

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«СЕВЕРО-КАВКАЗСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

ПРАКТИЧЕСКИЕ РАБОТЫ ПО ДИСЦИПЛИНЕ
«Биотехнология получения пищевых и биологически активных добавок и их
использование в пищевых производствах»

Направление подготовки направленность (профиль)	19.06.01-Промышленная экология и биотехнологии Биотехнология пищевых продуктов и биологически активных веществ	
Квалификация выпускника	Исследователь. Преподаватель-исследователь.	
Форма обучения	очная	
Учебный план	2017	
Изучается в 5 семестре		
Объем занятий: Итого	108 ч.	3 з.е.
В т.ч. аудиторных	36 ч.	
Из них:		
Лекций	18 ч.	
Лабораторных работ	-	
Практических занятий	18 ч.	
Самостоятельной работы	45 ч.	
Экзамен 6 семестр	27 ч.	

СОГЛАСОВАНО:

Зав. кафедрой прикладной
биотехнологии
_____ Лодыгин А.Д.
«7» _____ 2017 г.

Рассмотрено УМК института
живых систем
Протокол № 7 от «18» 02.2017 г.

Председатель УМК института
живых систем
_____ Кухарук М.Ю.

РАЗРАБОТАНО:

Разработчик заведующий кафедрой
прикладной биотехнологии
_____ Лодыгин А.Д.
Должность разработчика доцент
_____ Абакумова Е.А.
"7" _____ 2017 г.

Ставрополь, 2017

Практическое занятие 1
ПРОМЫШЛЕННЫЕ СПОСОБЫ БИОТРАНСФОРМАЦИИ
ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

1. Определение и классификация процессов микробиологической трансформации (биотрансформации) органических соединений.
2. Общие принципы проведения биотрансформаций органических соединений.
3. Применение процессов биотрансформации в пищевой биотехнологии.

1. Определение и классификация процессов микробиологической трансформации (биотрансформации) органических соединений.

Биосинтез предусматривает получение целевых продуктов на основе реализации тех или иных метаболических путей биообъекта. В процессах биотрансформации имеет место видоизменение молекулы – предшественника целевого продукта или превращение одного продукта в другой.

Большинство процессов микробиологической трансформации приводит к незначительной химической модификации субстрата под действием одного или нескольких экзоферментов клетки. Однако разработаны биотехнологические процессы, существенно изменяющие структуру трансформируемого соединения под действием сложных ферментных комплексов. К биотрансформациям также относят синтез метаболитов из предшественников, если при этом структура целевого продукта определяется химическим строением присутствующих в среде молекул предшественников (например, синтез нуклеотидов).

В настоящее время процессы микробиологической трансформации органических соединений являются реальной альтернативой традиционным методам химического синтеза пищевых добавок, БАД к пище и других практически важных продуктов. Преимуществами биотрансформации органических соединений по сравнению с химическим синтезом являются:

- специфичность микробных ферментных систем к трансформируемому субстрату и, как следствие, высокая химическая чистота получаемых продуктов;
- способность микроорганизмов осуществлять в одну стадию многоступенчатые химические превращения;
- возможность тонких перестроек сложных органических молекул;
- простота аппаратного оформления и экономичность процессов биотрансформации;
- перспектива получения целевых продуктов, синтез которых химическими методами затруднен или не осуществим в настоящее время.

Процессы микробиологических трансформаций принято классифицировать по типу присоединения функциональных групп к продукту или их отщепления от предшественника: окисление, восстановление, декарбоксилирование, аминирование и дезаминирование, образование гликозидов, гидролиз, метилирование и деметилирование, этерификация, конденсация, галогенирование др.

2. Общие принципы проведения биотрансформаций органических соединений.

Общая схема проведения процессов биотрансформации включает следующие этапы:

- подготовка питательной среды, внесение специфических факторов, активизирующих биотрансформационную способность продуцента, стерилизация питательной среды;
- установление оптимальных для получения целевого продукта значений температуры и рН среды, интенсивности аэрации;
- введение в среду трансформируемого соединения в виде стерильных растворов, эмульсий или суспензий;
- подготовка посевного материала при условиях, обеспечивающих максимальный выход биомассы, и инокуляция питательной среды;
- культивирование продуцента при температуре, рН и интенсивности аэрации, обеспечивающих максимальный выход продукта реакции биотрансформации;
- отделение биомассы продуцента от культуральной жидкости, выделение и очистка целевого продукта, получение товарной формы препарата.

В настоящее время в лабораторных и промышленных условиях реализованы процессы получения лекарственных препаратов, витаминов, других биологически активных веществ, основанные на микробиологических трансформациях различных органических соединений. В ряду этих процессов особое место занимают методы биотрансформации стероидов, углеводов и гетероциклических соединений, приводящие к получению продуктов, не имеющих биосинтетических аналогов.

Для пищевой биотехнологии наибольший интерес представляют процессы микробиологической трансформации углеводов (реакции окисления, восстановления, изомеризации и эпимеризации), которые будут рассмотрены более подробно.

3. Применение процессов биотрансформации в пищевой биотехнологии.

Микробиологические трансформации углеводов по типу осуществляемой ферментативной реакции можно разделить на три группы:

1. Окислительные трансформации.
2. Восстановление углеводов.
3. Изомеризация и эпимеризация.

Наиболее широко распространены и изучены окислительные трансформации; практическое применение нашел процесс окисления полиолов. В промышленных масштабах реализованы два процесса окисления полиолов:

1. Превращение глицерина в диоксиацетон. Разработан метод с многократным использованием клеток *Acetobacter suboxydans*, в т.ч. иммобилизованных, в среде содержащей глицерин, KH_2PO_4 и 10% дрожжевого экстракта. Процесс осуществляют при 28°C в течение 36 ч.

2. Трансформация D-сорбита в L-сорбозу. В промышленности используется метод глубинного культивирования *Acetobacter suboxydans*. Посевной материал выращивают на среде, содержащей сорбит, глюкозу, дрожжевой экстракт и CaCO_3 . Полученную культуру бактерий вносят в 15-20% растворы D-сорбита, содержащие необходимые ростовые факторы. Процесс проводят при 30°C с интенсивной аэрацией в течение 24 ч. Выход L-сорбозы составляет 93% от исходной концентрации D-сорбита.

3. Препараты витамина С получают в промышленных условиях комбинированным способом, включающим каталитическое гидрирование глюкозы с образованием D-сорбита, микробиологическую трансформацию D-сорбита в L-сорбозу

культурами *Acetobacter suboxydans* и *Ac.xylinum* и далее L-сорбоза может быть трансформирована в кетоглуоновую кислоту (КГК) через стадию образования L-сорбозона. Первую реакцию осуществляют клетки *Gluconobacter melanogenum*; вторую – *Pseudomonas putida*. Полученная КГК трансформируется в L-аскорбиновую кислоту химическим путем.

Разработан способ, предусматривающий окисление глюкозы до D-глюконовой кислоты и дегидрирование последней с образованием 5-кето-D-глюконата Са; процессы катализируются клетками *Acetobacter suboxydans*, 5-кето-D-глюконата Са каталитически гидрируется с образованием эквимолярной смеси L-глюконата и D-глюконата Са. L-глюконат трансформируется в КГК культурой *Xanthomonas translucens*.

Получение витамина С методом Крафта предусматривает гидролиз лактозы препаратами β-галактозидазы; анаэробную ферментацию сыворотки культурами дрожжей не ассимилирующих галактозу; выделение этанола перегонкой; содержащуюся в барде галактозу трансформируют культурой дрожжей *Candida norvegensis* с образованием витамина С в количестве более 1 г/л.

Практический интерес представляют восстановительные биотрансформации углеводов, заключающиеся в превращении альдегидной или кетонной группы в спиртовую. Данный метод получил широкое распространение для промышленного производства ксилита. В качестве трансформирующей культуры используют дрожжи *S. utilis*. Биомассу дрожжей выращивают на среде с ксилозой и добавками фосфатов. Процесс биотрансформации осуществляют в растворах ксилозы с добавками минеральных солей, при температуре 29-33°C, рН 7,0. Выход ксилита составляет до 60%. Использование иммобилизованных продуцентов позволяет повысить выход до 90-92%.

Технология получения концентратов и препаратов триптофана.

Концентраты и препараты триптофана получают 2 способами: одностадийным (биосинтез) и двухстадийным (биотрансформация антраниловой кислоты).

Первый способ основан на культивировании штаммов-сверхпродуцентов *Vac.subtilis* при 37° С; рН 7,0-7,2; интенсивности аэрации 5-6 м³/м³*ч на среде следующего состава: сахароза – 10%; кукурузный экстракт – 2%; мочевины – 0,5%; с добавлением К₂НРО₄, КН₂РО₄, NaCl. Продолжительность предферментации – 20ч; главной ферментации – 48 ч. При производстве кормового концентрата культуральную жидкость без отделения клеток сгущают до 40% СВ и высушивают.

Процесс получения технического препарата триптофана предусматривает отделение клеток и нерастворимых примесей; подкисление фильтрата НС1; адсорбцию триптофана на катионитах; десорбцию 5% водно-изопропанольным раствором аммиака; концентрирование вакуум-выпариванием; кристаллизацию триптофана; промывку кристаллов этанолом, сушку кристаллов.

Второй способ получения триптофана предусматривает культивирование дрожжей *Candida utilis* на среде, содержащей мелассу (6-6,5%); мочевины (0,5%); добавки КН₂РО₄, СаС1₂; MgSO₄. На первой стадии при температуре 28-30°С; рН 7,5-8,0; интенсивности аэрации 8-10 м³/м³*ч в течение 24 ч происходит рост культуры; далее вносят раствор антраниловой кислоты и мочевины. На второй стадии осуществляют подпитку 25%-ного раствора мелассы. Продолжительность стадии биотрансформации – 120 ч. Последующие операции получения концентрата или препарата триптофана аналогичны описанным выше.

Препараты глутаминовой кислоты и глутамата натрия

Их получают методами биосинтеза и биотрансформации.

Биосинтетический способ основан на культивировании *Corynebacterium glutamicum* при 28-30⁰С, рН 7,0-7,2; интенсивности аэрации 6-8 м³/м³*ч в течение 48-52 ч на среде, содержащей мелассу (20%), мочевины (2%), мел (1%), с добавками КН₂РО₄, MgSO₄, пеногасителя. Концентрация глутаминовой кислоты по завершении ферментации – 40-45 г/л.

Клетки продуцента отделяют с предварительной флокуляцией (внесением Са(ОН)₂ и Н₃РО₄); фильтрат осветляют от пигментов на активированных углях или анионитах; концентрируют, подкисляют до рН 3,2 (ИЭТ глутаминовой кислоты) и охлаждают до 14-15⁰ С; кристаллы отделяют, промывают дистиллированной водой и высушивают.

Для получения глутамата натрия влажные кристаллы растворяют и обрабатывают NaOH до рН 6,8; раствор фильтруют, отделяя примеси; фильтрат концентрируют до 60% СВ, кристаллизуют глутамат натрия, кристаллы высушивают.

Биотрансформацию проводят 2 методами:

- переаминирование, которое заключается в культивировании продуцентов α-кетоглутаровой кислоты, например *Candida utilis* на n-алканах (первая стадия); проведение биотрансформации α-кетоглутаровой кислоты культурами *E.coli*, в качестве доноров аминогруппы выступают аспарагиновая кислота или аланин;
- восстановительное аминирование полученной аналогичным способом α-кетоглутаровой кислоты культурами *Pseudomonas ovalis*.

Ферментативное разделение оптических изомеров аминокислот.

Перспективным методом получения L-аминокислот является разделение рацематов аминокислот путем ассиметричного гидролиза их производных с использованием микроорганизмов, обладающих специфической L-ацилазной, L- амидазной, L- эстеразной активностью.

Ферментативное разделение рацематов аминокислот с L-ацилазами основано на избирательном гидролизе ацилированных производных L-аминокислот. При отщеплении ацильной группы L-аминокислоты становятся более растворимыми и легко отделяются от малорастворимых ацилированных D-аминокислот.

Некоторые протеолитические ферменты, например, химотрипсин, проявляют высокую L-эстеразную активность. Амидазы гидролизуют амиды аминокислот с образованием L-аминокислот. Не прореагировавшие производные D-аминокислот могут быть подвергнуты рацемизации и вновь использованы для ферментативного разделения.

При культивировании микроорганизмов с ацилазной, амидазной и эстеразной активностью для повышения выхода целевого продукта необходимо вводить в среду культивирования индукторы синтеза соответствующих ферментов. Индукторами в ряде случаев являются вещества, близкие по природе к субстрату действия ферментов. Например, для ацилазы лизина – ε-ацетил-L-лизин.

У многих микроорганизмов, прежде всего грибных и дрожжевых культур, ацилазы являются внутриклеточными ферментами. Поэтому для их использования клетки необходимо предварительно подвергать дезинтеграции.

Практическое занятие 2.
ИММОБИЛИЗОВАННЫЕ БИООБЪЕКТЫ
В БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОИЗВОДСТВАХ

1. Материалы, применяемые для иммобилизации ферментов и клеток. Методы иммобилизации биообъектов.
2. Типы иммобилизованных биокаталитических систем.
3. Аппаратурное оформление процессов с применением иммобилизованных ферментов и клеток.
4. Применение процессов биотрансформации и иммобилизованных биообъектов в пищевой биотехнологии.

1. Материалы, применяемые для иммобилизации ферментов и клеток. Методы иммобилизации биообъектов.

Иммобилизация - ограничение подвижности молекул ферментов, позволяющее закрепить их активный центр, сохраняя максимальную работоспособность в течение длительного времени, не подвергаясь структурным изменениям.

Материалы, используемые для иммобилизации ферментов, должны обладать следующими основными свойствами: нерастворимостью; высокой химической и биологической стойкостью; значительной гидрофильностью; достаточной проницаемостью, как для ферментов, так и для коферментов, субстратов и продуктов реакции; способностью носителя легко активироваться (переходить в реакционноспособную форму).

Естественно, ни один из используемых в настоящее время в качестве носителя материал не отвечает полностью перечисленным требованиям. Тем не менее, существует широкий набор носителей, пригодных для иммобилизации определенных энзимов в конкретных условиях.

В зависимости от природы носители делятся на органические и неорганические материалы.

Органические полимерные носители. Существующие органические полимерные носители можно разделить на два класса: природные и синтетические полимерные носители. В свою очередь, каждый из классов органических полимерных носителей подразделяется на группы в зависимости от их строения. Среди природных полимеров выделяют белковые, полисахаридные и липидные носители, а среди синтетических - полиметиленовые, полиамидные и полиэфирные.

К преимуществам природных носителей следует отнести их доступность, полифункциональность и гидрофильность, а к недостаткам - биодegradируемость и достаточно высокую стоимость.

Из полисахаридов для иммобилизации наиболее часто используют целлюлозу, декстран, агарозу и их производные. Для придания химической устойчивости линейные цепи целлюлозы и декстрана поперечно сшивают эпихлоргидрином. В полученные сетчатые структуры довольно легко вводят различные ионогенные группировки. Химической модификацией крахмала сшивающими агентами (формальдегид, глиоксаль, глутаровый альдегид) синтезирован новый носитель - губчатый крахмал, обладающий повышенной устойчивостью к гликозидазам.

Из природных аминсахаридов в качестве носителей для иммобилизации применяют хитин, который в значительных количествах накапливается в виде отходов в процессе промышленной переработки крабов и креветок. Хитин химически стоек и имеет хорошо выраженную пористую структуру.

Среди белков практическое применение в качестве носителей нашли структурные протеины, такие, как кератин, фиброин, коллаген, желатин. Эти белки широко распространены в природе, поэтому доступны в значительных количествах, дешевы и имеют большое число функциональных групп для связывания фермента. Белки способны к биодegradации, что очень важно при конструировании иммобилизованных ферментов для медицинских целей.

К синтетическим носителям относятся полимеры на основе стирола, акриловой кислоты, поливинилового спирта; полиамидные и полиуретановые полимеры. Большинство синтетических полимерных носителей обладают механической прочностью, а при образовании обеспечивают возможность варьирования в широких пределах величины пор, введения различных функциональных групп. Некоторые синтетические полимеры могут быть произведены в различных физических формах (трубы, волокна, гранулы). Все эти свойства полезны для разных способов иммобилизации ферментов.

Носители неорганической природы. В качестве носителей наиболее часто применяют материалы из стекла, глины, керамики, графитовой сажи, силикагеля, а также силихромы, оксиды металлов. Их можно подвергать химической модификации, для чего носители покрывают пленкой оксидов алюминия, титана, гафния, циркония или обрабатывают органическими полимерами. Основное преимущество неорганических носителей - простота регенерации. Подобно синтетическим полимерам неорганическим носителям можно придать любую форму и получать их с любой степенью пористости.

Существуют два принципиально различных метода иммобилизации ферментов: без возникновения ковалентных связей между ферментом и носителем (физические методы иммобилизации) и образованием ковалентной связи между ними (химические методы иммобилизации). Каждый из этих методов осуществляется разными способами.

Используемые в настоящее время физические способы иммобилизации делят на 3 группы:

- адсорбция на нерастворимых носителях;
- включения в полимерную структуру;
- инкапсулирование (включение в полупроницаемую мембрану).

