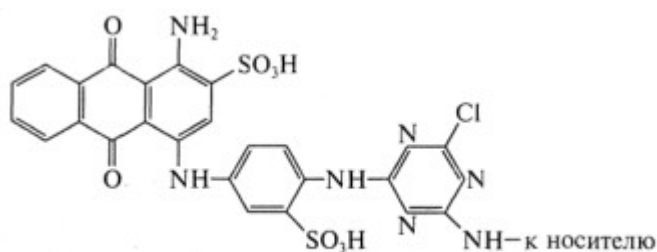


С-концевой остаток
фенилаланина в субстрате
карбоксипептидазы



Аффинный сорбент с лигандом.
Бензилянтарная кислота изостерична
структуре остатка фенилаланина

Сорбенты, содержащие цибакрон голубой и некоторые другие красители антрахинонового ряда, используют для аффинной хроматографии НАД-зависимых дегидрогеназ, а носители, имеющие цикло-пептидный антибиотик грамицидин, — для протеолитических ферментов:



Аффинный сорбент, содержащий антрахиноновый краситель

Таблица 1— Схема очистки глюкоамилазы из культуры
Endomycopsis ssp. 20-9

Стадия очистки	Объем, мл	Общее количество белка, мг	Глюкоамилазная активность				Амилолитическая активность		Трансглю- козидазная активность
			общая, ед. (Е)	удельная, Е/мг	выход, %	степень очистки	общая, ед.(Е)	выход, %	
Исходная культураль- ная жидкость	1200	13 600	28 500	2,1	100,0	1,0	9500	100	Глюкоза, изомальтоза
Отделение биомассы, концентрирование, отделение балласта	560	11 100	25 600	2,3	90,0	1,1	8500	89,0	То же
Осаждение ацетоном, растворение в воде	350	2040	19 800	9,7	69,5	4,6	1050	11,3	—
Ультрафильтрация	55	1610	18 200	11,3	64,0	5,4	860	9,10	—
Хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе	555	298	15 000	50,4	52,5	24,5	30,0	0,35	—
Ультрафильтрация	16	250	13 450	54,0	47,2	25,7	27,5	0,29	—
Гель-фильтрация через акрилекс П-100	100	140	11 400	76,5	40,5	36,5	22,8	0,24	—
Обессоливание, лиофилизация	0,1	92	7150	77,0	25,0	37,0	14,3	0,15	—

В процессе выделения повышается доля фермента в массе тотальных белков, т.е. увеличивается его удельная активность. В таблице представлены данные, характеризующие процедуру очистки от сопутствующих ферментов и балластных белков глюкоамилазы из культуры *Endomycopsis ssp.* 20-9. Анализ таблицы 1 показывает, что чистота глюкоамилазы в препарате возросла в 37 раз и в полученном препарате отсутствует активность двух ферментов углеводного обмена гликозилтрансферазы и α -амилазы.

В производственных условиях активность получаемого ферментного препарата оценивается количеством субстрата, преобразованного 1 мг (1кг) препарата при оптимальных условиях за 1 мин, и измеряется в Е/мг, моль/мг или каталаз/кг белка.

Очищенные ферментные препараты хранят при низкой температуре (до $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$). Для стабилизации ферментов в их препараты добавляют коферменты и субстраты. Ферментные препараты для промышленного применения стабилизируют, добавляя глицерин, моносахариды, дисахариды (глюкоза, сахароза, лактоза), HS-соединения (цистеин, глутатион, меркаптоэтанол, дитиотреитол и др.), отдельные аминокислоты, желатину и другие белки-наполнители.

Существенно, что из 2003 включенных в список известных в настоящее время ферментов более 1500 выделено и в той или иной степени очищено; это служит не только базой для изучения физико-химических основ ферментативного катализа, но и фундаментом для совершенствования химического производства и промышленности.

Инженерная энзимология

Развитие прикладной энзимологии долгое время сдерживалось дороговизной чистых ферментных препаратов, неустойчивостью их при хранении и невозможностью многократного использования. Принципиально новые перспективы открылись перед прикладной энзимологией в 60-е годы XX в. в результате появления на стыке химии и биологии новой отрасли – инженерной энзимологии. Ее задачи заключаются в развитии прогрессивных методов выделения ферментов, их стабилизации и иммобилизации; конструировании катализаторов с нужными свойствами и разработке научных основ их применения.

В частности, методами белковой инженерии, сущность которых состоит в изменении первичной структуры природной молекулы фермента посредством химической модификации самого; энзима или его гена, удастся принципиально трансформировать структуру активного центра и его функцию, модулировать субстратную специфичность и физико-химические свойства фермента. Так, замена остатка глутамина-102 в молекуле лактатдегидрогеназы на аргинин

превратила фермент в высокоактивную малатдегидрогеназу. Описанным способом получены термостабильные формы лизоцима Т-4 и субтилизина (каталитическая константа субтилизина изменена в 100 раз), созданы гибридные формы ферментной системы, ценной в иммуноферментном анализе, сочетающие в себе свойства бета-галактозидазы и бета-галактокиназы.

Многие проблемы технологии синтеза органических соединений, пищевой и медицинской промышленности, мониторинга человека и окружающей среды, защиты окружающей среды, энергетики не могут быть решены без использования методов современной инженерной энзимологии.

Важным этапом развития инженерной энзимологии стала разработка способов получения и использования иммобилизованных ферментов.

2.2. Пребиотики, пробиотики, синбиотики

Развитие производства и пищевого инжиниринга продуктов данной группы является необходимым элементом для формирования в России рынка здорового питания. Задачей данного комплекса мероприятий является создание пробиотических продуктов, расширение исследований и практики внедрения в ассортимент предприятий новых продуктов и комплексных решений.

Пребиотики и пробиотики относятся к одной из основных категорий функционального питания, и, таким образом, использование пищи с большим количеством балластных веществ (различные пищевые волокна), а также продуктов с живыми культурами бактерий (бифидопродукты, йогурты и т.п.) является основой профилактических мероприятий для предупреждения развития нарушений микробиоценоза кишечника.

Пребиотики, по определению термина, приведённом в российском терминологическом стандарте ГОСТ Р 52349-2005 – это функциональные пищевые ингредиенты в виде препаратов, БАД, или в составе пищевых продуктов, состоящие из полезных живых микроорганизмов, оказывающие благоприятное воздействие на организм благодаря нормализации состава или повышению активности нормальной микрофлоры кишечника.

Соответственно, пробиотическим пищевым продуктом называют функциональный пищевой продукт, содержащий в качестве физиологически функционального пищевого ингредиента специально выделенные штаммы полезных для человека (непатогенных и нетоксигенных) живых микроорганизмов, которые благоприятно воздействуют на организм человека через нормализацию микрофлоры пищеварительного тракта. Сегодня пробиотическими культурами, рекомендованными ФГБНУ "НИИ питания", согласно ГОСТ Р 56139-2014, являются следующие микроорганизмы: бифидобактерии (*Bifidobacterium*), пропионовокислые бактерии (*Propionibacterium*), лактобациллы (*Lactobacillus*), бактерии рода *Lactococcus*, стрептококки вида *Streptococcus thermophilus*

В России до 80% используемых пробиотических культур представлено бифидобактериями, в частности видами: *B. bifidum*, *B. longum*, *B. adolescentis*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. lactis*, *B. animalis*. Поэтому при рассмотрении вопроса, будем опираться на свойства этих микроорганизмов.

Применяемые на практике препараты пробиотиков должны иметь чёткие физиолого-биохимические и генетические маркировки, а также

стабильные характеристики клинической и технологической эффективности.

Необходимым качеством пробиотиков, обеспечивающим их физиологическое действие, является высокая скорость роста и совместимость с другими микроорганизмами, присутствующими в желудочно-кишечном тракте, минимальная способность микроорганизмов-пробиотиков к транслокации из просвета пищеварительного тракта во внутреннюю среду организма. Длительное использование пробиотических препаратов не должно вызывать побочных эффектов.

К основным процессам, обеспечивающим положительные эффекты пробиотиков относятся: ингибирование роста потенциально вредных микроорганизмов, в результате продукции антимикробных субстанций, активации иммунокомпетентных клеток; стимуляция роста представителей микрофлоры в результате продукции витаминов и других ростостимулирующих факторов; нейтрализация токсинов и нормализация pH; изменение микробного метаболизма, проявляющееся в повышении или снижении активности ферментов.

Специфическая активность разных пробиотических микроорганизмов заключается в наличии антибактериальной и антимутагенной, антиканцерогенной активности; способности к снижению уровня сывороточного холестерина, улучшения метаболизма лактозы; стимуляции иммунной системы.

Бифидобактерии – "первопроходцы" среди признанных пробиотиков

Тема совместного раздела о про и пребиотиках очень обширная, то для сокращения объема информации для первой части к рассмотрению возьмем наиболее представительный вид кишечной симбионтной микрофлоры - бифидобактерии.

В настоящее время идентифицировано более 50 видов бифидобактерий (от лат. bifidus – раздвоенный, расщепленный надвое), объединенных в род *Bifidobacterium*, который относится к семейству *Actinomycetaceae*.

Наиболее изучаемыми видами бифидобактерий являются: *B. bifidum*, *B. longum*, *B. adolescentis*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. lactentis*, *B. liberorum* и т.д.

Бифидобактерии – это грамположительные, анаэробные, бесспорные, неподвижные палочки, (0,5-1,3) x (1,5-8) мкм. Бифидобактерии представляют собой чрезвычайно вариабельные по форме палочки – прямые, изогнутые, разветвленные, раздвоенные Y- или V – формы, булабовидные и лопатовидные. Полиморфизм является

характерным свойством бифидобактерий: в мазках молодой культуры встречались неразветвленные особи, а более старой – ветвящиеся или с булавовидными утолщениями на концах, иногда неравномерно окрашенные, гранулированные палочки.

Среди штаммов, выделенных из кишечника взрослых людей, преобладают палочковидные и булавовидные формы: ветвящиеся палочки чаще встречаются у детей грудного возраста. На ранних стадиях развития преобладают палочковидные формы, а при дальнейшем культивировании образуются разветвленные нити с многочисленными перегородками и в основном стволе и ответвлениях.

Форма клеток микроба зависит от различных факторов: условий культивирования, возраста культуры, изменения состава питательных сред, изменения pH среды и др. Несмотря на то что, ряд авторов, описывая морфологию бифидобактерий, были единодушны, отмечая их полиморфизм, то в отношении причин, его вызывающих, мнения были противоречивы.

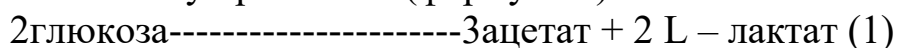
Все виды бифидобактерий при первичном выделении являются строгими анаэробами. В присутствии углекислого газа они могут быть толерантными к кислороду. При лабораторном культивировании эти микроорганизмы приобретают способность развиваться в присутствии некоторого количества кислорода, а высокопитательных средах – расти в полностью аэробных условиях. Чувствительность к кислороду у многих штаммов варьирует, что обусловлено различиями в механизме брожения. Некоторые виды могут расти в атмосфере воздуха, обогащенного 10% CO₂. Оптимальной является температура 37–41°C. Оптимальное значение pH 6–7, при pH ниже 4,5 и выше 8,5 рост микроорганизмов прекращается.

Бифидобактерии являются хемоорганотрофами, активно сбраживают сахарозу, галактозу, фруктозу, мелибиозу, раффинозу, лактозу и др., с образованием, в основном, уксусной и молочной кислот в молярном соотношении 3:2. Образуют также примеси муравьиной и янтарной кислот, а также этанола. Масляную, пропионовую кислоты и CO₂ не образуют. Для роста на питательных средах нуждаются в добавлении витаминов.

Бифидобактерии не продуцируют каталазы, не образуют индол и сероводород, не восстанавливают нитраты, не разжижают желатин. Они не продуцируют фенол, не образуют аммиак из аргинина. При развитии в лакмусовом молоке бифидобактерии вызывают частичное или полное его восстановление.

Бифидобактерии сбраживают сахар с образованием молочной кислоты в качестве основного конечного продукта. Однако суммарное уравнение носит особый характер и не соответствует ни

гомоферментативному, ни типичному гетероферментативному молочнокислому брожению (формула 1).



Этот вид брожения имеет единственный в своем роде биохимический механизм превращения глюкозы.

Как и при расщеплении по пути Эмбдена – Мейергоффа, глюкоза сначала фосфорилируется в положении 6, а затем превращается во фруктозо-6-фосфат. Расщепление связи C₂-C₄ во фруктозо-6-фосфат сопровождается присоединением неорганического фосфата. Последующей реакцией между эритрозо-4-фосфатом и фруктозо-6-фосфатом начинается сложный ряд взаимных превращений сахарофосфатов, в результате чего, в конечном счете, образуются 2 моля ацетилфосфата и 2 моля глинеральдегида-3-фосфата. Из ацетилфосфата получается ацетат, а триазафосфат через пируват превращается лактат. В энергетическом отношении это брожение несколько более эффективно, поскольку оно дает 5 молей АТФ на каждые 2 моля сброженной глюкозы. Имеются данные, указывающие, что бифидобактерии продуцируют L (+) молочную кислоту, которая является для млекопитающих физиологически активной формой, целенаправленно используется организмом, тогда как D – молочная кислота не устанавливается. В организме человека молочная кислота образуется в больших количествах и играет важную роль в метаболизме. Однако, следует отметить, что только L (+) – молочная кислота служит в качестве источника энергии для сердца, скелетных мускул, печени, почек, мозга и сжигается до CO₂ и воды, а также используется в цикле глюкозы для образования гликогена и животного крахмала.

Некоторые штаммы бифидобактерий растут при наличии азотфиксирующих олигосахаридов – N-ацетил-глюкозамине, N-ацетил-галактозамине N-ацетил-манозамине и др., которые отсутствуют в коровьем молоке (содержатся в женском молоке). Присутствие таких соединений в молоке делает его наиболее благоприятной средой для бифидобактерий, и, вероятно, именно этим объясняется их преобладание в кишечной микрофлоре грудных детей. Благодаря исследованиям японских ученых бифидофактор был идентифицирован и компоненты его выделены в чистом виде. В последующем оказалось, что стимулирующей рост активностью в отношении к различным штаммам бифидобактерий обладают различные производные пантотеновой кислоты, в том числе витамин. Констатировано, что бифидобактерии подобно молочнокислым бактериям, обнаруживают абсолютную зависимость от производных пантотеновой кислоты.

Имеются сведения о выделении бифидус-факторов или их синтеза на основе аминокарбонильных реакций.

Особый интерес в последние годы проявляется к олигосахаридам женского молока. Как известно, главным углеводом молока является лактоза. Установлено, что этот дисахарид сопровождается небольшим количеством других олигосахаридов. Различные группы олигосахаридов женского молока обладают различными видами активности. Считают, что олигосахариды, содержащие N – ацетил-глюкозамин, обладают действием, стимулирующим рост *B. bifidum*. В настоящее время установлено, что микроорганизмы *B. bifidum* нуждаются в качестве ростового фактора в N – ацетил – D – глюкозамине в виде β – гликозидов или концевой восстанавливающего сахара в 4 – 0 – β замещенных ди- и олигосахаридов. Причина ростовой активности этих двух типов производных заключается, по-видимому, в том, что они могут превращаться в обычный предшественник мурамовой кислоты, который является важным компонентом клеточных стенок некоторых бактерий.

Из олигосахаридов женского молока ростовую активность проявляют лакто- n-тетраоза, лакто-n-фукопентоза I, лакто-N-футсопентаоза II и лакто-n-дифукогексаоза. Таким образом, некоторые олигосахариды формируют главный структурный компонент бактериальной клеточной стенки.

Проведенная российскими исследователями статистическая обработка данных о видовом составе бифидофлоры у различных возрастных групп населения России показала, что у здорового грудного ребенка, находящегося на грудном вскармливании, *B. bifidum*, *B. longum*, *B. breve*, *B. infantis* встречаются в соотношении 35%, 42%, 17%, 12%. Штаммы *B. adolescentis* выявляются в 1,5% случаев или отсутствуют в фекальном содержимом. У детей на искусственном вскармливании содержание доминирующих видов бифидобактерий падает до 3-5%, в то время как представители вида *B. adolescentis* обнаруживаются у 22% детей. У взрослых в толстом кишечнике обнаруживаются преимущественно представители *B. bifidum*, *B. longum* и *B. adolescentis*. В кишечнике лиц старше 35 лет представители вида *B. adolescentis* начинают превалировать в бифидофлоре, достигая 60-75% в пожилом возрасте. Основываясь на этих данных, авторы полагают, что в пробиотиках, предназначенных для детей до 3-х лет, видовое соотношение бифидобактерий должно соответствовать количественному содержанию этих микроорганизмов в кишечнике здоровых детей. При этом вид *B. adolescentis* не следует вводить в пробиотики и продукты функционального питания, предназначенные для этой возрастной группы россиян.

Антагонистическая активность бифидобактерий, связанная с продукцией органических кислот (ацетата и лактата) и бактериоцинов с широким спектром антимикробного действия, так же, как и блокирование рецепторов на слизистой кишечника, предотвращающие фиксацию на них потенциально патогенных микроорганизмов, определяют важнейшую роль этих микроорганизмов в колонизационной резистентности. Снижение количества бифидобактерий или даже их полное исчезновение является одним из патогенетических механизмов длительных кишечных дисфункций у детей и взрослых. Оно ведет к нарушению минерального обмена, процессов кишечного всасывания, белкового и жирового обмена, к формированию хронических расстройств пищеварения. Имеются сведения, что бифидобактерии являются «поставщиком» ряда незаменимых аминокислот, в том числе триптофана, витаминов, установлена их антиканцерогенная и антимутагенная активность, способность снижать уровень холестерина в крови и др. Все эти положительные эффекты в свое время позволили рассматривать бифидобактерии как эффективный биокорректор и основу для создания препаратов обладающих многофакторным регулирующим и стимулирующим воздействием на организм, а позднее и как одну из основных категорий функционального питания.

Предпосылки для использования пребиотиков

В технологических процессах производства, обогащённых пробиотиками пищевых продуктов, а также при их прохождении через пищеварительный тракт пробиотические культуры подвергаются множеству агрессивных воздействий, которые приводят к снижению их активности, частичной гибели.

Производственные факторы риска: высокая концентрация молочной, уксусной или других кислот в культуральной среде; технологическая обработка (центрифугирование, ультрафильтрация); температурные режимы (замораживание, сушка); действие кислорода; повышенное осмотическое давление, вызванное повышенным присутствием соли.

В желудочно-кишечном тракте микроорганизмы подвергаются длительному пребыванию в кислой среде желудка, действию желчных кислот, воздействию антимикробных компонентов, содержащихся в продуктах.

Пребиотики

В связи с этим возникает необходимость использования пребиотиков, которые выступают не только как стимулятор роста и

активизатор метаболизма полезной микрофлоры, но и выполняют определённую протекторную функцию.

В соответствии с ГОСТ Р 52349-2005, пребиотик – функциональный пищевой ингредиент в виде вещества или комплекса веществ, обеспечивающий при систематическом употреблении человеком в пищу в составе пищевых продуктов благоприятное воздействие на организм человека в результате избирательной стимуляции роста и /или повышения биологической активности нормальной микрофлоры кишечника.

К основным видам пребиотиков относятся олиго- и полисахариды (включая пищевые волокна, в т.ч. резистентный крахмал), многоатомные спирты, аминокислоты и пептиды (в т.ч. резистентные белки), ферменты, органические низкомолекулярные и ненасыщенные высшие жирные кислоты, антиоксиданты; В качестве пребиотиков могут рассматриваться отдельные витамины и их производные, а также вещества белковой природы. Наиболее и известным пребиотиком является инулин (из цикория) (табл.2).

Таблица 2 – Классификация пребиотиков

Химическая природа	Пребиотики
Углеводы	Фруктоолигосахариды, ксилоолигосахариды, арабиногалактоолигосахариды, изомальтоолигосахариды, изомальтулоза, лактулоза, раффиноза, стахиноза, палатиноза, устойчивые крахмалы, пищевые волокна, гетероглюканы и др.
Белки	Гликопептиды, лактоглобулины
Витамины и их производные	Пантотеновая кислота, пантотеназы, инозит

Исследования показали, что пребиотическим эффектом, т.е. способностью стимулировать рост и активность симбионтной микрофлоры, обладает большое количество соединений:

- олигосахариды (соевый олигосахарид, фруктоолигосахариды, галактоолигосахариды);
- моносахариды (ксилит, раффиноза, сорбит, ксилобиоза и др.);
- дисахариды (лактулоза);
- полисахариды (целлюлоза, гемицеллюлоза, пектины, камеди, слизи, декстрин, инулин и др.);
- пептиды (соевые, молочные и др.);
- ферменты (протеазы сахаромикетов, β -галактозидазы микробного происхождения и др.);

- аминокислоты (валин, аргинин, глутаминовая кислота); антиоксиданты (витамины А, С, Е, каротиноиды, глутатион, Q10, соли селена и др.);
- жирные кислоты (эйкозапентаеновая кислота и др.);
- органические кислоты (уксусная, лимонная и др.);
- растительные и микробные экстракты (морковный, картофельный, кукурузный, рисовый, тыквенный, чесночный, дрожжевой и др.)
- и другие (лецитин, парааминобензойная кислота, лизоцим, лактоферрин, лектины, экстракты различных водорослей и др.).

