

Занятие семинарского типа № 9

ТЕМА ЗАНЯТИЯ: Регуляция биосинтеза белковых препаратов в условиях биотехнологического производства

УЧЕБНЫЙ МАТЕРИАЛ

Технологические особенности биосинтеза биологически активных веществ

В основе технологии биосинтеза биологически активных веществ (БАВ) главными компонентами являются биологические объекты: вирусы, грибы, растительные или животные клетки, биомолекулы, обладающие различными физиологическими свойствами.

При этом основной задачей технологии биосинтеза БАВ является преобразование природного сырья или отходов различного происхождения помощью биологического объекта (микроорганизмов, изолированных клеток, ферментов, клеточных органелл и т.п.), поддержание и активизация путей обмена веществ в клетках, ведущих к накоплению БАВ в целевом продукте при заметном подавлении других реакций обмена у культивируемого организма, а также получение клеток или их составных частей (главным образом, ферментов) для направленного изменения сложных молекул.

В зависимости от биологического объекта, используемого в технологическом процессе биосинтеза БАВ, данные процессы можно классифицировать: микро-, фито- и зообиотехнологии.

Основные принципы микробиологического синтеза БАВ основываются на принадлежности биологических объектов к надцарствам живых существ (акариот, прокариот, эукариот); его функциональной активности (биосинтез, биотрансформация); возможности вычленения отдельных этапов из биотехнологических схем производства в виде самостоятельных процессов (подготовка питательных сред и оборудования, технологического воздуха, ферментация, стерилизация сред и оборудования).

Преимущества микробиотехнологии заключаются в:

- ✓ простоте организации генома;
- ✓ легкой приспособляемости (лабильности) к среде обитания в естественных и искусственных условиях;
- ✓ достаточно высоких скоростях протекания ферментативных реакций при низких температурах (20–60 °С) и нарастания клеточной массы;
- ✓ возможности использования недефицитного, доступного и экономичного сырья (твердых отходов производства, сточных вод).

К недостаткам технологии микробного синтеза БАВ можно отнести:

- ✓ многокомпонентность питательных сред;

✓ необходимость стерилизации питательных сред, оборудования и коммуникаций для удаления или разрушения контаминантов при сохранении качества среды;

✓ трудности в управлении процессом биосинтеза и автоматизации. Это связано с процессами саморегуляции биообъектов (включая способность к мутации), которые могут привести к непредвиденному изменению биотехнологического процесса. При размножении и развитии происходит постоянное изменение отдельных параметров, и в каждый момент времени клетки функционируют в иных условиях.

В этой связи, при управлении технологическим процессом биосинтеза БАВ следует учитывать индивидуальные особенности «поведенческих реакций» биологического объекта в конкретных условиях культивирования:

✓ чувствительность биообъектов к воздействию физико-механических факторов при перемешивании;

✓ знание химической природы синтезируемого БАВ;

✓ характера биохимических процессов, осуществляемых биообъектами;

✓ специфику наследственных свойств данного вида.

Основные технологические показатели биосинтеза БАВ

Для нормального роста, размножения биологического объекта в процессе биосинтеза БАВ необходимо поддерживать оптимальные условия его культивирования. При нарушении оптимальных условий реализации процесса нарушается обмен веществ, прекращается или ограничивается рост и размножение культуры продуцента, снижается выход и качество целевого продукта.

Параметры контроля процесса культивирования, относящиеся к основным технологическим показателям биосинтеза БАВ:

✓ температура;

✓ значение рН среды;

✓ количество биомассы клеток;

✓ скорость потребления источников питания;

✓ количество растворенного кислорода (в случае аэробных биообъектов);

✓ количество образующегося метаболита.

К основным технологическим стадиям микробиологического синтеза БАВ:

✓ предферментация стадия (подготовительные работы);

✓ ферментация (биосинтез продукта);

✓ постферментационная стадия (выделение и очистка целевого продукта).

Управление технологическими процессами биосинтеза БАВ

Биосинтез целевого продукта в ферментере происходит при заданных условиях: температурном режиме, аэрации, перемешивании и значении рН культуральной жидкости; величину рН обычно регулируют периодической подачей аммиачной воды через барботер ферментера.

Аэрация жидкости способствует пенообразованию, снижающему качество ферментации, поэтому используют механическое (установка в верхней части ферментера специальной дополнительной мешалки) или физико-химическое (использование ПАВ для снижения поверхностного натяжения на границе раздела фаз газ – жидкость) пеногашение.

Длительность ферментации зависит от природы используемых биологических объектов, особенностей их развития и строения.

Для поддержания постоянства концентраций отдельных компонентов питательной среды их подают в виде стерильных растворов по команде компьютера с определенной скоростью и периодичностью в ферментер из специальных аппаратов.