Иммобилизация путем адсорбции. Биообъект фиксируют на поверхности неорганических (силикагели, алюмогели, керамика, бентонит, гидрокеиды титана, циркония, железа) и органических (целлюлоза, хитин и хитозаи, ионообменные смолы, полимерные волокна) носителей.

В зависимости от используемого инертного материала и типа иммобилизуемого биообъекта взаимодействие между ними может осуществляться за счет сил физической адсорбции, ковалентных и координационных химических связей, полярных, ионных и гидрофобных взаимодействий.

Для иммобилизации без химической сшивки характерно слабое влияние носителя на свойства и каталитическую активность иммобилизуемого фермента, в то же время, слабая связь фермента с матрицей приводит к десорбции, вымыванию из биореактора.

Более прочными являются ионные взаимодействия биокатализатора и носителя, при которых адсорбция поддерживается при определенных значениях рН и ионной силы раствора. Важно, чтобы в ионном взаимодействии не участвовал активный центр фермента. Изменение рН или ионной силы раствора может привести к десорбции фермента; изменению ионообменных характеристик носителя.

Иммобилизация путем включения в полимерную структуру. Данный метод основан на участии молекул фермента в реакции сополимеризации (поликонденсации) с молекулами полимеризующегося мономера. Т.о. получают гранулы, пленки, волокна, несущие биокатализатор. Метод перспективен применительно к иммобилизации клеток.

Для иммобилизации широко используют агар-агар, альгинаты, каррагинан полиакриламид, желатин. Биокатализатор вносят в раствор, содержащий ионы Ca^{2+} , Al^{3+} Fe^{3+} и др. образуются сферические полимерные частицы, несущие иммобилизованные объект. Для получения однородных гранул раствор пропускают через специальные иглы, распыляющие устройства, вибрационные устройства для разрыва струи жидкости. Данные методы получили название «внешнее гелеобразование».

Наряду с ними используют методы «внутреннего гелеобразования»: в раствор полимера вносят солевой раствор (например, цитрат кальция для альгината), вызывающий гелеобразование. Перспективными материалами для иммобилизации ферментов и клеток являются агар-агар.

Иммобилизация путем инкапсулирования. При использовании этого метода биообъект покрывают специальными полупроницаемыми оболочками из целлюлозы, полиакриламида, полистирола, полисульфонатов, поликарбонатов, полиэфиров. Размеры пор полупроницаемой мембраны подбирают т.о., чтобы в капсуле удерживался целевой продукт например, белок, а низкомолекулярные примеси вымывались с раствором.

Липидные мембраны (липосомы), используемые в качестве капсул, могут выполнять функцию «температурного реле»: при определенной температуре глицериды плавятся, что приводит к резкому увеличению проницаемости мембраны и каталитической активности фермента.

Инкапсулирование также проводят в биореакторах с полыми волокнами, изготовленными из целлюлозы и других полимерных материалов, Раствор, содержащий биокатализатор, подают во внутренний объем полого волокна.

К методу инкапсулирования близок метод обращенных мицелл, применяемый для реализации биокаталитических процессов в неводной фазе. Водный раствор фермента солюбилизируют в органическом растворителе с помощью ПАВ, при этом молекулы фермента включаются в водные мицеллы, стабилизированные ПАВ.

Химические методы иммобилизации ферментов. Иммобилизация ферментов путем образования новых ковалентных связей между ферментом и носителем – наиболее массовый способ получения промышленных биокатализаторов. В отличие от физических методов этот способ иммобилизации обеспечивает прочную и необратимую связь фермента с носителем и часто сопровождается стабилизацией молекулы энзима. Однако расположение фермента относительно носителя на расстоянии одной ковалентной связи создает стерические трудности в осуществлении каталитического процесса. Фермент отделяют от носителя с помощью вставки в роли которой чаще всего выступают бифункциональные и полифункциональные агенты (бромциан, гидразин, сульфурилхлорид, глутаровый диальдегид и др.). Например, для выведения

галактозилтрансферазы из микроокружения носителя между ним и ферментом вставляют последовательность $-\text{CH}_2-\text{NH}-(\text{CH}_2)_5-\text{CO}-$. В этом случае структура иммобилизованного фермента включает носитель, вставку и фермент, соединенные между собой ковалентными связями.

Принципиально важно, чтобы в иммобилизации фермента участвовали функциональные группы, не существенные для его каталитической функции. Так, гликопротеины обычно присоединяют к носителю через углеводную, а не через белковую часть молекулы фермента.

Ковалентное связывание с носителем предусматривает взаимодействие молекул фермента с функциональными группами линейных полимеров.

Иммобилизация путем поперечных сшивок осуществляется при помощи бифункциональных реагентов. Молекулы фермента, свободно перемещающиеся в растворе, соединяются между собой с помощью определенных радикалов сшивающего реагента. В результате образуется полимерная структура, включающая активные молекулы фермента и доступная для диффузии молекул субстрата и продуктов ферментации.

Сополимеризация фермента и полимера-носителя. Предусматривает образование ковалентных связей между функциональными группами молекулы фермента и боковыми радикалами полимеризующегося трехмерно сшитого полимера. В данном случае образуется наиболее прочная связь между биообъектом и иммобилизующим агентом из всех рассмотренных методов. В то же время, наиболее высока вероятность снижения активности фермента в процессе иммобилизации. Особое значение метод поперечных сшивок имеет при проведении соиммобилизации двух и более биообъектов, например, микробных клеток и молекул ферментов.

В ряде случаев применяют комбинации описанных методов. Например, поперечную сшивку применяют для дополнительной фиксации ферментов, иммобилизованных на поверхности носителя или в структуре полимера; либо в «строящийся» полимер вносят раствор фермента, обработанный сшивающим реагентом. Также используют инкапсулирование объекта, закрепленного на носителе.

Все методы химической иммобилизации классифицируют в зависимости от природы реакционной группы носителя, вступающей во взаимодействие с молекулой фермента. Ниже представлен ряд примеров, иллюстрирующих некоторые способы химической иммобилизации ферментов.

Иммобилизация ферментов на носителях, обладающих гидроксо-группами. Наиболее распространенным методом образования ковалентной связи между ферментом и полисахаридным носителем или синтетическим диольным соединением является бромциановый метод, который был предложен Р.Аксеном, Дж. Поратом и С. Эрнбаком в 1967 г. При обработке носителя бромцианом возникают реакционноспособные цианаты и имидокарбонаты, которые при взаимодействии с нуклеофильными аминогруппами фермента образуют производные изомочевины и уретанов.

Иммобилизация ферментов на носителях, обладающих аминогруппами. Первичные аминогруппы носителя, связанные с ароматическим кольцом, предварительно превращают в соли диазония, которые затем подвергают разнообразным реакциям сочетания. В реакции сочетания вступают фенольные, имидазольные, аминные,

гуанидиновые, тиольные группы белков. Так, в щелочной среде фенольные радикалы тирозина образуют прочные азосоединения, в составе которых белок связан с носителями:

Иммобилизация на носителях, обладающих активированными производными карбоксильной группы. Наиболее часто для соединения аминокрупп белка с ацильными группировками носителя используют ангидриды, галогенангидриды, активированные эфиры и другие производные карбоновых кислот.

Реакционная способность производных карбоновых кислот в реакциях ацилирования аминокрупп фермента уменьшается от галогенангидридов до эфиров.

Иммобилизация на носителях, обладающих сульфгидрильными группами. Сульфгидрильные группы носителя и фермента легко окисляются с образованием дисульфидных связей под действием кислорода воздуха:

Иммобилизация путем химического присоединения биокатализатора к носителю отличается высокой эффективностью и прочностью связи. Несмотря на это, методы ковалентной иммобилизации ферментов все еще малодоступны для промышленного использования в связи со сложностью и дороговизной их применения. Однако они остаются незаменимыми инструментами в практике проведения научных и лабораторных исследований по созданию энзимов с контролируемыми свойствами.

Для прочной химической сшивки фермента с носителем широко используются белки различной природы. Перспективным направлением является иммобилизация на инертных полимерах, которым «привиты» активные функциональные группы (алифатические, ароматические, эфирные, альдегидные, аминоксодержащие радикалы). При иммобилизации не должна изменяться нативная конформация белка, активные центр должен быть максимально удален от места сшивки.

2. Типы иммобилизованных биокаталитических систем.

Методы иммобилизации, первоначально разрабатывавшиеся для использования ферментных систем, в настоящее время все шире используются для фиксации клеток микроорганизмов-продуцентов, клеточных органелл, комбинированных биообъектов. Рассмотрим особенности функционирования иммобилизованных биокаталитических систем.

Иммобилизованные ферменты. При иммобилизации снижается вероятность изменения нативной конформации под действием внешних факторов (температуры, pH, органических растворителей). В связи с этим повышается стабильность фермента, диапазон рабочих значений температура и pH. Даже если происходит денатурация, при определенных условиях иммобилизованный фермент ренатурирует быстрее свободного. Повышение стабильности также обуславливает увеличение устойчивости ферментных препаратов к микроорганизмам, возможность длительного хранения при температуре до -15°C .

Стабилизация фермента достигается при правильном подборе условий и метода стабилизации. В противном случае наступает дестабилизация вплоть до необратимой денатурации. Наряду со стабилизацией часто наблюдается снижение активности препарата, что обусловлено искажением структуры, ограничением доступа кофакторов и субстрата, особенно, если фермент со всех сторон «экранирован» носим гелем. В то же время, иммобилизация приводит к снижению эффектов ингибирования ферментов.

Одностадийные реакции, не требующие кофакторов, относятся к биокаталитическим процессам первого поколения. При переходе к процессам второго поколения зависящим от кофакторов (ATP, NAD, NADP, FPr), возникает проблема регенерации кофакторов. В настоящее время предложены два способа ее решения:

- сшивка кофактора с ферментом или носителем;
- увеличение массы кофактора за счет присоединения к интенсивно набухающим в водной среде полимерам, что позволяет удерживать полученные агломераты при ультрафильтрации культуральной жидкости и рециклировать кофактор в биореактор.

Иммобилизация клеток. Применение иммобилизованных клеток имеет следующие преимущества:

- не требуется проведение выделения и очистки ферментного препарата;
- клетки могут осуществлять многостадийные биокаталитические процессы, при наличии всех необходимых кофакторов.

В то же время, применение иммобилизованных клеток целесообразно, когда речь идет об «эксплуатации» внутриклеточных ферментных систем.

В промышленности часто используют инактивированные клетки, способные осуществлять одностадийные процессы; кроме того, компоненты цитоплазмы, не несущие каталитических функций, являются балластом и даже разрушают фермент или целевой продукт (протеазы).

Живые клетки, иммобилизованные различными способами, характеризуются нестабильностью и непостоянством во времени каталитических свойств. Они, как правило, не прекращают рост и размножение при иммобилизации, что приводит к уходу делящихся клеток с поверхности носителя, разрушению структуры гелей, капсул. Использование подобных биокаталитических систем наиболее целесообразно при непрерывном культивировании биомассы дрожжей, бактерий.

Иммобилизация клеток микроорганизмов, как правило, приводит к утрате ими жизнеспособности. Например, глутаровый альдегид, проникая внутрь клетки, образует многочисленные сшивки между органеллами, ферментами клетки, блокируя основные функции жизнедеятельности. В то же время происходит стабилизация нативной конформации и повышение каталитической активности. В других случаях при иммобилизации вводят агенты, ингибирующие рост микроорганизмов (антибиотики), клеток растений (фитогормоны).

При иммобилизации микробных клеток в ряде случаев параллельно проводят пермеабиллизацию - повышение проницаемости клеточных мембран, в результате чего клетки выделяют в культуральную жидкость максимальное количество целевого продукта. Иногда сама процедура иммобилизации вызывает повышение проницаемости мембраны; однако, нередко требуется дополнительное регулирование pH, обработка клеток органическими растворителями. При использовании клеток растений радикальным методом является удаление клеточной стенки с последующей иммобилизацией протопласта.

Иммобилизация клеточных органелл. Изолированные клеточные органеллы (хлоропласты, митохондрии, микросомы, лизосомы, пероксисомы и др.) содержат ферменты или полиферментные системы и свободны от других компонентов клетки. Выделение органеллы или группы органелл с технологической точки зрения проще, чем выделение и очистка ферментного препарата.

Соиммобилизация биообъектов. Соиммобилизация нескольких ферментов, видов микроорганизмов; ферментов и клеток проводят для осуществления многостадийных биохимических процессов.

При использовании нескольких ферментов проведение основной реакции может быть сопряжено с регенерацией кофактора (трансформация кетокислот в аминокислоты); соиммобилизация клеток нескольких микроорганизмов проводится для реализации многоступенчатых микробиологических трансформаций (получение L-аскорбиновой кислоты). Наиболее распространена соиммобилизация ферментов и клеток микроорганизмов. При этом используются два варианта:

- клетки имеют ту же каталитическую активность, что и фермент;
- использование системы позволяет ускорить процесс и повысить выход целевого продукта;
- клетки и фермент катализируют разные реакции поэтапной трансформации субстрата в целевой продукт.

При использовании подобных систем важным показателем является функциональная совместимость биообъектов (оптимум температуры, pH, потребность в специфических факторах и т.д.).

3. Аппаратурное оформление биотехнологических процессов с использованием иммобилизованных ферментов и клеток.

При иммобилизации биообъекты из разряда гомогенных катализаторов переходят в разряд гетерогенных, что накладывает отпечаток на аппаратное оформление ферментационных процессов; управление процессами в биореакторе:

- в нужный момент времени реакция может быть прекращена;
- биообъект должен быть многократно использован в биотехнологическом процессе при условии его регенерации;
- целевой продукт может быть получен без примеси фермента, что особенно важно для фармацевтической и пищевой промышленности.

Иммобилизованные ферментные системы функционируют в биореакторе в виде неподвижной фазы, через которую протекает среда с субстратом, подлежащим химическому превращению (гетерогенный катализ). В таких реакторах наряду с непрерывным режимом используется и периодический. Наиболее целесообразным является использование непрерывной ферментации.

Для реализации процессов биосинтеза и биотрансформации с использованием иммобилизованных биообъектов используют следующие типы оборудования.

Реакторы с механическими мешалками (одно- и многоступенчатые). Для указанных целей нашли применение реакторы, функционирующие по принципу хемостата. Если иммобилизованные биокатализаторы имеют вид гранул, то большое значение имеет их плотная упаковка в реакторе. Недостатком реакторов с механическим перемешиванием является опасность повреждения гранул или капсул. Повреждающее действие мешалки на биокатализатор устраняют, закрепляя определенным образом его гранулы. Например, в биореакторе «корзиночного» типа мешалка вращается в полном цилиндре из сетчатой структуры (корзина), в ячейках которой закреплен иммобилизованный фермент. Также используются биореакторы, в которых сетчатая вставка образует полое пространство с внутренней стенкой емкостного аппарата.

Аппараты с упакованной насадкой биокатализатора. Представляют собой аппараты колонного типа с подводом раствора субстрата в нижней части, в которых слой биокатализатора располагается по всему объему аппарата между двумя фильтрующими сетками. Недостатком таким систем является отсутствие перемешивания среды и, как следствие, затрудненная диффузия растворенных веществ и кислорода.

Аппараты с псевдооживленной насадкой. Представляют собой аппараты колонного типа, в которых гранулу иммобилизованного биообъекта зафиксированы между двумя фильтрующими сетками. Под воздействием протекающего раствора и воздуха создается псевдооживленный слой гранул биокатализатора, что обеспечивает хорошие условия аэрации и диффузии растворенных веществ.

Аппараты с биообъектами, иммобилизованными путем включения в полупроницаемые мембраны. В данном случае конструкция аппарата определяется типом используемых мембран и способом их компоновки в мембранном модуле. По аналогии с процессами мембранной фильтрации используют аппараты типа фильтр-пресс, реакторы с полыми волокнами, трубчатые, рулонные.

4. Применение процессов биотрансформации и иммобилизованных биообъектов в пищевой биотехнологии.

Сочетание уникальных каталитических свойств энзимов с преимуществами иммобилизованных ферментов как гетерогенных катализаторов позволило создать новые промышленные технологические процессы. Следует отметить, что все они относятся к производству пищевых продуктов и лекарственных препаратов.

Основными направлениями использования иммобилизованных биообъектов в пищевой биотехнологии являются:

1. Гидролиз олиго- и полисахаридов (производство глюкозо-фруктозных сиропов, патоки, глюкозы, глюкозо-галактозных сиропов и низколактозных молочных продуктов).
2. Синтез непереваримых олигосахаридов-пребиотиков (лактосахароза, галкто- и фруктоолигосахариды).
3. Получение оптически активных L-аминокислот (выделение из рацемических смесей, синтез L-аспарагиновой кислоты из фумарата аммония, синтез L-аланина из L-аспарагиновой кислоты).
4. Производство интенсивных подсластителей на основе реакций поликонденсации аминокислот с образованием сладких дипептидов (аспартам).
5. Синтез пищевых кислот (биотрансформация фумаровой кислоты в L-яблочную кислоту).

Практическое занятие 2.