Хотя они могут и не в полной мере отвечать всем требованиям, предъявляемым к классу пребиотических препаратов, в частности перевариваемости, абсорбируемости, селективности.

К пребиотикам в чистом виде предъявляются достаточно строгие требования:

- они не должны подвергаться гидролизу пищеварительными ферментами человека;
- не должны абсорбироваться в верхних отделах пищеварительного тракта;
- должны селективно стимулировать один вид или определенную группу микроорганизмов, резидентных для толстой кишки.

Основными представителями этой группы препаратов являются:

- олиго- и полисахариды натурального происхождения (например, пищевые волокна злаковых, овощей, фруктов (в частности, инулин), трав (псиллиум);
- дисахариды искусственного происхождения (лактULOза);
- парааминобензойная кислота;
- лизоцим;
- кальция пантотенат.

Изготовителями функциональных продуктов и биологически-активных добавок к пище, направленными на коррекцию состава кишечной микробиоты, а также потребителями отдаётся предпочтение неперевариваемым волокноподобным ОС- классу углеводов со средней степенью полимеризации 2-10, растворимым в воде. Существуют несколько разновидностей таких углеводов: коротко- и среднецепочечные олигомеры из остатков фруктозы (ФОС-фруктоолигосахариды, фруктаны, полифруктозаны, в том числе инулин), галактозы (ГОС-галактоолигосахариды), глюкозы

(глюкоолигосахариды, глюканы и декстраны) и их сочетания. Общим свойством этих соединений является их способность к селективной стимуляции сахаролитических свойств и активации обмена углеводов у бифидобактерий как *in vivo*, в организме человека и животных, так и *in vitro*, на выделенных культурах. Это свойство обусловлено метаболическими отличиями бифидобактерий от других бактерий кишечника и их способностью утилизировать гексозы по специфическому пути через фруктозо-6-фосфат, при котором фермент фруктозо-6-фосфокетолаза играет ключевую роль. Кроме того, ферментами для утилизации углеводов у бифидобактерий являются N-ацетил- β -глюкозаминидаза и β -глюкозидаза, отсутствующие у лактобактерий и других симбионтов ЖКТ.

Действие пребиотиков начинаясь в толстой кишке, реализуется на системном уровне. Не перевариваясь в тонкой кишке, они с пищей поступают в толстую кишку, где утилизируются микрофлорой, обеспечивая её рост, стабильность и активность. Кроме того, в процессе микробного метаболизма из неперевариваемых компонентов пищи образуются короткоцепочечные жирные кислоты.

Наибольшее значение имеют уксусная, пропионовая, масляная/изомасляная, валериановая/изовалериановая, капроновая/изокапроновая кислоты. Бифидобактерии преимущественно образуют уксусную и молочную кислоты в молярном отношении 3:2. Они снижают pH в просвете кишечника, препятствуя развитию гнилостной и патогенной флоры, а также утилизируются энтероцитами в качестве трофического материала.

В наибольшей степени данной концепции отвечают фруктоолигосахариды (ФОС). Считается доказанной связь ФОС с повышением уровня бифидобактерий уровнем здоровья. Экспериментально показана обратная зависимость между уровнями бифидофлоры и глюкозы в крови. Некоторые пребиотики нормализуют уровень холестерина в крови, также связывают и выводят из организма некоторые токсические вещества, поступающие с пищей.

Эти эффекты реализуются за счёт улучшения состава химуса и трофики кишечной слизистой, активации абсорбции магния и кальция, стимуляции выработки энтероэндокринными клетками кишечника гормона насыщения (глюкогана), которая приводит к снижению базального уровня глюкозы и липидов в печени и крови. Кроме того, ФОС хороши тем, что создают вязкий гель в обогащаемых ими продуктах, препятствующий всасыванию моносахаридов, жира, и сами имеют низкую энергетическую ценность.

В зависимости от расположения β -связей между мономерами, атакуемыми представителями симбионтных бактерий, ФОС

подразделяют на инулин- и фруктан содержащие. Известны природные и биотехнологические источники ФОС. К первым относятся широко распространённые богатые инулином топинамбур, корни одуванчика, девясила, цикорий, а также многие съедобные растения (лук, чеснок, спаржа, артишок, бананы, овёс, пшеница, рожь, пшеница, рожь, томаты, инжир, корень цикория, зелёные бананы), ко вторым – производные микробного синтеза из сахарозы и других углеводов. Из-за высокой себестоимости производства инулина из натурального растительного сырья сегодня преимущественно используются синтетические варианты олигофруктозы с более низкой степенью полимеризации (соответственно 40–60 мономеров в цепи у инулина и 7–23 у олигофруктозы).

По сравнению с инулином природного происхождения они характеризуются меньшей селективностью и в среднем в 2 раза чаще стимулируют популяции клостридий и энтерококков, не относящихся к защитным представителям микрофлоры.

Олигосахариды других видов, как правило, вырабатываются промышленным путём из лактозосодержащего сырья (лактозула, сахароспирты- лактит, лактолит) и глюкозосодержащего (полидекстроза, изомальтит) сырья, в том числе вторичного. Бифидогенный эффект у этих видов олигосахаридов значительный, но способность обуславливать системные оздоравливающие эффекты в соответствии с пребиотической концепцией до конца не изучена или чётко не прослеживается.

Наряду с положительными эффектами от применения пребиотиков при создании функциональных продуктов должны учитываться и такие нежелательные для потребителей факторы (присущие только НКП), как флатуленция и её следствие в виде потери нутриентов. Эти эффекты, в первую очередь, обусловлены индивидуальной непереносимостью пищевых волокон, которыми, по сути, являются олигосахариды, и, как правило, они дозозависимы. Известно, чем больше длина углеводной цепи и более разветвлена цепь олигосахарида, тем меньше выражен эффект флатуленции, поэтому выбору пребиотиков должны предшествовать клинические испытания и обоснование величины суточного потребления, которую не рекомендуется превышать. Следует отметить, что, несмотря на объективную способность уже известных пребиотиков благотворно действовать на здоровье потребителей необходимо вести поиск альтернативных доступных природных источников бифидогенных ингредиентов (табл.). Кроме того, целесообразно использовать олигосахариды в качестве ростовых добавок в питательные среды для производства заквасок и

бакконцентратов бифидобактерий, предназначенных для использования в молочной и других отраслях пищевой промышленности.

Таблица 3 – Способы получения пребиотиков

Способ получения	Выделение из природных источников	Ферментативный или кислотный гидролиз	Химический синтез	Ферментативный синтез
Источники	Соя, сахарный тростник, сахарная свекла, топинамбур, цикорий, молочная сыворотка, грибы и актиномицеты, злаковые (отруби)	Галактаны, ксиланы, хитин, ламинаран, арабиноксиланы, пектиновые вещества	Лактоза, сахароза, мальтоолигосахара	Сахароза, мальтоза, лактоза, мальтодекстрины
Пребиотические вещества	Галакто-олигосахариды, фрукто-олигосахариды, инулин, лактоглобулины, гликопептиды, гетероглюканы, лентинаны, устойчивый крахмал, пищевые волокна	Галакто-олигосахариды, арабиноксило-олигосахариды, галактуроно-олигосахариды, N-глюкозаминовые олигосахариды, -1.3 – глюко-олигосахариды	Лактулоза, трансгалакто-олигосахариды, галакто-олигосахариды	Фрукто-олигосахариды, изомальто-олигосахариды, лактулоза, циклодекстрины

Известно, что нормальная микрофлора наряду с волокнистоподобными олигосахаридами усваивает и полисахариды пищевых волокон – устойчивый крахмал, полисахариды растительных клеточных клеток, гемицеллюлозу, пектины, камеди.

Злаковые (зерновые) культуры. Продукты переработки злаковых культур являются важным источником пищевых волокон. Человек употребляет крупяные продукты с раннего возраста – с 4–5 месяцев, так как блюда из крупы (каши) – одна из первых продуктов прикорма ребёнка.

Таблица 4 – Содержание пищевых волокон в различных зерновых культурах

Продукт	Крахмал, %	Суммарное содержание пищевых волокон	Растворимые ПВ, г/100г	Нерастворимые ПВ, г/100г
Рис	61,4	7,5±1,8	3,5±0,7	4,0±0,6
Кукуруза	53,7	8,9±1,0	4,6±1,4	4,3±1,7
Просо	54,6	8,8±3,4	3,8±1,5	5,0±1,9
Пшеница	54,5	12,1±0,8	2,7±0,2	9,4±0,6
Овёс	58,2	17,8±2,3	8,7±1,1	9,1±1,1
Ячмень	54,6	11,8±1,4	7,9±0,9	3,9±0,5

Рассматривая эту группу пищевых продуктов в качестве источника пищевых волокон нужно подчеркнуть их неоспоримые преимущества: безопасность, доступность, возможность создания на их основе продуктов с заданным составом и с требуемыми свойствами. Содержание пищевых волокон в том или ином растительном сырье неодинаково. Оно зависит от его ботанической принадлежности, морфологической и анатомической особенности тканей. В таблице приведено содержание пищевых волокон в некоторых зерновых продуктах.

Сравнивая содержание пищевых волокон в основных видах зерновых культур и современную характеристику значений пищевой ценности продуктов в основных видах крупы, кроме рисовой, попадают в группу с их высоким значением 3 г на 100 г. Содержание пищевых волокон в зерновых продуктах зависит от вида культуры и технологии переработки. Значительное снижение массовой доли пищевых волокон происходит при переработке проса в 3,8 раза и пшеницы в 2,5 раза. Овёс и ячмень по содержанию растворимых пищевых волокон значительно превосходит остальные культуры. Главным растворимым компонентом пищевых волокон зерновых культур являются (1,3;1,4)-β-D-глюканы. Содержание β-глюканов в зерне различных культур представлено в таблице 5.

Таблица 5 – Количественное распределение β-глюканов в зерне различных культур

Материал	Содержание β-глюканов, %			
	овёс	ячмень	рожь	пшеница
Зерно	4,8...4,6	3,9...4,5	1,2...2,9	1,2...1,4
Эндосперм	1,4...2,3	3,7...4,5	1,5...2,0	0,2...0,4
Отруби	9,6	-	-	-

Овес и ячмень. Надо подчеркнуть, что между содержанием пищевых волокон, минеральных веществ и витаминов группы В существует прямая зависимость. Поэтому большой интерес для функционального питания представляют овёс и ячмень. В таблице 3 представлен химический состав овсяной и ячменной муки. Наиболее высоким содержанием минеральных веществ отличаются овсяная и ячменная крупы (в частности, более 350 мг калия, более 40 мг магния). Все крупы за исключением рисовой и манной входят в группу с высоким содержанием железа (более 1,4 мг). Зёрна ячменя и овса содержат значительное количество кальция (93-117мг).

Как правило, крупы, содержащие высокое количество пищевых волокон, имеют и высокое содержание белка. Для овса характерно наилучшее для зерновых культур соотношение аминокислот, в основном объясняемое тем, что доминирующими фракциями овса являются глобулины. Белки глобулинной формы наиболее богаты незаменимыми аминокислотами: треонином – 3,3%, триптофаном – 1,9, валином – 5,3. Характерной особенностью зерна овса является высокое содержание жиров (3–11%), в 2-3 раза больше чем у других зерновых.

Таблица 6 – Химический состав овсяной и ячменной муки.

Показатель	Овсяная мука	Ячменная мука
Белки, %	12,3	10
Жир, %	6,1	1,2
Пищевые волокна, %	8,0	8,1
Влажность, %	13	14
Зола, %	2,1	1,2
Углеводы, %		
Общие	59,5	65,4
Моно- и дисахариды	1,1	1,1
Крахмал	58,2	63,8
Витамины мг%		
Токоферолэквивалент	1,7	1,5
Ниациновый эквивалент	4,3	4,7
В ₁	0,47	0,27
В ₂	0,12	0,09
РР	1,10	2,7
С	0	
Микро- и макроэлементы мг%		
Кальций	64	80
Фосфор	349	343
Калий	362	205
Натрий	37	15

Магний	116	50
Железо	3,9	1,8

Овёс является уникальным видом среди зерновых, поскольку более 50% общего жира семян отлагается в крахмалистом эндосперме, а не в зародыше развивающейся зерновки. Овсяные масла более стойки к окислению, что связано с низким содержанием линолевой кислоты. В масле овса выделено десять высокомолекулярных карбоновых кислот, две из них (линолевая и линоленовая) являются незаменимыми для человека и животных. Суммарное количество линолевой, олеиновой и пальмитиновой кислот достигает 90-95%, стеариновой и линолевой по 1-4 %, что указывает на его высокие пищевые качества. Пищевые волокна овсяной муки содержат целлюлозу (12%), гемицеллюлозу (83%), лигнин (12%).

В настоящее время накоплены данные, свидетельствующие о том, что по многим своим полезным свойствам продукты из ячменя (и сам ячмень) уникальны. Ячмень содержит достаточно ценные по аминокислотному составу белки, слизи, богат активными ферментами (амилаза, протеаза, пероксидаза).

Наличие β-глюкана придает овсяной и ячменной муке способность снижать холестерин в крови при смешивании с желчными кислотами в кишечнике и тем самым предотвращать его абсорбцию. Молекула β-глюкана состоит из глюкопиранозных звеньев, соединённых группами сопряжённых (1-4)- β-связей и изолированными (1-3) – β-связями. Хотя большинство сегментов в этих блоках являются тримерами и тетрамерами, в полимерных цепях обычно присутствуют более длинные блоки. Молекулярный вес β-глюканов ячменя обычно выражается шести – семизначными числами, $31-2700 \cdot 10^3$.

Было доказано что β-глюканы способствуют снижению уровня холестерина и сахара в крови, уменьшают риск сердечно-сосудистых заболеваний и диабета, являются эффективными средствами в предотвращении и лечении ряда серьёзных заболеваний, включая рак кишечника.

Механизмы, посредством которых растворимые пищевые волокна снижают уровень холестерина и глюкозы в крови до конца не выяснены и активно обсуждаются в научной литературе.

Растворимые волокна вместе с желчными кислотами выводятся из организма. При этом содержание желчных кислот снижается, и в результате печень, забирая холестерин из кровяного русла, переносит его в тонкий кишечник, уменьшая уровень холестерина в крови. Употребление β-глюкана снижает количество липопротеидов низкой плотности и триглицеридов в крови, также адсорбцию глюкозы при

употреблении мультикомпонентной пищи. Это подтверждено клиническими исследованиями. Суточная норма потребления β-глюканов составляет около 0,75 г.

Важной технологической функцией растворимых полисахаридов ПВ относящихся к гидроколлоидам является их способность к формированию реологических характеристик продукта, то есть пищевые волокна можно использовать в качестве пищевых добавок со свойствами загустителей, гелеобразователей, стабилизаторов.

Таким образом, зерновые культуры в частности, ячменная и овсяная мука можно рассматривать как перспективные источники натуральных пищевых волокон, обладающих выраженным бифидогенным эффектом.

Бесспорно, углеводные пребиотические компоненты являются наиболее важными ростовыми факторами бифидобактерий, при этом никем не оспаривается, что кроме источников углерода для их размножения требуется большое количество питательных веществ. Необходимыми источниками азота служат аминокислоты, при промышленном культивировании обнаружена потребность ряда штаммов бифидобактерий в лизине, пролине, аргинине, аланине, глутаминовой кислоте, изолейцине, серине, аспарагине.

Добавление в среду пантотеновой кислоты, биотина, рибофлавина, никотиновой кислоты, пептидов, некоторых ненасыщенных жирных кислот стимулирует рост бифидобактерий.

Кедровый жмых. Одним из побочных продуктов переработки кедровых орехов является жмых, который в настоящее время практически не используют.

Жмых – это высокопитательный продукт. Повышенное содержание в кедровом жмыхе белковых фракций, микроэлементов, жира, незаменимых аминокислот, витаминов, безусловно, свидетельствует об эффективности использования его в качестве высокоценной добавки в продукты питания. Согласно представленным данным жмых кедровый следует рассматривать как концентрат ценных в биологическом отношении пищевых веществ-белков, липидов, углеводов. Большое пищевое и технологическое значение имеют углеводы, которые определяют органолептическую ценность и усвояемость продуктов. Отличительная особенность углеводного состава жмыха кедрового ореха – высокое содержание полисахаридов, на долю которых приходится 65% от их общего количества, в том числе пищевых волокон (клетчатки и пентозанов).

Что касается аминокислотного состава, то сравнительная оценка на соответствие эталону ФАО показывает, что белок жмыха лимитирован по содержанию отдельных незаменимых аминокислот, что

является характерным для всех видов растительного сырья. Поскольку жмых предполагается использовать как ингредиент питательной среды для культивирования бифидобактерий, его целевым комбинированием с другими видами сырья можно в определённой степени повысить показатели аминокислотной сбалансированности. Высокие бифидогенные свойства КЖ обеспечивает также наличие витаминов, макро и микроэлементов. Химический состав жмыха кедрового ореха представлен в таблице 7.

Таблица 7 – Химический состав жмыха кедрового ореха

Показатель	Значение
1	2
Белки, %	34
Жир, %	30,6
Углеводы %:	27,1
крахмал	9,4
Сахароза	9,4
клетчатка	5,0
пентозаны	3,5
Аминокислоты, г/100г белка	
Незаменимые:	
валин	5,06
изолейцин	4,95
лейцин	6,09
лизин	6,29
метионин+цистеин	3,86
треонин	4,12
триптофан	2,50
фенилаланин+ тирозин	7,60
Всего:	40,47
Заменимые:	
аргинин	13,85
аспарагиновая кислота	12,95
гистидин	3,50
глицин	3,22
аланин	3,81
глутаминовая кислота	10,55
пролин	7,73
серин	3,92
Всего:	59,53
Итого	100
Микро- и макроэлементы, мг/100 г	

Кальций, мг	4,68
Фосфор, мг	227,53
Калий, мг	121,52
Натрий, мг	2,42
Магний, мг	60,8
Железо, мг	17,06
Марганец, мг	21,66
Медь, мг	3,27
Цинк, мг	26,98
Витамины мг/100г	
Токоферолы (Е)	11,43
Тиамин (В)	0,58
Рибофлавин (В ₂)	1,86
Пантотеновая кислота (В ₃)	1,72
Никотиновая кислота (В ₅)	3,45
Пиридоксин (В ₆)	0,14
Жирные кислоты, %	
Мононенасыщенные	25,0
Полиненасыщенные :	67,9
Линолевая*	45,5
Линоленовая*	21,4

Примечание:* от общей суммы жирных кислот

Дисперсность частиц кедрового жмыха составляет менее 0,5 мм что увеличивает площадь для адсорбции бактерий. Важной технологической характеристикой является способность КЖ к гидратации. Влагопоглощающая и влагоудерживающая способность составляет 178,5 и 80,3%.

Синбиотики

Синбиотики – это физиологически функциональные пищевые ингредиенты, включающие в себя комбинацию пребиотиков и пробиотиков (пробиотических культур вместе со стимулирующим их размножение субстратом), которая обладает свойством взаимного усиливающего (положительного) воздействия на физиологические функции и процессы обмена веществ в организме человека.

Основной особенностью синбиотиков является проявление синергического эффекта, который достигается за счет повышения скорости размножения полезных бактерий в 1,5–2 раза, способности закреплять пробиотики в кишечнике с помощью пребиотиков, увеличения скорости доставки пробиотиков к месту назначения за счет транзита на пребиотиках, активного развития пробиотиков

с получением их метаболитов в процессе производства синбиотиков.

Известны синбиотики, в состав которых входят один или несколько видов пробиотических микроорганизмов, а в качестве пребиотиков применяется лактулоза, экстракт листьев чая, топинамбура, инулин, хитозан, изоляты соевого белка, пектин, спирулина и др.

В основной массе синбиотические продукты – это кисломолочные продукты. В Японии широко распространены синбиотические йогурты. Коллективом университета им. Фридриха-Вильгельма г. Бонна разработана технология синбиотического творога. Имеются и отечественные разработки в данной области. К ним можно отнести кисломолочные напитки с ацидофильными палочками и олигосахаридами, кисломолочно-растительные пастообразные продукты с бифидобактериями и экстрактами плодов и овощей в качестве пребиотиков, напитки из молочной сыворотки и мягкие сыры с пробиотиками и лактулозой, молочные конфеты с про- и пребиотиками и т. д.

Первые синбиотики создавались путем непосредственного смешивания про- и пребиотиков в ходе производства функциональных молочных продуктов. Другим распространенным вариантом стало раздельное внесение про- и пребиотиков в молочные продукты на определенных стадиях производства. Перспективным направлением является создание синбиотических композиций с использованием новых процессов и оборудования, где важную роль имеют способы производства синбиотиков в жидком и криозамороженном состоянии, что связано с высокой степенью готовности к использованию по сравнению с сухими синбиотиками.

Примеры синбиотиков:

1. Lactobacillus acidophilus CBT LA1 + Lactobacillus rhamnosus CBT LR5 + Bifidobacterium longum CBT BG7 + Bifidobacterium lactis CBT BL3 + Bifidobacterium bifidum CBT BF3 + Streptococcus thermophilus CBT ST3 + фруктоолигосахариды (Необиотик Лактобаланс).
2. Lactobacillus acidophilus CBT LA14 + Lactobacillus rhamnosus CBT LR32 + Bifidobacterium lactis CBT BL4 + инулин + витамины группы В-В₁, В₆, В₁₂ (Флориоза).
3. Lactobacillus rhamnosus + Bifidobacterium bifidum + Lactobacillus acidophilus + Lactobacillus plantarum + Lactobacillus bulgaricus + инулин + псилиум (Фитомуцил Сорбент форте).
4. Lactobacillus Acidophilus LA-5 и Bifidobacterium BB-12 + фруктоолигосахариды + нутриоза + гидроксипропилметилцеллюлоза (Флорок форте).