Технология получения белковых селенобогатых БАД на основе дрожжей

Биологически активные добавки (БАД), обогащенные селеном, на основе биомассы дрожжей получают по типовой технологической схеме производства дрожжевой биомассы, которая включает следующие основные технологические стадии:

- подготовка питательной среды;
- подготовка инокулята;
- ферментация – выращивание (культивирование) дрожжей;
- концентрирование дрожжевой суспензии (сепарация, выпаривание) и термическое инактивирование клеток;
- сушка концентрированной дрожжевой суспензии.

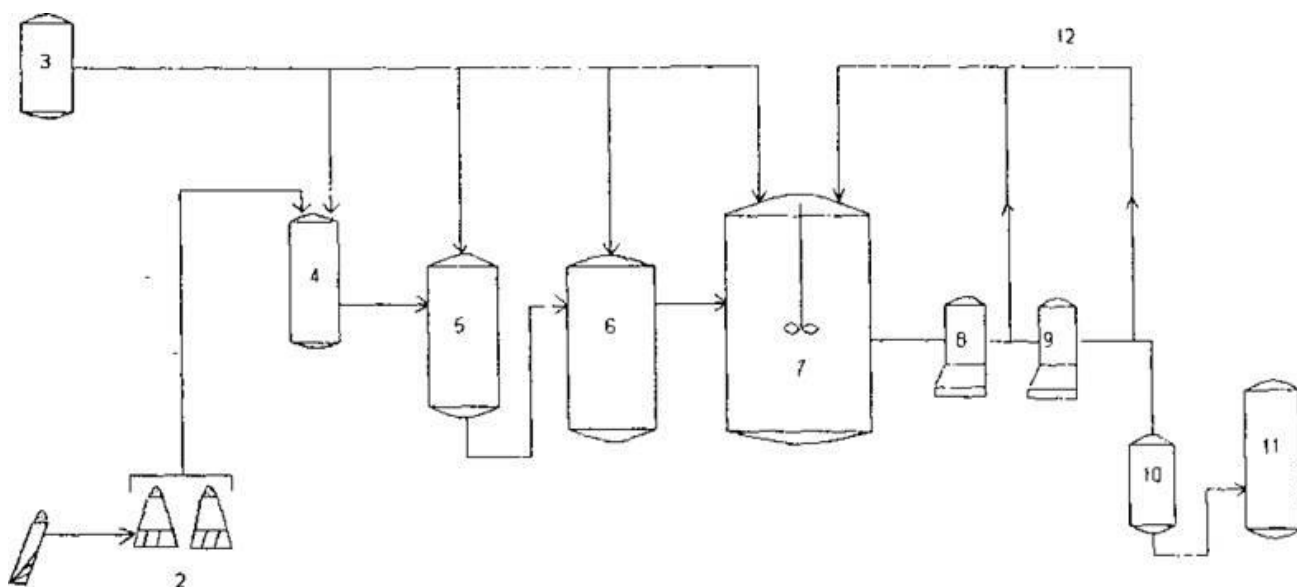


Рис. 1. Технологическая схема производства биомассы микроорганизмов
 1 – музейная чистая культура – пробирки; 2 – выращивание культуры в колбах; 3 – приготовление питательной среды; 4, 5, 6 – аппараты выращивания инокулята, последовательно увеличивающегося объема; 7 – ферментатор; 8, 9 – сепарация I и II ступени; 10 – сборник; 11 – сушка; 12 – возврат отработанной культуральной жидкости

Выбор штамма дрожжей

Исходя из физиолого-биохимических особенностей резистентных и нерезистентных к селену дрожжей, выбор штаммов для получения БАД, обогащенных селеном, определяется особенностями используемого сырья и необходимым уровнем содержания селена в готовом продукте, что, в свою очередь, определяется назначением его использования.

По расчетам специалистов в области кормления животных, исходя из нормы ввода кормовых дрожжей в рационы с учетом содержания в них сырого протеина – в селенобогатых дрожжах – кормовых белковых добавках, содержание селена не должно превышать 2 мг/кг.

В селеносодержащих дрожжевых препаратах – лечебно-профилактических и ветеринарных БАД – концентрация селена не ограничивается, поскольку поступление необходимого количества селена в организм можно регулировать при дозировании данных препаратов.

Для получения белковых кормовых добавок с содержанием селена в биомассе не более 2 мг/кг можно использовать любые производственные штаммы дрожжей, продуктивные на конкретных видах сырья.

Для получения лечебно-профилактических БАД и ветеринарных препаратов, обогащенных селенопротеинами, необходимо применять нерезистентные к селену штаммы, продуктивные на конкретном виде сырья. Такие штаммы позволят получать биомассу дрожжей с высоким

содержанием белка, с высоким содержанием селена до 700–800 мг/кг, основная масса которого находится в органической форме.

Подготовка штамма к культивированию

Поскольку выявлена тенденция к адаптации дрожжей к высокой концентрации селена в среде культивирования рекомендуется следующая схема подготовки штамма к культивированию:

- выращивание чистой культуры на твердой среде, сусло-агар или среде Сабуро;
- пересев на среду Сабуро с добавлением селена в концентрации 1 мг/л селенита:
- подготовка инокулята: инокулят выращивается на жидкой среде, состав которой соответствует промышленному регламенту получения дрожжей на определенном сырье, но при добавлении к среде селенита в концентрации 0,5 мг/л.