ПОЛУЧЕНИЕ НУТРИЕНТОВ МЕТОДАМИ БИОТЕХНОЛОГИИ

- 1. Направления получения пищевого белка методами биотехнологии.**
- 2. Особенности технологии белково-витаминных и белково-липидных концентратов на основе биомассы дрожжей.**
- 3. Биотехнологические процессы получения пищевых кислот (лимонной, уксусной, молочной).**

1. Направления получения пищевого белка методами биотехнологии.

В настоящее время в мире существует дефицит пищевого белка. При суточной норме потребления 70 г/сутки среднее потребление составляет 60 г/сутки. По данным РАМН в России начиная с 1992 года потребление белков животного происхождения снизилось на 25-35 % и составляет около 49 % от общего рациона белковой пищи при рекомендуемом соотношении животных и растительных белков 55 : 45. Общий дефицит пищевого белка на планете по данным ФАО/ВОЗ оценивается в 15-20 млн. тонн в год.

Пути решения проблемы белкового дефицита:

- повышение хранимоспособности сырья и пищевых продуктов, в первую очередь, животного происхождения;
- повышение производительности в животноводстве и растениеводстве методами селекции, генетической и клеточной инженерии;
- корректировка аминокислотного состава пищевого сырья и продуктов питания;
- вовлечение в производство продуктов питания белка микроорганизмов, микро- и макромицетов, гидробионтов, получаемого методами биотехнологии.

Одним из перспективных путей получения белковых веществ является микробный синтез - это реальное решение проблемы снятия дефицита белка в пище и кормах. Сырье, которое непосредственно не может идти на изготовление пищевых продуктов, с помощью микроорганизмов превращается в богатую белками биомассу. В этом случае необходимый азот в форме дешевых неорганических соединений (мочевина, солей аммония, нитратов) может почти без потерь использоваться для построения белков. Микроорганизмы способны накапливать до 60 - 70 % белка от АСБ.

Существуют три основных направления использования белка одноклеточных для пищевых целей:

1. цельная биомасса микроорганизмов;
2. частично очищенная от балластных веществ (облагороженная) биомасса;
3. изолированные из биомассы очищенные белки.

К микробным белкам, предназначенным для пищевых целей, предъявляются следующие требования:

- безопасность по санитарно-гигиеническим и токсикологическим показателям;
- высокая пищевая и биологическая ценность;
- соответствие органолептических показателей аналогам растительного и животного происхождения;
- низкая себестоимость.

В настоящее время можно выделить четыре основных направления получения пищевого белка биотехнологическими методами:

1. получение биомассы дрожжей с высоким (не менее 50 % от АСБ) содержанием белка;
2. направленный синтез белков микромицетами;
3. выращивание макромицетов в условиях биореактора;
4. искусственное культивирование водорослей и других гидробионтов, богатых белком.

Применение цельной необлагороженной биомассы микроорганизмов как пищевого продукта вызывает наибольшие возражения, связанные с медико-биологическими аспектами. В настоящее время Министерством здравоохранения РФ разрешено использование в пищевых целях лишь биомассы высших базидиальных грибов. В США Управлением по контролю за пищевыми продуктами было дано разрешение на применение цельноклеточной биомассы дрожжей, выращенных на этаноле в стерильных условиях. В России и за рубежом проводятся исследования по получению и применению в пищевых целях облагороженной биомассы микроорганизмов. В этом отношении наиболее исследованным микробиологическим объектом являются дрожжи.

Дрожжи содержат 40 - 55 % белка и усваиваются организмом человека на 85 - 88 %, занимая по этому показателю промежуточное положение между белками растительного и животного происхождения. Белок дрожжей обычно беден метионином и цистеином, но богат лизином и треонином. Отсюда очевидна целесообразность его переработки вместе с белками зерновых культур.

В Великобритании, Франции, США, Нидерландах получают белковые экстракты из дрожжей в виде паст или порошкообразных продуктов. Дрожжевые экстракты содержат от 30 до 55 % белка и используются при производстве консервов, пищевых концентратов первых и вторых блюд, хлебобулочных, кондитерских и колбасных изделий, плавленых сыров. Добавление дрожжевых паст и порошков обычно не превышает 1,5 - 10 % массы пищевого продукта. В нашей стране были также разработаны технологии белковых пищевых добавок на основе хлебопекарных и пивных осадочных дрожжей, ферментативных гидролизатов и белковых изолятов из дрожжевой и бактериальной биомасс, выращенных на пищевых и непищевых питательных средах (меласса, этанол, метанол, природный газ, n-парафины).

На основе исследований, проводившихся во ВНИИСинтезбелок, была разработана технология высокомолекулярных белковых изолятов из дрожжей и бактерий. Технологическая схема включает следующие основные этапы: дезинтеграция клеток микроорганизмов в водной суспензии на установке, основанной на принципе декомпрессии, щелочная экстракция клеточных белков, нейтрализация, отделение остатков клеточных структур от белкового экстракта, очистка и сгущение последнего на ультрафильтрационных установках и обезвоживание. Белковые изоляты из микроорганизмов содержат около 80 % белка, 2 - 3 % нуклеиновых кислот и имеют молекулярную массу в диапазоне от 50000 до 300000 Д.

Теоретической предпосылкой использования микроскопических грибов в пищевой биотехнологии является способность многих видов к окнверси углеводов и других углеродных субстратов в вещества белковой природы. В качестве продуцентов пищевого белка могут быть использованы грибы родов *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Mucor*.

Ценным источником пищевого белка являются съедобные шляпочные грибы. Производство спорофоров и мицелия базируется на совершенно различных технологиях.

Шляпочные грибы выращивают в питомниках, а производство мицелия является промышленным процессом ферментации. При выращивании шляпочных грибов мицелий является отходом, тогда как в процессе промышленного производства нитчатых грибов методом ферментации подбираются такие условия, при которых спорообразование не происходит.

Выращивание шляпочных грибов в промышленных условиях связано с определенными трудностями и существенными затратами. Эти грибы используют непосредственно как пищевой продукт или как вкусовую приправу к различным блюдам. В последнем случае приемлемо использование мицелиальных форм грибов. Мицелиальные массы в промышленных условиях начали получать в 40 - 50-х годах XX столетия. В настоящее время во многих странах производят в промышленных условиях съедобные грибы.

Для выращивания грибов используются практически любые отходы, особенно при поверхностном способе ферментации. На основе соломы, початков, кочерыжек, стеблей кукурузы, опилок с добавлением органических удобрений готовят твердые питательные среды, которые засевают мицелием гриба. После снятия урожая грибов остатки компоста, обогащенные мицелиальной массой, используют в кормопроизводстве. Приемлемым субстратом для биотехнологического процесса культивирования базидиальных съедобных грибов, удовлетворяющим требованиям безопасности и качества, предъявляемым к питательным средам для культивирования с целью получения пищевого продукта, является молочная сыворотка.

Важным источником пищевого белка являются зеленые (*Chlorella vulgaris*) и сине-зеленые (*Spirulina platensis*, *Synechococcus elongatus*, *Coccoloba*) водоросли. Потенциально могут также использоваться водородные бактерии (*Hydrogenomonas eutropha Z-1*). Эти микроорганизмы характеризуются высоким содержанием белка по сумме аминокислот (45 - 60 % - водоросли, 65 - 70 % - водородные бактерии).

По содержанию аминокислот белки водородных бактерий превосходят данные стандартной шкалы ФАО по всем аминокислотам, кроме цистеина и триптофана. Белки хлореллы содержат меньше изолейцина. Все водоросли дефицитны по серосодержащим аминокислотам и триптофану. Отношение суммы незаменимых аминокислот к общему азоту в продукте близко по величине для водорослей и водородных бактерий, но ниже, чем для стандартных продуктов (коровье молоко, гусиные яйца). Интересна также возможность получения из водорослей одновременно с белком кислых полисахаридов - важного компонента искусственных продуктов питания.

Установлено, что при полном обеспечении кислородом за счет фотосинтезирующей деятельности водорослей суточный прирост их составляет 500 - 600 г, в том числе 250 - 300 г белка. Белок водорослей достаточно полноценен, а биомасса одноклеточных водорослей содержит большое количество витаминов и минеральных веществ. В РФ разработана аппаратура и технология для непрерывного культивирования спирулины и хлореллы с целью получения белково-углеводного комплекса кормового и пищевой категории качества.

Одной из причин, сдерживающих развитие промышленного производства микроводорослей, является отсутствие эффективной технологии и аппаратуры, обеспечивающих получение продукции, по себестоимости сопоставимой с традиционными растительными продуктами. Большая часть крупных установок

рассчитана на использование открытых бассейнов, однако относительно низкие капитальные затраты на их возведение не обеспечивают низкой себестоимости продукции.

В основу крупномасштабного микробного фотосинтеза НПО "Биотехника" было предложено использование аппаратов закрытого типа - фотореакторов. Исследование различных типов аппаратов показало перспективность для промышленного использования фотореакторов с трубчатой формой лучеприемника, обеспечивающей максимальную фотоэнергоёмкость. Фотореактор включает также теплообменник, газообменное устройство для насыщения суспензии клеток диоксидом углерода и десорбции образующегося кислорода, побудитель расхода суспензии, а также специальное устройство, которое обеспечивает ежедневную очистку внутренних поверхностей без применения ручного труда и остановки аппарата.

Производство микроводорослей объединяют с линией комплексной безотходной переработки биомассы. В результате такой переработки получают ряд продуктов (в том числе ценных биологически активных веществ), производство которых обеспечивает экономическую рентабельность производства, а также дешевых полноценных кормовых продуктов. Так, например, при переработке биомассы хлореллы могут быть последовательно получены следующие продукты (в % к массе исходного сырья): липидный концентрат 8 - 13, белковый гидролизат 22 - 35, деструктат клеток (шрот) до 60.

Полученный белковый гидролизат содержит (в % СВ): свободные аминокислоты - 60, нуклеотиды - 6,85, остаточный белок - 4,12, углеводы (сумма) - 21,12. В составе гидролизата обнаружено значительное количество водорастворимых витаминов, главным образом группы В. Им могут быть заменены белковые основы, изготавливаемые в настоящее время из пищевого белкового сырья (мяса, рыбы, казеина).

Аналогичным образом осуществляется комплексная переработка биомассы некоторых других микроводорослей. Перспективным сырьем для получения серии ценных продуктов, в том числе биологически активных веществ, является биомасса спирулины, в которой содержится 60 - 68 % протеина. В зависимости от условий культивирования в биомассе спирулины обнаруживаются (в мг/100 г): β -каротин 300 - 600, рибофлавин 4 - 6,6, кобаламин 0,1 - 0,18. Клетки спирулины лишены прочной оболочки, что существенно упрощает технологию переработки биомассы.

Таким образом, получение пищевых белковых веществ из биомассы микроорганизмов является не только принципиально возможным, но и широко используется во многих странах. Однако белковые вещества микробиологического происхождения, за исключением высших базидиальных грибов, могут быть использованы в питании населения преимущественно в виде концентратов и изолятов.

Пищевые белки производят в виде трех основных типов продуктов, которые различаются по содержанию белка (около 50, 70 - 75, 90 % и выше) и его фракционному составу. К первому типу продуктов с содержанием около 50 % белка относят дезинтеграт биомассы дрожжей. Ко второму типу продуктов - концентраты из биомассы микроорганизмов с содержанием белка 70 - 75 %. Изоляты, содержащие 90 % белка, - наиболее дорогой и безопасный тип белковых продуктов на основе микробной биомассы.

2. Особенности технологии белково-витаминных и белково-липидных концентратов на основе биомассы дрожжей.

Перспективным направлением получения белково-витаминных концентратов пищевого назначения является биотехнологическая переработка молочной сыворотки. Белково-витаминные концентраты могут выпускаться в жидком, сгущенном и сухом видах.

Сухой кормовой продукт "Провилакт". Технология продукта разработана сотрудниками Института микробиологии АН Беларуси. Она включает следующие технологические операции: приемка сырья и оценка его качества; подготовка сырья к ферментации, ферментация сыворотки; составление смеси и сгущение; гомогенизация смеси; сушка смеси; фасовка и упаковка готового продукта.

Молочную сыворотку, очищенную от казеиновой пыли и жира, пастеризуют при температуре 70-74 °С с выдержкой 15-20 с, охлаждают до 8 °С. Сыворотку перед ферментацией сгущают на вакуум-выпарной установке до концентрации сухих веществ 14-16 %, пастеризуют при температуре 90 °С с выдержкой 3-5 мин, охлаждают до 24-28 °С и направляют в ферментер, вносят минеральные соли в виде растворов 20 %-ной концентрации из расчета на 1000 кг сыворотки (в кг): сульфат аммония – 5,0; мочевины – 8,0; диаммонийфосфат – 3,0; хлорид калия – 1,0. Минеральные соли в среду вносят в два приема равными долями: перед ферментацией и через 6 дрожжевания.

В качестве продуцента при ферментации используют дрожжи *T. candida* ФКО. Посевной материал готовят из пастеризованной молочной сыворотки в несколько этапов. Коллекционная культура на сушловом агаре → Рабочая культура дрожжей на сушловом агаре → Глубинная культура дрожжей на стерильной молочной сыворотке (колбы на качалке) → Засевные дрожжи на стерильной сыворотке (инокулятор) → Посевной материал на пастеризованной молочной сыворотке (маточный ферментер).

Дрожжи из маточного ферментера в количестве 20-30 % общего объема среды вносят в рабочий ферментер, который заполняют на 50 % вместимости. Температуру среды в процессе ферментации поддерживают в пределах 24-28 °С, рН 4,5-5,5 устанавливают в начале ферментации и в дальнейшем не регулируют.

Процесс ферментации заканчивают при снижении лактозы в растворе до 0,5 %. К этому времени концентрация сырой биомассы дрожжей достигает 160-240 г/л. После окончания ферментации сыворотку пастеризуют при температуре 80-85 °С с выдержкой 15-20 с и охлаждают до 8 °С. Из ферментированной и натуральной сыворотки составляют смесь согласно рецептуре, смесь тщательно перемешивают и сгущают на вакуум-выпарных установках до концентрации сухих веществ 28 %. Сгущенную смесь нагревают (при необходимости) до температуры 60 °С и гомогенизируют при давлении 15 МПа. Такая обработка способствует разрушению дрожжевых клеток и улучшает растворимость сухого продукта

Сушат гомогенизированную смесь на распылительных сушилках при температуре воздуха, поступающего в башню, 170-185 °С, температура уходящего воздуха – 80-90 °С. Готовый продукт фасуют в многослойные бумажные мешки с мешками-вкладышами из полиэтилена и герметично упаковывают.

Микробный синтез жира на молочной сыворотке активно исследуют ученые всего мира. В качестве продуцента этого продукта могут быть использованы различные виды микроорганизмов. Некоторые штаммы *Oidium lactis* в условиях поверхностного

культивирования синтезировали 12,5-14,3 г жира на 100 г лактозы сыворотки; микроскопические грибы *Aspergillus ustus* на молочной сыворотке с добавлением к среде нитрата аммония при глубинном культивировании использовали 96 % лактозы и накапливали 17 г/л биомассы, содержащей 13 % белка и 28 % жира. Дрожжи *S. curvata* на подсырной сыворотке и её ультрафильтрате накапливали до 15,6 г/л липидов (15-27 г липидов на 100 г лактозы). По расчетам американских исследователей при переработке пермеата в количестве 200-230 т/сут с помощью этих дрожжей можно получать ежедневно 3,4 т липидов, 0,55 т протеина и 2,85 т клеточного материала в виде углеводов.

Перспективным продуцентом жира считают дрожжи *Candida himicola*. Дрожжи этого вида хорошо развиваются на очищенной от белков подсырной или творожной сыворотке без внесения дополнительных минеральных источников питания. Они способны накапливать до 27 г/л и более абсолютно сухой биомассы, содержащей до 36...40 % липидов. Жир дрожжей *C. himicola* содержит: 81,8 % триглицеридов, 2,7 % моно- и диглицеридов, 2,3 % фосфолипидов, 7,7 % свободных жирных кислот, 1,7 % стерина, 1,6 % эфиров стерина и воска и 2,1 % - неидентифицированная фракция. Это позволяет считать его как триглицериды с примесью других фракций. Исследованием жирнокислотного состава такого жира установлено, что на долю пальметиновой кислоты приходится 28,9 %, стеариновой – 13,7 %, олеиновой – 57-62 % и линолевой – 3,0-7,0 %. Кроме этих кислот в жире обнаружены: миристиновая, пальмитолеиновая, линоленовая. Состав синтезируемых липидов существенно изменяется под действием температуры, аэрации и активной кислотности (рН). Изменением этих факторы можно регулировать жирнокислотный состав липидов.

Предварительные расчеты показывают, что при переработке 1 т молочной сыворотки с использованием дрожжей *C. himicola* можно получить до 18 кг дрожжевого жира или при использовании сыворотки вместе с дрожжами до 45-48 кг сухого жиробелкового продукта. Использовать его можно в качестве кормовой добавки в рационах животных и птицы. Получены положительные результаты при использовании его в составе заменителей цельного молока.

3. Биотехнологические процессы получения пищевых кислот (лимонной, уксусной, молочной).