5. *Bifidobacterium animalis* subspecies *lactis* BS01 + инулин, мальтодекстрин (Пробиолог транзит[H7]).
6. *Bifidobacterium bifidum* + *Bifidobacterium longum* + *Bifidobacterium infantis* + *Lactobacillus rhamnosus* + микрокристаллическая целлюлоза + олигофруктоза (Флоросан).
7. *L.rhamnosus* R049 + *L.casei*R215 + *L.plantarum* R202 + *L.acidophilus* R053 + *B.longum* R023 + *B.bifidum* R071 + *B.breve* R070 + фруктоолигосахариды (Флора-Дофилус).
8. *Bifidobacterium bifidum* W23 + *Bifidobacterium lactis* W51 + *Lactobacillus acidophilus* W37 + *Lactobacillus acidophilus* W55 + *Lactobacillus paracasei* W20 + *Lactobacillus plantarum* W62 + *Lactobacillus rhamnosus* W71 + *Lactobacillus salivarius* W24 + инулин + фруктоолигосахариды 1,2% (РиоФлора).
9. *Bifidobacterium longum* + *Bifidobacterium breve* + *Lactobacillus acidophilus* + *Lactobacillus rhamnosus* + *Lactobacillus plantarum* + *Lactobacillus casei* + *Lactococcus lactis* + *Streptococcus thermophilus* + Фруктоолигосахариды 5 г + микрокристаллическая целлюлоза (Максилак).
10. *Lactobacillus paracasei*, штамм CNCM I-1572 + фруктоолигосахариды 5 г (Энтеролактис)
11. *Lactobacillus acidophilus* DDS®-1, *B.bifidum* UABB-10, *B.longum* UABL-14, *B.lactis* UABLA-12, рисовый мальтодекстрин, фруктоолигосахариды (ЛББ).

Синбиотики, отличаются от пробиотиков наличием пребиотических компонентов, а также более сбалансированным составом с большим количеством штаммов микроорганизмов в составе препаратов. Обычно комбинацию составляют несколько штаммов бифидо– и лактобактерий. Также синбиотики, зарегистрированные в последние несколько лет, уже имеют в составе пробиотические компоненты в рекомендуемых дозах – около 5 г фруктоолигосахаридов.

В настоящий момент со средним и низким уровнем доказательности (В-С), ввиду недостаточного количества исследований, рекомендованы следующие комбинации:

- при антибиотик-ассоциированной диарее пробиотики и синбиотики, которые в составе имеют от 3 до 8 компонентов: *Bifidobacterium bifidum* W23, *B. lactis* W18, *B. longum* W51, *Enterococcus faecium* W54, *Lactobacillus acidophilus* W37 и W55, *L. paracasei* W72, *L. plantarum* W62, *L. rhamnosus* W71 и *L. salivarius* W24 [H9] – 10^9 КОЕ/г

- (5 г дважды в день). Обычно в комбинацию входят несколько штаммов разных видов бактерий;
- повышают приверженность к эрадикационной терапии *H.pylori* – Смесь *Lactobacillus acidophilus* и *L. bulgaricus* и *Bifidobacterium bifidum* и *Streptococcus thermophilus* и галактоолигосахаридов $5 \times 10^8 + 1 \times 10^9$, дважды в день;
 - при синдроме раздраженного кишечника – ряд комбинаций в большой дозе в составе синбиотика улучшает качество жизни пациентов;
 - *Lactobacillus rhamnosus* NCIMB 30174, *L. plantarum* NCIMB 30173, *L. acidophilus* NCIMB 30175 и *Enterococcus faecium* NCIMB 30176 – 10 миллиардов бактерий;
 - *Lactobacillus animalis* подвид *lactis* BB12®, *L. acidophilus* LA-5®, *L. delbrueckii* подвид *bulgaricus* LBY-27, *Streptococcus thermophilus* STY-31 – 4 миллиарда КОЕ, дважды в день;
 - *Bifidobacterium animalis* DN-173 010 в ферментированном молоке (с *Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus bulgaricus*) 10^{10} КОЕ, дважды в день.

Увеличение количества компонентов не сделало синбиотики универсальными препаратами. При разных состояниях показали свою эффективность разные комбинации микроорганизмов.

На данный момент все рекомендации по биотикам имеют слабую силу. Для некоторых нозологий (неспецифический язвенный колит, болезнь Крона, диарея, псевдомембранозный колит) назначение пробиотиков, особенно комбинаций, не рекомендуется из-за недостаточной степени изученности. Так же есть вероятность развития сепсиса, вызванного штаммами пробиотических микроорганизмов, у групп риска – наличие иммунного дефицита, ослабленные пациенты, в т.ч. с онкологическими заболеваниями, нарушением кишечного эпителиального барьера.

В настоящий момент основное место применения для про-, пре или синбиотика это профилактика дисбиотических состояний и лечение дисбиоза при конкретной патологии в составе комплексной терапии. В клинической практике продолжают использоваться пробиотики всех поколений. Эффект от пребиотика проявится быстрее, но пробиотик будет работать дольше. Выбор препарата будет обусловлен не только клиническими рекомендациями, безопасностью препарата, но также конкретной клинической ситуацией: при наличии синдрома диареи – препаратом выбора может быть пробиотик 4 поколения или синбиотик, при наличии синдрома избыточного бактериального роста –

санирующие пробиотики 2 поколения, а при запоре – лучше показали себя некоторые пребиотики. Но то, как будет работать про- или пребиотик в каждой конкретной ситуации зависит не только от самого препарата, но и от индивидуальных особенностей микробиоты человека.

Применение пробиотических и пребиотических и синбиотических препаратов продолжает оставаться перспективным для дальнейших клинических исследований. Пробиотические препараты широко используются в медицинской реабилитации и комплексе профилактических мероприятий. Дальнейшие исследования будут способствовать усилению требований к данным препаратам с точки зрения безопасности и доказанной эффективности. Несмотря на большое разнообразие различных штаммов микроорганизмов и их комбинаций, остается нерешенной проблемой индивидуального подбора препаратов. Это связано с тем, что кишечный микробиом у каждого человека индивидуален, а современные методы для оценки состава кишечной микробиоты не применяются широко.

2.3. Пищевые ингредиенты, включая витамины и функциональные смеси

Пищевые ингредиенты используются для повышения питательной ценности, удлинения срока хранения, изменения консистенции и усиления вкуса и аромата продуктов. Используемые производителями пищевые ингредиенты, как правило, имеют растительное или бактериальное происхождение. Многие аминокислотные добавки, усилители вкуса и витамины, добавляемые в пищевые продукты, производятся с помощью бактериальной ферментации. В результате реализации комплекса мероприятий биотехнология должна обеспечить производителям пищевых продуктов возможность синтеза большого количества пищевых добавок, которые в настоящее время слишком дороги либо малодоступны из-за ограниченности природных источников этих соединений.

Вопросы *биосинтеза рибофлавина* и его регуляции детально изучены в работах Г. М. Шавловского. В состав среды для роста продуцентов витамина B₂ входят достаточно сложные органические вещества – соевая мука, кукурузный экстракт, сахароза, карбонат кальция, хлорид натрия, гидрофосфат калия, витамины, технический жир. Грибы весьма чувствительны к изменению состава среды и подвержены инфицированию. Перед подачей в ферментер среду подвергают стерилизации, добавляя к ней антибиотики и антисептики. Подготавливают жидкую питательную среду и посевной материал культуры дрожжей в разных емкостях – ферментере и посевном аппарате.

В качестве посевного материала используют споры *E. ashbyii*, выращенные на пшене (7–8 дней при 29–30°C). После стерилизации жидкий посевной материал подается в ферментер. Процесс ферментации грибов для получения кормового рибофлавина длится 3 суток при температуре 28–30°C. Концентрация рибофлавина в культуральной жидкости может достигать 1,4 мг/мл. По завершении процесса ферментации культуральную жидкость концентрируют в вакууме, высушивают на распылительной сушилке (влажность 5–10%) и смешивают с наполнителями.

В 1983 г. во ВНИИ генетики микроорганизмов сконструирован рекомбинантный штамм продуцента *Bacillus subtilis*, характеризующийся увеличенной дозой оперонов, которые контролируют синтез рибофлавина. Клонированием генов рибофлавинового оперона в одной из созданных плазмид был получен

производственный штамм-продуцент витамина В₂, способный синтезировать втрое больше по сравнению с *E. ashbyii* количество рибофлавина всего за 40 ч ферментации.

Получение витамина В₁₂ (Cоa[a-(5,6-диметилбензимидазолил)] – Сор – цианокобамид). Витамин В₁₂ открыт в 1948 г. одновременно в США и Англии. В 1972 г. в Гарвардском университете был осуществлен химический синтез корриноидного предшественника витамина В₁₂. Химический синтез корнестерона – структурного элемента корринового кольца витамина, включающий 37 стадий, в крупных масштабах не воспроизведен из-за сложности процесса. Витамин В₁₂ регулирует углеводный и липидный обмен, участвует в метаболизме незаменимых аминокислот, пуриновых и пиримидиновых оснований, стимулирует образование предшественников гемоглобина в костном мозге; применяется в медицине для лечения злокачественной анемии, лучевой болезни, заболеваний печени, полиневрита и т. п. Добавление витамина к кормам способствует более полноценному усвоению растительных белков и повышает продуктивность сельскохозяйственных животных на 10–15 %.

В последние годы исследуется возможность получения витамина с использованием иммобилизованных клеток пропионовокислых бактерий. Для нужд животноводства сотрудниками Института биохимии им. А. Н. Баха РАН разработана более простая и дешевая технология получения витамина В₁₂, в создание которой большой вклад внесли работы В.Н.Букина, В.Я.Быховского, И.С.Логоткина, Е. С. Панцхавы и др.

По указанной технологии ферментацию осуществляет сложный биоценоз термофильных микроорганизмов, производящих метановое брожение. Комплекс микроорганизмов включает целлюлозоразлагающие, углеводсбраживающие, аммонифицирующие, сульфитвосстанавливающие и метанообразующие бактерии. На первой фазе процесса (10–12 дней) развиваются термофильные углеводсбраживающие и аммонифицирующие бактерии. При этом в слабокислой среде (рН 5,0–7,0) органические соединения превращаются в жирные кислоты и аммиак. На второй фазе, когда среду подщелачивают до рН 8.5, в биоценозе преобладают метанообразующие бактерии, которые сбраживают возникающие на первой фазе продукты до метана и диоксида углерода. Именно метанообразующие бактерии – главные продуценты витамина. Обогащение сред очищенными культурами метанообразующих бактерий увеличивает выход активных форм витамина В₁₂. Источником углерода в питательной среде служит ацетонобутиловая и спиртовая барда, которую представляют заводы, перерабатывающие зерно и мелассу. Для оптимизации питательной

среды в нее добавляют соединения кобальта (хлорид кобальта – 4 г/м³), который входит в состав молекулы витамина В₁₂, и субстраты для роста метанообразующих бактерий – низшие жирные кислоты и низшие спирты, что позволяет значительно повысить выход витамина. Подготовленное сырье освобождают в декантаторе от взвешенных частиц и непрерывно подают в нижнюю часть ферментера (метантенка) емкостью 4200 м³. Одновременно в ферментер поступает посевной материал культуры микроорганизмов, предварительно выращенный в специальных аппаратах. Для выращивания продуцента требуются облигатно анаэробные условия, ибо даже следы кислорода подавляют рост бактерий. При создании анаэробных условий в среду подают диоксид углерода или газы, выделяющиеся в процессе ферментации. Ежедневно из метантенка отбирают 25–30 % объема среды. Продукт ферментации стабилизируют, подкисляя соляной или фосфорной кислотой до pH 6,3–6,5 и добавляя 0,2–0,25 % сульфита натрия, что предотвращает разрушение витамина при тепловой обработке, особенно существенное в щелочной среде. В дальнейшем отобранная часть культуральной жидкости дегазируется, упаривается в вакууме.

Производство органических кислот. В настоящее время биотехнологическими способами в промышленных масштабах синтезируют ряд органических кислот. Из них лимонную, глюконовую, кетоглюконовую и итаконовую кислоты получают лишь микробиологическим способом, молочную салициловую и уксусную – как химическим, так и микробиологическим способами, а яблочную – химическим и ферментативным путем. Получение уксусной кислоты. Уксусная кислота имеет наиболее важное значение среди всех органических кислот. Ее используют при выработке многих химических веществ, включая каучук, пластмассы, волокна, инсектициды.

Процесс идет в анаэробных условиях в режиме непрерывного культивирования продуцента. Для роста бактерии *Acetobacter aceti* используют питательные среды, содержащие 6–12% этилового спирта, 1 % бактериального гидролизата, 0,05 % дигидрофосфата калия, 0,1% гидрофосфата аммония и 0,05% сульфата магния. Максимальная удельная активность непрерывной культуры *A. aceti* (количество микрограммов субстрата, подвергшегося окислению 1мкг биомассы за 1 мин) достигается к 20-м суткам культивирования при концентрации спирта 7 % и составляет 3,0 ед./мг.

Получение лимонной кислоты. Лимонную кислоту широко используют в пищевой, фармацевтической и косметической промышленности. Ею заменяют фосфаты в составе детергентов, так как она полностью метаболизируется живыми организмами. Лимонная

кислота образует хелаты с металлами, поэтому ее применяют для их очистки. Объем мирового производства цитрата составляет 400 тыс. т/год. Самый крупный производитель лимонной кислоты – США. Производство лимонной кислоты принадлежит к числу старейших промышленных микробиологических процессов: оно было организовано в 1893 г. С этого момента параллельно развитию фундаментальной микробиологии велись изыскания оптимальных продуцентов и технологических вариантов процесса ферментации. Для промышленного производства лимонной кислоты используют главным образом культуру гриба *Aspergillus niger*, а также *A. wentii*. Метаболическим источником лимонной кислоты в организме служит цикл трикарбоновых кислот – составная часть цикла Кребса.

Реакция образования лимонной кислоты, катализируемая цитратсинтазой, открывает цикл Кребса, в котором цитрат постепенно окисляется до щавелево-уксусной кислоты (ЩУК). ЩУК снова конденсируется с ацетил-КоА, так что вновь образуется лимонная кислота. Цитратсинтаза определяет скорость реакций, составляющих цикл Кребса. Активность фермента зависит от концентрации ЩУК, содержание которой может поддерживаться за счет функционирования конститутивной пируваткарбоксилазы, обеспечивающей переключение в аэробных условиях процессов гликолиза и глиоксильного цикла.

Скорость оборота цикла Кребса определяется поддержанием необходимого уровня окисленных форм коферментов дегидрогеназ (НАД⁺ и ФАД; см. уравнение реакции), поэтому высокий выход цитрата получается лишь при условии хорошей аэрации. Накопление в культуральной среде существенных количеств цитрата — промежуточного соединения цикла Кребса — невыгодно для организма и является следствием дисбаланса метаболизма или нарушения его генетической природы. Рост культуры грибов обычно регулируют путем изменения содержания фосфата, ионов марганца, железа и цинка в среде. Дефицит фосфата ведет к сверхпродукции цитрата. Роль ионов металлов не до конца установлена. Считают, что дефицит ионов металлов влияет на свойства клеточных мембран и морфологию гиф. Процесс ферментации, ведущий к образованию лимонной кислоты, проводят при низких значениях pH (3–4), что облегчает поддержание стерильных условий ферментации и уменьшает возможность образования побочных продуктов. В более щелочной среде происходит накопление щавелевой и глюконовой кислот. Предполагают, что в кислой среде стимулируется гликолиз, что обеспечивает направление потока углерода в цикл Кребса.

Питательные среды для культивирования продуцентов лимонной кислоты в качестве источника углерода содержат дешевое углеводное

сырье: мелассу, крахмал и глюкозный сироп. Гриб *A. niger* чаще всего выращивают на мелассе. Гриб *Trichoderma viride* синтезирует значительные количества цитрата из глюкозы, что позволяет использовать для этого процесса целлюлозу. Предложены штаммы бактерий (*Corynebacterium*, *Arthrobacterium* и *Brevibacterium*) и дрожжей рода *Candida*, осуществляющие процесс на основе *n*-парафинов (C9–C30), которые пока широко не внедрены в промышленность.

Существует несколько технологических вариантов промышленного производства лимонной кислоты. Первоначально был разработан вариант процесса, основывающийся на поверхностной ферментации, позднее – на глубинном культивировании. Последнее ведется в две стадии: на первой стадии идет рост мицелия, а на второй, после выхода культуры в стационарную фазу – интенсивный синтез лимонной кислоты. В конце ферментации массу мицелия отделяют путем фильтрования и промывают. Затем при $\text{pH} < 3,0$ в виде кальциевой соли осаждают щавелевую кислоту, а из маточного раствора выделяют лимонную кислоту в форме средней соли, кристаллизующейся в комплексе с четырьмя молекулами воды. Свободную кислоту выделяют из промытых кристаллов соли после их обработки сульфатом кальция. Высокоочищенные препараты лимонной кислоты получают после дополнительной процедуры очистки методом ионообменной хроматографии. Выход продукта составляет 85 %. С 20-х годов XX в. налажено промышленное производство D- глюконовой кислоты из глюкозы при участии *A. niger*. При этом за 48 ч ферментации культуры гриба степень превращения субстрата составляет 90 %. Глюконат натрия, в виде которого обычно выделяют глюконовую кислоту, используют для извлечения металлов, борьбы со ржавчиной, как моющее средство и в качестве медицинского препарата.

С участием культуры грибов из рода *Aspergillus* путем ферментации глюкозы получают с высоким выходом итаконовую кислоту, используемую для производства пластмасс и красителей.

Новые возможности для интенсификации производственных процессов получения органических кислот открывает применение иммобилизованных ферментов и клеток микроорганизмов.

ТЕМА 3. ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ

Литературные данные свидетельствуют, что в настоящее время с помощью генноинженерных штаммов *Escherichia coli* получают более 70 протеинов, таких как инсулин, интерферон, антиген вируса гепатита С. Раньше для получения гормонов использовались органы и ткани животных и человека (из крови доноров, удаленных при операции органов, трупного материала). Требовалось много материала для получения небольшого количества продукта. Так, человеческий гормон роста соматотропин получали из гипофиза человека, каждый гипофиз содержит его не более 4 мг. В то же время для лечения одного ребенка, страдающего карликовостью, требуется около 7 мг соматотропина в неделю, а курс лечения должен продолжаться несколько лет (до половой зрелости). С применением генноинженерного штамма кишечной палочки *Escherichia coli* K12 в настоящее время получают до 100 мг гормона роста на 1 литр среды культивирования. Соматотропин также способствует заживлению ран и ожогов, регулирует обмен кальция в костной ткани.

Инсулин – гормон поджелудочной железы, представляет основное средство лечения при сахарном диабете. Эта болезнь вызвана дефицитом инсулина и проявляется повышением уровня глюкозы в крови. Долгое время источником инсулина служили железы коров и свиней. Учитывая, что поджелудочная железа коровы весит 200–250 г, для получения 100 г кристаллического инсулина нужно 800–1000 кг исходного сырья. Инсулин построен из двух полипептидных цепей А и В длиной 20 и 30 аминокислот, последовательность которых была установлена Сэнгером в 1955 г. В 1979 г. в США были синтезированы гены, кодирующие А и В цепи инсулина. Далее каждый синтетический ген встраивали в плазмиду *E. coli* в конце гена галактозидазы. После синтезированные полипептиды отщепляли от фермента, проводили их очистку и цепи соединяли *in vitro* для получения полной молекулы инсулина. В клетках *E. coli* был также осуществлен биосинтез проинсулина, а не только отдельных ее цепей. Для этого на и-РНК проинсулина синтезировали ее ДНК-копию с помощью обратной транскриптазы (ДНК-полимераза). Этот способ имеет серьезное преимущество, поскольку различные этапы экстракции и выделения гормона сведены к минимуму. С помощью этого метода был получен высокий гормона – 200 г на 1000 л культуральной жидкости (это эквивалентно количеству инсулина, выделенного из 1600 кг поджелудочной железы животных). Исследователям из компании

«Генентек» потребовалось 10 месяцев, чтобы в сентябре 1978 г. получить инсулин человека в специально сконструированном штамме кишечной палочки. Этот инсулин прошел самые серьезные и длительные испытания, которые показали, что он не вызывает никаких побочных явлений, как инсулин животных (у одного из каждых 20-ти больных инсулин животных вызывает аллергию; часто наблюдаются также расстройства почек и зрения). Кроме того, при длительном применении препарат не вызывал отрицательных иммунологических реакций. Технология производства инсулина в бактериальных клетках имеет большие преимущества перед получением инсулина из поджелудочной железы животных: не зависит от перебоев или количества сырья, конечный продукт всегда имеет одинаковый состав и степень чистоты. В октябре 1982 г. Был налажен выпуск «хемулина» (препарата синтетического инсулина человека) фирмой «Эли Лилли», которая затратила 100 млн. долларов, чтобы начать поставку продукта на рынок.