Получение кормовых белковоселеновых добавок

При получении селенобогатых дрожжей, содержащих селена до 2 мг/кг, используются производственные регламенты получения соответствующих продуктов на конкретных видах сырья (гидролизатах целлюлозосодержащих отходов древесины и сельского хозяйства, этанол, мелассу, *n*-парафины и др.).

В данном случае в состав соответствующей питательной среды дополнительно вводится селенит в концентрации 0,05–0,1 мг/л. При такой концентрации селенита в питательной среде не снижается производительность стадии выращивания ни при периодическом, ни при непрерывном режимах культивирования.

Степень потребления селена из питательной среды составляет 80–90%. Остаточные концентрации селена не влияют на процесс ферментации с рециклом культуральной жидкости, а также на эффективность биологической очистки сточных вод.

Получение лечебно-профилактических и ветеринарных БАД

При получении лечебно-профилактических и ветеринарных БАД с содержанием селена до 20 мг/кг продукта используются технологические регламенты для производства биомассы дрожжей на соответствующих видах сырья: меласса, сахар-сырец – для культивирования пекарских дрожжей (*S. cerevisiae*), пивных дрожжей (*S. carlbergensis*); молочная сыворотка – для выращивания дрожжей *Kluyveromyces marxianum*; на этаноле – *S. cerevisiae* и *C. utilis*.

При этом вносятся следующие изменения в технологический режим.

Изменение состава питательной среды. Дополнительно в состав питательной среды вводится селенит в концентрации 2 мг/л. Для повышения степени потребления селена снижается концентрация серы в среде до 20–100 мг/л за счет эквивалентной по действующему началу замены солей серной кислоты на соли соляной кислоты: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ на NH_4Cl ; MgSO_4 на $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ и т.п.

Добавление к среде культивирования селенита в концентрации 2 мг/л не приводит к снижению активности роста культур, как при непрерывном, так и периодическом культивировании. При этом степень потребления селена составляет около 30%. Остаточная концентрация селена в среде не оказывает влияния на качество готового продукта, не влияет на показатели содержания органически связанного селена в биомассе при регламентных процессах постферментационной обработки, включающей сгущение (концентрирование), двукратную промывку водой, термообработку и сушку. Не выявлено особенностей и при хранении полученного продукта.

Для предотвращения накопления селенита в среде культивирования при длительном непрерывном процессе с рециркуляцией культуральной жидкости необходимо осуществлять контроль за концентрацией селенита в подаваемой среде. При этом концентрация вводимого селенита постепенно уменьшается на 20% через интервал времени, равного времени обмена среды в ферментере. В таблице 1 приводится режим изменения концентрации селенита: в подаваемой среде при непрерывном культивировании при $D = 0,2 \text{ час}^{-1}$ и рециркуляции культуральной жидкости до 50%.

Спустя 20–24 ч непрерывного культивирования необходимо перейти на периодическое культивирование для доутилизации накопившегося селенита, или на несколько часов прекратить подачу селенита в ферментер.

Табл. 1. Изменение концентрации селенита в питательной среде при непрерывном культивировании

Время культивирования, часы	Концентрация селенита в подаваемой среде, мг/л
0	2,0
5	1,4
10	1,0
15	0,7
20	0,2

Режимы культивирования при получении дрожжевой биомассы с высоким содержанием селена

Биомасса дрожжей с высоким содержанием селена, до 900 мг/кг может быть получена при периодическом культивировании нерезистентных к селену штаммов при повышенной концентрации селенита в среде культивирования, снижающей активность роста дрожжей не менее, чем на 50% (табл. 2).

В биомассе нерезистентного к селену штамма дрожжей *C. utilis* накапливается селена около 900 мг/кг при концентрации его в среде 20 мг/л. При этом активность роста (концентрация биомассы) снижается на 80%, а из среды потребляется не более 20% селена. Такой процесс ни с экологической, ни с технологической точек зрения не является приемлемым.

Технологически возможным является режим культивирования дрожжей *C. utilis* при концентрации в среде 5,0 мг/л селенита. При этой концентрации селенита концентрация биомассы снизится 2–3%, содержание селена достигнет уровня 400 мг/кг, а степень потребления селена из среды – 80% .

Табл. 2. Показатели роста и уровня накопления селена в биомассе этанолусваивающих дрожжей *C. Utilis* при периодическом культивировании в ферментере на питательной среде, обедненной по сере (содержание серы 6,8 мг/л)

Концентрация селенита в среде, мг/л	Концентрация биомассы, % от контроля	Содержание селена в биомассе, мг/кг	Степень потребления селена из среды, %
0 (контроль)	100,0	0,2	-
5,0	97,2	416,0	80,0
10,0	69,4	565,0	50,0
20,0	20,8	997,0	-20,0
50,0	9,0	900,0	

Получить биомассу дрожжей с высоким содержанием селена, возможно, при периодической культивировании с дробной подачей селена или селена и источника углерода (см. табл. 3).