Производство органических кислот из молочной сыворотки.

Органические кислоты можно получать как на основе брожения лактозы, так и на основе окисления лактозы в молочной сыворотке.

Молочная кислота может иметь оптические формы: D (-); L (+) или DL (-+). Форма образуемой кислоты характерна для различных видов микроорганизмов и служит одним из признаков при их идентификации. Так, молочнокислые палочки *L. bulgaricus*, *L. lactis* при брожении лактозы образуют D (-) молочную кислоту; *L. casei* var *casei* – L (+), а *L. plantarum*, *L. helveticus*, *L. acidophilus*, *L. jogurt* – DL (-+) форму.

Для промышленного производства молочной кислоты в качестве продуцента используют *L. bulgaricus* и *L. acidophilus*. Эти микроорганизмы могут превращать более 90 % лактозы в молочную кислоту. Кроме того *L. bulgaricus* может развиваться при сравнительно высокой температуре 45-50 °С, когда затруднено развитие посторонней микрофлоры.

Процесс получения молочной кислоты из молочной сыворотки состоит из следующих операций: приемка и оценка качества сырья; подготовка посевного материала микроорганизма-продуцента; подготовка питательной среды для брожения; проведение брожения; обработка сброженного сусла; получение чистой молочной кислоты из лактата кальция.

Сырьем для производства молочной кислоты служит молочная сыворотка всех видов. Посевной материал или закваску готовят на пастеризованной молочной сыворотке в несколько этапов. Вначале стерилизованное обезжиренное молоко в колбе засевают чистой культурой микроорганизма-продуцента. Сквашивание длится 24 ч при температуре 40-43 °С. приготовленную культуру используют для засева большей порции пастеризованного обезжиренного молока. Режимы выращивания культуры те же. Вновь полученная культура используется для засева пастеризованной молочной сыворотки (маточник), которая и служит посевным материалом и вносится в производственный ферментер в количестве 10 % от объема производственной питательной среды. Температура культивирования 40-43 °С, продолжительность – 24 ч.

Молочную сыворотку, очищенную от казеиновой пыли и жира, пастеризуют при температуре 70-75 °С с выдержкой в течение 60 мин, нейтрализуют молочную кислоту (если сыворотка кислая) и охлаждают до 45 °С. В подготовленную питательную среду (затор) добавляют мел в количестве 2 % к массе лактозы, содержащейся в питательной среде. В подготовленную смесь вносится посевной материал из расчета 5-10 %. Количество посевного материала зависит от активности штаммов и запрограммированной продолжительности брожения. Процесс брожения проводят в ферментерах, имеющих паровую рубашку и мешалку. Температуру брожения поддерживают в пределах 40-43 °С. Через каждые 6 ч к бродящему суслу добавляют болтушку из гашеной извести для связывания излишней молочной кислоты. Свободная молочная кислота не должна превышать 0,6 % (65-70 °Т). Нейтрализация позволяет сократить продолжительность брожения и увеличивает выход молочной кислоты. В конце брожения содержание молочной кислоты не должно превышать 0,1 % (10-12 °Т). При проведении нейтрализации необходимо учитывать, что для проведения нейтрализации каждых 18 частей молочной кислоты требуется 10 частей химически чистого мела. Используют для этих целей обычно технический мел, который содержит 60-65 % карбоната кальция, что необходимо учитывать при расчетах. Для расчета количества молочной кислоты считают, что каждый 1 °Т эквивалентен 0,009 % молочной кислоты. При проведении нейтрализации среда тщательно перемешивается.

После окончания процесса брожения среда, содержащая лактат кальция, нагревается до температуры 95-97 °С для денатурации сывороточных белков и микробных клеток. Денатурированные белковые соединения отделяют, а прозрачную жидкость пропускают через фильтр-пресс. Фильтрат собирают в специальную емкость, добавляют известь, доводя щелочность до 0,1 %. В эту же емкость добавляют активированный уголь, смесь тщательно перемешивается и отстаивается. Надосадочную жидкость снова пропускают через фильтр-пресс и прозрачный раствор собирают в резервуар. В этот же резервуар к жидкости добавляют молочную кислоту с таким расчетом, чтобы содержание свободной молочной кислоты в растворе составляло 0,05 % (6 °Т). После этого к раствору добавляют активированный уголь и диатомит или перлит для улучшения процесса фильтрации. Смесь перемешивают и дают отстояться. Прозрачную жидкость сливают и

фильтруют, а осадок используют для очистки свежей порции лактата кальция. Полученный очищенный раствор лактата кальция направляют на вакуум-выпарную установку для концентрации и последующей кристаллизации. Начальная концентрация лактата должна составлять 14,5-15,5 %. Процесс кристаллизации длится в течение 10-12 ч при температуре 10-15 °С. Кристаллы лактата отделяют центрифугированием и промывают. Фугат и промывные воды от кристаллов смешивают с лактатом кальция, поступающем на вакуум-выпарную установку.

Тщательно промытые и высушенные кристаллы лактата кальция используют в медицине, отмытые, но невысушенные кристаллы лактата кальция направляют для получения молочной кислоты.

Выпускаемая молочная кислота подразделяется на 4 сорта: химически чистая, фармакопейная, пищевая и техническая. Для каждого вида кислоты нормируются: степень очистки и концентрация. Достигается это различной технологией получения кислоты. Химически чистая кислота выпускается 90 %-ной концентрации плотностью 1240 кг/м³. Применяют такую кислоту в чистом виде, в виде солей или эфиров. Фармакопейная кислота выпускается 72 %-ной концентрации. Используют её в медицине в чистом виде, в виде солей кальция, железа, магния. Пищевая кислота выпускается 68 %-ной концентрации или более слабая. Такая кислота не должна содержать ядовитых примесей, солей тяжелых металлов, пропионовой и масляной кислот. Техническая кислота выпускается 42-50 %-ной концентрации. Используют её только для технических целей.

Для производства технической молочной кислоты используют неочищенный раствор лактата кальция. После осаждения белковых соединений и фильтрации раствор лактата концентрируют и направляют в глазурированную емкость. К раствору добавляют активированный уголь и реактивы для осаждения железа и тяжелых металлов. Смесь подкисляют чистой серной кислотой до слегка кислой реакции, фильтруют через вакуум-фильтр из пористого фарфора, осадок на фильтре промывают и выбрасывают. Фильтрат и промывную воду соединяют вместе и получают неочищенный раствор молочной кислоты 20-22 %-ной концентрации. Раствор подвергается дальнейшей очистке и концентрации до 42-50 %.

Исходным сырьем для других сортов молочной кислоты служит отмытые кристаллы лактата кальция. Для разложения 1 массовой части лактата кальция расходуется 0,449 массовой части моногидрата серной кислоты. Процесс разложения лактата кальция ведут при температуре не выше 40-45 °С. в противном случае может произойти обугливание молочной кислоты.

Пропионовая и уксусная кислоты образуются при сбраживании углеводов пропионокислыми бактериями. Пропионовую кислоту и её производные применяют в различных отраслях народного хозяйства: пропионат кальция – для предохранения хлеба от плесневения и картофельной болезни (фунгицидные свойства); эфиры пропионовой кислоты – в парфюмерии; амилпропионат – высококипящий растворитель нитроцеллюлозы; фенилпропионат – пластификатор для ацетата и целлюлозы. Для производства пропионовой кислоты используют все виды молочной сыворотки. Сыворотку не очищают от сывороточных белков, т.к. пропионовокислые бактерии активно сбраживают белки. Технологический процесс производства кислоты осуществляют в следующей последовательности: подготовка молочной сыворотки к переработке; подготовка чистой культуры пропионовокислых бактерий; заквашивание и

сбраживание молочной сыворотки; сгущение сброженной сыворотки; выделение пропионовой кислоты.

Молочную сыворотку пастеризуют, охлаждают до температуры 30 °С (температура заквашивания), вносят 5 % карбоната кальция и 1 % сухих дрожжей или 10 % дрожжевого автолизата. Чистую культуру пропионовокислых бактерий готовят на водной среде, содержащей 5 % лактата кальция, 1 % пептона, 5 % карбоната кальция. Активная кислотность среды (рН) – 7,0, температура культивирования – 30 °С.

В подготовленную сыворотку вносят 5-10 % чистой культуры пропионовокислых бактерий. Одновременно с внесением пропионовокислых бактерий вносится 2 об% культуры *Lactobacillus casei*, выращенных на обезжиренном молоке. Это активизирует протекание пропионовокислого брожения. Возможно это связано с более легким усвоением молочной кислоты и её солей, чем непосредственно лактозы, специфическим действием продуктов метаболизма молочнокислых бактерий. Брожение проводят при температуре 30 °С и рН среды 7,0. Процесс брожения протекает в течение двух недель. На протяжении всего периода брожения поддерживают первоначальное значение рН и температуры. При смешанном брожении пропионовокислых и молочнокислых бактерий их 1 т сыворотки можно получить 24 кг пропионовой и около 10 кг уксусной кислот. За этот период общий выход кислот составляет 85 об% от сахара среды. Сброженную сыворотку сгущают, подкисляют серной кислотой и отгоняют летучие кислоты с водяным паром. Смесь уксусной и пропионовой кислот в дальнейшем разделяют перегонкой.

Органические кислоты можно получать и на основе аэробной ферментации лактозы. Наиболее важное значение среди таких кислот имеет лимонная.

Лимонная кислота вырабатывается на основе окисления лактозы. Получать лимонную кислоту можно двумя способами: поверхностным и глубинным. Технологический процесс производства лимонной кислоты включает следующие операции: приемка сырья, оценка его качества, сортировка; подготовка сыворотки к ферментации; ферментация сыворотки и получение сброженного раствора; обработка сброженного раствора и получение лимонной кислоты.

В качестве сырья используют подсырную сыворотку с рН 4,0-5,0. отобранную сыворотку стерилизуют при давлении 0,106-0,108 МПа в течение 30 мин, охлаждают до температуры 25-28 °С, устанавливают рН 4,5 и инокулируют суспензией спор гриба *A.niger*. Качество посевного материала определяют по количеству спор в 1 мл. Их должно быть не менее $3 \cdot 10^6$ спор/мл. Количество посевного материала должно быть 5-10 %-. Процесс ферментации ведут при температуре 25-28 °С в течение 6 суток. Конец процесса определяют по количеству оставшейся лактозы (0,5 %). По окончании процесса ферментации удаляют мицелий гриба фильтрацией или центрифугированием и направляют на кормопроизводство. Сброженный раствор (субстрат) направляют на обработку. Для этого готовят известковое молоко (40 %-й раствор), вносят его в субстрат из расчета 43,5 л на 1 т, смесь перемешивают, выдерживают два часа для завершения реакции и выделяют кальциевую соль лимонной кислоты фильтрацией или центрифугированием. Фильтрат идет на переработку (кормопроизводство), цитрат кальция на получение водного раствора лимонной кислоты. Разложение цитрата кальция проводят серной кислотой 20 %-ной концентрации. Количество серной кислоты берут из расчета 75 л/т. Раствор перемешивают и выдерживают 1,5 ч для завершения реакции. После чего осадок удаляют фильтрацией или центрифугированием, а водный раствор

лимонной кислоты упаривают до нужной концентрации. Выход лимонной кислоты составляет 19,8 кг из 1 т сыворотки.

Глубинный способ получения лимонной кислоты считается более эффективным. Технологический процесс производства этим способом включает следующие операции: подготовка молочной сыворотки к ферментации; инокуляция среды суспензией спор гриба-продуцента и ферментация; обработка сброженной сыворотки и получение водного раствора лимонной кислоты; концентрация водного раствора кислоты; кристаллизация лимонной кислоты; отделение и сушка кристаллов лимонной кислоты.

Для выработки лимонной кислоты этим способом пригодны все виды молочной сыворотки. Сыворотку очищают от сывороточных белков тепловым методом, денатурированные белки отделяют, а безбелковую фракцию раскисляют до pH 6,25-6,50 и повторно фильтруют или центрифугируют для отделения дополнительно денатурированных белковых соединений. После этого очищенную сыворотку сгущают на вакуум-выпарном аппарате в 2-4 раза, сгущенную сыворотку подкисляют до pH 4,5 серной или соляной кислотой и направляют на стерилизацию. Стерилизуют подготовленную сгущенную сыворотку при давлении 0,106-0,108 МПа в течение 30 мин и охлаждают до 35-39 °С. На этом этапе подготовки молочной сыворотки к ферментации считают законченным.

Засев подготовленной сгущенной сыворотки спорами гриба аналогичен поверхностному способу. Количество посевного материала колеблется в пределах 5-10 %. Процесс ферментации протекает при температуре 32-35 °С в течение 2,5-3,5 суток. В процессе ферментации в среду вносят минеральные соли и обильное количество стерильного воздуха. Конец ферментации определяют по количеству оставшейся лактозы (0,5 %). По окончании ферментации мицелий гриба отделяют фильтрацией и направляют на кормопроизводство, а сброженный раствор на дальнейшую переработку. Лимонную кислоту с помощью известкового молока переводят в соль – цитрат кальция. Лимонную кислоту в виде соли отделяют центрифугированием или фильтрацией, а фильтрат используют в кормопроизводстве. Цитрат кальция разлагают серной кислотой 96 %-й концентрации. Осадок сернокислого кальция удаляют центрифугированием или фильтрацией, а водный раствор лимонной кислоты направляют на упаривание. Для получения пересыщенного раствора лимонной кислоты используют вакуум-выпарные аппараты. Температуру сгущения поддерживают в пределах 65-70 °С, а концентрация пересыщенного раствора составляет 71-72 %. Кристаллизацию лимонной кислоты из пересыщенного раствора осуществляют в несколько этапов, изменяя скорость охлаждения раствора:

Температурный интервал, °С	Скорость охлаждения, °С в час
70 → 37	20,0
37 → 27	10,0
27 → 22	5,0
22 → 08	3,0

В конце кристаллизации раствор выдерживают в течение 30 мин для созревания кристаллов. Выкристаллизовавшуюся молочную кислоту отделяют от маточного раствора центрифугированием. Влажные кристаллы с массовой долей влаги 2-3 % направляют на сушку. Сушат продукт на барабанных сушилках из кислотоустойчивой стали. Температура воздуха на входе в сушилку не должна превышать 70 °С, а на выходе – 35 °С.

Маточные растворы, после отделения из них кристаллов, не смешивают между собой и основным раствором лимонной кислоты, чтобы не снизить качество готового продукта. Первый маточный раствор сгущают и кристаллизуют, получая второй маточный раствор (может быть и третий). Для повышения качества лимонной кислоты вторичные маточные растворы обрабатывают активированным углем (1...2 %) при температуре 70 °С в течение 30 мин.

В зависимости от химических показателей лимонная кислота подразделяется на сорта: экстра, высший и первый.

Практическое занятие 3.

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ ПОЛУЧЕНИЯ ПИЩЕВЫХ ДОБАВОК

- 1. Классификация пищевых добавок и БАД к пище. Гигиеническая регламентация применения пищевых добавок.**
- 2. Получение пищевых красителей биотехнологическими методами на примере препаратов β -каротина.**
- 3. Биотехнологические процессы получения интенсивных подсластителей и сахарозаменителей, усилителей вкуса.**
- 4. Биотехнология получения консервантов на примере низина и пропионовой кислоты.**

1. Классификация пищевых добавок и БАД к пище. Гигиеническая регламентация применения пищевых добавок.

В мире вопросами применения пищевых добавок занимается специализированная международная организации - Объединенный комитет экспертов ФАО/ВОЗ по пищевым добавкам JECFA, который является совещательным органом Комиссии по CODEX ALIMENTARIUS. Комиссия по CODEX ALIMENTARIUS - межправительственный орган, включающий более 120 государств-членов. В рамках Европейского Сообщества действует аналогичная комиссия, а в России решение вопроса о применении пищевой добавки является прерогативой Министерства здравоохранения и Государственного комитета санитарно-эпидемиологического надзора.

Министерством здравоохранения РФ совместно с ИП РАМН, Московской медицинской академией им И.М. Сеченова и другими научными центрами Минздрава РФ разработаны понятия и требования к пищевым и биологически активным добавкам (БАД) к пище.

Список пищевых добавок (ПД), разрешенных к применению в пищевой промышленности РФ, представленный в дополнениях к «Медико-биологическим требованиям и санитарным нормам качества продовольственного сырья и пищевых продуктов» (Москва, 1994 г.) включает:

1. ПД, снижающие калорийность пищи: пищевые волокна, микрокристаллическая целлюлоза, пектиновые вещества и т.п.;
2. ПД, улучшающие внешний вид, вкус, запах, цвет: ароматизаторы, подслащивающие вещества, отбеливающие вещества, красители и т.п.;
3. ПД, улучшающие консистенцию пищи: загустители, поверхностно-активные вещества, стабилизаторы и т.п.;
4. ПД, удлиняющие сроки хранения пищи: консерванты, антиокислители;
5. Радиопротекторы и энтеросорбенты экологически вредных веществ: пектиновые вещества, хитин и хитозан, лигнин, полисорб и т.п.;
6. ПД, повышающие питательную ценность пищи: концентраты и изоляты белка, аминокислоты, витамины, микроэлементы и другие;
7. Лечебно-профилактические добавки.