Вакцины — специально выращенные болезнетворные микроорганизмы, вирусы и их компоненты, которые после специальной обработки вводят в виде ослабленной или убитой культуры в организм и обеспечивают за счет этого создание у человека иммунитета к данному заболеванию. С этого началась эпоха Луи Пастера, и по сей день вакцины — это наиболее эффективное средство борьбы с инфекционными заболеваниями. В настоящее время выпускают живые вакцины, содержащие ослабленные живые клетки возбудителей инфекционных болезней, к тому же генетически измененные. Другая группа вакцин — убитые или инактивированные, клетки. Третья группа — «химические» вакцины, представляющие собой антигены, тем или иным способом извлеченные из микробных клеток. Четвертая группа — это специальным образом обезвреженные токсины, выделяемые некоторыми возбудителями заболеваний в культуральную жидкость (например, дифтерийный, столбнячный, ботулиновый и другие токсины).

Антибиотики — это не просто вещества, которые действуют против болезнетворных микроорганизмов, но это еще и вещества, получаемые с помощью микроорганизмов-продуцентов. В 1929 г. английский ученый Александр Флеминг обратил внимание на то, что вблизи плесени не растут многие болезнетворные микроорганизмы. Позднее было выделено вещество, синтезируемое плесенью, и названо оно пенициллином. Во время Второй мировой войны было начато его производство и применение для лечения раненых. Эффект превзошел все ожидания; по некоторым данным, только в 1940-е и 1950-е годы с помощью пенициллина было спасено от смерти более 15 миллионов

человек. Сразу же после открытия пенициллина начались поиски и других антибиотиков. Обычно антибиотик не действует на все подряд микроорганизмы, да это и нежелательно: ведь наряду с болезнетворными будут уничтожаться полезные микробы, которые всегда есть в человеческом организме. Поэтому должен быть набор различных антибиотиков, пригодных для разных болезней. Но есть и другая сторона: болезнетворные микроорганизмы постепенно «привыкают» к действию антибиотиков; возникают микробы, которые вызывают заболевание, но нечувствительны к «старому» антибиотику. Конечно, такое «привыкание» происходит небыстро – в течение 10–15 лет. Но раз это все-таки происходит, ученым необходимо искать все новые и новые антибиотики и продуцирующие их микроорганизмы. Многие ученые в разных странах мира работают над этим. Сейчас существует уже более 3000 различных антибиотиков, все время ищут более продуктивные микроорганизмы для их биосинтеза и при этом достигают поразительных успехов. Например, плесень Флеминга давала активность по пенициллину не более 10 ед/мл. А современные штаммы микроорганизмов дают 50000 ед/мл того же пенициллина. Интересно, что в США в послевоенные годы поисками микроорганизмов занимались не только ученые. Институты давали объявления в газеты с просьбой за вознаграждение приносить им разные образцы плесеней. Рассказывают, что в одном из городов этим занималась некая пожилая женщина по имени Мэри. Она по всему городу искала плесень в гнилых фруктах, овощах, испорченном хлебе. Ей даже дали прозвище «Заплесневелая Мэри». Так вот, именно она нашла родоначальника современных высокоактивных штаммов биосинтеза пенициллина в заплесневевшей гнилой дыне. Этот микроорганизм был назван *Penicillium chrysogenum*.

Витамины. Известно, что витамины сначала были найдены во фруктах и овощах, откуда их и получали. Позднее были открыты микроорганизмы, синтезирующие витамины гораздо быстрее, чем растения. Однако поскольку молекулы витаминов относительно просты, химики научились их синтезировать. Сейчас за биотехнологией осталось производство витаминов В₂ и В₁₂ и один из процессов в преимущественно химическом производстве витамина С.

Иммуномодуляторы. Физическое здоровье человека во многом определяется состоянием его иммунной системы (а не только, например, отсутствием болезнетворных микробов или наличием витаминов). Найдены средства (интерфероны и интерлейкины), которые стимулируют иммунную систему безотносительно к типу заболевания. Их получают из крови человека, на которую во все годы был большой дефицит, а теперь, в связи с угрозой СПИДа, в особенности. К счастью,

биотехнологии создали микроорганизмы, синтезирующие интерфероны с высокой скоростью, так что эта проблема, во всяком случае, может быть решена, если вложить необходимые средства.

Иммунодепрессанты. Бывают случаи, когда требуется не стимулировать иммунную систему, а наоборот, подавлять ее. Классический пример – пересадка органов: сердца, почек и других. Первые операции такого рода, несмотря на мастерство хирургов, заканчивались неудачно, так как чужеродный орган отторгался организмом. Сейчас после операций используют специальные вещества – иммунодепрессанты, многие из которых получают биотехнологическим путем, например, циклоспорин А. В результате больным удастся «освоить» чужой орган и жить с ним полноценной жизнью.

Кровезаменители. Во многих случаях при операциях человеку необходимо переливание крови. Как уже упоминалось, кровь – большой дефицит. В связи с этим созданы различные кровезаменители, например, полиглюкин, которые синтезируют с помощью специальных микроорганизмов.

Стероидные гормоны. В детстве многие страдают диатезом, иногда возникает и более тяжелое заболевание – экзема. Для лечения этих болезней используют мази, основанные на стероидных гормонах, при получении которых применяют процесс биотрансформации.

Медицинские ферменты. С помощью биотехнологии получают ферменты, применяемые в медицине. Один из них – стрептокиназа – помогает растворять тромбы в кровеносных сосудах и тем самым спасает людей от преждевременной смерти. Другой фермент – бета-галактозидаза – помогает усваивать молочный сахар (лактозу) тем людям, у которых по генетическим причинам такой фермент в организме не вырабатывается. Фермент протеазу используют для очистки гнойных очагов, а также для лечения ожогов. L-аспарагиназу применяют для лечения рака: она лишает раковые клетки аминокислоты аспарагина; здоровым клеткам это не страшно – они сами синтезируют аспарагин. Коферменты – это вещества, которые усиливают деятельность многих собственных ферментов в организме человека. Собственно говоря, многие витамины являются коферментами. Но есть и другие коферменты, также получаемые с помощью биотехнологии, которые используют для лечения сердечных и других заболеваний, например, инозин, рибоксин, убихинон и др.

Медицинские аминокислоты. Известно, что белки состоят из аминокислот. Иногда заболевшего человека приходится «кормить» при помощи уколов. В этом случае вместо белкового питания дают смесь аминокислот, которую получают биотехнологическим путем –

ферментативным расщеплением белка, или смесь аминокислот, каждую из которых получают специальным биосинтезом, когда аминокислота синтезируется особым штаммом микроорганизмов. Используют аминокислотные смеси и для питания спортсменов, наращивающих мышечную массу. Это не допинг, так как аминокислоты образуются и естественным путем при ферментативном расщеплении белка в желудке человека.

Подсластители. Биотехнология позволяет получать препараты на основе аминокислот, которые в 200 раз слаще сахара (аспартам) и при этом сахаром не являются. Они очень подходят больным диабетом и людям, склонным к полноте, – это как бы «безопасная сладость».

Биоразлагаемые полимеры. В хирургии применяют нити, которые позволяют сшить разрушенную ткань внутри организма человека и животного во время операции. Но необходимо, чтобы после того как шов заживет, сама эта нить разложилась и исчезла. Для этих целей использовали «кетгут», представляющий собой кишку ягненка длиной около 30 м. Эта вымытая, скрученная и высушенная кишка и есть хирургическая нить. Она не совсем хороша, так как представляет собой чужеродный белок и вызывает иммунное отторжение – в виде воспаления. Биотехнология позволила создать биоразлагаемые полимеры в виде материала, напоминающего по свойствам полипропилен и способного к формированию нитей, штифтов для соединения костей, пленок и других необходимых компонентов. Такой материал называется полигидроксibuтират и получают его путем выращивания специальных бактерий, больше половины объема которых занимают как бы комочки пластмассы (это видно под электронным микроскопом). Этот прекрасный материал можно использовать и для создания лекарств более длительного действия (они выделяются из гранул с полигидроксibuтиратом по мере их растворения), а также для аппликаций на раны или ожоги.

Моноклональные антитела. В настоящее время развивается новое направление диагностирования различных заболеваний – применение моноклональных антител. Обычные поликлональные антитела содержатся в сыворотке крови иммунизированных животных. Но там, кроме целевых антител, есть и другие, что часто мешает диагностированию. По новому методу можно получать специфические антитела к клеткам разных органов одного человека, например, антитела к клеткам раковых опухолей, и появилась надежда на возможность лечения с помощью таких антител (они не действуют на здоровые клетки). Основанные на моноклональных антителах диагностикумы позволяют определять беременность, выявлять предрасположенность к диабету, ревматоидному артриту, устанавливать

наследственные заболевания, сопровождающиеся утратой каких-то ферментов или белков.

Препараты против комаров. Наряду с различными химическими препаратами созданы биопрепараты, представляющие собой микроорганизмы, патогенные для личинок комаров и безвредные для человека и других животных. Этим препаратом обрабатывают места, где происходит размножение комаров (в частности, подвалы домов), что позволяет снизить их количество или полностью ликвидировать.

Нейропептиды. Ведется разработка биотехнологических методов получения естественных нейропептидов, которые ответственны в мозге человека за сон, боль, память, удовольствие и т. д. Подход тот же – с помощью генной инженерии «конструируют» микроорганизм, способный синтезировать соответствующий пептид.

Косметические токсины. В последнее время научились делать косметические средства, разглаживающие морщины и омолаживающие лицо, из ботулинов – сильнодействующих ядов паралитического действия, продуцируемых микроорганизмами.

Проект «Геном человека» и генная терапия. Сравнивая гены, ученые смогут выявить связи разных генетических вариаций и мутаций со всевозможными заболеваниями. Генотерапия постепенно начинает привлекать все большее внимание научно-популярных изданий и СМИ. Несколько десятков технологий генотерапии разных заболеваний прошли апробацию на тысячах больных и добровольцах в США, Англии, Франции и других странах. Первая фаза клинических испытаний, как известно, направлена на проверку безопасности нового средства (метода) лечения. Имеются сообщения о нескольких случаях возникновения лейкомиоподобных заболеваний после клинической апробации некоторых технологий генотерапии. Отмечается, что во всех таких случаях использовались векторы на основе ретровирусов. Сообщается также об отдельных случаях, когда введенный ген экспрессировался не столь длительно, как было запланировано.

Приведенные примеры, конечно, не исчерпывают всех перспектив биотехнологии в медицине, но они демонстрируют первостепенную важность биотехнологии для этого вида человеческой деятельности.

3.1. Производство антибиотиков

Необходимость поисков новых антибиотиков обусловлена многими причинами. Постоянно ведутся поиски эффективных антибиотиков для борьбы с теми заболеваниями, на возбудители которых не действуют существующие препараты. Потребность в антибиотиках обусловлена также тем, что при их использовании в лечебных целях происходит накопление резистентных к этим соединениям форм организмов. Длительное и не всегда оправданное применение антибиотиков приводит зачастую к ускорению эволюции патогенных организмов в сторону закрепления их устойчивости к этим препаратам. Поэтому необходимо постоянно заменять одни виды антибиотиков на другие. Для этого нужно находить наиболее активные микроорганизмы – продуценты антибиотиков.

Основные этапы поисков антибиотиков:

- выделение микробов-антагонистов из почвы;
- определение антагонистического спектра и активности антибиотиков;
- подбор условий культивирования продуцентов антибиотиков;
- выделение и химическая очистка антибиотиков;
- изучение физико-химических и фармакологических свойств антибиотиков;
- испытание химико-терапевтической эффективности;
- идентификация антибиотиков.

В мире ежегодно производится антибиотиков почти на 20 млрд. долларов. К числу антибиотиков относятся важнейшие противомикробные и противоопухолевые препараты. Открытие антибиотиков произвело переворот в лечении инфекционных заболеваний. Ушли в прошлое представления о неизлечимости многих бактериальных инфекций (туберкулез, сепсис, сифилис и др.). Антибиотики применяют в ряде отраслей народного хозяйства (растениеводство, животноводство, ветеринария, пищевая промышленность и др.), где они используются более широко, чем в медицине. Организация крупномасштабного производства антибиотиков сыграла решающую роль в становлении промышленной биотехнологии.

К антибиотикам относятся низкомолекулярные эффекторы изначально природного происхождения, способные подавлять рост живых клеток. Антибиотики, продуцируемые растительными

объектами, называют фитонцидами. Вопрос о физиологических функциях антибиотиков, их месте в метаболизме и процессах эволюции окончательно не решен. Антибиотики возникли в борьбе за существование почвенных биоценозов, поэтому многие из них служат средствами нападения и защиты, т. е. представляют собой своеобразное химическое «оружие» клетки. Однако эти функции у антибиотиков не единственны. Известно, что они могут участвовать в процессах детоксикации вредных метаболитов, контролировать некоторые стороны обмена веществ и целые процессы развития, например, дифференцировку клеток, служить запасными питательными веществами. Некоторые исследователи рассматривают антибиотики как случайные вещества, обладающие полезными свойствами, другие считают их реликтовыми молекулами, вытесненными в ходе эволюции продуктами рибосомального синтеза, но и до сих пор сохранившими способность вмешиваться в биохимические процессы.

Способность нитчатого гриба зеленой плесени *Penicillium notatum* вызывать гибель микроорганизмов впервые была установлена в 1928 г. английским микробиологом А. Флеммингом. Однако лечебные свойства этой плесени были описаны еще в 1871 г. Русским дерматологом А. Г. Полотебновым. Количество открываемых антибиотиков постоянно растет. В 1940 г. было известно всего 6 антибиотиков, а в настоящее время описано более 12 000 аналогичных соединений, из которых в клинике применяют около 200 препаратов. 97% известных антибиотиков токсичны, поэтому в практике не используются. В химическом отношении они представляют сборную группу органических веществ.

В зависимости от химической природы и ряда других свойств известные антибиотики делят на ряд классов:

1. Р-Лактамные (пенициллины, цефалоспорины) составляют более 50 % рынка антибиотиков.
2. Тетрациклины (тетрациклин, морфоциклин, метациклин).
3. Макролиды (эритромицин, олеандомицин).
4. Аминогликозиды (гентамицин, амикацин).
5. Гликопептиды (ванкомицин, ристомицин).
6. Амфениколы (левомицетин).
7. Линкосамиды (линкомицин).
8. Полиеновые [противогрибковые (нистатин, леворин)].
9. Противоопухолевые (блеомицин) и др.

Большой вклад в установление структуры ряда антибиотиков внесли М. М. Шемякин, Ю. А. Овчинников, В. Т. Иванов, А. С. Хохлов, Г. Б. Локшин, М. Н. Колосов, Ю. А. Берлин, Е. С. Есипов.

По типу действия антибиотики делят на бактерицидные

(лактамы, аминогликозиды), вызывающие гибель микроорганизмов, и бактериостатические (макролиды, тетрациклины, левомицетин), нарушающие способность микроорганизмов делиться. По спектру действия различают антибиотики узкого и широкого действия. К последним относят тетрациклины, макролиды, аминогликозиды, которые особенно полезны в случае неидентифицированных возбудителей болезни, однако при длительном применении они вызывают у пациентов дисбактериоз.

Биосинтез антибиотиков – наследственная особенность организмов, проявляющаяся в том, что каждый вид (штамм) способен образовывать один или несколько вполне определенных, строго специфичных для него антибиотических веществ. Вместе с тем известно, что одинаковые антибиотики могут образовываться несколькими видами организмов.

Выявление потенциальной возможности образовывать в процессе жизнедеятельности антибиотики связано с условиями культивирования организмов. В одних условиях организм образует антибиотик, в других условиях тот же организм не будет обладать способностью синтезировать антибиотическое вещество. В связи с резистентностью микроорганизмов к антибиотикам постоянно проводится их совершенствование, что приводит к появлению новых поколений. Например, цефалоспориновые антибиотики, приводящие к нарушению синтеза компонентов клеточной мембраны, присутствуют в виде 4-х поколений полусинтетических цефалоспориновых антибиотиков:

1. Цефадроксил, Цефазолин, Цефалексин – 1 поколение;
2. Цефамандол, Цефуроксим – 2 поколение;
3. Цефиксим, Цефоперазон, Цефотаксим, Цефтазидим, Цефтриаксон – 3 поколение;
4. Цефпиром, Цефепим – 4 поколение.

Основными продуцентами антибиотиков являются актиномицеты, плесневые грибы, бактерии. Главным местом их обитания является почва. Для выделения микроорганизмов, образующих антибиотики, берут пробы почвы, высушивают ее до воздушно-сухого состояния и делают высевы на специальные питательные среды.

Выделенные штаммы-продуценты антибиотиков часто переменчивы и нестабильны. Поэтому методом селекции отбирают наиболее перспективные штаммы, а затем проводят отбор индуцированных мутантов. Мутантное действие на микроорганизмы достигается применением различных источников лучистой энергии (УФ-лучи, рентгеновские лучи, нейтроны и др.).

Антибиотики продуцируются плесневыми грибами, актиномицетами, эубактериями и рядом других микроорганизмов.

Некоторые из этих организмов способны продуцировать большое количество антибиотиков.

Так, шесть родов филаментозных грибов производят 1000 различных антибиотиков, в том числе пенициллин и цефалоспорин, а три рода актиномицетов – 3000 антибиотиков. Среди актиномицетов наибольший вклад вносит род *Streptomyces*, один из видов которого *S. griseus* синтезирует более 50 антибиотиков. В процессе образования антибиотиков задействовано значительное число генов. Массовая расшифровка первичной структуры геномов микроорганизмов показала, что эта величина равна 1–2 %. Так, у *Bacillus subtilis* число таких генов достигает 2 %, что обеспечивает микроорганизму большие возможности для защиты и адаптации. С другой стороны, это обстоятельство затрудняет анализ путей биосинтеза антибиотиков и идентификацию отдельных мутаций, способных увеличить выход продукта. Тем не менее, большинство известных в настоящее время высокопродуктивных штаммов продуцентов антибиотиков получено традиционными методами мутагенеза и селекции.

Выделенные культуры микроорганизмов-антагонистов изучают по содержанию в них антибиотических веществ, необходимых для практических целей. При этом методом хроматографии определяют наличие известных антибиотиков. Если обнаруживают новый антибиотик, то вначале осуществляют первичное выделение и химическую очистку антибиотика, определяют его токсичность и химико-терапевтические свойства на животных, зараженных возбудителями различных заболеваний.

Биосинтез молекулы любого антибиотика происходит с участием ряда ферментов – от нескольких единиц до нескольких десятков. Координация действия ферментов, т.е. обеспечение правильной последовательности ферментативных реакций, обеспечивается разными, не всегда еще ясными путями.

Процесс развития микроорганизмов (продуцентов антибиотиков) имеет, как правило, двухфазный характер:

В первой фазе развития культуры, носящей название трофофазы (тропофазы) (фаза сбалансированного роста микроорганизма), идет интенсивное накопление биомассы продуцента. Продуцент синтезирует белки, нуклеиновые кислоты, углеводы, ферменты и другие биологически активные вещества (БАВ), необходимые для роста микроорганизма; наблюдается быстрое потребление основных компонентов субстрата (источников углерода, азота, фосфора и др.), интенсивное поглощение кислорода. В культуральной среде может снижаться рН, как результат накопления органических кислот. В трофофазе антибиотик, как правило, не образуется или его количество

незначительное. Возможно, в этой фазе синтез ферментов, принимающих участие в образовании антибиотика, подавлен.

Вторая фаза развития культуры, носящая название идиофазы (фаза несбалансированного роста) характеризуется снижением общего количества биомассы. В период второй фазы происходит развитие микроорганизма и образование новых клеток, но в культуре начинают преобладать автолитические процессы, что приводит к снижению общего числа биомассы.

Продукты метаболизма микроорганизмов частично используются на построение клеток мицелия, частично – на синтез антибиотика. Среда обогащается продуктами обмена и продуктами автолиза клеток, возрастает значение рН, происходит интенсивный процесс биосинтеза и максимальное накопление антибиотика.

Биосинтез антибиотиков возрастает в фазе замедленного роста клеточной популяции (конец трофофазы) и достигает максимума в стационарной фазе (идиофазе). Считают, что в конце трофофазы изменяется энзиматический статус клеток, появляются индукторы вторичного метаболизма, освобождающие гены вторичного метаболизма из-под влияния катаболитной репрессии. Поэтому любые механизмы, тормозящие клеточную пролиферацию и активный рост, стрессовые ситуации, активируют процесс образования антибиотиков.

Процесс культивирования идиолитов происходит в две фазы (двухступенчатое культивирование). На первой фазе происходит накопление достаточного количества биомассы, которая выращивается на среде для роста микроорганизма. Эта фаза должна быть быстрой, а питательная среда дешевой. На второй фазе осуществляется запуск и активный синтез антибиотика. На этой фазе ферментацию ведут на продуктивной среде.

Получение антибиотиков с использованием биосинтеза

Методы получения антибиотиков путем химического синтеза достаточно сложны и не могут конкурировать с их биосинтезом методом биотехнологии. Существует несколько способов получения как природных, так и полусинтетических антибиотиков. Направленный биосинтез антибиотиков осуществляется путем прямой ферментации микроорганизма – продуцента с подходящим предшественником, что индуцирует синтез ферментов вторичного метаболизма в идиофазе. Точный механизм индуцирования первичными метаболитами генов, кодирующих синтез ферментов вторичного метаболизма, окончательно не расшифрован, однако выяснено, что молекулы предшественника необходимо добавлять в среду в период фазы роста микроорганизмов. Установлено, что вводимый предшественник должен лимитировать

скорость биосинтеза антибиотика. Например, производство бензилпенициллина в значительной степени стимулируется добавками его метаболического предшественника – фенилуксусной кислоты; пропионовая кислота и пропиловый спирт индуцируют биосинтез макролидов через метилмалонил КоА; L-фенилаланин – предшественник фенилаланина – ускоряет синтез грамицидина-S. Аналогичный эффект вызывает использование ингибиторов метаболизма. Так, при подавлении процесса введения хлора микроорганизм *S. aureofaciens* образует тетрациклин, а не хлортетрациклин, а при ингибировании реакции метилирования им синтезируются деметилированное производное хлортетрациклина.