Табл. 3. Рост и накопление селена в биомассе при дробном введении селена в среду культивирования (среда, обедненная по сере, содержание серы 6,8 мг/л)

Общая концентрация селенита, введенного в среду, мг/л	Режим введения селенита	Концентрация биомассы, % от контроля	Содержание селена в биомассе, мг/кг	Степень потребления селена из среды, %
20,0	разово	20,8	997,0	20,0
20,0	дробно [10-(2.5 • 4)]	86,4	790,0	40,0
50,0	разово	9,0	900,0	-
50,0	дробно [10 ⁻¹⁰ • 4]	64,7	442,0	10,0

При однократном внесении селенита в исходную питательную среду концентрация селена 20 мг/л будет ингибировать начальную стадию роста. При дробной подаче обеспечивается достаточно низкая по отношению к биомассе концентрация селена, обеспечивается активность роста дрожжей, высокий уровень накопления селена в биомассе, до 800 мг/кг. При таком режиме в два раза повышается степень потребления селена из среды, в сравнении с разовой подачей аналогичной концентрации селена в среду культивирования.

Аналогичная ситуация наблюдается при повышении общей концентрации вводимого в среду культивирования селена до 50 мг/л при дробной подаче.

В случае, если рассчитать продуктивность данных технологических процессов по селену (X_{Se}), как произведение показателей содержания селена в биомассе и концентрации биомассы, отнесенное ко времени ферментации, и выразить в мг (Эе)/л • час, то X_{Se} в режиме дробной подачи селенита в концентрации 20 мг/л и 50 мг/л составит 0,55 и 0,21, соответственно.



Рис. 2. Расчетное, содержание селена в биомассе дрожжей при использовании, батареи ферментеров, работающих последовательно

Низкая степень потребления селена из питательной среды даже при дробном его внесении требует разработки технологического процесса повторного использования отработанной культуральной жидкости. В данном случае техническим решением указанной проблемы может быть использование батареи ферментеров, работающих последовательно. При этом питательная среда для каждого последующего ферментера готовится на основе культуральной жидкости предыдущего и промывной воды биомассы. Такая организация технологического процесса позволяет получить из каждого последующего ферментера биомассу с меньшим уровнем содержания селена. Примерный расчет при подобной организации технологического процесса представлен на рис. 1.

Такая технологическая схема обеспечивает получение биомассы дрожжей с высоким уровнем содержания селена и высокой степенью утилизации селенита из среды культивирования (около 90%). В данном случае остаточные концентрации селена не будут оказывать угнетающего воздействия на микроорганизмы активного ила при биологической очистке сточных вод предприятия.

Данный технологический процесс может быть реализован и с помощью одного ферментера при последовательном использовании культуральной среды от предыдущего процесса для приготовления питательной среды для последующего процесса ферментации. Следует отметить, что при приготовлении питательной среды следует обеспечивать постоянное соотношение серы и селена.

Высокая остаточная концентрация селена в культуральной жидкости, возможно, не будет лимитировать практическое использование такого

режима в том случае, если процесс осуществляется не на автономной установке, а на производстве получения хлебопекарных дрожжей или кормовых дрожжей.

Постферментационная обработка биомассы

При культивировании дрожжей на питательной среде, содержащей более 5 мг/л селенита, происходит окрашивание биомассы в розовый или красный цвет в результате образования элементарного селена при его восстановлении в процессе выдерживания клеток в культуральной жидкости более 30–60 мин., как в условиях аэрации, так и при ее отсутствии, и даже в случае снижения температуры до 6 °С.

Восстановление селена не происходит как при отделении биомассы от культуральной жидкости, содержащей селен, так и при ее термической обработке.

В целях исключения ферментативного процесса образования элементарного селена постферментационная обработка биомассы дрожжей, обогащенной селеном, должна предусматривать после стадии культивирования быстрое отделение биомассы от культуральной жидкости, двухкратную промывку биомассы от остаточных концентраций селена в межклеточном пространстве и термическую инактивацию дрожжевых клеток. При такой технологии обработки биомассы дрожжевых клеток будет содержаться до 90% селена в органической форме.

Качество целевого продукта (дрожжевой биомассы, обогащенной селеном) и его практическое использование

Содержание белка в дрожжах, обогащенных селеном, зависит от физиологических особенностей штаммов и содержания соединений серы в среде культивирования.

Снижение содержания серы в среде культивирования до 6,8 мг/л для обеспечения более полной утилизации селена из среды не приводит к снижению в клетке содержания сырого протеина и истинного белка, кроме отдельных штаммов дрожжей, отличающихся повышенной потребностью в сере.

Селен по фракциям клеточных компонентов селенообогащенных дрожжей распределяется следующим образом: до 80% селена содержится в белках и аминокислотах; 1% в липидах; неорганического селена содержится 14–20%, что зависит от штамма.

В селеннerezистентных штаммах свободные селеноаминокислоты, селенометионин и селеноцистеин составляют 7–13% в зависимости от уровня накопления селена в биомассе.