Первые четыре группы ПД используются в технологических целях, а составные части этих ПД не обладают биологической активностью. Пищевые добавки, объединенные в 6 и 7 группы, могут быть отнесены к БАД. Так, ПД, отнесенные к 6-й

группе, являются нутрицевтиками, а лечебно-профилактические добавки, согласно последней классификации, разделяются на пробиотики и парафармацевтики. Промежуточное положение между ПД и БАД занимают радиопротекторы и энтеросорбенты, объединенные в 5-ю группу.

Биологически активные добавки к пище - композиции натуральных или идентичных натуральным биологически активных веществ, предназначенных для непосредственного приема с пищей или введения в состав пищевых продуктов с целью обогащения рациона отдельными пищевыми или биологически активными веществами и их комплексами.

Таким образом, к числу БАД к пище (Food supplements) относятся природные, идентичные природным или синтетические вещества, характеризующиеся наличием либо пищевой ценности (нутрицевтики), либо обладающие выраженной биологической активностью (парафармацевтики), а также БАВ, обеспечивающие поддержание нормального состава и функциональной активности микрофлоры (эубиотики).

Нутрицевтики - БАД к пище, применяемые для коррекции химического Состава пищи (дополнительные источники нутриентов: белка, аминокислот, ВОФОВ, углеводов, витаминов, минеральных веществ, пищевых волокон).

Эубиотики - БАД к пище, в состав которых входят живые микроорганизмы и (или) их метаболиты, оказывающие нормализующее действие на состав и биологическую активность микрофлоры пищеварительного тракта. Пробиотики - синоним понятия эубиотики.

Парафармацевтики - БАД к пище, применяемые для профилактики, вспомогательной терапии и поддержания в физиологических границах функциональной активности органов и систем.

Федеральным Законом РФ № 29 «О качестве и безопасности пищевых продуктов» от 02.01.2000 г. БАД к пище отнесены к пищевым продуктам и определяются как «...природные (идентичные природным) биологически активные вещества, предназначенные для употребления одновременно с пищей или введения в состав пищевых продуктов».

2. Получение пищевых красителей биотехнологическими методами на примере препаратов β -каротина.

Из целевых продуктов биотехнологии, выпускаемых в условиях крупнотоннажного производства, в качестве натуральных пищевых красителей используются препараты рибофлавина (E 101 – рибофлавин и натриевая соль рибофлавин-5-фосфата) и β -каротин (E 160a). Препараты рибофлавина в составе комбинированных продуктов питания в большинстве случаев рассматривают как БАД-нутрицевтики. Рассмотрим биотехнологию получения препаратов β -каротина.

Технология получения препаратов β -каротина. Наиболее активным продуцентом β -каротина является гриб *Blakeslea trispora*. В качестве перспективных продуцентов рассматривают фототрофные бактерии.

Посевной материал спор гриба *Bl. trispora* инокулируют в среде, содержащей кукурузный экстракт, кукурузный крахмал, K_2HPO_4 и тиамин, в течение 40 ч при $26^{\circ}C$ и аэрации $8\text{ м}^3/\text{м}^3\cdot\text{ч}$.

Для главной ферментации используют среду на основе спиртовой барды с добавлением кукурузного крахмала, этоксихинина, $MnSO_4$, тиамина, изониазида,

керосина. Параметры ферментации: температура 22⁰ С, рН около 6,3, аэрация 8 м³/м³*ч, продолжительность 185 ч, через 48 ч вносят 1 г/л β-иона и 5 мл/л керосина и далее непрерывно до конца ферментации – раствор глюкозы (до 42 г/л).

Мицелий гриба отделяют и высушивают под вакуумом, измельчают. Готовый концентрат содержит 5 г/кг β-каротина.

Способностью синтезировать каротиноиды характеризуются дрожжи родов *Rhodotorula* и *Sporobolomyces*. Данные микроорганизмы эффективно утилизируют в качестве источника углерода молочную кислоту, в связи с чем сотрудниками института микробиологии АН РБ была исследована возможность направленного синтеза каротиноидов на творожной сыворотке. По результатам исследований была разработана технология получения беклово-каротиноидного концентрата, предусматривающая совместное культивирование молочнокислых микроорганизмов рода *Lactobacillus* и дрожжей родов *Rhodotorula* или *Sporobolomyces*.

Технология концентрата предусматривает следующие операции:

- очистка молочной сыворотки от жира и казеиновой пыли,
- депротеинизация методом термокислотной или кислотно-щелочной коагуляции;
- пастеризация депротеинизированной сыворотки и охлаждение до температуры инокуляции молочнокислых палочек и дрожжей 30-32 °С;

- внесение растворов питательных солей (сернокислого аммония – 0,8 %, фосфата калия однозамещенного – 0,3 %, сернокислого магния – 0,05 %);

- приготовление закваски молочнокислых бактерий на пастеризованном обезжиренном молоке (доза внесения 0,5-1,0 %) и рабочей культуры дрожжей (доза внесения 10-50 %) на среде, состав которой аналогичен составу производственной питательной среды;

- производственная ферментация при температуре 30-32 °С, рН 4,0-5,0, интенсивности аэрации 35-60 м³/м³*ч, максимальное накопление каротиноидов наблюдается за 96 часов культивирования;

- сгущение и сушка концентрата.

Сухой белково-каротиноидный концентрат содержит 40-42 % белка, каротиноиды (1,2 – 1,3 мг/л), витамины группы В.

3. Биотехнологические процессы получения интенсивных подсластителей и сахарозаменителей, усилителей вкуса.

В настоящее время в мире освоено биотехнологическое производство четырех групп подслащающих веществ:

- сахаристые крахмалопродукты;
- сиропы гидролизованной лактозы;
- сахарозаменители;
- интенсивные подсластители.

1) В пищевой промышленности получило распространение производство и использование сахаристых продуктов на основе частичного или полного гидролиза крахмала с использованием препаратов амилолитических ферментов, а также с модификацией отдельных продуктов гидролиза. К первой группе традиционных продуктов гидролиза относят крахмальные патоки, состав которых варьируется в зависимости от

глубины гидролиза крахмала (мальтодекстрины, низко- и высокоосахаренные, мальтозные и глюкозо-мальтозные патоки).

Продукты полного гидролиза крахмала с возможной их модификацией включают моногидратную или ангидридную глюкозу, фруктозу, глюкозные и глюкозо-фруктозные сиропы. Перспективным направлением является производство сахаристых крахмалопродуктов непосредственно из зернового сырья без выделения крахмала – зерновых сиропов, углеводных добавок.

Наиболее распространенной по объемам производства в мире группой сахаристых крахмалопродуктов являются глюкозо-фруктозные сиропы. Исходным сырьем для производства сиропов служит глюкоза, получаемая при гидролизе кукурузного или картофельного крахмала. В промышленных биореакторах используют препараты глюкозоизомеразы, иммобилизованной на ионообменных смолах или неорганических носителях. Также отработаны процессы с иммобилизованными клетками *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Streptomyces phaeochromogenes*, *Streptomyces olivaceus*, *Streptomyces venezuelae*, иммобилизованные путем включения в полимерные структуры (гранулы, шарики, полые волокна).

Для получения глюкозо-фруктозных сиропов используют биореакторы колонного типа производительностью 6000 – 9000 кг глюкозо-фруктозного сиропа на 1 кг иммобилизованного фермента. Время полуинактивации ферментационной системы составляет 20-50 суток. Получаемый сироп содержит 42-45 % фруктозы, 51 % глюкозы, небольшое количество олигосахаридов.

2) Технология получения сиропов гидролизованной лактозы (глюкозо-галактозных сиропов) основана на ферментативном гидролизе дисахарида с использованием препаратов растворимой или иммобилизованной дрожжевой и грибной β -галактозидазы. Иммобилизация лактазы осуществляется методами включения в полимерные структуры (полиакриламидные гели, сефадексы, полые волокна) и/или адсорбции на ионообменных смолах, активированных углях, цеолитах. Для производства сиропов гидролизованной лактозы используется депротеинизированная молочная сыворотка или ультрафильтрат (пермеат) молочной сыворотки или обезжиренного молока. Современные биокаталитические системы позволяют получить концентраты с регулируемым уровнем гидролиза лактозы от 60 до 90 %. В промышленных условиях процесс ферментативного гидролиза лактозы реализуется с использованием следующих типов биокаталитических систем:

- биореакторы с однократным использованием препарата лактазы и ее последующей термической инактивацией;
- блочная аппаратура типа «биореактор – ультрафильтрационный модуль» с многократным использованием ферментного препарата за счет рециркуляции ультраконцентрата;
- проточные биореакторы колонного или тарельчатого типа;
- каскады последовательно соединенных аппаратов с полыми волокнами (возможно совмещение гидролиза с процессом ультрафильтрации молочной сыворотки);
- системы с инъекцией малых количеств стерильного растворимого фермента в асептических условиях в молочное сырье, подвергнутое УВТ-обработке, с последующим медленным протеканием гидролиза лактозы в молочных продуктах в процессе их хранения.

Перспективным направлением применения метода иммобилизации при получении гидролизатов лактозы является использование неразрушенных иммобилизованных клеток микроорганизмов с высокой лактазной активностью. В частности, проведены исследования ферментативного гидролиза лактозы с использованием иммобилизованных клеток *Bacillus stearotherophilus*, *Kluyveromyces lactis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*, *Escherichia coli*.

Принципиальная схема получения сиропа гидролизованной лактозы включает следующие технологические процессы:

- приемка молочной сыворотки (подсырной или творожной), выделение жира и казеиновой пыли;
- депротеинизация сыворотки или ультрафильтрационная обработка;
- концентрирование осветленной сыворотки или пермеата до массовой доли СВ 15-20 %;
- ферментация при температуре 30-35°C и рН 6,0-6,5 для дрожжевой лактазы или температуре 50-55°C и рН 4,0-4,5 для грибного препарата, продолжительность периодической ферментации составляет 3 – 5 часов, при непрерывной ферментации поддерживается скорость потока питательной среды на уровне не менее 1,0 ч⁻¹;
- инактивация или отделение ферментного препарата при использовании растворимой лактазы;
- деминерализация сиропа методами электродиализа или ионного обмена;
- сгущение до массовой доли сухих веществ 40 или 60 %;
- рафинация сиропа с использованием диатомита и активированного угля;
- фасование и хранение.

3) Сахарозаменители-полиолы (сорбит, ксилит, манит, лактит) могут быть получены на основе реакций микробиологической трансформации восстановления соответствующих углеводов. Наибольшее распространение в практике биотехнологических производств получило производство ксилита (Е 967), рассмотренное ранее (см. тему «Микробиологические трансформации углеводов»).

4) Перспективным направлением получения интенсивных подсластителей биотехнологическими методами является направленный синтез сладких аминокислот и дипептидов. В настоящее время в ряде стран (Япония, США и др.) освоено биотехнологическое производство аспартама (Е 951).

Технология получения аспартама включает следующие основные стадии:

- микробиологическая трансформация фумарата аммония в L-аспарагиновую кислоту с использованием иммобилизованных клеток *E. Coli* с высокой активностью фермента аспартат-аммиак-лиазы;
- получение кристаллической L-аспарагиновой кислоты при подкислении раствора до рН 2,8 и охлаждении до температуры 15°C;
- получение фенилаланина;
- реакция конденсации L-аспарагиновой кислоты и метилового эфира L-фенилаланина под действием фермента термолитина иммобилизованных клеток *Bacillus thermoproteolyticus*, включенных в полиуретан.

Наряду с подсластителями, в промышленных масштабах методами биотехнологии могут производиться пищевые добавки, усиливающие вкус и аромат пищевых продуктов:

глутаминовая кислота и глутамат натрия (E 620 и E 621), глицин (E 640), L-лейцин (E 641), лизина гидрохлорид (E 642).

4. Биотехнология получения консервантов на примере низина и пропионовой кислоты.

Из ассортимента консервантов, разрешенных к применению в РФ, методами биотехнологии получают уксусную кислоту (E 260) и ее соли (ацетат калия – E261, ацетат натрия – E 262), пропионовую кислоту (E 280) и ее соли (пропионат натрия – E 281, пропионат кальция – E 282, пропионат калия – E 283), а также антибиотики низин (E 234) и пирамицин (E 235).

Низин - антибиотик полипептидного строения с молекулярной массой 7000 Да (в состав молекулы низина входят аминокислоты лизин, гистидин, аспарагиновая кислота, лантионин, β -метиллантониин, пролин, глицин, аланин, валин, метионин, изолейцин, лейцин, дегидроаланин и β -метилдегидроаланин), получаемый на основе культивирования специально подобранных штаммов *Lactococcus lactis*. Например, штамм *Lactococcus lactis ssp. lactis biovar. diacetylactis* (UL 719), который был выделен из сыра.

Наиболее благоприятной средой для биосинтеза низина является обезжиренное молоко. Низинообразующие культуры, не подвергавшиеся селекции, дают в обезжиренном молоке до 500 ед/мл низина. Отрицательно на выход низина влияют остатки в молоке моющих и дезинфицирующих средств, попадание в него антибиотиков, молока от коров, больных маститом, чрезмерное размножение в молоке до стерилизации естественной микрофлоры. В сыворотке выход низина в два раза меньше, чем в молоке.

Добавление к сыворотке 25% пепсинового гидролизата молочнокислых бактерий, картофельной патоки или глюкозы (2,5—5%) повышает выход низина до 90% от выхода, получаемого в обезжиренном молоке. Избыток глюкозы, пантотенат кальция, смесь минеральных солей увеличивают количество низина на синтетических питательных средах, но не влияют на его выход в обезжиренном молоке. Соли органических кислот (уксусной, яблочной, янтарной, пировиноградной) благоприятно влияют на прирост биомассы и только незначительно повышают количество образуемого низина. Аминный азот гидролизатов казеина, пептонов, дрожжевого автолизата стимулирует образование низина, а соли аммония (хлориды, сульфаты, нитраты, фосфаты) не усваиваются низинообразующими молочнокислыми стрептококками и не влияют на выход низина.

В культуре, полученной непрерывным методом, выход антибиотика примерно на 20% выше, чем стационарным. Оптимальная температура для образования низина 24—27°C, pH среды - 5,6—6,5, аэрация, разбавление или увеличение концентрации питательных веществ в среде уменьшает выход антибиотика. При раскислении среды и использовании высокопродуктивных штаммов получено до 8000 ед/мл низина в культуральной среде. Максимальная активность низина достигается после 8 часов ферментации.

Помимо антимикробных агентов и антибиотиков, методами биотехнологии получают ряд целевых продуктов, выполняющих в пищевых продуктах функции антиокислителей: аскорбиновая кислота (E 300), ее соли (аскорбат натрия – E 301, аскорбат кальция – E 302, аскорбат калия – E 303), лактаты натрия (E 325) и калия (E 326), лимонная кислота (E 330), глюкозооксидаза (E 1102).

Практическое занятие 4.
**ПОЛУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ДОБАВОК
 К ПИЩЕ МЕТОДАМИ БИОТЕХНОЛОГИИ**

- 1. Биотехнологические процессы получения нутрицевтиков.**
- 2. Виды пробиотиков. Технология получения пробиотков на примере бактериального препарата «Бифидумбакетрин».**
- 3. Характеристика БАД-парафармацевтиков, получаемых методами биотехнологии.**
- 4. Направления использования БАД в технологии продуктов функционального питания.**

1. Биотехнологические процессы получения нутрицевтиков.

БАД получают из растительного, животного или минерального сырья, а также химическими или биотехнологическими способами. БАД к пище вырабатываются в виде сухих и жидких концентратов, экстрактов, настоев, бальзамов, изолятов, порошков, сиропов, таблеток, драже, капсул и других форм в соответствии с техническими условиями, технологическими инструкциями, рецептурами, согласованными в установленном порядке с органами Санэпиднадзора РФ.

Наибольший удельный вес составляют БАД-нутрицевтики, крупномасштабное производство и применение которых было освоено в 80-е годы XX века. В 90-е годы активное распространение получили БАД, пробиотики. Относительно новым направлением в производстве пищевых добавок является разработка и производство парафармацевтиков.

Первыми в ряду БАД к пище были созданы БАД - нутрицевтики. В связи с этим данная группа БАД к пище является наиболее многочисленной и широко применяемой. Наиболее распространенные нутрицевтики - отдельные витамины, витаминные комплексы; минеральные вещества и их комплексы; витаминно-минеральные добавки.

В настоящее время в мире реализовано крупнотоннажное биотехнологическое производство ряда витаминных и аминокислотных препаратов, которые могут индивидуально или в комплексе с другими БАД использоваться в качестве нутрицевтиков в технологии продуктов функционального питания.

Получение концентратов и препаратов аминокислот представляется перспективным по трем направлениям:

- управляемый гидролиз белков животного, растительного и микробиологического происхождения, при необходимости, с последующим выделением L-изомеров из рацемических смесей;
- микробиологический синтез с использованием штаммов-сверхпродуцентов и питательных сред, допущенных к применению в пищевой промышленности;
- биотрансформация предшественников по механизму реакций аминирования и переаминирования.