Другой способ получения антибиотиков состоит в использовании для их биосинтеза блокированных мутантов, у которых отсутствует (блокировано) определенное звено в цепи реакций, ведущих к синтезу антибиотика. Блокированные мутанты не способны образовывать нужный антибиотик, используя низкую субстратную специфичность ферментов вторичного метаболизма и вводя аналоги предшественника антибиотика, последние переводят в аналоги самого антибиотика в ходе процесса, известного как мутационный биосинтез, или мутасинтез. Так, мутанты *Nocardia mediterranei*, у которых нарушена способность к ацилированию, образуют аналог предшественника рифамицина В – рифамицин SV, который служит исходным веществом для получения многих синтетических рифамицинов.

Особенно успешны разработки в области биосинтеза полусинтетических пенициллинов и цефалоспоринов. Получение новых более эффективных аналогов пенициллина основано на изменении его ацильной группировки при сохранении в неизменном виде ядра пенициллина – 6-аминопенициллановой кислоты (6-АПК). В промышленности 6-АПК получают путем гидролиза природных пенициллинов с помощью специфического фермента пенициллинацилазы, образующейся с высоким выходом в процессе ферментации ряда штаммов микроорганизмов. Ацилазы различают по их субстратной специфичности. Некоторые из них способны катализировать и обратные реакции – процессы ацилирования аминоксигруппы 6-АПК с образованием модифицированного пенициллина. Таким путем было получено более 40000 полусинтетических пенициллинов.

Получение антибиотиков с использованием генной инженерии

Весьма перспективным является получение новых антибиотиков путем создания генно-инженерных продуктов, в частности рекомбинантных штаммов продуцентов. Большой эффект может дать технология рекомбинантных ДНК. При создании рекомбинантных штаммов *Streptomyces* (основного микроорганизма, используемого для получения антибиотиков) важно понять, что трансформация и отбор трансформированных клеток не должны быть слишком сложными. Однако, в отличие от *E. coli*, *Streptomyces* существует не в виде изолированных клеток, а в виде протяженных мицелл, поэтому перед трансформацией необходимо разрушить клеточную стенку и высвободить отдельные протопласты. Без этого будет невозможно отличить трансформированные клетки от нетрансформированных, поскольку видимые колонии на твердой среде будут образовываться из группы клеток, а не из индивидуальной клетки. Соответственно колонии, растущие в присутствии селективного антибиотика, будут представлять собой смесь трансформированных и не трансформированных клеток. Проникновение плазмидной ДНК в протопласты *Streptomyces* облегчается в присутствии полиэтиленгликоля. После трансформации протопласты сначала высевают на твердую среду, чтобы образовалась клеточная стенка, а затем для отбора трансформированных клеток переносят на селективную среду, обычно содержащую неомицин, либо тиострептон. Актиномицеты являются продуцентами большинства промышленно важных антибиотиков. Известно, что один из эффективных путей воздействия на геном актиномицетов – это протопластирование их клеток. Показано, что протопластирование может влиять на уровень антибиотической активности. Метод слияния протопластов различных штаммов может служить для получения рекомбинантов, способных синтезировать новый антибиотик, или обладающих более высоким уровнем образования антибиотика.

Биотехнология данного процесса следующая: мицелий отмывают от питательной среды, промывают специальными средами путем центрифугирования; проводят лизис в питательной среде, содержащей 20 % сахарозу и лизоцим в концентрации 1–2 мг/мл; нелизированный материал отделяют центрифугированием при 1000 об/мин; протопласты осаждают путем центрифугирования при 3000 об/мин; протопласты высевают на питательные среды и инкубируют при $(27 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в течение 15 суток.

Кроме того, с помощью генной инженерии можно не только создавать новые антибиотики, но и увеличивать эффективность синтеза уже известных. Лимитирующим фактором в промышленном производстве антибиотиков с помощью *Streptomyces* часто является количество доступного клеткам кислорода. Вследствие плохой растворимости кислорода в воде и высокой плотности культуры *Streptomyces* его часто оказывается недостаточно, рост клеток замедляется, и выход антибиотика снижается.

Решить эту задачу можно двумя способами: во-первых, изменить конструкцию ферментера, в котором выращивается культура *Streptomyces*, а во-вторых, используя методы генной инженерии, создать штаммы *Streptomyces*, более эффективно использующие имеющийся кислород. Эти два подхода не исключают друг друга. Одна из стратегий, которая используется некоторыми аэробными микроорганизмами для выживания в условиях недостатка кислорода, состоит в синтезе гемоглобинподобного продукта, способного аккумулировать кислород и доставлять его в клетки. Например, аэробная бактерия *Vitreoscilla* синтезирует гомодимерный гемсодержащий белок, функционально подобный эукариотическому гемоглобину. Ген гемоглобина *Vitreoscilla* был выделен, встроен в плазмидный вектор *Streptomyces* и введен в клетки этого микроорганизма. После его экспрессии на долю гемоглобина *Vitreoscilla* приходилось примерно 0,1 % всех клеточных белков *Streptomyces coelicolor* даже в том случае, когда экспрессия осуществлялась под контролем собственного промотора гена гемоглобина *Vitreoscilla*, а не промотора *Streptomyces*. Трансформированные клетки *Streptomyces coelicolor*, растущие при низком содержании растворенного кислорода (примерно 5 % от насыщающей концентрации) синтезировали в 10 раз больше актинородина на 1 г сухой клеточной массы и имели большую скорость роста, чем нетрансформированные. Этот подход можно использовать и для обеспечения кислородом других микроорганизмов, растущих в условиях недостатка кислорода.

Исходным материалом при химическом синтезе ряда цефалоспоринов – антибиотиков, обладающих незначительным побочным эффектом и обладающий высокой антибактериальной активностью, – является 7-аминоцефалоспоровая кислота (7ACA), которая в свою очередь синтезируется из антибиотика цефалоспорина С. К сожалению, природных микроорганизмов, способных синтезировать 7ACA, до сих пор не выявлено.

Предложен путь биосинтеза 7ACA за счет включения специфических генов в плазмиду гриба *Ascremonium chrysogenum*, который в обычных условиях синтезирует только цефалоспорин С.

Один из этих генов был представлен кДНК гриба *Fusarium solani*, кодирующий оксидазу D-аминокислот, а другой происходил из геномной ДНК *Pseudomonas diminuta* и кодировал фермент – цефалоспорициназу. В плазмиде гены находились под контролем промотора *Acremonium chrysogenum*. На первом этапе нового биосинтетического пути цефалоспорин С превращается в 7-β-(5-карбокси-5-оксопентанамид) цефалоспорановую кислоту (кето-AD-7ACA) при помощи оксидазы D-аминокислот. Часть этого продукта, вступая в реакцию с пероксидом водорода, одним из побочных продуктов, превращается в 7-β-(4-карбосибутанамид) цефалоспорановую кислоту (GL-7ACA). И цефалоспорин С, и кето-AD-7ACA, и GL-7ACA могут подвергаться гидролизу цефалоспорициназой с образованием 7ACA, однако только 5 % цефалоспорина С напрямую гидролизуются до 7ACA. Исходя из полученных данных установлено, что для образования 7ACA с высоким выходом необходимы оба фермента.

Получение антибиотиков с использованием иммобилизованных ферментов

Хорошо известно, что 6-АПК является исходным соединением для получения эффективных полусинтетических аналогов природных пенициллинов. Получение 6-АПК в промышленности путем химического гидролиза бензилпенициллина сопряжено с большими трудностями в связи с крайней неустойчивостью лактамного цикла его молекулы. Так, при щелочном гидролизе бензилпенициллина выход 6-АПК составляет всего 1 %.

Продуктивность этого метода удалось значительно повысить благодаря применению гидролиза иммобилизованных бактериальных клеток, содержащих пенициллинамидазу. Со второй половины 70-х годов XX века вся 6-АПК, выпускаемая в России и значительная часть 6-АПК, выпускаемой в Италии производится с помощью иммобилизованных ферментов. Применяют фермент, иммобилизованный путем включения клеток *E. coli* в волокна триацетата целлюлозы, а на российских предприятиях используют бактериальные клетки, иммобилизованные в полиакриламидном геле. Переход к технологии, применяющей иммобилизованные бактериальные клетки обеспечивают высокий выход 6-АПК, составляющий 80–85 %. По данным японских исследователей, время полуинактивации пенициллинамидазы в полиакриламидном геле бактериальных клеток равно 42 суткам при 30°C или 17 суткам при 40 °C.

Одним из перспективных методов получения антибиотиков

является использование ферментов в качестве катализаторов. Ферментативный синтез полусинтетических β -лактамных антибиотиков является объектом пристального внимания исследователей в течение нескольких десятилетий, а в последние годы он находит все большее практическое применение, благодаря преимуществам биокатализа, перед традиционными химическими технологиями. Прежде всего, это связано с возможностью достижения высокой чистоты конечного продукта, так как уникальная специфичность и высокая реакционная способность ферментов позволяет проводить направленные реакции, избегая побочных процессов и риска рацемизации.

Неоспоримы преимущества биокаталитических технологий с точки зрения охраны окружающей среды: ферментативные реакции протекают в мягких условиях (pH, температура); исключается использование токсических реагентов на стадии активации карбоксильной группы ацилирующего агента и особо вредных галогенсодержащих растворителей; значительно уменьшается общее количество используемых органических растворителей и реагентов. На сегодняшний день известны единичные случаи применения энзиматического синтеза для промышленного производства β -лактамных антибиотиков (например, выпуск цефалексина компанией DSM, Нидерланды).

Исходными соединениями для получения беталактамных антибиотиков являются пенициллины, такие как цефалоспорин С и цефамицин С или получаемые путем их химической или энзиматической трансформации производные (например, 7-фенилацетамидодезацетксидефалоспоровая кислота, называемая цефалоспорином G).

Для ферментативного синтеза β -лактамных антибиотиков чаще всего используют широко специфичную пенициллинацилазу из различных микроорганизмов, а также другие ферменты, принадлежащие к тому же классу гидролаз, но более специфичные к синтезу определенных групп антибиотиков (например, синтетазу цефалоспоринов – из *E. Coli*). Пенициллинацилаза проявляет специфичность предпочтительно к фенилуксусной и феноксиксусной кислотам, а также к их производным, содержащим небольшие заместители в положении (амин, гидроксил, метил) или в ароматическом ядре.

Известно два направления синтеза β -лактамов:

1. Термодинамически контролируемый синтез – прямое образование ациламидной связи из свободной карбоновой кислоты и ключевой аминокислоты (ядра антибиотика), являющееся наиболее простым энзиматическим способом синтеза β -лактамных антибиотиков;

2. Кинетически контролируемый синтез является альтернативой прямому синтезу, который предусматривает синтез с переносом ацильной части ацилирующего агента на первичную аминогруппу ключевой аминокислоты. Ацилирующим агентом в данном случае служит не свободная карбоновая кислота, а активированное производное карбоновой кислоты или аминокислоты.

Выделение продуктов биокаталитического синтеза. Биокаталитические технологии отличаются от традиционных химических технологий не только стадией собственно синтеза, но и схемой выделения целевых продуктов. Реакционные смеси при ферментативном синтезе, как правило, содержат соединения близкой физико-химической природы, поэтому разработка процессов разделения компонентов реакционных масс и выделения целевых продуктов, представляет собой, пожалуй, наиболее сложную проблему при создании биокаталитической технологии получения β -лактамов. Особенно сложной является проблема разделения компонентов реакционной смеси синтеза аминок- β -лактамов, содержащей три аминокислоты (целевой продукт, ядро β -лактама и побочный продукт синтеза), изоэлектрические точки и растворимость которых достаточно близки.

Кроме того, из-за низкой растворимости побочных продуктов синтеза существует опасность осаждения их еще в процессе ферментативного превращения даже при работе с низкоконтрированными растворами реагентов, поскольку ацильный донор практически всегда берется в избытке.

Разработаны оригинальные методы отделения иммобилизованных ферментов от реакционной массы, содержащей кристаллические компоненты. Один из методов основан на использовании иммобилизованного фермента с плотностью меньше единицы, частицы которого флотируют на поверхности жидкости после прекращения перемешивания реакционной массы, в то время как кристаллические продукты удаляются через днище реактора. Другой подход к этой проблеме базируется на инженерном решении. Сконструированы специальные сита с порами такого размера, который позволяет мелким кристаллическим компонентам реакционной смеси проходить вместе с фильтратом через отверстия в сите, задерживая при этом в реакторе крупные частицы иммобилизованного фермента с диаметром более 150 мкм. Реакторы с такими фильтрующими ситовыми днищами используют, например, для отделения биокатализатора от смеси амоксициллина с парагидрокси-D-фенилглицина при получении амоксициллина.

Условия культивирования продуцентов антибиотиков

Синтез антибиотиков определяется условиями культивирования микроорганизмов. Поэтому оптимизация питательной среды является одним из главных факторов, приводящих к увеличению выхода целевого продукта – антибиотика.

При проведении первой стадии технологического процесса получения антибиотиков применяют натуральные среды неопределенного состава, к числу которых относят продукты крахмалопаточного производства, агар, желатин, отруби, зерно. Композиция натуральных сред неопределенного состава не является постоянной. Например, агар, получаемый из разных видов морских водорослей, по химическому составу является сложным эфирным комплексом полисахарида с серной кислотой и разнообразными микроэлементами. Агар содержит также жирные кислоты, биотин, тиамин или его компоненты. В картофельной среде с глюкозой и пептоном, при одной и той же партии пептона и химически чистой глюкозы, состав картофельного экстракта зависит от сорта картофеля, места его выращивания, время уборки, срока и режима хранения и других причин. Поэтому для получения сопоставимых результатов, особенно при изучении физиологических и биохимических особенностей микроорганизма, применяют синтетические среды, в состав которых входят определенные химически чистые соединения, взятые в точно указанных концентрациях. Для выделения актиномицетов, являющихся основными продуцентами антибиотиков, используют синтетические питательные среды, в которые в качестве источника углерода добавляют крахмал или глицерин. В качестве источника азота в среды добавляют нитратные соли. На этих средах рост бактерий подавляется, а грибы развиваются в малом количестве. Чтобы они росли лучше, нужно подкислить среду до значений $pH = 4,0-4,5$. Например, мутантные штаммы культивируют на обогащенной питательными компонентами среде.

Процесс контролируют либо по концентрации биомассы, либо по концентрации питательных веществ в среде. Исследования показали, что выход цефалоспориноса С уменьшается при переходе от использования в качестве источника углерода сахарозы к быстро усваиваемому углеводу глюкозе.

Наиболее оптимальной средой для образования антибиотика культурой *Streptomyces antibioticus* оказалась смесь 0,1 % глюкозы и 1 % галактозы. При таком соотношении моносахаридов глюкоза быстро утилизируется и микроорганизм переключается на усвоение галактозы,

что и инициирует идиофазу. Для производства ряда антибиотиков необходимы липидные компоненты, в частности, насыщенные и ненасыщенные жирные кислоты.

Так, например, для образования цефалоспоринов *C* (штамм *Cephalosporium acremonium*) необходимо потребление в составе питательной среды жирных кислот: миристиновой C14:0, пальмитиновой C16:0, олеиновой C18:1, линолевой C18:2. Обнаружено, что при культивировании штамма обнаруживается максимальное потребление олеиновой и линолевой кислот.

Для выращивания актиномицетов предложено множество сред различного состава, например, соево-глицериновая среда, содержащая соевую муку – 1,5 %, глицерина – 3 %, натрия хлористого – 0,3 %, кальция карбоната – 0,3 % или соево-глюкозная среда, содержащая соевую муку – 1,5 %, глюкозы – 4 %, натрия хлористого – 0,25 %, кальция карбоната – 0,2 %, кальция хлорида – 0,2 %, сульфата натрия – 0,05 %. На этих средах культуры выращивают при 28°C в течение 6–7 суток.

На примере *Streptomyces hygroscopicus* (продуцент комплекса антибиотика азоломицина, полиеновых и неполиеновых макролидов) было показано, что использование хлористого аммония как единственного источника азота в высоких концентрациях или его добавление в питательные среды, содержащие аминокислоты (валин, треонин, серин) снижает синтез антибиотика. Добавление хлористого аммония в питательную среду, содержащую аланин и лизин, приводит к повышению синтеза антибиотика.

Наличие в среде индивидуальных аминокислот валина и треонина также усиливает синтез антибиотика. Данный эффект может быть связан с тем, что у многих видов микроорганизмов ионы аммония ассимилируются по одному или двум метаболитным путям. Для увеличения выхода антибиотика и возможности направлять биосинтез в необходимом направлении в питательные среды добавляют ряд веществ – предшественников антибиотиков. Так как многие антибиотики берут свое начало от промежуточных соединений обмена первичных метаболитов, то их биосинтез возможно регулировать путем ретроингибирования. Например, биосинтез пенициллина культурой гриба *Penicillium chrysogenum* контролируется по принципу обратной связи L-лизином. Этот эффект объясняется тем, что биосинтез как пенициллина, так и лизина осуществляется через общего предшественника – α -аминоадипиновую кислоту. Торможение лизином первого фермента биосинтеза (гомоцитратсинтазы) приводит к недостатку α -аминоадипиновой кислоты, что снижает выход антибиотика. Добавление в питательную среду α -аминоадипиновой

кислоты предотвращает ингибирующий эффект лизина и активирует биосинтез пенициллина в отсутствие лизина. Кроме ретроингибирования биосинтез многих антибиотиков тормозится высокими концентрациями своих же антибиотиков. С накоплением определенной концентрации антибиотика рост микроорганизмов прекращается (например, *Streptomyces griseus* прекращает свой рост при концентрации в среде стрептомицина сульфата 0,5%). Следует отметить, что в процессе эволюции многие микроорганизмы выработали механизмы защиты от действия собственных антибиотиков. Эта проблема успешно решается в результате использования иммобилизованных ферментов.

Большинство антибиотиков получают при глубинной аэробной ферментации периодического действия в асептических условиях. Период ферментации длится 7–10 суток.

Стадия выращивания вегетативного инокулюма в значительной мере определяет конечный результат ферментации. Установлено, что способность продуцента к интенсивному биосинтезу зависит от многих факторов, в том числе, от гидродинамических условий выращивания посевного материала, возраста и количества посевного мицелия. Культуры инокулюма используют от 10 % до 40 % при различных значениях интенсивности дыхания. Кроме того, направленность вторичного синтеза на образование того или иного метаболита определяется интенсивностью углеводного обмена, а именно, соотношением активности ферментов гликолиза и пентозофосфатного пути, которое в свою очередь зависит от характеристики посевного материала. На этом этапе при производстве антибиотиков необходимо проводить определение интенсивности дыхания посевной культуры, например, с помощью газоанализатора. Желательно использовать культуру с максимальной интенсивностью роста. В процессе культивирования возникает необходимость изучения ферментов, катализирующих ключевые для вторичного метаболизма реакции, обусловленная практической задачей повышения продуктивности промышленных штаммов. Важное значение одного из этих ферментов – пропионил-КоА-карбоксилазы – определяется участием её в синтезе первичного безазотистого предшественника – метил-малонил-КоА, включающегося в макроциклические лактонные кольца макролидных антибиотиков (эритромицин, олеандомицин и др.), полиэфирных антибиотиков (салиномицин, монензин и др.) анзамицинов и др.

Выделение и очистка антибиотиков

Экстракцию антибиотиков из культуральной жидкости проводят ацетоном, бутанолом и другими органическими растворителями.

Необходимо отметить, что при экстракции антибиотиков используют различные значения pH: для *A. Rubra* – нейтральное значение pH, для *A. Madurae* и *Carminata* (карминомицин) – щелочное значение pH.

Технология выделения антибиотиков включает: экстракцию антибиотиков подходящими растворителями, осаждение и перекристаллизация их из разных сред, фракционирование на ионообменных смолах, лиофильную и распылительную сушку готовых препаратов. На экстракцию антибиотика в значительной степени влияет значение pH. Так, например, при выделении антрациклиновых антибиотиков установлено, что антрациклиновые антибиотики (рубомидин, канамицин, доксорубин) взаимодействуют с полимерными сорбентами по ион-ионному и гидрофобному механизмам. Наиболее селективная сорбция происходит на сегрегированном карбоксильном катионите БДМ-12 (метакрилсодержащий катионит). Показано, что максимальное поглощение антрациклинового антибиотика находится в области нейтральных значений pH, когда в системе сорбент – сорбат реализуются как ионные, так и гидрофобные взаимодействия.