Для получения лечебно-профилактических добавок могут быть использованы три формы дрожжевой биомассы, обогащенной селеном:

- инактивированные клетки дрожжей (пекарских, пивных и т.п.) без разрушения клеточных стенок;
- биомасса инактивированных частично разрушенных клеток (разрушение клеточных стенок, частичный или полный автолиз или ферментолиз);
- изолированные из биомассы белки.

С древнейших времен биомасса микроорганизмов является компонентом многих продуктов питания человека. При этом их содержание в пищевых продуктах (молочнокислые продукты, дрожжевой хлеб, пиво, квас и др.) составляет десятые, а в рационе человека сотые доли процента.

В мировой практике имеется опыт использования цельной биомассы этанообразующих дрожжей в качестве белковой добавки к продуктам питания (фирма «Амокофудс», США), а также мицелия высших грибов *Pleurotus ostreatus*.

В случае, если применение дрожжей и других микроорганизмов в качестве существенной доли белкового рациона вызывает возражение специалистов из-за высокого содержания нуклеиновых компонентов, а также содержания трудногидролизуемых компонентов клеточной стенки, то использование дрожжей в качестве белковой основы биологически активных добавок не дает основания отвергать перспективность данного направления.

К частично разрушенной биомассе может быть отнесена автолизированная биомасса или ее ферментативный гидролизат. Данные продукты содержат весь набор компонентов биомассы в более низкомолекулярной форме.

На рынке лечебно-профилактических добавок, обогащенных селеном, имеются БАД, представляющие автолизированную биомассу пекарских и пивных дрожжей. Однако не все данные продукты получены в результате автолиза биомассы, обогащенной селеном в процессе культивирования. Такие продукты не будут содержать селен в органической форме.

Однако только органический селен и определяет биологическую ценность БАД, полученных на основе дрожжевой биомассы.

Получение белковых изолятов из биомассы дрожжей является одним из перспективных направлений получения белкового дрожжевого комплекса, включающего и селенсодержащие белки.

Разработана технология выделения белковых изолятов при значении рН 8,5, обеспечивающая минимальные химические изменения белка в процессе выделения.

Содержание незаменимых аминокислот в изоляте практически близко к их содержанию в казеине. Основной лимитирующей аминокислотой изолятов является метионин. Балансирование метионина в изолятах до его содержания 4% (равное казеину) повышает биологическую ценность белковых изолятов.

Способность микроорганизмов синтезировать элементарноорганические соединения использована для получения селеновых аналогов

серосодержащих аминокислот. Селеноаминокислоты селенометионин и селеноцистеин (также и меченые) получают при выращивании пекарских дрожжей на среде свободной от серы в присутствии селенита. После кислотного гидролиза дрожжевой биомассы выделяются селеноаминокислоты с использованием химических методов.

Разработан метод получения белков, содержащих селенометионин, при культивировании микроорганизмов – ауксотрофов по метионину при добавлении к питательной среде селенометионина. Затем проводят выделение селенометионинзамещенных белков.

Получение белковых изолятов из биомассы дрожжей, обогащенных селеном, является одним из перспективных направлений получения селенсодержащих белков.

Технология получения автолиза дрожжей

Получение автолизированной микробной биомассы или растворимого белка не требует капитальных вложений для создания специализированного оборудования или получения дорогостоящих ферментных препаратов, поэтому может рассматриваться как дополнительная стадия в технологии получения продуктов микробного синтеза широкого спектра применения.

Следует подчеркнуть, что Международная Организация питания и сельского хозяйства (FAO) предсказывает резкое увеличение пропасти в обеспечении белком между развитыми и развивающимися странами. В настоящее время, по меньшей мере, 25% мирового населения страдает от голода или недостатка питания, при этом несоразмерно большая часть этого населения живет в развивающихся странах, где засушливый климат и мало плодородные почвы затрудняют ведение продуктивного сельского хозяйства. И, тем не менее, продуктивность сельского хозяйства во всех его отраслях постоянно повышается практически по всему миру. В этом процессе, безусловно, определенную помощь окажут и различные биотехнологические подходы, призванные усовершенствовать традиционные сельскохозяйственные приемы. При этом следует отметить, что во многих регионах Земли постоянно появляются пищевые излишки, особенно велико их количество в Северной Америке и Европе, где практически постоянна популяция людей. Кроме того, ряд стран, ранее являвшихся чистыми импортерами большинства пищевых продуктов (Индия, Индонезия), в настоящее время сумели наладить самообеспечение. Однако, несмотря на это, в мире имеет место несбалансированность в снабжении населения хлебом, и данный недостаток постоянно усугубляется в связи с изменениями в неблагоприятную сторону глобальной погоды (сильные ливни, засухи и т.п.), а также национальными и межнациональными войнами, сопровождаются разрушением сельского хозяйства и колоссальными перебоями в распределении продуктов питания. По данным ряда специалистов, мировой дефицит белка оценивается в 30–35 млн. т. Причем

степень дефицита варьирует в зависимости от страны и должна рассматриваться в рамках каждой национальной экономики.