В настоящее время ассортимент БАД-нутрицевтиков включает преимущественно препараты лизина, цистеина и метионина. В промышленных масштабах методами биотехнологии получают концентраты и высокоочищенные препараты лизина.

Технология получения концентратов и препаратов лизина.

Продуценты лизина культивируют на мелассных (штаммы-сверхпродуценты лизина *Corynebacterium glutamicum* и *Brevibacterium flavum*) и ацетатных (штамм *Brev. sp. 22*) средах. При использовании штаммов *Corynebacterium glutamicum* и *Brevibacterium flavum* выращивание посевного материала и производственную ферментацию проводят на средах следующего состава: меласса (по м.д. сахарозы) – 7-12%; кукурузный экстракт с содержанием СВ 50% - 1,2-1,5%; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 2%; K_2HPO_4 и KH_2PO_4 – по 0,05%; CaCO_3 – 1%; пеногаситель – 0,1%.

При выращивании посевного материала поддерживают следующие условия: температура 28-32⁰С, рН 7,0-7,2; интенсивность аэрации 50-60 м³/м³*ч. Продолжительность 18-24 ч. Посевную культуру вносят в главный ферментатор в количестве 5-10%.

Главную ферментацию осуществляют в течение 55-72 ч при аналогичных условиях и избыточном давлении 0,02-0,03 Мпа. Содержание лизина по завершении процесса до 4%, остаточное количество сахаров 0,5-1,0%.

При культивировании *Brevibacterium sp. 22* на ацетатных средах концентрация уксусной кислоты в среде в пересчете на ацетат-ионы не должна превышать 2,0%. Для повышения выхода лизина используют среду следующего состава: ацетат аммония – 1,5%; глюкоза – 1,0%; K_2HPO_4 – 0,02%; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 3%; MgSO_4 – 0,04%; гидролизат соевой муки – 1,5%. Процесс проводят при 28-32⁰С; рН 7,0-7,2; интенсивности аэрации 50-60 м³/м³*ч, продолжительность 72 ч, концентрация лизина по завершении ферментации – 34-50 г/л.

Культуральную жидкость без отделения биомассы стабилизируют 25%-ным раствором NaHSO_3 и подкисляют до рН 4,5-5,0 HCl ; сгущают до 40% СВ. Таким образом получают жидкий концентрат лизина (ЖКЛ). При получении кормового концентрата лизина (ККЛ) сгущенный продукт высушивают до остаточной влажности 4-8%, гранулируют.

При производстве высокоочищенных препаратов лизина культуральную жидкость отделяют от клеток продуцента, нерастворимых карбонатов и фосфатов Ca , осадок высушивают и используют в качестве кормовой добавки; пигменты выделяют из культуральной жидкости адсорбцией на активированном угле и анионитах. Раствор стабилизируют и сгущают при 60⁰С до 40 % СВ; кристаллизуют монохлоргидрат лизина охлаждением до 12-14⁰ С, кристаллы промывают чистым этанолом и высушивают под вакуумом при 60⁰ С до остаточной влажности 0,5%.

В состав комплексных БАД-нутрицевтиков и продуктов функционального питания включают препараты рибофлавина, цианкобаламина, аскорбиновой кислоты и β -каротина, получаемые методами микробиологического синтеза и биотрансформации. Рассмотрим подробнее технологические процессы производства препаратов рибофлавина и цианкобаламина.

Производство препаратов рибофлавина в настоящее время осуществляют тремя способами: химический синтез, полный микробиологический синтез, смешанный синтез (микробный синтез рибозы с последующей химической трансформацией в витамин В₂). Наиболее распространенным является химический синтез рибофлавина из рибозы, полученной путем микробной трансформации с использованием сверхпродуцентов *Vas. subtilis*.

Для получения медицинских препаратов рибофлавина используют промышленные штаммы *Ashbya gossypii* и *Eromothecium ashbyii*. Культура гриба *Ashbya gossypii* выращивают на питательной среде следующего состава: соевое масло – 4,5%; пептон – 3,5%; кукурузный экстракт – 2,25%; ростовые факторы: биотин, инозит и тиамин (биосинтез); лейцин и фенилаланин. Посевной споровой материал (0,75-2%) после проращивания в течение 24-48 ч вносят в питательную среду для главной ферментации, которую осуществляют при 28⁰С, рН начальной 7,0; интенсивность аэрации 18-20 м³/м³*ч. Продолжительность ферментации – 7 суток, выход рибофлавина 7г/л.

Eromothecium ashbyii культивируют на среде, содержащей глюкозу (5 г/л), подсолнечное масло (15 г/л), соевую муку, кукурузный экстракт, мел, К₂НРО₄, NaCl при 30⁰ С, рН 6,5-7,0; интенсивность аэрации 10-15 м³/м³*ч в течение 72 часов. Выход рибофлавина – 10-11 г/л.

По завершении ферментации культуральную жидкость нагревают до 120⁰ С и выдерживают 1 ч для выделения связанного с мицелием рибофлавина; раствор рибофлавина подвергают очистке от примесей подкисляют для стабилизации рибофлавина соляной кислотой до рН 4,5-5,0, концентрируют и кристаллизуют рибофлавин. При производстве кормовых препаратов культуральную жидкость после отделения мицелия стабилизируют соляной кислотой, концентрируют до 20 % СВ, высушивают распылительным способом, смешивают с наполнителями.

Получение препаратов и концентратов витамина В₁₂. На основе микробного синтеза получают следующие формы витамина В₁₂: цианкобаламин, гидроксикобаламин, аденозилкобаламин (коэнзим В₁₂), метилкобаламин. Для культивирования продуцентов кобаламина используют глюкозные, меласные и лактозосодержащие среды (пропионовокислые бактерии), перспективным является использование метанола и н-алканов.

Основные промышленные продуценты *Prop. shermanii*, *Prop. freudenreichii*, *Pseudomonas denitrificans*. Перспективным направлением является использование метаногенных бактерий. Среда для производственной ферментации содержит мелассу инвертированную или глюкозу (до 10% по массовой доле РВ), кукурузный экстракт (3-7%); сульфат аммония (2-2,5%); соли Со (10-100 мг/л). Ферментацию осуществляют при температуре 30⁰ С и рН 6,5-7,0; первые 80 ч процесс проводят без аэрации; последующие 85-90 ч при интенсивности аэрации 2 м³/м³*ч.

Выделение и очистку кобаламина проводят по следующей схеме:

- экстракция витамина из клеток при 80-120⁰ С в течение 10-30 мин при рН 6,6,5;
- отделение клеток продуцента;
- обработка раствора или клеточной суспензии раствором цианида или тиоцианата в присутствии нитрита натрия;
- сорбция кобаламинов на активированных углях, алюмогелях (Al₂O₃) и элюирование водно-спиртовыми растворами;
- экстракция кобаламинов органическими растворителями;
- концентрирование экстракта с последующим выделением осадка или кристаллов витамина В₁₂.

При культивировании продуцента *Pseudomonas denitrificans* биосинтез кобаламина осуществляют в периодическом или непрерывном режиме на питательной среде

следующего состава: меласса – 10%; дрожжевой экстракт – 0,2%; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ – 0,5%; MgSO_4 – 0,3%; MnSO_4 – 200 мг/л; CoNO_3 – 190 мг/л; ZnSO_4 – 20 мг/л; Na_2MoO_3 – 5 мг/г; 5,6-диметилбензимидазол – 25 мг/л. Ферментацию проводят при температуре 29-30° С, pH начальном 7,4; аэрации 50-60 м³/м³*ч в течение 90 ч.

Получение препарата витамина В₁₂ предусматривает термообработку культуральной жидкости с клетками, превращение кобаламина в CN-кобаламин; многоступенчатую органическую и водную экстракцию; хроматографическое выделение препарата витамина.

Перспективным направлением получения нутрицевтиков является производство витаминизированных концентратов на основе различных видов пищевого сырья с использованием сверхпродуцентов витаминов группы В. Сотрудниками Института микробиологии АН РБ разработаны технологические процессы получения концентратов рибофлавина, кобаламина на основе молочной сыворотки. С технологической точки зрения наиболее целесообразной является комплексная переработка культуральной жидкости и биомассы продуцента на пищевые концентраты, либо получение витаминизированной биомассы продуцента.

Кормовые концентраты рибофлавина получают на молочной сыворотке по следующей технологической схеме:

- культуру продуцента *Clostridium acetobutylicum* выращивают на лактозосодержащих или крахмалсодержащих средах при 20-22° С в течение 2-3 суток, наиболее термостойкие споры отбирают методом «теплового шока»;
- посевной материал (суспензию спор) вносят в питательную среду на основе стерилизованной молочной сыворотки с добавлением ксилозы (0,5-1%); CaCO_3 (0,15%); $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (0,15%); ZnSO_4 (4,8мг/л); MnSO_4 (4,2 мг/л); ионов Fe (1,2 мг/л), п-аминобензойной кислоты (0,01 мг/л) при 37-38°С в течение 48 ч в анаэробных условиях;
- культуральную жидкость с клетками продуцента направляют на перегонку (выделение бутанола, ацетона, этанола);
- сыворотку сгущают до 40% СВ и высушивают распылительным способом.

Кормовой концентрат витамина В₁₂ на основе молочной сыворотки получают по следующей схеме:

- посевной материал выращивают в течение 48 ч на молочной сыворотке при 35-37° С и pH 6,9-7,0;
- для главной ферментации используют депротеинизированную сыворотку с добавлением 5 % гидролизованного обезжиренного молока, 5% дрожжевого автолизата, ростовых факторов (MgSO_4 , CoCl_2 , 5,6-ДМБ); в питательную среду вносят 3% посевного материала и культивируют при 35-37° С и pH 6,9-7,0 в течение 96 ч, через 48 и 72 ч нейтрализуют мелом, первые 48 ч – в анаэробных условиях, далее при слабой аэрации;
- сыворотку с клетками продуцента сгущают до 40 % СВ и высушивают распылительным способом.

2. Виды пробиотиков. Технология получения пробиотков на примере бактериального препарата «Бифидумбакетрин».

К бактериям-пробиотикам в основном относят так называемые эубиотики (представители нормальной микрофлоры кишечника и других полостей организма) и чаще всего бифидобактерии и молочнокислые микроорганизмы, называя их классическими

пробиотиками. Вместе с тем, имеется достаточно фактических данных, свидетельствующих о наличии пробиотических свойств у молочнокислых палочек и кокков, не встречающихся в кишечнике человека, а также других микроорганизмов - грамположительных (*Propionibacterium*, *Bacillus*) и грамотрицательных (*Escherichia coli*, *Citrobacter*) бактерий, дрожжей (*Saccharomyces*, *Candida parapsilosis*) и грибов, в том числе высших (*Aspergillus*, *Rizopus*, *Cordiceps*).

Благоприятное влияние пробиотиков на здоровье людей проявляется разноплановыми положительными эффектами, основными из них являются следующие:

- колонизация ЖКТ пробиотическими микроорганизмами, проявляющими антагонизм в отношении условно патогенных и патогенных бактерий, вирусов, грибов и дрожжей;

- улучшение нарушенного баланса микроорганизмов в кишечнике и устранение дисбактериозов и дисбиозов в целом;

- полезная и адекватная метаболическая активность - продукция витаминов К, биотина, ниацина, пиридоксина и фолиевой кислоты; гидролиз желчных солей и холестерина, регуляция его уровня;

- нормально функционирующая микрофлора контролирует продукцию токсинов в кишечнике, предупреждая их избыточную выработку и попадание в кровоток;

- оптимизация пищеварения и нормализация моторной функции кишечника;

- детоксицирующая и защитная роль: предотвращение негативного влияния радиации, химических загрязнителей пищи, канцерогенных факторов, токсичных эндогенных субстратов, непривычной и экзотической пищи, загрязнённой воды, повышение неспецифической иммунорезистентности.

Препараты БАД-пробиотиков содержат микроорганизмы как в виде чистых монокультур (в защитных питательных средах или без них), так и в комбинациях, чаще всего в лиофильно высушенном состоянии, реже - в жидком виде. Комбинации могут включать сочетания культур (нескольких штаммов одного рода или вида, разных таксономических групп). В последние годы получили распространение препараты, состоящие из 6 - 8 пробиотиков - "симбиотики" или "мультипробиотики".

Наряду с симбиотиками широко применяются пробиотические продукты смешанного состава - комплексы пробиотиков, в том числе мультиштаммовых с различным пребиотическими веществами - "синбиотики". Понятие "пребиотики" используется для обозначения веществ или диетических добавок, в большинстве своем не абсорбируемых в кишечнике человека, но благотворно влияющих на организм путем стимуляции роста полезных представителей кишечной микрофлоры, т.е. пребиотики можно назвать стимуляторами, или моторами, пробиотиков.

К классическим пребиотикам относят **волоконподобные неперевариваемые олигосахариды НПО** - класс углеводов со степенью полимеризации 2-10. Существует 12 классов НПО: лактулоза; галактоолигосахариды; фруктоолигосахариды; лактосахароза; палантинозоолигосахариды; гликозилсахариды; мальтоолигосахариды; изомальтоолигосахариды; циклодекстрины; соевые олигосахариды; гентиоолигосахариды; ксилоолигосахариды.

В настоящее время синтетические НПО получают четырьмя методами:

1. Контролируемый гидролиз растительных и микробных полисахаридов (фруктоолигосахариды, мальтоолигосахариды, ксилоолигосахариды).

2. Выделение из растительного сырья (фруктоолигосахариды, соевые олигосахариды).

3. Химический синтез (лактuloза, лактосахароза).

4. Ферментативный синтез из простых сахаров реакцией трансгликозилирования (галактоолигосахариды, лактосахароза, фруктоолигосахариды, палатинозоолигосахариды, гликозилсахароза, гентиоолигосахариды)

Эффективно увеличивают популяцию бифидобактерий и лактобацилл в кишечнике микроводоросли (хлорелла, спирулина, отдельные сине-зелёные и бурые морские водоросли). Комплексные препараты пробиотиков к микроводорослей становятся популярным и широко рекламируются. Нормальная кишечная микрофлора, наряду с волокноподобными олигосахаридами, усваивает и полисахариды пищевых волокон (ПВ) - устойчивый крахмал, полисахариды растительных клеточных стенок, гемицеллюлозу, пектины, камеди.

В качестве пребиотиков безусловно могут быть рассмотрены отдельные витамины и их производные. Так, давно известно и описано селективное ростстимулирующее действие пантотеновой кислоты и её производных на различные штаммы бифидобактерий *in vivo* и *in vitro*. Другим классом веществ, которые можно рассматривать как пребиотики, являются **биологические активные иммунные белки** – лактоглобулины и гликопептиды, вырабатываемые в организме человека и млекопитающих.

В настоящее время в пищевой промышленности при производстве функциональных продуктов питания используют препарат «Бифидумбактерин» на основе живых клеток бифидобактерий штаммов *Bifidobacterium bifidum* 1,791 или ЛВА-3. Внешний вид препарата - пористая или кристаллическая масса разных оттенков бежевого или беловато-серого цвета. Препарат имеет вид лиофилизированной кристаллической или пористой массы бежевого цвета различной интенсивности или бежевого цвета с сероватым оттенком, со специфическим запахом и вкусом. При добавлении воды образует непрозрачную взвесь.

Технологический процесс получения сухого бакпрепарата включает в себя следующие стадии:

- приготовление и стерилизация питательной среды;
- культивирование бифидобактерий на селективных питательных средах при температуре $(38 \pm 1)^\circ\text{C}$, рН среды (4,5 - 5,0) в течение 36-40ч (каждая стадия);
- отделение бактериальной суспензии на бактофуге или концентрирование культуральной жидкости без отделения клеток микроорганизмов;
- подготовку и внесение защитной среды;
- стерильный розлив во флаконы;
- замораживание и сублимационное высушивание препарата.

3. Характеристика БАД-парафармацевтиков, получаемых методами биотехнологии.

Отдельные пищевые вещества или их комплексы обладают специфической физиологической активностью и могут использоваться в составе продуктов питания в качестве фармакологических средств - **парафармацевтиков**. К таким пищевым веществам относятся в первую очередь белки, ферменты, аминокислоты. Биотехнологическое получение парафармацевтиков предусматривает выделение целевых

продуктов из природных источников или направленный биосинтез белков, поли- и олигопептидов, характеризующихся специфической биологической активностью.

В настоящее время предпочтение отдается первому способу, поскольку направленный микробный синтез веществ пептидной природы затруднен необходимостью воссоздания аминокислотной последовательности и нативной конфигурации. Примером получения БАД-парафармацевтиков из натурального сырья является ангиогенин – биологически активный полипептид, стимулирующий рост кровеносных сосудов. Он может быть выделен из препаратов крови, культуральных жидкостей некоторых микроорганизмов, а также путем глубокого фракционирования сывороточных белков молока.

В перспективе может быть освоено крупнотоннажное производство парафармацевтиков, основанное на культивировании генноинженерных штаммов микроорганизмов, клеток и тканей животных.

Сотрудниками НИИ комплексного использования молочного сырья разработаны концентрат натурального казеина (КНК), получаемый с помощью пектина (КНК-п), микрокристаллической целлюлозы (КНК-мкц), концентрат молочный стабилизирующий (КМС), концентрат структурирующей пищевой (КСП).