Из культуральной среды антибиотики выделяют экстракцией органическими растворителями, осаждением, адсорбцией. Очистку антибиотиков проводят повторной заменой растворителя, адсорбционно-хроматографическими методами, высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ). От степени чистоты препарата, влажности, температуры, pH растворителя зависит стабильность антибиотика. Поскольку основным этапом микробиологического производства антибиотиков является процесс ферментации продуцента, осуществляющего синтез целевого продукта, особое внимание необходимо уделять конструкции ферментеров их автоматизации и обеспечению надежности производственного процесса. Ферментеры должны быть оснащены электронными стойками автоматического управления процессом ферментации в автоматическом режиме и контролировать такие технологические параметры, как значения pH, уровень растворенного кислорода (pO_2), температуру, давление, число оборотов мешалки, уровень пены в аппарате, расход подаваемого на аэрацию воздуха. Также необходимо учитывать возможность последовательной передачи биологического материала из аппаратов меньшего объема в аппараты большего объема. Для обеспечения стерильных условий ферментации и защиты окружающей среды в составе обвязки ферментера должны присутствовать стерилизующие фильтры тонкой очистки, например, фирмы PALL или MILLIPORE (DURAPORE, MILIDISK), обеспечивающие подачу в ферментер стерильного воздуха и очистку отработанного воздуха, выбрасываемого

в атмосферу.

Аэрация культуральной жидкости в стерильных условиях. Степень бактериальной очистки воздуха, подаваемого на аэрацию культуральной жидкости, во многих случаях должна быть выше, чем для воздуха, подаваемого в «чистые» помещения наиболее ответственных стадий фармацевтического производства инъекционных препаратов. В полном объеме схема получения стерильного сжатого воздуха многостадийна и включает в себя фильтр на входе в компрессор, компрессор, теплообменники для охлаждения и нагрева воздуха, предфильтр, фильтр тонкой очистки. Наиболее ответственным узлом в этом перечне является фильтр тонкой очистки, который должен удовлетворять следующим требованиям:

- обеспечить гарантию 100 % удаления бактерий из сухого и влажного воздуха;
- иметь достаточно длительный срок службы (не менее 1 года);
- работать при низком исходном перепаде давления в продолжении длительного периода времени;
- обладать свойствами, позволяющими периодически осуществлять стерилизацию паром;
- быть простым в обслуживании;
- иметь надежное уплотнение фильтрующего элемента.

По механизму фильтрации фильтры тонкой очистки подразделяются на поверхностные и глубинные.

Глубинные фильтры удерживают отделяемые частицы во всем объеме фильтрующего материала. Для их изготовления в настоящее время используют волокнистые, порошковые и прессованные материалы, а также пластик на бумажной или асбестовой основе. Вероятность задержки микроорганизмов в таких фильтрах связана с толщиной фильтрующего слоя, вследствие чего степень эффективности находится в диапазоне 90–99,999 %. Теоретически нельзя удалить из воздушного потока 100 % находящихся в нем микроорганизмов. Поэтому применение глубинных фильтров возможно только на стадии предварительной фильтрации.

Поверхностным фильтрам свойственна абсолютная эффективность (100 %). Механизм их действия подобен работе сита. Частицы и микроорганизмы не могут преодолеть мембрану, так как она имеет поры, размер которых меньше, чем размер этих частиц и микроорганизмов. Как правило, мембраны изготавливают в виде простых листов из эфира целлюлозы, чистой целлюлозы, неорганических микроволокон, покрытых смолами, полипропилена,

нейлона, капрона, фторопласта и других материалов, изготовленных как одно целое. Размеры пор мембран в этих материалах лежат в широком диапазоне от 0,1 мкм до 5 мкм. Для стерилизующих фильтров воздуха, подаваемого в ферментеры, как правило, используют мембраны с размерами пор 0,22 мкм. Большинство фильтров выдерживают в течение 1 года многократную стерилизацию при режиме 121°C в течение 30 минут, либо 141°C в течение 10 минут.

Регулирование параметров процесса биосинтеза. Управление технологическим процессом микробиологического синтеза заключается в поддержании на заданных уровнях значений основных технологических параметров. Наиболее широко применяют следующие контуры управления:

- регулирование температуры культуральной жидкости путем изменения параметров теплоносителя;
- контроль и регулирование концентрации растворенного кислорода (pO_2) путем изменения расхода воздуха, подаваемого на аэрацию или числа оборотов мешалки;
- поддержание давления в ферментере путем открытия или закрытия клапана на линии выходящего воздуха;
- стабилизация pH путем добавления кислоты или щелочи;
- поддержание уровня пены в заданных пределах путем внесения пеногасителя, снижения расхода воздуха или уменьшения числа оборотов мешалки;
- поддержание на заданном уровне концентрации ингредиентов субстрата в культуральной жидкости путем их добавления в ферментер.

Регулирование температуры суспензии в ферментере. Процесс обеспечивается за счет подачи в «рубашку» аппарата теплоносителя – смеси воды и пара, транспортируемой циркуляционным насосом. Регулировка температуры теплоносителя в диапазоне от 0 до 150°C с точностью $\pm 0,5$ °C обеспечивается за счет установления требуемой температуры на стойке управления. Паровоздушная смесь, пройдя через обратный клапан и инжектор, в котором происходит смешение воды и пара, поступает в рубашку ферментера. После выхода из рубашки, теплоноситель поступает на вход циркуляционного насоса. Избыток теплоносителя, образующийся за счет конденсации пара, отводится в канализацию через отрегулированный на определенное давление клапан.

Контроль уровня растворенного кислорода. Растворенный кислород имеет исключительно большое значение в процессах биосинтеза, характеризующихся интенсивными скоростями роста

биомассы и повышенными вязкостями культуральной жидкости, что характерно для процессов получения антибиотиков. При анаэробном метаболизме кислород играет роль акцептора электронов или водорода при участии фермента оксидазы.

Кроме того, с помощью оксигеназ кислород может встраиваться в молекулу углеродных субстратов при их катаболизме. Причем, требующееся на единицу биомассы количество кислорода зависит от свойств субстрата 56 (углеводы требуют меньшего количества кислорода, а углеводороды – значительно большего). Экспериментально установлено, что в случае ферментации бактерий и грибов, использующих в качестве источника энергии углеводы, на 1 г сухой биомассы требуется 1 г кислорода (теоретически для биосинтеза 3,39 г сухой биомассы – 1 г кислорода).

Кислород является трудно растворимым газом (8 мг/л при 25°C; 7 мг/л при 35°C), причем наличие солей в жидкости существенно снижает растворимость в ней кислорода. При высоком содержании биомассы в культуральной жидкости (потребление кислорода может достигать 50 г/л) необходимо интенсивно пополнять среду растворенным кислородом. Датчики, регистрирующие концентрацию растворенного кислорода, выдерживающие многократную стерилизацию, основаны на методе полярографического определения диффузионного потока кислорода через полупроницаемую мембрану, под которой располагается анод (материал – свинец или серебро) и катод (материал – платина) в растворе электролита. Датчики имеют температурную компенсацию в диапазоне 0–50°C. Рабочее давление в ферментере может изменяться от 0 до 2,5 атм. Результирующий сигнал от датчика давления преобразуется в электрический сигнал и по команде от блока управления с помощью клапана обратного давления поддерживает его в заданных пределах. Контур давления дополнительно оснащен контрольным манометром.

Концентрация водородных ионов (pH) – важный параметр, влияющий на рост микроорганизмов и образование конечного продукта. Бактерии обычно растут в диапазоне значений pH 4–8, дрожжи при pH 3–6, микроскопические грибы при pH 3–7. По разным причинам pH в ходе ферментации имеют тенденцию к изменению, поэтому необходима схема управления и поддержания pH на оптимальном уровне. Регулирование pH осуществляется автоматически добавлением кислоты или щелочи при помощи перистальтических насосов (температурная компенсация 0–100 °C).

Регулирование уровня пены. Процесс культивирования аэробных микроорганизмов сопровождается образованием пены. Это связано, во-первых, с введением в жидкость воздуха, во-вторых, с наличием в

составе культуральной жидкости белков и других поверхностноактивных веществ стабилизирующих пузырьки пены. В стойких пенах длительность существования пузырька 1–15 минут.

Интенсивное пенообразование затрудняет максимальное использование емкости биореактора, так как способствует выбросу пены и потери целевого продукта. Кроме того, выброс пены зачастую приводит к нестерильности продукта. Для пеногашения в настоящее время использую различные методы: механические (разрушение пены за счет ударного воздействия твердых поверхностей, воздействия струями жидкости или газа, резкое изменение давления и др.); химические (добавление поверхностно-активных веществ, уменьшающих прочность пленок, добавление веществ, связывающих пенообразователи в поверхностно-неактивные комплексы); физические методы (электрическое пеногашение, воздействие колебаний звуковой или ультразвуковой частоты и др.); стабилизация уровня пены путем временного уменьшения подачи воздуха или временного прекращения механического перемешивания, вывода избыточной пены из биореактора. Наиболее эффективными, по нашему мнению, являются химические и механические способы пеногашения или их комбинации. Проблему вспенивания можно решить, если оставить в верхней части реактора достаточный объем пустого пространства, в котором бы лопались пузырьки воздуха, но это уменьшает рабочий объем реактора на 25–30 %.

Таким образом, регулирование уровня пены осуществляется несколькими способами:

- воздействие на пену химическими и физико-химическими средствами;
- разрушение пены механическими, гидро- и аэродинамическими способами;
- разрушение пены колебаниями звуковой и ультразвуковой частоты;
- стабилизация уровня пены уменьшением расхода аэрирующего воздуха и снижением числа оборотов мешалки.

Для химического пеногашения наибольшее распространение получили полиэфирные препараты пропиол Б-400 и адеканоль, полиметилсилоксаны АС-60 и др. В ходе культивирования химические пеногасители могут подаваться либо по заранее заданной программе, либо по мере необходимости при повышении уровня пены.

Стерилизация питательных сред и аппаратуры. В биотехнологии

наибольшее распространение получила термическая стерилизация. В технических системах, работающих в асептических условиях, должна обеспечиваться стерилизуемость всех точек внутренних объемов аппаратов, коммуникаций, арматуры, контрольно-измерительных приборов, непосредственно соприкасающихся с чистыми культурами целевых микроорганизмов или со стерильными материальными потоками. Для этого в каждой точке необходимо создать требуемую температуру и поддерживать её в течение заданного промежутка времени.

Наибольшим бактерицидным эффектом обладает насыщенный водяной пар под давлением. При стерилизации насыщенным водяным паром споры наиболее устойчивых термофилов гибнут при температуре 121°C и времени экспозиции 25 минут, при 132°C – за 4 минуты. При использовании сухого пара время гибели спор составляет при 160 °C – 60 минут, а при 180°C – 10 минут. Инактивация спор в кипящей воде при 100°C происходит медленно, они гибнут через 8–9 часов. Большое значение имеет содержание воды в клетке микроорганизма – чем больше воды, тем ниже температура коагуляции белков. Именно этим объясняется высокий стерилизующий эффект насыщенного водяного пара – он не только нагревает, но и увлажняет клетки, что повышает термочувствительность.

Стерилизацию жидких питательных сред при работе с небольшими объемами целесообразно вести в периодическом режиме в несколько этапов:

- стерилизация всех коммуникаций и ферментера острым или глухим паром;
- наполнение аппарата прогретой гомогенизированной средой;
- нагревание питательной среды до температуры стерилизации;
- выдерживание при температуре стерилизации в течение времени, необходимого для гибели всех микроорганизмов;
- охлаждение стерильной питательной среды в этой же емкости.

Этот способ стерилизации длителен, и поэтому во избежание существенных изменений в составе среды, процесс ведут при избыточном давлении 0,5–1 атм при температуре 110–120°C в течение 1–1,5 часов с момента достижения заданной температуры.

Особое внимание следует уделять стерилизации аппаратуры и коммуникаций, предназначенных для подачи пеногасителя (125–135°C в течение 1,5–2 часов). Стерилизацию осуществляют в следующей последовательности:

- входной и выходной фильтры тонкой очистки, трубопроводы, арматура;
- ферментеры;
- питательная среда при следующих режимах: температура – 120–124°C, время выдержки после достижения заданной температуры – 40–60 минут.

Получение пенициллина

Для производства пенициллина используют специально отобранные расы плесневых грибов (суперпродуцентов), принадлежащие к роду *Penicillium*. Для промышленного производства пенициллина применяют биореакторы-ферментеры с механическим перемешиванием, объемом свыше 10000 дм³. Питательная среда, используемая для производства пенициллина, обычно содержит кукурузный экстракт, лактозу, глюкозу и др.

После стерилизации и охлаждения среда засеивается проросшими спорами гриба, аэрируется путем пропускания через нее воздуха и перемешивается с помощью мешалки. Температуру культивирования поддерживают в пределах 24–25°C. Для предотвращения чрезмерного образования пены применяются химические пеногасители. После окончания ферментации мицелий гриба отделяется вакуумной фильтрацией или центрифугированием.

Для концентрирования пенициллина применяется экстракция органическими растворителями и адсорбция на активированном угле. Возможно также применение упаривания и осаждения.

Для промышленного производства антибиотика используют культуру *Penicillium chrysogenum* и среду, содержащую кукурузный экстракт, гидрол, лактозу и минеральные соли.

Вместо кукурузного экстракта может быть применена арахисовая мука, жмыхи, мука из хлопковых семян и другие источники. Возможность широкого использования продуктов растительного происхождения обусловлена тем, что у *P. chrysogenum* имеются сильные протеолитические ферменты. В качестве углеводов часто используют сахарозу или смесь лактозы с глюкозой в соотношении 1:1. Глюкоза может снижать биосинтез антибиотика; на средах, содержащих лактозу или сахарозу (в условиях депрессии), биосинтез антибиотика идет активнее. Важную роль в процессе биосинтеза пенициллина играет сера, которая содержится в структуре антибиотика. В качестве источника серы используются натрия сульфат и натрия тиосульфат. Избыток ионов меди не влияет на рост гриба, но подавляет биосинтез пенициллина. Эффект торможения биосинтеза снимается добавлением в

среду ионов железа. *P. chrysogenum* в качестве источника фосфора может использовать не только фосфаты, но и фитаты (соли инозитфосфорных кислот). Этот продуцент содержит фермент, разрушающий фитин с освобождением неорганического фосфора.

Температура в период первой фазы должны быть 30°C, во вторую фазу – 20 °C; pH в период роста гриба ниже 7,0; потребление углеводов должно быть медленным, что достигается использованием лактозы, либо дробным введением глюкозы. Синтез того или иного пенициллина зависит от наличия специфического вещества в среде, иначе говоря, предшественника, который микроорганизм включает в молекулу антибиотика без предварительного расщепления. Следует отметить, что предшественники биосинтеза пенициллина (фенилуксусная кислота, фенилацетамид, феноксиуксусная кислота) при определенных концентрациях и pH среды оказывают токсическое влияние на продуцент. Фенилуксусная кислота ($C_6H_5CH_2COOH$) наименее токсична. Добавление её в среду в концентрации выше 500 мкг/мл угнетает рост мицелия, особенно в первые 24 часа его развития. При таких условиях обеспечивается наибольший выход бензилпенициллина, который через 72 часа развития может достигать 500–1000 мкг/мл.

При развитии гриба без внесения предшественника образуется около 45 % бензилпенициллина (пенициллин G) и около 53 % пенициллина K (радикал – n-гептилпенициллин). При добавлении к среде фенилуксусной кислоты меняется соотношение образующихся компонентов в сторону резкого увеличения бензилпенициллина, количество которого в зависимости от возраста достигает 75–99 % от смеси пенициллинов. В процессе культивирования *P. chrysogenum* в среде, не содержащей фенилуксусной кислоты, в ней накапливаются серосодержащие соединения не β -лактамного характера, близкие к цистеину и метионину. Добавление в среду фенилуксусной кислоты способствует более интенсивному метаболизму серосодержащих компонентов в соединения β -лактамного характера.

При развитии продуцента пенициллина (гриба *P. Chrysogenum*) на кукурузно-лактозной среде выделяют три фазы.

Первая фаза – рост мицеллия, выход антибиотика низок. Всегда присутствующая в кукурузном экстракте молочная кислота потребляется продуцентом с максимальной скоростью, лактоза используется медленно. Потребление кислорода высокое. Усиливается азотный обмен, в результате в среде появляется аммиак и резко поднимается значение pH.

Вторая фаза – максимальное образование пенициллина. Это связано с быстрым потреблением лактозы и аммонийного азота. Увеличение массы мицелия незначительное, потребление кислорода

снижается, рН среды остается почти без изменений.

Третья фаза – снижение концентрации антибиотика в среде в связи с начавшимся автолизом мицелия и выделением в результате этого процесса аммиака, что сопровождается повышением рН среды. В настоящее время описано шесть условно выраженных возрастных фаз продуцента пенициллина. Заметное количество пенициллина начинает образовываться с IV возрастной фазы гриба, максимум накопления приходится на VI фазу – в период автолиза.

Определение возрастных фаз путем микроскопического контроля позволяет установить:

1. ход общего темпа развития гриба, его состояние, пригодное для использования посевного материала, контроль за ходом образования антибиотика;
2. дефекты развития и возможные причины этих дефектов;
3. момент окончания развития гриба в реакторе.

По мере развития гриба меняется и химический состав мицелия. Количество общего азота и белка в мицелии уменьшается, содержание моносахаридов в период максимального биосинтеза пенициллина (96 часов) увеличивается почти в 6 раз по сравнению с начальным периодом, количество дисахаридов уменьшается. Изменяется количество отдельных аминокислот. Процесс биосинтеза пенициллина ведется при самом тщательном соблюдении стерильности всех операций, так как загрязнение культур посторонней микрофлорой резко снижает накопление антибиотика. Это связано с тем, что многие бактерии воздуха способны образовывать пенициллиназу. Особенно активно продуцируют этот фермент *B. subtilis* и *B. cereus*. Одним из активных продуцентов пенициллиназы является туберкулезная палочка (*Mycob. tuberculosis*). Предположительно именно с этим свойством связана резистентность этого микроорганизма к пенициллину.

Современная биотехнологическая промышленность получает культуральные жидкости, содержащие свыше 55 тыс. ед/мл пенициллина. Выделение пенициллина начинается с фильтрации или центрифугирования (отделения мицелия гриба). Из культуральной жидкости антибиотик, где он находится в виде кислоты, выделяют путем экстракции неполярными органическими растворителями (амилацетатом, хлороформом, бутилацетатом, бутанолом и др.). Очистку антибиотика проводят путем замены растворителей, поскольку соли пенициллина плохо растворимы в органических растворителях. Экстрагированный пенициллин в виде кислоты переводят в водный раствор в виде соли, добавляя щелочь. Повторяя эти операции, пенициллин концентрируют и очищают. Большинство пенициллинов производят в виде натриевых или калиевых солей. Новокаиновые и

бензатиновые соли являются основой пролонгированных препаратов пенициллина для внутримышечного введения.

В сухой кристаллической форме пенициллиновые соли достаточно стабильны в течение длительного времени при температуре 4°C. Растворы быстро теряют активность (в течение 24 часов при температуре 20 °C), их готовят непосредственно перед введением.

В настоящее время большое практическое значение имеет полусинтетический (биологический + химический) способ получения аналогов природного пенициллина. Исходным продуктом служит 6-аминопенициллановая кислота (6-АПК). Эту кислоту получают в результате биосинтеза при развитии *P. Chrysogenum* при отсутствии предшественника в среде или путем ферментативного дезацилирования бензилпенициллина или феноксиметилпенициллина при участии фермента пенициллинацилазы (пенициллинамидазы). Второй способ наиболее перспективен. Используется иммобилизованная пенициллинацилаза, которая гидролизует бензилпенициллин с образованием 6-АПК и фенилуксусной кислоты. Пенициллинацилаза образуется различными группами микроорганизмов, в том числе она образуется всеми продуцирующими пенициллин грибами. В настоящее время предложен способ получения иммобилизованных клеток *E. Coli* с высокой пенициллинацилазной активностью, пригодных для многократного применения.

Сама по себе 6-АПК не активна. Её подвергают химическому ацилированию и получают аналоги пенициллина (оксациллин, ампициллин, метициллин, амоксициллин и др.) с улучшенными или новыми свойствами. Всего в настоящее время используется порядка четырех десятков таких препаратов. Из всего общего количества природных пенициллинов примерно 35 % используется как медицинские препараты, а 65 % – для получения 6-АПК.

3.2. Производство инсулина

Диабет – это хроническое эндокринное заболевание, сопровождающееся повышенным уровнем глюкозы в крови вследствие абсолютного или относительного дефицита гормона поджелудочной железы инсулина и/или уменьшения чувствительности к нему клеток – мишеней организма. Страдает данным заболеванием около 230–350 млн. человек на планете (около 6 %). Такие огромные цифры поражают каждого и стимулируют ученых генной инженерии создавать всё новые и новые методы по способу лечения этой глобальной болезни.

Существует один способ лечения – прием инсулиновых препаратов. Согласно существующему законодательству все граждане РФ обеспечены медицинской помощью в рамках обязательного медицинского страхования, в том числе бесплатными лекарственными препаратами инсулина для лечения диабета.

В зависимости от источников получения различают инсулины животного происхождения (главным образом, препараты свиного инсулина), препараты инсулина человека полусинтетические (получают из свиного инсулина методом ферментативной трансформации), препараты инсулина человека генно-инженерные (ДНК-рекомбинантные, получаемые методом генной инженерии).

Генная инженерия – это использование технологии молекулярной биологии для изменения последовательности (последовательностей) ДНК в геномах с использованием различных подходов. В то время как некоторые принципы генной инженерии остаются неизменными, другие меняются по мере того, как технологии постоянно развиваются и продолжают революционизировать исследования во многих областях. Генная инженерия – метод, который является наиболее развитым и имеет больше возможностей, поэтому используется чаще остальных.