Сдвиг от злаковой к мясной диете в различных странах приобретает значительные масштабы и ведет к увеличению расхода зерна в пересчете на человека, поскольку требуется от 3 до 10 кг зерна, чтобы произвести 1 кг мяса путем повышения эффективности животноводства и совершенствования кормовых программ. Поиски дополнительных источников белка предпринимаются постоянно и повсеместно. Так, например, широко внедряются новые сельскохозяйственные приемы; создаются новые сорта злаков, характеризующиеся повышенным содержанием белка; там, где это позволяют климатические и другие природные условия, интенсивно внедряется выращивание сои и земляного ореха; белки начинают экстрагировать путем ультрафильтрации из определенных жидких отходов; и, наконец, разрабатываются новые нетрадиционные способы производства белковых соединений. В частности, определенные успехи достигнуты в получении белка с помощью микробного синтеза. Данное направление получило название производства белка одноклеточных организмов (БОО), поскольку большинство микроорганизмов, используемых для этих целей, растут в виде одноклеточных или мицелиальных (нитевидных) особей, а не как сложные многоклеточные организмы (растения или животные).

Полагают, что применение одноклеточного белка, получаемого на доступных и экономичных субстратах, для корма сельскохозяйственных животных окажет большое влияние на улучшение питания людей в результате снижения их конкуренции с животными за растительную пищу, богатую белком.

Преимущества микроорганизмов как продуцентов белка состоят в следующем: они обладают высокой скоростью накопления биомассы, которая в 500–5000 раз выше, чем у растений и животных; микробные клетки способны накапливать очень большие количества белка (дрожжи – до 60%, бактерии – до 75% по массе); в микробиологическом производстве вследствие высокой специфичности микроорганизмов отсутствует многостадийность процесса; а собственно процесс биосинтеза осуществляется в мягких условиях при температурах 30–45 °С, значении рН среды 3–6 и давлении около 0,1 МПа. Кроме того, микробиологический путь получения богатой белком биомассы менее трудоемок, в сравнении с получением сельскохозяйственной продукции и органическим синтезом белка. В целом, данные преимущества и определили быстрое развитие технологии производства микробного белка, которое в настоящее время является одной из наиболее крупнотоннажных отраслей биотехнологии, и открывает возможность промышленной продукции различных кормовых добавок для животноводства и птицеводства с помощью микроорганизмов. Причем получаемые целевые продукты характеризуются высокой кормовой ценностью.

Следует подчеркнуть, что большое число компаний во всем мире участвует в реализации этих процессов и в настоящее время производится значительное количество белка одноклеточных организмов.

Основной целью продукции одноклеточного белка является его высокое содержание в препарате. Однако следует иметь в виду, что помимо белка микроорганизмы содержат и другие БАВ: углеводы, витамины, нуклеиновые кислоты и различные минеральные соединения, часть из которых может оказывать неблагоприятное воздействие на организм, при их употреблении в пищу человеком или животными. Так, вследствие ограниченной способности человека деградировать нуклеиновые кислоты, прежде чем использовать одноклеточный протеин в качестве пищевого продукта, он должен подвергаться специальной обработке. Тем не менее, высокое содержание белка, слабый запах и мягкий вкус одноклеточного протеина в сочетании с легкостью хранения придают существенную ценность данному продукту питания.

Кроме того, одноклеточный белок с успехом может применяться в так называемых водных культурах: например на фермах для разведения креветок, форели, семги и т.п.

Преимущества микробного белка перед животным (в отношении скорости получения) иллюстрируются следующими показателями: продукционная способность коровы весом в 250 кг и 250 г дрожжей практически одинакова. В то время, как корова будет прибавлять в день по 200 г веса, микроорганизмы за этот же период времени способны произвести (теоретически, в идеальных условиях культивирования) до 25 т биомассы. Однако корова обладает уникальной особенностью превращать (конвертировать) траву в богатое белком и другими ценными веществами молоко. Несмотря на многолетние попытки разработки конкурентоспособного способа подобного типа конверсии, все они остались пока безрезультатными. В этой связи, в настоящее время коровы рассматриваются как "живые, самовоспроизводящиеся и съедобные «ферментеры»». Поэтому вопрос о замене коров микроорганизмами в пределах обозримого будущего остается открытым.

Применимость и токсикология одноклеточного белка

Помимо чисто технологических и экономических сложностей, существенное влияние на развитие производства одноклеточного белка оказывают географические, политические, социологические и психологические факторы, которые порой оказываются в значительной степени определяющими. В частности, большое внимание уделяется проблемам безопасности, питательной ценности и применимости данного продукта.

Природа сырьевого материала, используемого в производстве одноклеточного белка, представляет известную опасность, например, потенциальная канцерогенность углеводородов нефти и *n*-парафинов,

наличие тяжелых металлов или других загрязняющих примесей в минеральных солях, присутствие остатков растворителей после экстракции продукта, а также токсинов (в частности, микотоксинов), образуемых некоторыми микроорганизмами (например, определенными грибами), и т.д.