Концентраты натурального казеина (КНК) вырабатывают из обезжиренного молока с использованием полисахаридов. В качестве полисахарида используют пектин яблочный сухой. Выпускают концентраты натурального казеина в жидком и сухом видах. Технологический процесс производства КНК состоит из следующих операций: приемка и подготовка сырья и материалов; составление смеси обезжиренное молоко : раствор пектина; отделение и обработка КНК; сушка жидкого КНК; расфасовка и упаковка продукта.

Обезжиренное молоко с кислотностью не выше 20 °Т пастеризуют при температуре 72-76 °С с выдержкой 15-20 с, охлаждают до 6-10 °С и направляют в резервуар для приготовления смеси. Сухой пектин растворяют в воде из расчета получения раствора с концентрацией пектина 6,5 %. Массовая доля пектина в смеси должна составлять 0,55-0,75 %. Полученную смесь с температурой 6-10 °С перемешивают в течение 15 мин и выдерживают в течение 1-5 ч до полного разделения смеси на две фазы: нижняя – концентрат нативного казеина и верхняя – концентрат структурирующий пищевой жидкий.

Разделив фазы, концентрат натурального казеина направляют на пастеризацию и охлаждение, а концентрат структурирующий пищевой – на дальнейшую переработку. Пастеризацию КНК проводят на трубчатых пастеризационных установках при температуре 74-76 °С с выдержкой 20-25 с. После пастеризации продукт направляют на сушку или охлаждают до 6-10 °С и расфасовывают во фляги (жидкий КНК). При этой температуре жидкий КНК допускается хранить не более 48 ч. После пастеризации жидкий КНК с массовой долей сухих веществ не менее 17 % сушат на распылительных сушилках типа А1-ОРЧ при температуре 40-60 °С. Режимы сушки продукта: температура воздуха на входе в сушильную башню 140-150 °С, на выходе – 55-65 °С. Фасуют сухой КНК в многослойные бумажные мешки с мешками-вкладышами из полиэтилена массой нетто 15 кг.

К сывороточно-полисахаридному концентрату добавляют 20-25 % обезжиренного молока, смесь перемешивают и направляют на вакуум-выпарную установку. Сгущение

ведут при температуре 50-60 °С до массовой доли сухих веществ 20-30 % и направляют на сушку. Сушат продукт распылительным или сублимационным способом.

Обнинским научно-производственным предприятием «Медбиофарм» разработана биологически активная добавка «Йодказеин», позволяющая кардинально улучшить состояние здоровья проживающих на йодэндемичных территориях.

Диетологами и фармакологами всего мира определенное внимание придается фосфолипидам, вследствие проявляемого ими широкого спектра положительного физиологического воздействия на организм. В Кубанском ГТУ разработана БАД «Витая», получаемая по специальной технологии из подсолнечного масла. Институтом питания и Институтом биомедицинской химии РАМН получены БАДы липидной природы - источники полиненасыщенных жирных кислот и фосфолипидов.

В последние годы большое внимание исследователей привлекают биологически активные вещества пептидной структуры, оказывающие иммунологическое действие и обладающие способностью восстанавливать иммунитет в случае его угнетения, повышающие сопротивляемость организма к инфекционным и неблагоприятным факторам среды.

Одно из направлений в разработке лечебно-профилактических продуктов - использование фитодобавок. Фирмой «Артлайф» совместно с КемГИПП разработаны БАД, которые апробированы в качестве отдельных препаратов, а также компонентов пищевых продуктов в профилактике и лечении распространенных заболеваний. В качестве фитодобавок используют экстракты лечебного растительного сырья: крапивы двудомной и шиповника (источники витаминов); лапчатки прямостоячей, аниса, зверобоя, мяты перечной (улучшают пищеварение и регулируют работу желудочно-кишечного тракта); родиолы розовой, женьшеня, шиповника (обладают тонизирующим и общеукрепляющим эффектом). Актуально использование фитодобавок на основе топинамбура, который характеризуется антиаритмическим, противотуберкулезным, сахароснижающим, антианемическим действием. БАД на основе топинамбура используют для обогащения цельномолочных продуктов, создания специализированных лечебно-профилактических продуктов.

4. Направления использования БАД в технологии продуктов функционального питания.

В настоящее время могут быть выделены следующие направления использования БАД в технологии продуктов питания:

- молочные продукты (аскорбиновая кислота, витамины группы В, β-каротин, витамин Е, макро- и микроэлементы, пробиотические микроорганизмы, пребиотики, пептиды, линолевая кислота);
- зернопродукты (пищевые волокна, витамины А, В, Е, кальций, фитодобавки);
- хлебопродукты (йодказеин, витамины группы В, пищевые волокна и непереваримые олигосахариды, пробиотики);
- жировые эмульсионные продукты и растительные масла (полиненасыщенные жирные кислоты, жирорастворимые витамины);
- мясопродукты (молочно-белковые концентраты, белковые гидролизаты и концентраты незаменимых аминокислот, олигосахариды-пребиотики, пищевые волокна, пробиотические микроорганизмы);

- натуральные соки и напитки (аскорбиновая кислота и витамины группы В, β-каротин, пищевые волокна, фитодобавки).

ИП РАМН был разработан ассортимент продуктов лечебно-профилактического назначения, обогащению микро-нутриентами, а именно: витаминами и бета-каротином; витаминами, минеральными веществами и бета-каротином; лечебно-профилактические соли,

обогащенные калием, магнием и йодом, а Министерством здравоохранения и Госкомитетом санитарно-эпидемиологического надзора РФ утверждены соответствующие инструкции и методические рекомендации по употреблению этих продуктов.

Институтом питания совместно с ГУ ВНИИ молочной промышленности проведены исследования по использованию поливитаминного премикса 730/4 для обогащения молока и молочных продуктов. Премикс представляет собой смесь 12 основных необходимых человеческому организму витаминов с лактозой. Добавление премикса к молоку в соответствии с разработанной нормативно-технической документацией в количестве 750 г на 1 т молока обеспечивает удовлетворение одним стаканом молока половины средней суточной потребности человека практически во всех витаминах

В МГУПБ разработана технология сухой витаминно-минеральной добавки, предусматривающая получение молочно-белкового концентрата методом ультрафильтрации с последующим внесением в него глицерофосфат железа, жиро- и водорастворимых витаминов. Добавку получают в сухом виде с содержанием белка - 52-55 %; железа - 1,0-1,5 г, витаминов В1 - 0,15-0,2; В2 - 0,2-0,23; А - 0,1-0,12; С - 10,0-10,5; Е - 1,4-1,5 г на 1 кг сухого продукта. Добавка позволяет повысить биологическую и пищевую ценность обогащаемого продукта, так как содержит такое количество витаминов и минеральных веществ, которое составляет половину суточной потребности детей школьного возраста.

В нашей стране на протяжении ряда лет ведется работа по адаптации культур бифидобактерий к молоку и разработке напитков, содержащих живые культуры бифидобактерий. В последние годы разработан ряд технологий напитков с использованием комбинированных заквасок, обогащенных биомассой бифидобактерий: бифидокефир, биоигурт, биопростокваша, бифилайф, бифилюкс и др. Примером является кефир, обогащенный биомассой бифидобактерий «Бифидок», выпускаемый с м.д. жира 1,0; 2,5; 3,2 %; с витамином С.

Кефир «Особый». Биологическая ценность продукта повышена за счет обогащения белками молока (м.д. белка в готовом продукте составляет 3,4–3,5%). В рецептуру продукта введены молочно-белковые концентраты: казеинат натрия из казеина и творога (м.д. СВ 94%), казеинат натрия влажный творожный (м.д. СВ 18%), копреципитат растворимый (м.д. СВ 94%), концентрат натурального казеина сухой (м.д. СВ 92%) и жидкий (м.д. СВ 17 %).

В Кемеровском технологическом институте пищевой промышленности разработана технология молочно-белковой пасты «Бодрость» с использованием минерально-пищевой биодобавки «Нектарин». Она представляет собой смесь цветочной пыльцы с медом. БАД содержит в своем составе все необходимые для жизнедеятельности человека вещества: белки - до 3,1 %; липиды - до 1,6 %; редуцирующие сахара - до 15,63 %; жиро- и водорастворимые витамины: токоферолы - до 14,87; каротиноиды - до 3,76 %; аскорбиновую кислоту до 16,54; биофлавоноиды - до 179,11 мг и др.; микро- и

макроэлементы, основными из которых являются: фосфор - до 93,4; калий - до 61, кальций - до 46,8; магний - до 433 мг. Важно отметить присутствие в БАД цинка (до 1 мг/100 г), который редко встречается в пищевых продуктах, и необходим для обменных процессов. Внесение; 10 % БАД «Нектарин» в творог позволило создать продукт с высоким содержанием витаминов и минеральных веществ, обладающих нежным вкусом цветочно-медовым ароматом и пастообразной консистенцией. Биопаста «Бодрость» рекомендуется для детей и взрослых.

Во ВНИМИ проведены работы по созданию низкохолестериновых молочных продуктов. Так, разработана сметана «Здоровье», в которой на 50 - 55 % по сравнению с исходными сливками снижено содержание холестерина. Для производства сметаны используется закваска «ТОН», представляющая собой симбиоз молочнокислых и пропионовокислых бактерий, которая продуцирует витамины группы В и обладает холестеринразрушающим действием. При определении состава сметаны «Здоровье» учтена потребность в витаминизации продукта, так как обогащение диеты витаминами оказывает благотворное влияние на функцию миокарда и состояние сосудистой стенки. Продукт дополнительно обогащен биологически активными добавками: аскорбиновой кислотой и циклокаром (препарат бета-каротина).

Практическое занятие 5.

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДОВ ГЕННОЙ И КЛЕТОЧНОЙ ИНЖЕНЕРИИ В РАСТЕНИЕВОДСТВЕ И ЖИВОТНОВОДСТВЕ

1. Основы биотехнологии рекомбинантных ДНК.
2. Методы генетической инженерии растений.
3. Современные направления получения трансгенных растений.
4. Генная и клеточная инженерия в животноводстве.

1. Основы биотехнологии рекомбинантных ДНК.

Под рекомбинантными понимают молекулы ДНК, образованные объединением в искусственных условиях двух или более фрагментов ДНК, выделенных из разных биологических источников. Получение р-ДНК стало возможным благодаря развитию экспериментальных методов генетической инженерии, позволяющих проводить направленное конструирование генетических систем на молекулярном уровне вне организма с последующим введением в живой организм. При этом рДНК становятся частью генетического аппарата организма-реципиента, сообщая ему уникальные генетические, биохимические и физиологические свойства.

Ферменты генетической инженерии – это ферменты, позволяющие проводить различные манипуляции с молекулами ДНК: разрезать в определенных местах, соединять различные по происхождению фрагменты, синтезировать новые, не существующие в природе последовательности, и т. д. Рассмотрим основные ферменты генетической инженерии.

ДНК-полимеразы. Одним из наиболее часто используемых в генетической инженерии ферментов является ДНК-полимераза I, выделенная из *E coli* или фага T4. ДНК-полимераза I обладает способностью удлинять цепь ДНК в направлении 5'→3' путем присоединения комплементарного нуклеотида. Это свойство ДНК-полимераз используется в генной инженерии для построения второй комплементарной цепи.

Использование специфических термостабильных ДНК-полимераз позволило проводить *амплификацию* – множественную наработку любого фрагмента ДНК методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Из некоторых вирусов была выделена специфическая ДНК-полимераза — РНК-зависимая ДНК-полимераза, названная обратной транскриптазой, или *ревертазой*. Ревертазы могут синтезировать комплементарную цепь ДНК на РНК-матрице.

ДНК-лигаза осуществляет одну функцию – соединение фрагментов ДНК путем восстановления фосфодиэфирных связей между соседними нуклеотидами. Этот процесс называется лигированием. Наиболее часто для лигирования в генной инженерии используют ДНК-лигазу фага T4. С помощью лигазы T4 соединяют любые фрагменты ДНК с любыми концами: «липкими» или «тупыми».

Нуклеазы – это большая группа ферментов, катализирующих реакцию гидролиза молекул нуклеиновых кислот. В результате действия нуклеаз молекула ДНК или РНК распадается на фрагменты или отдельные нуклеотиды. Исходная функция нуклеаз в клетке – деградация ненужных в данный момент жизнедеятельности молекул (например, деградация мРНК после трансляции) и защита от чужеродных молекул нуклеиновых

кислот (расщепление фаговой ДНК бактериальными нуклеазами при заражении бактерии фагом).

Рестриктазы. Отдельную группу, особенно с утилитарной точки зрения ее применения в геной инженерии, представляют специфические эндонуклеазы – *рестриктазы*. Еще в 1953 г. было обнаружено, что ДНК определенного штамма *E. coli*, введенная в клетки другого штамма, не проявляет, как правило, генетической активности, так как быстро расщепляется на фрагменты ДНК-специфическими ферментами – рестриктазами. К настоящему времени из разных микроорганизмов выделено более тысячи различных рестриктаз. В генетической инженерии наиболее широко используются около 200.

Рестриктазы представляют собой особый класс эндонуклеаз, которые гидролизуют ДНК строго по определенным специфическим последовательностям, называются *сайтами рестрикции*. Каждая из рестриктаз узнает свой сайт рестрикции и разрезает ДНК либо внутри последовательности сайта рестрикции, либо в непосредственной близости от него. Рестриктазы делятся на несколько типов по характеру расщепления нуклеотидной последовательности. Рестриктазы I типа узнают сайт рестрикции, но расщепляют последовательность ДНК на произвольном расстоянии (от нескольких десятков до нескольких тысяч пар нуклеотидов) от сайта узнавания. Такие рестриктазы невозможно использовать для решения генно-инженерных задач. Рестриктазы III типа похожи на рестриктазы I типа, они гидролизуют ДНК на расстоянии 20-35 н. п. от сайтов узнавания и также довольно редко используются практических целей.

Ферменты, используемые для получения рекомбинантных молекул – рестриктазы II типа. У них сайты узнавания и места рестрикции совпадают. Обычно рестриктаза II типа узнает определенную последовательность на ДНК и гидролизует ее внутри последовательности сайта рестрикции. Сайты рестрикции рестриктаз II типа представлены симметричными при повороте на 180° последовательностями – *палиндромами*.

Рестриктазы II типа делятся на несколько классов в зависимости от размера сайта рестрикции и длины получаемых фрагментов ДНК:

- 1) мелкощепящие – сайт рестрикции которых представлен четырьмя нуклеотидными парами;
- 2) среднещепящие – сайт рестрикции – 6-8 н. п.;
- 3) крупнощепящие – сайт рестрикции – 10-14 н. п.

Рестриктазы II типа можно отнести к двум группам по тому, как они расщепляют последовательность ДНК. Одни вносят разрывы по оси симметрии узнаваемой последовательности, а другие – со сдвигом, с образованием «ступеньки». В первом случае образуются так называемые «тупые» концы, а во втором – «липкие», т. е. фрагменты имеют на своих концах однонитевые взаимно комплементарные участки.

Ферменты рестрикции позволяют превращать молекулы ДНК очень большого размера ($10^6 - 10^{11}$ н. п.) в набор фрагментов длиной от нескольких сотен до десятков тысяч пар оснований. С помощью *метода электрофореза в агарозном геле* фрагменты ДНК, различающиеся по размеру, можно легко разделить, а затем исследовать каждый фрагмент отдельно. Метод электрофореза основан на разделении (фрагментов) молекул ДНК, движущихся с различной скоростью в электрическом поле.

Использование электрофореза для разделения рестрикционных фрагментов дает возможность получать *рестрикционные карты* – последовательности ДНК с нанесенными на них сайтами разрезания для различных рестриктаз.

Определение нуклеотидной последовательности – секвенирование. Методы, позволившие идентифицировать генетически важные участки ДНК, имели большое значение. Но они также способствовали разработке исключительно эффективных новых методов секвенирования ДНК и создания рекомбинантных молекул. Секвенирование позволяет довольно быстро определить полную нуклеотидную последовательность сегмента длиной 350-1000 нуклеотидных пар и более, образующегося при расщеплении ДНК рестрикционными эндонуклеазами. Существует два основных принципа секвенирования: химический и ферментативный сиквенс.

Химический сиквенс основан на избирательной химической деградации нуклеотидов. Наиболее широко сейчас применяется метод *ферментативного секвенирования*, или метод секвенирования путем терминации (остановки синтеза) цепи, предложенный Ф. Сэнгером в 1977 г. В основе метода Сэнгера лежит принцип репликации комплементарной цепи ДНК на одноцепочечной матрице при происходящем в разных местах последовательности ДНК обрыве синтеза, т. е. терминации роста цепи. Основным моментом ферментативного секвенирования является терминация синтеза строящейся цепи. Терминирующими агентами, приводящими к остановке репликации, являются 2', 3'-дидезокситрифосфаты (ддАТФ, ддГТФ, ддТТФ, ддЦТФ). Эти модифицированные основания не могут образовать фосфодиэфирную связь со следующим дезоксирибонуклеотидом. В результате рост (элонгация) данной цепи терминируется в том месте, где в ДНК включился дидезоксирибонуклеотид.