Впервые экспериментальный инсулиновый препарат был получен в 1921 г. Ф. Г. Бантингом и Ч. Г. Бестом. Они выделили из поджелудочной железы экстракт (как позже выяснилось, содержащий аморфный инсулин), который снижал уровень глюкозы в крови у собак с экспериментальным сахарным диабетом. В 1922 г. экстракт поджелудочной железы ввели первому пациенту – 14-летнему Леонарду Томпсону, больному диабетом, и тем самым спасли ему жизнь. В 1923 г. Джеймс Б. Коллип разработал методику очистки экстракта, выделяемого из поджелудочных желез свиней и крупного рогатого скота активные экстракты, дающие воспроизводимые результаты. В 1926 г.

Дж. Абель и В. Дю-Виньо получили инсулин в кристаллическом виде. В 1939 г. инсулин был впервые одобрен FDA (Food and Drug Administration). Фредерик Сэнгер полностью расшифровал аминокислотную последовательность инсулина (1949–1954 гг.). В 1958 г. Сэнгеру была присуждена Нобелевская премия за работы по расшифровке структуры белков, особенно инсулина. В 1963 г. был синтезирован искусственный инсулин.

Рекомбинантный человеческий инсулин был впервые произведен в *E. coli* компанией Genentech в 1978 г. с использованием подхода, который требовал экспрессии химически синтезированной кДНК, кодирующей цепи α и β инсулина отдельно в *E. coli*. После независимой экспрессии две цепи очищают и совместно инкубируют в оптимальных условиях реакции, которые способствовали образованию интактного и биоактивного инсулина за счет образования дисульфидной связи.

Первый коммерческий рекомбинантный инсулин был разработан для терапевтического применения у человека с помощью этой двухцепочечной комбинированной процедуры. Другой подход включает экспрессию единственной химически синтезированной кДНК, кодирующей проинсулин человека, в *E. coli*, с последующей очисткой и последующим удалением С-пептида протеолитическим расщеплением. Этот подход был более эффективным и удобным для крупномасштабного производства терапевтического инсулина по сравнению с подходом с двухцепочечной комбинацией и коммерчески использовался с 1986 г. Eli Lilly использовала эту технологию для производства хумулина, первого рекомбинантного инсулина, одобренного в 1982 г. для лечения пациентов с диабетом. Эти рекомбинантные инсулины первого поколения имеют аминокислотную последовательность, идентичную нативному человеческому инсулину, и предпочтительнее, чем продукты инсулина животного происхождения. Однако прогресс в области генной инженерии и разработка технологий химического синтеза генов с измененной нуклеотидной последовательностью облегчили разработку аналогов инсулина с измененной аминокислотной последовательностью.

Было замечено, что нативный инсулин в коммерческих препаратах обычно существует в олигомерной форме, как цинксодержащий гексамер из-за очень высокой концентрации, но в крови биологически активный инсулин находится в мономерной форме. Следовательно, этот олигомерный комплекс должен диссоциировать, чтобы инсулин мог абсорбироваться из места инъекции в кровь. Из-за этого рекомбинантный инсулин, вводимый подкожно, обычно имеет медленное начало с максимальной концентрацией в плазме после 2

часов с момента инъекции и большей продолжительностью действия, которая длится 6–8 часов.

Следовательно, для разработки быстродействующего аналога инсулина потребовалось модифицировать аминокислотные остатки, боковые цепи которых участвуют в образовании димера или олигомера.

Lispro, разработанный Eli Lilly, был первым аналогом инсулина быстрого действия, получившим разрешение регулирующих органов в 1996 г. для терапевтического использования. Инсулин Lispro разработан таким образом, что он имеет аминокислотную последовательность, аналогичную природному инсулину, но имеет инверсию пролинлизиновой последовательности в положениях 28 и 29 В-цепи, что приводит к снижению гидрофобных взаимодействий и, таким образом, предотвращает образование димеров.

Для коммерческого производства инсулина Lispro синтетическая кДНК, кодирующая про-инсулин Lys B28 – Pro B29 человека, была экспрессирована в *E. coli*, и инсулин Lispro был протеолитически вырезан из проинсулина обработкой трипсином и карбоксипептидазой. Другой аналог инсулина быстрого действия, продуцируемый *E. coli*, представляет собой глу-лизин (Apidra), который был разработан Aventis Pharmaceuticals и одобрен регулируемыми органами США в 2004 г. Инсулин Глулизин был получен путем замены аспарагина В3 на лизин и лизина В29 на глутаминовую кислоту.

Чтобы избежать многократных инъекций, также были созданы аналоги инсулина пролонгированного действия с увеличенной продолжительностью действия. Инсулин Гларгин – один из таких аналогов инсулина длительного действия, который был разработан Aventis Pharmaceuticals и одобрен регулируемыми органами США и ЕС в 2000 г. Инсулин Гларгин был получен путем замены С-концевого аспарагина А-цепи остатком глицина и С-конец В-цепи был модифицирован путем добавления двух остатков аргинина. Эти модификации привели к увеличению изоэлектрической точки (pI) с 5,4 до нейтральных значений. Гларгин продуцируется в виде проинсулина и экспрессируется в *E. coli*, и, наконец, был составлен при pH 4 в растворимой форме. Однако после подкожного введения он выпадал в осадок из-за нейтрального pH в подкожной клетчатке. Ресольбулизация инсулина происходит медленно, что увеличивает продолжительность его высвобождения в кровь.

Система экспрессии дрожжей для производства инсулина

Дрожжи являются очень привлекательной системой экспрессии, позволяющей сочетать дешевизну прокариотического культивирования

с эукариотическим процессингом белков. Дрожжи являются одноклеточным организмом, генетика и физиология которого детально изучены и который можно выращивать как в небольших лабораторных колбах, так и в промышленных культиваторах.

Для эффективной экспрессии и секреции рекомбинантного проинсулина в дрожжах была сконструирована конструкция инсулина, содержащая нативную а-цепь и Р-цепь, лишенную С-концевого треонина В30, либо непосредственно слитого, либо связанного через короткий синтетический С-пептид (например, ААК). Последовательность кДНК, кодирующая эту конструкцию, была слита с сигнальной последовательностью а-фактора *Saccharomyces cerevisiae* для секретируемой экспрессии проинсулина, которая дала выход до 80 мг/мл инсулина. Одно-цепочечный проинсулин очищали и превращали в активный инсулин с помощью реакции транс-пептидации, опосредованной трипсином, в присутствии эфира треонина.

Помимо природного рекомбинантного инсулина, в *S. cerevisiae* также производятся различные аналоги инсулина.

Инсулин Аспарт – аналог инсулина быстрого действия, который был произведен в *S. cerevisiae*, разработанный Novo Nordisk и одобренный FDA США в 2001 г. для терапевтического использования у человека. Инсулин Аспарт получали заменой остатка пролина в положении 28 на аспарагиновую кислоту в Р-цепи. Эта генетическая модификация привела к увеличению отталкивания межцепочечных зарядов, снижению самоассоциации и, таким образом, к быстрому проникновению в кровь из места подкожной инъекции.

Инсулин Детемир – рекомбинантный аналог инсулина длительного действия, коммерчески производимый в *S. cerevisiae*, разработанный Novo Nordisk и одобренный для терапевтического использования у человека в 2004 г. европейскими регулирующими органами.

Рекомбинантный Детемир был получен путем удаления остатка треонина в положении 30 Р-цепи и цепи жирной кислоты С14, ковалентно присоединенной к остатку лизина в положении 29 Р-цепи. Эти генетические изменения привели к связыванию инсулина с альбумином в плазме, что обеспечивало медленное и постоянное высвобождение инсулина и, таким образом, увеличивало продолжительность его действия до 24 часов.

Одна из основных проблем, связанных с получением терапевтического гликопротеина для применения человеком, заключается в том, что дрожжевое N-гликозилирование относится к типу высокоманнозного, что обеспечивает короткий период полужизни

в пробирке и гипериммуногенность и, таким образом, снижает эффективность терапевтического гликопротеина.

Система экспрессии кишечной палочки для производства инсулина

E. coli является предпочтительным микроорганизмом для крупномасштабного производства инсулина.

Инсулин – это пептидный гормон поджелудочной железы, который состоит из 51 аминокислотного остатка и двух полипептидных цепей, связанных между собой двумя дисульфидными мостиками. Синтезируется он в виде одноцепочечного предшественника — препроинсулина, содержащего концевой сигнальный пептид (23 аминокислотных остатка) и 35-звенный соединительный пептид (С-пептид). При удалении сигнального пептида в клетке образуется проинсулин из 86 аминокислотных остатков, в котором А- и В-цепи инсулина соединены С-пептидом, обеспечивающим им необходимую ориентацию при замыкании дисульфидных связей. После протеолитического отщепления С-пептида образуется инсулин.

Ген, синтезирующий человеческий проинсулин (INS), находится в 11 хромосоме.

Путем комплементарной ДНК получили копию INS-гена. Он состоит из комплементарных цепей и «липких концов» (комплементарная последовательность оснований). Полученный ген подстраивается к 3'-концу β-галактозидазы и вводится в раскрытую (разрезанную) ферментом (эндону-клеаза рестрикции), оставляющим «липкие концы», плазмиду PBR322.

«Липкие концы» чужеродной ДНК и плазмиды PBR322 взаимодействуют друг с другом, образуя комплементарные пары оснований. Затем плазмида замыкается, встраивая в себя новый ген. Фермент ДНК-лигаза окончательно запечатывает плазмиду.

Такая рекомбинантная ДНК встраивается в тело *E. coli*, в которой плазида ведет себя как вектор (переносчик) нового гена. В результате, такой вид гена будет реплицироваться в новом поколении *E. coli*.

В результате жизнедеятельности, такие генномодифицированные бактерии, осуществляют синтез проинсулина человека, от которого после частичного протеолиза отщепляется С-пептид, превращая его в инсулин.

Полученный инсулин очищают.

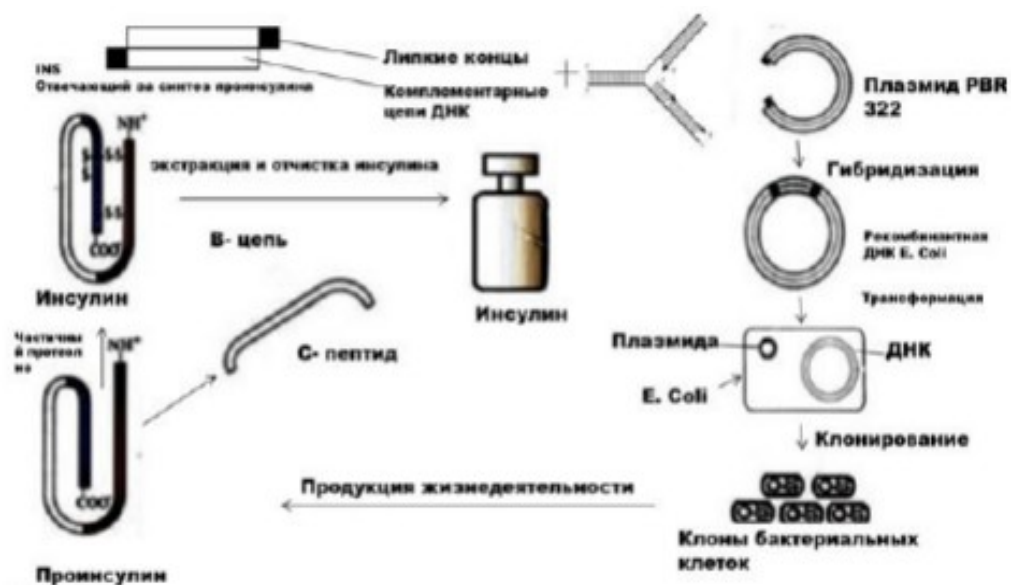


Рис.8. Схема искусственного получения инсулина

Инсулиноterapia при сахарном диабете 1 типа

Интенсивная инсулиноterapia (ИКТ) и инсулиновая помповая терапия (непрерывная подкожная инфузия инсулина; ППИ) являются наиболее распространенными методами инсулиновой терапии для людей с диабетом 1 типа. Обычная инсулиноterapia (КТ) с двумя ежедневными инъекциями предварительно смешанного инсулина используется у людей с диабетом 1 типа только в исключительных случаях.

Инсулиновая помпа – это небольшое компьютеризированное устройство, которое непрерывно подает небольшие дозы инсулина для удовлетворения базовых потребностей (почасовая базальная скорость). Согласно действующим руководствам, интенсивная инсулиноterapia считается золотым стандартом лечения людей с диабетом 1 типа. Помповую инсулиноterapia (ППИИ) назначают только для определенных условий, таких как очень низкая потребность в инсулине. Нет явных преимуществ в пользу того или иного способа применения инсулина при диабете 1 типа. Тем не менее есть некоторые очевидные медицинские причины для использования непрерывной подкожной инфузии инсулина, такие как очень низкая потребность в инсулине или ярко выраженный феномен рассвета. В большинстве случаев столь однозначных причин в пользу непрерывной подкожной инфузии инсулина не существует. Помповая инсулиновая терапия сложна и подходит не всем.

Последние разработки были сосредоточены на сочетании генетической и химической инженерии с фармацевтической

оптимизацией для создания аналогов инсулина сверхбыстрого и сверхдлительного действия, научные усилия в области молекулярной инженерии включали реализацию мечты о доставке инсулина, реагирующего на глюкозу. Рекомбинантный человеческий инсулин производится преимущественно с использованием *E. coli* и *Saccharomyces cerevisiae* для терапевтического применения у человека. Тем не менее существует острая необходимость в увеличении в несколько раз производства биологически активного инсулина и его аналогов из кишечной палочки и дрожжей с использованием новейших эффективных технологий. Еще одна стратегия с использованием другого экспрессирующего хозяина, отличного от *E. coli* и *Saccharomyces cerevisiae*. Системы экспрессии на основе растений обладают огромным потенциалом для высокопроизводительного производства инсулина очень рентабельным способом. Разработанные методики синтеза инсулина предоставили возможность стабилизировать состояние пациентов с сахарным диабетом. Текущие производственные технологии не смогут удовлетворить растущий спрос на инсулин из-за ограниченных производственных мощностей и высокой стоимости производства.

3.3. Стероидные гормоны

Использование современных биотехнологических методов открывает новые пути получения гормональных препаратов. Ранее в качестве источников гормонов применяли органы и ткани животных и человека. Для получения небольшого количества препарата требовалось очень много сырьевого материала. Разработки и внедрение биотехнологических способов производства гормонов позволили решить одну из самых остро стоящих проблем – дефицит гормональных препаратов.

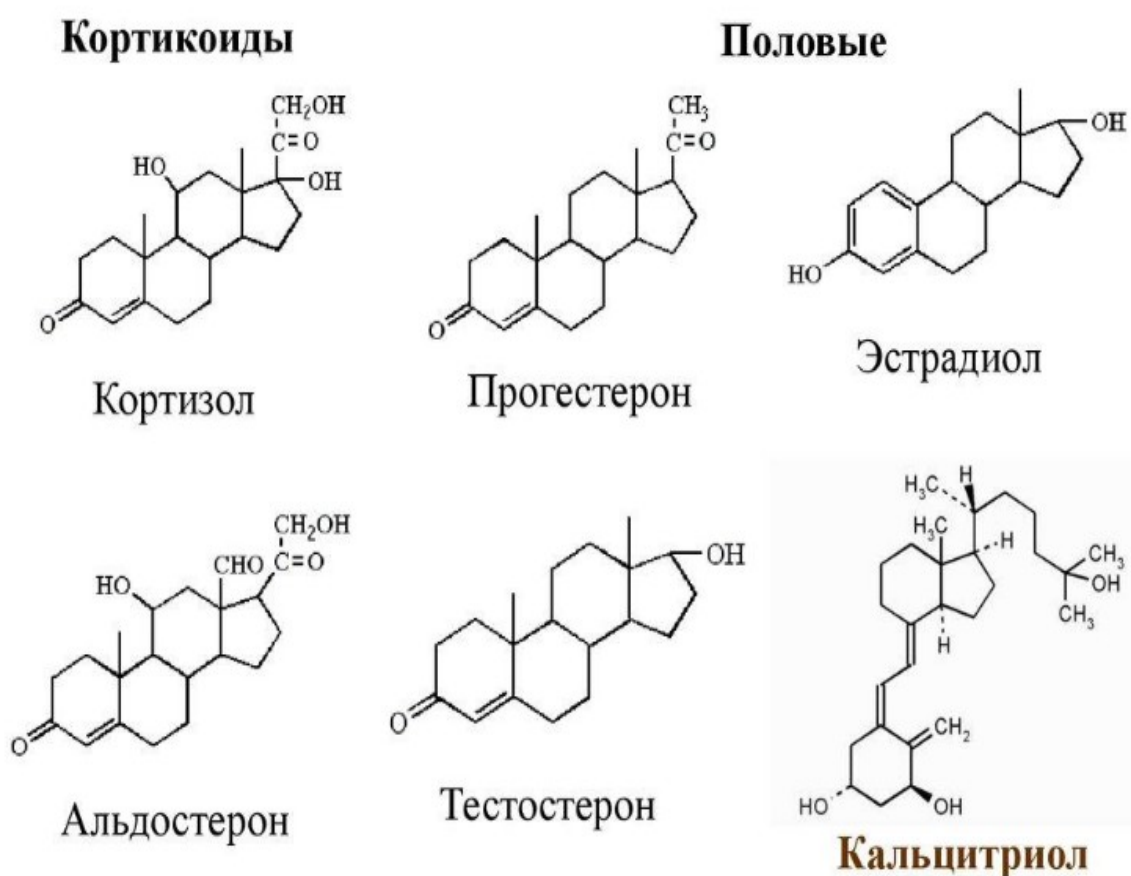
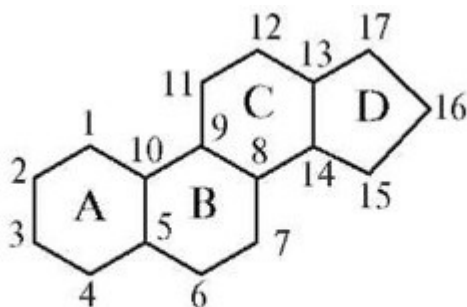


Рис.9. Стероидные гормоны

Наибольшее значение биотехнологии отмечено при производстве стероидных гормонов. Стероиды – полициклические соединения липидной природы; различают гормоны коры надпочечников – минералокортикоиды (альдостерон), глюкокортикоиды (кортизол) и половые гормоны – андрогены, гестагены и эстрогены.

Сравнивая структуру основных стероидных гормонов, можно обнаружить, что они содержат в молекуле специфический циклический скелет – циклопентаперигидрофенантрен, состоящий из четырех колец [(трех шестичленных (A, B и C) и одного пятичленного (D))].



Структурная формула цикlopентaпергидрофeнантрeна

Глюкокортикоиды, андрогены и прогестагены в положении С-3 содержат кетогруппу, тогда как эстрогены – ароматическое кольцо. В положении С-17 глюкокортикоиды имеют гидроксизамещенную ацетильную группу и у 11-го углеродного атома – кислородную группу. Андрогены и эстрогены в положении С-17 содержат карбонильную или гидроксильную группу. Производные этого циклического ядра, имеющие в положении С-3 гидроксильную группу, называются стеринны или стеролы.

В организме животных и человека прогестины, половые гормоны и глюкокортикоиды образуются из холестерина. Основные пути биосинтеза гормонов из холестерина показаны на рисунке 10.



Рис.10. Основные пути биосинтеза гормонов из холестерина

На начальном этапе синтеза стероидных гормонов в митохондриях из холестерина образуется промежуточный продукт – прегненолон, который является предшественником стероидных гормонов.

Базовые стероидные соединения, получаемые микробиологической трансформацией

- **основное сырье** для синтеза гормональных стероидов – стеролы растительного и животного происхождения : фитостерол и холестерол;
- практически вся номенклатура современных стероидных лекарств может быть получена из стеролов через **17-кетандростаны**:
 - андростендион (АД),
 - 9 α -гидрокси-АД (9 α -ОН-АД),
 - андростадиендион (АДД),
 - дегидроэпиандростерон (ДГЭА)
- из АДД получают эстрогены и 19-норстероиды, остальной спектр стероидных средств получают из АД, 9 α -ОН-АД и ДГЭА

Сырье для получения базовых стероидных соединений

Существует 2 основных способа получения базовых стероидных соединений с использованием различного сырья:

- **химическая трансформация** сапогенинов, (диосгенин, гекогенин, соласодин) до C₂₁ стероидов (16-дезоксипрогненолон);
- **микробиологическая трансформация** стеролов до C₁₉ или C₂₂ стероидов.

В последние десятилетия 20-го века существенно сократились запасы традиционного сырья для производства стероидных препаратов - **диосгенина**, получаемого из произрастающей в Мексике диоскореи, и **соласодина**, получаемого из культивируемого в Казахстане паслена птичьего, являющегося труднодоступным сырьевым источником вследствие чрезвычайной зависимости растения от климатических условий.