Поскольку микроорганизм-продуцент должен быть непатогенным и нетоксикогенным, а его продукты метаболизма безвредными, строгий санитарный режим и различные процедуры контроля качества должны постоянно осуществляться в течение всего биотехнологического процесса в целях предотвращения порчи целевого продукта, а также загрязнения его патогенными или токсикогенными микроорганизмами.

Применимость одноклеточного белка как пищевого продукта для человека зависит не только от его безвредности и питательной ценности, но также и от ряда других факторов. Помимо обычного нежелания людей потреблять вещества, получаемые с помощью микроорганизмов, процесс питания характеризуется многими сложными психологическими, социальными и религиозными аспектами. У различных культур существует большое число специфических ассоциаций с едой, общественным положением, а также символической значимостью различных видов пищи. Кроме того, необходимо учитывать и более явные особенности, связанные с применимостью продукта: запах, цвет, вкус, консистенция и внешний вид. Так, например, одноклеточный белок может использоваться в качестве пищи для человека, по-видимому, лишь при относительно низком его количественном содержании в обычных традиционных продуктах. Поэтому в настоящее время он может использоваться преимущественно в качестве кормового источника для различных видов сельскохозяйственных животных, птиц или рыб.

И все же в последнее время некоторые промышленные процессы направлены на получение микробных продуктов для человека, например, грибной белок фирмы Ranks Novis McDougall/ICI. К факторам, помимо технологических, влияющих на расширение биотехнологического производства одноклеточного белка относятся, главным образом, политические и социальные аспекты использования для его получения нефтепродуктов в качестве субстратов для культивирования продуцентов, поскольку последние могут быть существенно загрязнены канцерогенными веществами. В силу этого обширные программы, связанные с биотехнологическим производством одноклеточного белка, в Японии, Италии и Великобритании в свое время были приостановлены, а основные усилия биотехнологов были направлены на его производство из этанола или метанола либо на основе различных органических отходов, являющихся потенциально менее опасными.

Одноклеточный белок на высокоэнергетических субстратах

Представляющие существенное коммерческое значение как источники энергии материалы (нефтегаз, метанол, этанол, метан и налканы) привлекают

внимание биотехнологов в качестве субстратов для реализации ряда биотехнологических процессов, основными участниками которых являются бактерии и дрожжи. Естественно, что в разработке технологий использования подобных материалов принимают участие многие нефтяные компании, а сама проблема обсуждалась и изучается различными научно-исследовательскими учреждениями.

При этом наиболее подробно как сырье для получения одноклеточного белка изучался метан, хотя в настоящее время его использовании для данной цели сопряжено со значительным количеством трудностей. В противоположность данному субстрату, большое значение придается метанолу. Так, компанией ICI в Великобритании разработана технология крупномасштабной (75000 л) ферментации растительного сырья для метанолутилизирующих бактерий. Компании Hoechst (Германия) и Mitsubishi (Япония) также работают над разработкой аналогичных технологий, предназначенных для использования в качестве продуцентов биомассы дрожжевых клеток, вместо, бактериальных.

Продукт, выпускавшийся компанией ICI (прутин), использовался исключительно в качестве корма для животных. Метанол как источник углерода для получения одноклеточного белка обладает существенными преимуществами, в сравнении с *n*-парафинами. Так, в нем отсутствуют потенциально токсичные вещества, он легко растворим в водной фазе в любых концентрациях и при культивировании на средах с метанолом в получаемой биомассе отсутствуют остаточные количества углерода. Кроме того, имеют важное значение и аспекты технического порядка. Завод компании ICI для производства прутинина является единственным в своем роде в западном мире и в настоящий момент вследствие довольно высоких цен на метанол, практически не функционирует с надлежащим экономическим эффектом, поскольку стоимость метанола составляет примерно 50% от стоимости получаемого продукта.

В США стоимость одноклеточного белка, полученного на метаноле в 2–5 раз дороже, чем при его производстве из рыбной муки.

На Среднем Востоке низкая стоимость метанола и относительно высокие цены на рыбную муку в сочетании с необходимостью производства большого количества животных продуктов делают одноклеточный белок типа ICI-прутина весьма привлекательным.

Относительно благоприятная ситуация для производства одноклеточного белка на *n*-парафинах нефти сложилась в 70-е гг. в Советском Союзе, что было связано с низкими внутренними ценами на нефть. В этой связи, были построены три крупных завода по культивированию дрожжей рода *Candida*. В лучшие годы продукция дрожжевого белка достигала 1 млн. т сухой биомассы и обеспечивала потребности сельского хозяйства (добавка в корм животных) и промышленности. Однако в середине 80-х гг. производство на данных заводах было законсервировано, в связи с высокой себестоимостью микробного белка (цена была в 2 раза выше, чем кормового соевого белка).

Широкий спектр исследований, выполненных в 60-70-е гг. по использованию метанола и сходных соединений в качестве субстратов для получения одноклеточного белка, дали значительный стимул для совершенствования ферментационных технологий, направленных на его производство в крупномасштабных количествах.