2. Методы генетической инженерии растений.

Традиционные методы селекции, основанные, главным образом, на половой гибридизации и отборе, позволяют получать новые генотипы растений. Генно-инженерные манипуляции позволяют решать ряд важных задач по повышению устойчивости новых форм, линий, сортов и гибридов сельскохозяйственных растений к патогенам и сокращению продолжительности выведения новых сортов.

Технология рекомбинантных ДНК позволяет выделять гены как прокариотического, так и эукариотического происхождения, переносить этот ген (или несколько генов) в хромосомы реципиентного растения и обеспечивать его экспрессию. Применение этой технологии делает поиск более целенаправленным и значительно расширяет возможности манипулирования генетическим аппаратом.

Важным преимуществом растений по сравнению с животными является возможность получения целого растения из одной клетки, основанная на свойстве тотипотентности. Результаты генетической инженерии растений во многом зависят от разработки методов культуры тканей, особенно методик регенерации различных растений.

Технология генетической инженерии состоит из следующих основных этапов получения трансгенных растений: 1) выбор гена и его клонирование; 2) подбор генотипа растения-реципиента; 3) введение гена и его экспрессия в геноме растения-реципиента; 4) регенерация трансформированных клеток и отбор трансгенных растений.

Выбор гена и его клонирование. Выбор гена определяется необходимостью передачи растению определенного хозяйственно-полезного признака. В настоящее время

для трансформации растений используются в основном гены, определяющие моногенные признаки, такие, как устойчивость к гербицидам и пестицидам, устойчивость к некоторым другим видам стрессов. Большинство генов, определяющих эти признаки, выделены из бактериальных геномов. В последнее время в качестве доноров генов, определяющих признаки устойчивости растений. Такие гены не могут быть введены в геном растений-реципиентов путем половой гибридизации из-за биологической несовместимости растений, относящихся к разным видам, родам и даже семействам. Еще более сложной является проблема получения признаков, относящихся к группе количественных признаков: качество зерна, устойчивость к засухе, низким и высоким температурам.

Подбор генотипа растения-реципиента. В идеальном варианте в качестве реципиента подбираются растения такого сорта или линии, которые отвечали бы требованиям производства по урожайности, качеству плодов, устойчивости к биотическим и абиотическим стрессам, но имели бы лишь одно отрицательное свойство, например неустойчивость к насекомым. Тогда введение в геном растений этого сорта, например, бактериального гена *bt2*, экспрессирующего белок прототоксин, вызывающий гибель насекомых, приводил бы к значительному улучшению выбранного сорта. Также выбор генотипа растения-реципиента определяется способностью его клеток к регенерации в целое фертильное растение, так как показано, что это свойство значительно зависит от генотипа.

Введение гена и его экспрессия в геноме растения-реципиента. Проблема переноса чужеродных генов в геном растений существенно облегчается в связи с обнаружением Ti-плазмид почвенных агробактерий *Agrobacterium tumefaciens*, позволяющих вводить чужеродные гены в геном двудольных и некоторых однодольных растений. В последнее время довольно широко, особенно для трансформации клеток однодольных растений, используется метод биобаллистической трансформации.

Суть метода заключается в том, что на мельчайшие частички вольфрама, платины или золота, диаметром 0,6-1,2 мкм, напыляется ДНК вектора, содержащего необходимую для трансформирования генную конструкцию. Вольфрамовые, платиновые или золотые частички, несущие ДНК, на целлофановой подложке помещаются внутри биобаллистической пушки. Каллус или суспензия клеток вносится в чашку Петри с агаризированной средой и помещается под биобаллистическую пушку на расстоянии 10-15 см. В пушке вакуумным насосом уменьшается давление до 0,1 атм. В момент сбрасывания давления вольфрамовые или золотые частички с огромной скоростью выбрасываются из пушки и, разрывая клеточные стенки, входят в цитоплазму и ядро клеток. Обычно клетки, располагающиеся непосредственно по центру, погибают из-за огромного количества и давления вольфрамовых или золотых частиц, в то время как в зоне 0,6-1 см от центра будут находиться трансформированные клетки. Далее клетки осторожно переносят на среду для дальнейшего культивирования и регенерации.

Важно обеспечить экспрессию чужеродного гена в геноме растения-реципиента и стабильное наследование признака в поколениях. Экспрессия введенного гена зависит от ряда причин, в том числе от места интеграции гена в геном растения, последующего метилирования промоторной области и введенного гена и т.п.

Регенерация трансформированных клеток и отбор трансгенных растений. Регенерация взрослых растений из трансформированных клеток зависит от тотипотентности клеток (способности части клеток или протопластов развиваться в целое

растение) и не всегда возможна. Тотипогентность хорошо выражена у клеток двудольных растений, таких как табак, картофель, свекла, соя, рапс, люцерна, томаты, морковь, капуста, некоторые плодовые. У однодольных, особенно злаков, этот признак выражен очень слабо, в связи с чем процесс регенерации клеток в целое растение проходит с большими трудностями. В настоящее время разработаны методы регенерации трансформированных клеток некоторых основных зерновых культур, таких как кукуруза, рис, пшеница, ячмень. Однако необходимо отметить, что с каждым годом методы регенерации разрабатываются для все большего числа растений.

3. Современные направления получения трансгенных растений.

Улучшение качества и повышение продуктивности растений методами генной инженерии. Одной из основных задач улучшения растений является повышение качества синтезируемых продуктов: белков, жиров, полисахаридов и других веществ, определяющих их питательную и техническую ценность.

У злаков наибольший интерес представляют запасные белки эндосперма. Запасные белки, в основном, кодируются несколькими, сходными по своей структуре и по нуклеотидному составу, генами, объединяемыми в мультигенные семейства.

Улучшение аминокислотного состава белка методами традиционной селекции довольно затруднительно в связи с тем, что гены, определяющие эти важные сельскохозяйственные признаки, часто бывают сцеплены и наследуются вместе с генами, вызывающими нежелательные признаки (например повышение содержание лизина приводило к уменьшению синтеза основных запасных белков зеина и гордеина и, в конечном итоге, с уменьшением продуктивности растений и урожайности посевов).

В связи с этим наиболее перспективным является использование генно-инженерных методов при создании новых сортов, что позволяет ввести в геном только полезный признак, без сцепления с отрицательными свойствами. Так, например, введение дополнительных кодонов лизина в гены проламинов может привести к синтезу белков, обогащенных лизином, и улучшению кормовой и питательной ценности белка.

Помимо получения трансгенных растений с модифицированными запасными белками зерновых и бобовых проводятся работы по улучшению *состава жирных кислот* ряда масличных культур, и в первую очередь рапса. Семена рапса характеризуются высоким содержанием масла, однако, из-за большого количества в нем специфической длинноцепочечной эруковой кислоты, а также глюкозинолатов вкусовые и питательные качества рапсового масла резко снижаются. С помощью генетической инженерии и последующей селекции были получены сорта рапса, содержащие гены, контролирующие длину молекулы жирных кислот, что привело к снижению доли эруковой кислоты и улучшению качества рапсового масла. Аналогичные работы ведутся по получению модифицированных жирных кислот с повышенным содержанием ненасыщенных связей, что позволит получать растения, синтезирующие новые ценные жирные кислоты. Кроме того, в последнее время было показано, что изменение состава жирных кислот может приводить к повышению устойчивости растений к ряду насекомых, а также к действию пониженных температур.

Одним из приоритетных направлений в селекции является повышение урожайности новых сортов. Генно-инженерные разработки активно ведутся в следующих

направлениях: увеличение фотосинтетической активности и увеличение синтеза отдельных веществ.

Другое направление проводимых работ касается возможностей *изменения метаболизма* у трансгенных растений. Введение гена сахарозофосфатсинтетазы кукурузы (SPS-гена), являющегося ключевым ферментом в регуляции углеводного метаболизма, в геном других растений приводило к изменению углеводного обмена и повышению продуктивности растений. В настоящее время получены такие трансгенные растения томата, картофеля, рапса, хлопчатника.

Получение трансгенных растений, устойчивых к стрессовым воздействиям.

Экстремальное влияние окружающей среды, такое как засуха, избыточное увлажнение, воздействие высоких или низких температур, засоление и кислотность почв приводит к значительным потерям сельскохозяйственной продукции. Поэтому использование сортов растений, толерантных к стрессовым воздействиям, имеет большое экономическое значение.

Многие из адаптивных реакций растений на стресс обуславливаются синхронным взаимодействием множества генов. Поэтому более доступными для генно-инженерных исследований оказываются биохимические процессы, непосредственно индуцировавшиеся фактором стресса. Так, например, известно, что в растениях, подвергающихся длительному водному стрессу, накапливается ряд органических низкомолекулярных соединений, таких, как пролин, глицинбетаин и ряд других, которые служат осморегуляторами или осмопротекторами.

Было показано сходство стрессового ответа у бактерий и высших растений: в обоих случаях в клетках происходит синтез молекул осмопротекторов, механизмом действия которых является установление осмотического баланса между цитоплазмой и окружающей средой и, кроме того, частичная стабилизация белков при стрессовых условиях. Сходные биохимические пути синтеза молекул осмопротекторов позволили использовать гены бактериального происхождения для получения трансгенных растений, устойчивых к стрессам.

Получение трансгенных растений, устойчивых к насекомым. Используя генно-инженерные методы, возможно конструирование растений с повышенной резистентностью к атаке насекомыми. Так, было показано, что бактерии *Bacillus thuringiensis* экспрессируют инсектицидный белок-протоксин, который, попадая в кишечник насекомых, расщепляется под действием протеаз до активного токсина, приводящего к гибели вредителей.

Препараты на основе этого токсина использовались для обработки растений в поле. Полученные препараты были нестойкими и довольно быстро разлагались, что не позволяло развить у вредителей устойчивость к инсектициду, в то время как продукция таких белков в растительных клетках могла обеспечивать устойчивую резистентность растений к насекомым.

Из генома *B. thuringiensis* был выделен ген токсина и интегрирован в геном растений табака методом агробактериальной трансформации. Эффективность защиты сельскохозяйственных культур от вредителей была показана также на трансгенных растениях томата, трансформированных генами эндотоксина, при этом бактериальный белок, синтезированный в тканях растений, обеспечивал защитный эффект, сравнимый с использованием инсектицидных препаратов. Помимо табака и томата бактериальный был

введен в геном многих сельскохозяйственных растений, в том числе в картофель, кукурузу, хлопчатник, рис, сою, брокколи и др. Использование трансгенных растений привело к резкому сокращению применения инсектицидов и повышению урожайности.

Получение трансгенных растений, устойчивых к грибной, бактериальной и вирусной инфекции.

При действии фитопатогенов в растениях включается каскад механизмов защитных реакций. При этом активные ответные реакции в растениях могут проходить по двум основным направлениям: во-первых, в ответ на инфекцию начинается синтез соединений, являющихся токсичными и ограничивающих жизнедеятельность патогенов, что в конечном итоге приводит к их гибели. Во-вторых, в качестве защитного ответа могут создаваться структурные барьеры, которые предотвращают повреждение растений и распространение патогенов, что достигается лигнификацией клеточных стенок растений, либо укреплением клеточных стенок за счет гликопротеидов, богатых гидроксипролином и других соединений, так называемых экстенсинов, что приводит к защите тканей от повреждения фитопатогенами.

В ответ на инфицирование вирусами, бактериями и грибами индуцируются специфические PR-белки (pathogenesis related proteins), в том числе и наиболее изученные хитиназы и β -1,3-глюканы. Эти ферменты ингибируют рост грибов, а также некоторых видов бактерий. Экспериментально был доказан фунгицидный эффект белков хитиназ и глюканаз, а также их кодирование одиночными генами. Поэтому гены хитиназы и глюканазы были использованы в генно-инженерных работах по получению трансгенных растений, устойчивых к фитопатогенам.

Другую группу соединений, также обладающих фунгицидным эффектом, представляют низкомолекулярные белки (40-50 кДа), к которым относятся цистеиновые белки растений, ингибиторы галактуроноз, растительные дефензины, группа MF-белков. Все эти белки обычно неспецифически повышают устойчивость растений к различным грибным и бактериальным инфекциям. Трансгенные растения, экспрессирующие этот белок, обладают устойчивостью как к грибной, так и к вирусной инфекции.

В процессе изучения взаимоотношений вирус – растение было вовлечено большое число различных методов. Только их комбинирование могло принести результаты по получению растений, устойчивых к вирусной инфекции. За последние годы в этом направлении был сделан заметный рывок, что напрямую связано с более детальным пониманием организации генома и функционирования вирусных генов. В настоящее время для получения растений, устойчивых к вирусной инфекции, с помощью генно-инженерных технологий существует ряд подходов, позволяющих получить трансгенные растения, трансформированные геном белка оболочки вируса, что приводит к уменьшению инфицированности и ингибированию размножения вируса. Таким методом были получены растения табака и картофеля, трансформированные геном белка оболочки вируса табачной мозаики, что привело к появлению стойкого антивирусного эффекта у трансгенных растений.

Еще одним подходом к получению устойчивых к патогенам растений является трансформация растительных клеток генами, кодирующими ферменты пути биосинтеза фитоалексинов, проявляющих фунгицидное и антимикробное действие. Трансформация этими генами растений томата и картофеля значительно повысила устойчивость к фитофторозу и фузариозу.

Получение трансгенных растений, устойчивых к гербицидам. Одним из основных направлений биотехнологии растений является получение культурных растений, устойчивых к воздействию гербицидов. Гербициды широкого спектра действия, уничтожая сорные травы, оказывают угнетающее действие и на посевы. Получение устойчивых к гербицидам растений ведется в двух направлениях: во-первых, прямая селекция устойчивых к гербицидам форм растений (в основном, путем скрещивания с дикими видами растений, устойчивых к гербицидам), во-вторых, получение трансгенных растений путем введения генов, экспрессия которых приводит к гербицидрезистентности. Теоретической основой получения трансгенных растений, устойчивых к гербицидам, являются данные о молекулярных механизмах возникновения устойчивости к гербицидам и выделения генов как бактериального, так и растительного происхождения, определяющих этот признак. Действие гербицидов проявляется в подавлении метаболизма растительных клеток: ингибировании биохимических процессов прежде всего фотосинтеза (атразин, симазин, диурон) и синтеза аминокислот (глифосат, сульфонилмочевина, биалафос). Устойчивость к гербициду возникает либо в результате изменения сродства гербицида с его ферментом-мишенью, либо непосредственно ингибированием молекулы гербицида.

Получение растений, устойчивых к гербицидам, методами генной инженерии прежде всего основывается на изучении молекулярных механизмов толерантности и включает следующие этапы: выявление мишеней действия гербицидов в клетке растений, отбор растений/бактерий, устойчивых к данному гербициду (в качестве источника генов резистентности), идентификация и клонирование этих генов, изучение их экспрессии для использования в трансгенных конструкциях.

4. Генная и клеточная инженерия в животноводстве.

Методы генной инженерии в животноводстве позволяют решать следующие задачи:

- идентифицировать в геноме животных гены, ответственные за передачу важных для животноводства свойств;
- модифицировать и клонировать их на основе р-ДНК биотехнологии;
- интегрировать в геном животного-реципиента.

При этом интегрированный ген определяют как трансген, продуцируемые данным геном белки – трансгенными продуктами, а животное, несущее в своем геноме рекомбинантный ген – как трансгенное животное.

Этапы получения трансгенных сельскохозяйственных животных:

- приготовление раствора ДНК для микроинъекции;
- подготовка донора и извлечение эмбрионов;
- идентификация представляющего интерес гена и микроинъекция ДНК;
- пересадка инъецированных эмбрионов животному-реципиенту;
- доказательство интеграции трансгена у родившихся потомков;
- получение трансгенных потомков традиционными методами сельскохозяйственного животноводства.

Данная методика реализуется в сельскохозяйственном животноводстве по следующим направлениям.

1. Получение трансгенных животных с новыми хозяйственно-полезными свойствами: увеличение скорости роста, повышение надоев, улучшение качества животноводческой продукции и ее биологической ценности.

2. Получение трансгенных животных, устойчивых к заболеваниям: повышение устойчивости к бактериальным и вирусным инфекциям.

3. Получение трансгенных животных, характеризующихся сверхпродукцией биологически активных веществ технологического и медицинского назначения: молоко с повышенным содержанием жира и белков, препараты крови, ферментные препараты.

Использование методов клеточной инженерии в животноводстве позволяет решать задачи по повышению продуктивности, устойчивости к заболеваниям, приданию им важных технологически важных свойств.

Объектом клеточной инженерии являются эмбриональные клетки на ранней стадии развития, обладающие полной генетической информацией о данном организме и не подверженные дифференциации. Большие возможности благодаря микрохирургии получил метод трансплантации эмбрионов.

Применение данного метода в животноводстве позволяет решать следующие задачи:

- получение идентичных близнецов путем микрохирургического разделения эмбрионов;
- получение трансгенных животных на основе клонирования эмбрионов с модифицированной генетической информацией;
- получение химерных животных посредством межвидовых пересадок эмбрионов.