Контрольные вопросы:

1. Роль отечественных и зарубежных ученых в развитии биотехнологии.
2. Разнообразие биологических процессов.
3. Роль гнилостных микроорганизмов в переработке органических соединений.
4. Использование веществ, вырабатываемых некоторыми растениями и микроорганизмами в парфюмерной и косметической промышленности.
5. Производство микробных белков и их применение.
6. Биоэнергия: производство водорода, углеводов и превращение энергии солнечного света.
7. Гормональная система растений.
8. Экологическая и генетическая безопасность применения регуляторов роста.
9. Значение лабораторного оборудования в биологической промышленности.
10. Применение достижений современной биотехнологии в агропромышленном производстве.
11. Достижения ветеринарной биотехнологии.
12. Новые направления в развитии биотехнологической промышленности.
13. Методы обеззараживания отходов.
14. Методы регулирования процессов биосинтеза и биотрансформации.
15. Производственное оборудование в биологической промышленности.
16. Фильтрующие материалы.
17. Технологическое обеспечение процессов культивирования.
18. Методы промышленного культивирования анаэробов.
19. Значение стимуляторов роста микроорганизмов.

ГЛОССАРИЙ

1. **Авидность** (функциональный аффинитет) — суммарная сила, с которой связываются между собой молекулы антигена и антитела; при этом учитывается валентность взаимоотношений. Авидность зависит как от аффинности, так и от числа активных центров на молекулу антитела.
2. **Адьювант** — любое вещество, неспецифически усиливающее иммунный ответ на конкретный антиген.
3. **Аллерген** — антиген, являющийся причиной развития аллергии.
4. **Аллергия** — повышение чувствительности иммунной системы организма к аллергену (антигену) при повторном с ним контакте, что клинически проявляется повреждением тканей организма.
5. **Антиген** — любое вещество, вызывающее иммунный ответ.
6. **Антигенпрезентирующая** (антигенпредставляющая) клетка (АПК) — клетка, способная презентировать (представлять) процессированный антигенный пептид вместе с молекулами главного комплекса гистосовместимости (ГКГ) класса II для распознавания Т-клеточным антиген распознающим рецептором на Т-лимфоцитах-хелперах (CD4+ клетки). В этом случае речь идет о макрофагах-моноцитах, В-лимфоцитах и дендритных клетках. Однако большинство ядерных клеток организма имеет на своей поверхности антигены ГКГ класса I, также способные представлять антиген в виде пептида, который имеется в пептид связывающей бороздке антигенов ГКГ класса I; этот пептид, как известно, распознается Т-лимфоцитами-киллерами (CD8+ клетки). Точно также распознаются и вирусинфицированные клетки.
7. **Антисыворотка** — сыворотка, содержащая антитела. Антитело — иммуноглобулин (растворимый белок), продуцируемый плазматическими клетками и способный специфически связываться с антигеном.
8. **Антитело** — специфический белок, синтезируемый в ответ на появление антигена и относящийся к одному из классов иммуноглобулинов.
9. **Антителозависимая клеточно-опосредованная** цитотоксичность (АЗКОЦ) одна из цитотоксических киллинговых реакций, при которой клетки-мишени, покрытые антителами, разрушаются благодаря тому, что к Fc-рецептору антител, покрывающих клетку-мишень, прикрепляются цитотоксические клетки, имеющие рецептор к Fc-фрагменту Ig — макрофаги, нейтрофилы и естественные киллерные клетки.
10. **Апоптоз** — одна из форм программированной клеточной смерти, которая характеризуется повреждением ДНК под влиянием

эндонуклеазы. Образующиеся при этом апоптотические тельца подвергаются фагоцитозу. В отличие от некроза, апоптоз представляет собой физиологический механизм смерти клетки, закончившей свою программу жизни. Апоптотическая гибель клеток не сопровождается воспалением.

11. **Аутоантитела** — антитела, реагирующие с антигенами собственного организма.
12. **Аутоиммунное заболевание** — заболевание, которое является результатом того, что иммунная система "ошибочно" атакует ткани собственного организма.
13. **Аутокринный** — термин используется в тех случаях, когда хотят подчеркнуть, что вещество, продуцируемое конкретной клеткой необходимо для воздействия и поддержания функций той клетки, которая это вещество продуцировала.
14. **Аутологичный** — имеющий отношение к данному конкретному индивидууму, например, аутологичный трансплантат — трансплантат, который пересажен в пределах одного индивидуума.
15. **Аффинитет** — обозначает понятие, характеризующее степень соответствия, которая определяет силу (прочность) связи между антигеном и антителом, рецептором и лигандом.
16. **Базофил** — одна из разновидностей лейкоцитов периферической крови, отличающаяся содержанием большого количества лизосом и гранул (секреторных пузырьков). На поверхности базофила имеется рецептор к Fc-фрагменту IgE. После связывания IgE, находящегося на поверхности базофила, со специфическим аллергеном происходит реакция дегрануляции с высвобождением большого количества биологически активных компонентов из гранул базофила. К ним относятся, прежде всего, гистамин, простагландины и лейкотриены, тромбоцит-активирующий фактор. Тканевые базофилы получили название тучных клеток.
17. **Белок** — молекула, образованная большим количеством аминокислот. Белки — большие пептиды
18. **Врожденный иммунитет** — (неспецифические факторы иммунитета, естественная резистентность) — совокупность защитных механизмов организма, которые реализуются без участия лимфоцитов.
19. **Вторичный иммунодефицит** — клинко-иммунологический синдром, который развивается на фоне ранее нормально функционировавшей иммунной системы; характеризуется устойчивым выраженным снижением количественных и функциональных показателей специфических и/или неспецифических факторов иммунитета и является зоной риска

развития хронических инфекционных воспалительных заболеваний, аутоиммунной патологии, аллергических заболеваний и опухолей.

20. **Высокие эндотелиальные венулы** — капиллярные венулы, содержащие специализированные клетки, которые позволяют лимфоцитам мигрировать в лимфоидные органы.
21. **Гены иммунного ответа (IR-гены)** — совокупность генов, расположенных в ГКГ, функциональная активность которых суммарно обеспечивает степень иммунного ответа на конкретный антиген у конкретного индивидуума.
Герминативный (зародышевый) центр — дискретные области в пределах лимфатических узлов и селезенки, где происходит индуцированное антигеном созревание В-клеток и накопление В-клеток памяти.
22. **Гибридома** — гибридная клеточная линия, получаемая после слияния опухолевой лимфоидной клетки с нормальным лимфоцитом. В результате полученная гибридная клетка приобретает "бессмертие" от опухолевой клетки и способность осуществлять эффекторную функцию, например, синтез антител, от нормального лимфоцита. Описанная ситуация лежит в основе технологии получения моноклональных антител.
23. **Гиперчувствительность** — иммунный ответ, в результате которого наступает повреждение органов или тканей. Обусловлен повышением реактивности организма в результате предшествующей сенсibilизации. Различают гиперчувствительность немедленного и замедленного типа. По классификации Джелла и Кумбса выделяют четыре типа реакции гиперчувствительности: 1-й, 2-й, 3-й и 4-й. Гиперчувствительность замедленного типа — иммунная реакция, которая развивается через 48—72 ч после контакта с антигеном и опосредуется высвобождением цитокинов из сенсibilизированных Т-лимфоцитов с последующим привлечением в очаг воспалительных клеток.
24. **Гистамин** — главный вазоактивный амин, который высвобождается из гранул базофилов периферической крови и тканевых базофилов (тучных клеток). Один из основных реагентов, участвующих в развитии аллергических реакций немедленного типа.
25. **Гистосовместимость** — совместимость по антигенам главного комплекса гистосовместимости, т. н. тканевая совместимость; обозначает способность реципиента воспринять трансплантат от донора. При определении гистосовместимости между донором и реципиентом выявляют их фенотипы по антигенам локусов А, В, С, DR, DP и DQ. Для этой цели используется как серологическое

типирование, так и, в последнее время, ДНК-типирование с помощью полимеразной цепной реакции.

26. **Главный комплекс гистосовместимости (ГКГ)** (major histocompatibility complex — МНС) — генный комплекс, расположенный на коротком плече 6-й хромосомы, который кодирует молекулы белков, часть из которых принимает участие в презентации антигенов при иммунном распознавании антигена в тканях.
27. **Гранулоциты** — лимфоидные клетки, содержащие цитоплазматические гранулы. Различают три вида гранулоцитов — нейтрофилы, эозинофилы и базофилы.
Гуморальный иммунитет (гуморальный фактор иммунитета, гуморальное звено иммунитета) — защитные иммунные реакции, выполняемые с помощью иммуноглобулинов (антител). В некоторых ситуациях это звено иммунитета является преобладающим. Примером такой ситуации может быть антибактериальный иммунный ответ.
28. **Дендритные клетки** — различают фолликулярные и интердигитальные дендритные клетки. Первые обнаруживаются в герминативных центрах лимфатических узлов и селезенки (В-зонах), имеют на своей поверхности рецептор к Fc-фрагменту иммуноглобулинов, но не имеют антигенов гистосовместимости класса II. Предполагается, что они несут на своей поверхности иммунные комплексы и способствуют развитию генерации антителопродуцирующих клеток, презентирова антиген В-лимфоцитам. Напротив, интердигитальные дендритные клетки обнаруживаются в Т-клеточных областях лимфатических узлов и селезенки. Имеют на своей поверхности антигены ГКГ класса II, но не имеют рецепторов к Fc-фрагменту. Интердигитальные дендритные клетки участвуют в презентации антигена для Т-лимфоцитов.
29. **Идиотип** — участок аминокислотных последовательностей в пределах вариабельного региона антител или Т-клеточного распознающего рецептора, который является для них специфическим и способен вызвать продукцию антиидиотипических антител. Идиотипическая сеть — регуляторное сетевое взаимодействие, основанное на том, что антиидиотипические антитела и идиотипы, имеющиеся на иммуноглобулинах и Т-клеточных распознающих рецепторах, взаимодействуют между собой. Таким образом регулируется выраженность иммунного ответа.

30. **Иммунный ответ** – ответ компонентов иммунной системы на антиген.
31. **Иммунный ответ** — реакция иммунной системы организма на чужеродные субстанции или, другими словами, на вещества, несущие признаки генетически чужеродной информации.
32. **Иммуноадсорбция** — метод удаления антител или антигена, в основе которого лежит способность антигена и антитела связываться между собой.
33. **Иммуноген** — любая субстанция, вызывающая иммунный ответ. Следует учитывать, что все иммуногены являются антигенами, но не все антигены обладают свойствами иммуногенов.
34. **Иммуноглобулин** – белок, образуемый В-лимфоцитами, который реагирует со специфическим антигеном.
35. **Иммунопатология** — патологические процессы и заболевания, в патогенезе которых принимают участие иммунные механизмы. Аллергические заболевания представляют собой часть иммунопатологии.
36. **Иммуносупрессия** — подавление иммунного ответа, например, с помощью лекарственных средств, предотвращающих трансплантационную реакцию отторжения.
37. **Иммуотоксин** — моноклональные антитела, связанные с токсическим веществом или радиоактивной субстанцией. Получение таких антител — один из подходов к созданию специфически действующих на клетки препаратов. В этом случае моноклональное антитело распознает нежелательный объект, например, опухолевую клетку, а конъюгированный с моноклональным антителом токсин, например, дифтерийный токсин, разрушает этот нежелательный объект (клетку опухоли).
38. **Интерлейкин** – разновидность цитокинов, которые обеспечивают взаимодействие между лейкоцитами.
39. **Интерферон** — группа цитокинов, которые увеличивают резистентность клеток к вирусной инфекции, обладают антипролиферативным эффектом, а также способны регулировать иммунный ответ.
40. **Клетка** – самая маленькая живая единица ткани, состоящая из ядра и цитоплазмы, окруженных мембраной. Ядро содержит ДНК, а цитоплазма – структуры (органеллы), которые осуществляют функции клетки.
41. **Клонально-селекционная теория** — теория формирования иммунного ответа, согласно которой под влиянием антигена происходит отбор (селекция) лимфоцитов, имеющих на своей поверхности специфический антигенраспознающий рецептор, с

- последующим формированием из таких лимфоцитов клона специфически реагирующих иммунокомпетентных клеток.
42. **Комплемент** — группа белков, которые помогают атаковать антигены.
 43. **Купферовские клетки** — фиксированные (резидентные) тканевые макрофаги печени.
 44. **Лангерганса клетки** — антигенпредставляющие дендритные клетки кожи, которые обладают рецептором к Fc-фрагменту иммуноглобулинов имеют на своей поверхности антигены гистосовместимости класса II и CD 1a.
 45. **Лейкоциты** — белые клетки крови. К лейкоцитам, в частности, относятся лимфоциты и нейтрофилы.
 46. **Лектины** — семейство белков, как правило растительного происхождения, которые связывают специфические сахара на гликопротеинах и гликолипидах. Некоторые лектины, прежде всего фитогемагглютинин и конканавалин А, являются митогенами для Т-лимфоцитов; митоген лаконоса является митогеном для В-лимфоцитов.
 47. **Лиганд (контррецептор)** — общий термин, употребляемый для молекул, предназначение которых состоит в распознавании и специфическом связывании с такими структурами, как рецептор.
 48. **Лизосомы** — цитоплазматические гранулы, содержащие гидролитические ферменты, с помощью которых антигенный материал подвергается процессингу (перевариванию).
 49. **Лизоцим** — антибактериальный фермент, присутствующий в гранулах фагоцитирующих клеток, в слезной жидкости и слюне, который расщепляет пептидогликаны мембраны бактериальной клетки.
 50. **Лимфоидная ткань**, ассоциированная с кишечником (GALT) — включает изолированные солитарные фолликулы (пейеровы бляшки), червеобразный отросток и лимфоидные узелки в подслизистом слое.
 51. **Лимфоидные органы (центральные)** — органы, в которых происходит развитие иммунокомпетентных лимфоцитов. К ним относятся тимус и костный мозг у млекопитающих.
 52. **Лимфокинактивированные** киллерные клетки (ЛАК) — в основном, К- и ЕК-клетки, активированные *in vitro* ИЛ-2 для усиления киллерного эффекта по отношению к клеткам-мишеням.
 53. **Лимфоциты** — основные клетки лимфатической системы. Различают В-лимфоциты (которые вырабатывают антитела) и Т-лимфоциты (которые помогают организму отличать «свое» от «чужого»).

54. **Липополисахарид** — эндотоксин, получаемый из грамотрицательных бактериальных клеток, оказывает воспалительное и митогенное влияние на лимфоидные клетки.
55. **Макрофаг** — фагоцитирующая клетка, которая происходит из моноцита периферической крови и может функционировать как антигенпредставляющая клетка и клетка, опосредующая антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность.
56. **Макрофаги** — большие лейкоциты, которые захватывают микроорганизмы и другие антигены после того, как они выявлены иммунной системой.
57. **Молекула** — группа химически объединенных атомов, образующих уникальное химическое вещество.
58. **Моноциты** — моноклеарные фагоциты, которые обнаруживаются в периферической крови и являются предшественниками тканевых макрофагов.
59. **Нейтрофилы** — большие лейкоциты, которые поглощают антигены и другие вещества.
60. **Нейтрофилы** — основная часть циркулирующих, фагоцитирующих полиморфноядерных гранулоцитов, характеризующихся тем, что они раньше других попадают в ткани при развитии воспалительного ответа. Кроме того, обладают способностью осуществлять антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность.
61. **Опсонин** — субстанции, усиливающие фагоцитоз: прежде всего, иммуноглобулины, активированный 3-й компонент комплемента (C3b) и др.
62. **Память иммунологическая** — характеристика специфического иммунного ответа, заключающаяся в том, что повторное попадание в организм специфического антигена индуцирует развитие иммунного ответа по вторичному типу, который характеризуется более быстрым и в более высоких титрах, чем при первичном иммунном ответе, появлением антител, а также Т-лимфоцитов-киллеров.
63. **Пейеровы бляшки** — элементы лимфоидной ткани, ассоциированной с кишечником в виде отдельных лимфоидных узелков, расположенных главным образом в тонкой кишке.
64. **Пептид** — молекула, образованная двумя или несколькими аминокислотами.
65. **Первичный иммунный ответ** — сравнительно слабый иммунный ответ, который развивается при первом контакте наивных лимфоцитов с конкретным антигеном.

66. **Плазматическая клетка** — конечный этап антигенной дифференцировки В- лимфоцитов; активно секретирует большое количество антител.
67. **Приобретенный (адаптивный) иммунитет** — иммунный ответ, основную роль в осуществлении которого играют лимфоциты; характеризуется антигенной специфичностью и памятью. Простагландины — жирные кислоты, которые образуются из арахидоновой кислоты; способны усиливать проницаемость сосудов и вызывать лихорадку; могут как стимулировать, так и ингибировать иммунный ответ.
68. **Рецептор** — молекула, расположенная на поверхности клетки или в ее цитоплазме и соответствующая другой специфической молекуле, как ключ замку.
69. **Хемотаксис** — направленное движение клеток под влиянием химических веществ.
70. **Цитокины** — белки, вырабатываемые клетками иммунной системы, которые действуют как посредники, помогая регулировать иммунный ответ.
71. **Человеческие лейкоцитарные антигены (HLA)** — то же, что главный комплекс гистосовместимости человека.
72. **Эндоцитоз** — процесс, при котором клетка поглощает некоторые антигены.
73. В- лимфоцитов; активно секретирует большое количество антител.
74. **Приобретенный (адаптивный) иммунитет** — иммунный ответ, основную роль в осуществлении которого играют лимфоциты; характеризуется антигенной специфичностью и памятью. Простагландины — жирные кислоты, которые образуются из арахидоновой кислоты; способны усиливать проницаемость сосудов и вызывать лихорадку; могут как стимулировать, так и ингибировать иммунный ответ.
75. **Рецептор** — молекула, расположенная на поверхности клетки или в ее цитоплазме и соответствующая другой специфической молекуле, как ключ замку.
76. **Хемотаксис** — направленное движение клеток под влиянием химических веществ.
77. **Цитокины** — белки, вырабатываемые клетками иммунной системы, которые действуют как посредники, помогая регулировать иммунный ответ.
78. **Человеческие лейкоцитарные антигены (HLA)** — то же, что главный комплекс гистосовместимости человека.
79. **Эндоцитоз** — процесс, при котором клетка поглощает некоторые антигены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Калинин М.Н. Актуальные вопросы эндокринологии в терапевтической практике: рук.для врачей / М. Н. Калинин, Л. В. Шпак, Ю. А. Волкова, Е. И. Березина [и др.] ; под ред. М. Н. Калинин, Л. В. Шпак. — Тверь: Фактор и К, 2019. — 698 с.
2. Кроненберг Г.М. Сахарный диабет и нарушения углеводного обмена / Г. М. Кроненберг, Ш. Мелмед, К. С. Полонски: пер. с англ.; под ред. И. И. Дедова, Г. А. Мельниченко. — Москва: Рид Элсивер, 2010. — 437 с.
3. Мельниченко Г.А. Практическая эндокринология / под ред. Г. А. Мельниченко. — Москва: Практическая медицина, 2009. — 351 с.
4. ЭБС "Лань": Иммунология [Электронный ресурс]: учебное пособие / Р.Г. Госманов [и др.]. — Электрон. дан. — Санкт-Петербург: Лань, 2018. — 188 с.
5. ЭБС «Znanium»: Ветеринарная микробиология и иммунология. Часть 1. Общая микробиология: учебник / В.Н. Кисленко, Н.М. Колычев. — М.: ИНФРА-М, 2018. — 183 с. — (Высшее образование).
6. Ajlouni K. Metabolic syndrome amongst adults in Jordan: prevalence, trend, and its association with socio-demographic characteristics / K. Ajlouni, Y. Khader, M. Alyousfi [et al.] // Diabetol Metab Syndr. — 2020. — Vol. 12. — № 100. — <https://doi.org/10.1186/s13098-020-00610-7>
7. Baeshen, M. N. Production of Biopharmaceuticals in E. coli: Current Scenario and Future Perspectives / A. M. Al-Hejin, R. S. Bora, M. M. Ahmed [et al.] // J Microbiol Biotechnol. — 2015. — Vol. 25. — № 7. — P. 953—962. DOI: 10.4014/jmb.1412.12079.
8. Baeshen, N. A. Cell factories for insulin production / N. A. Baeshen, M. N. Baeshen, A. Sheikh [et al.] // Microb Cell Fact. — 2014. — Vol. 13. — № 141. — <https://doi.org/10.1186/s12934-014-0141-0>.
9. Balbas, P. Back to basics: pBR322 and protein expression systems in E. coli / P. Balbas, F. Bolivar // Methods Mol Biol. — 2004. — Vol. 267. — P. 77-90. doi: 10.1385/1-59259-774-2:077.
10. Nimri, R. Insulin Pump Therapy / R. Nimri, J. Nir, M. Phillip // Am J Ther. — 2020. — Vol. 27. — № 1. — P. e30—e41. DOI: 10.1097/MJT.0000000000001097.
11. Sawitzke, J. A. Recombineering: in vivo genetic engineering in E. coli, S. enterica, and beyond / J. A. Sawitzke, L. C. Thomason, N. Costantino, M. Bubunencko [et al.] // Methods Enzymol. — 2007. — Vol. 421. — P. 171—199. DOI: 10.1016/S0076-6879(06)21015-2.
12. Thomason LC, Recombineering: genetic engineering in bacteria using homologous recombination / L. C. Thomason, J. A. Sawitzke, X. Li [et al.] // Curr Protoc Mol Biol. — 2014. — Vol. 106. — P. 1.16.1—1.16.39. DOI: 10.1002/0471142727.mb0116s106.