В настоящее время аэробное биотехнологическое производство прутина является одним из самых крупномасштабных из непрерывных процессов и, по существу, представляет собой одну из крупнейших биотехнологических систем в мире, что, в свою очередь, вследствие необходимости строжайшей экономии, обусловило прогресс в разработках биореакторов с восходящим воздушным потоком (эрлифтных ферменторов).

Весьма подходящим сырьем для получения одноклеточного белка, предполагаемого к использованию в пищу человека, является этанол. В ближайшем будущем перспективы биотехнологического производства одноклеточного белка на этаноле будут определяться рядом локальных факторов: возможностями расщепления этилена, наличием излишков углеводов сельскохозяйственного происхождения, политическими ситуациями, в региональной экономической самостоятельности, а также состоянием уровня мирового производства.

Одноклеточный белок на отходах

Рециклизация отходов (солома, выжимки, отходы цитрусовых, сыворотка молока, меласса, навоз животных, сточные воды), образующиеся в различного рода производствах, представляет существенную проблему биотехнологии. В отдельных местах количество таких отходов достигает значительных величин, что является источником серьезного загрязнения водных систем и окружающей среды в целом. В этой связи, использование данных органических отходов может способствовать достижению двух целей: снижению загрязнения и созданию пищевого белкового препарата.

Привлекательность растительных отходов, содержащих углеводы, состоит в их низкой стоимости, в результате чего снижается стоимость реализации биотехнологического процесса, а также в том, что одноклеточный белок может быть получен при относительно небольшом количестве технологических операций.

При этом обоснованием для разработки технологии производства одноклеточного белка на растительных отходах является их пригодность для микробной конверсии, наличие в достаточных количествах и в течение длительного периода, а также уровень существующих внедренных технологий. Процессы, использующие отходы в биотехнологическом производстве одноклеточного белка, базируются на применении различных дрожжевых организмов в подходящих ферменторных системах. Субстратами для организмов-продуцентов служат: меласса (*Sacharomyces cerevisiae*), молочная сыворотка в производстве сыра (*Kluyeromyces fragilis*), отходы

крахмального производства с использованием двух видов дрожжей (*Endomycopsis fibuligera* и *Candida utilis*).

Питательная ценность дрожжей, получаемых в данном технологическом процессе, была определена в многочисленных обширных экспериментах по скармливанию полученного одноклеточного белка различным видам животных (свиньям, цыплятам, телятам и т.п.). Результаты проведенных исследований показали хороший рост животных и отсутствие неблагоприятных последствий.

Заслуживает внимания новый продукт – *PeKilo*, представляющий собой грибной белок, получаемый путем ферментации углеводов мелассы, молочной сыворотки, отходов фруктов, гидролизатов древесины или сельскохозяйственного сырья. Данный продукт характеризуется хорошим аминокислотным составом и богат витаминами. Испытания на животных показали, что *PeKilo*-протеин является хорошим источником белка в питании свиней, телят, бройлеров, кур-несушек. Данный белковый продукт производится в условиях непрерывного культивирования. В производстве в качестве его продуцента используются мицелиальные грибы, а получаемый продукт обладает выраженной фиброзной структурой, что делает готовый препарат удобным для применения.

В Великобритании компания *Ranks Hovis McDoudall* совместно с корпорацией *ICI* поставляет на рынок другой грибной белок (*mycoprotein*), получаемый при выращивании гриба *Fusarium* на простых углеводах. Непохожий почти ни на один из других типов, одноклеточный белок микопротеин производится для введения в продукты питания для человека. Данный продукт производится путем непрерывной ферментации. Разработка и внедрение микопротеина оценивается по произведенным затратам более чем в 40 млн. фунтов стерлингов, а осуществление проекта заняло свыше 20 лет. Первоначально процесс осуществлялся посредством одноразовой ферментации, но затем была разработана технология непрерывного культивирования. Кульминацией проекта считается не только продукция грибной биомассы, но и получение ценного пищевого продукта.

Целлюлоза в сельскохозяйственных и лесных материалах, а также в различных отходах должна стать в недалеком будущем основным сырьевым компонентом для осуществления многих биотехнологических процессов, включая и технологию получения одноклеточного белка. Целлюлоза в ее естественной ассоциации с лигнином до сих пор является наиболее распространенным органическим веществом для биологической конверсии.

Различные научно-исследовательские учреждения ищут пути предварительной обработки биологических материалов подобного рода с целью деструкции лигнинового барьера (преимущественно физическими и химическими методами). Удаление лигнина из лигноцеллюлозы делает последнюю потенциальным источником получения энергии для жвачных животных, способных ее использовать в качестве источника питания. Таким путем лигноцеллюлозные материалы (солома, выжимки и в некоторых

случаях даже древесина) могут стать полезными кормовыми препаратами для сельскохозяйственных животных.

Многие виды грибов долгое время служили пищей для человека и выращивались на лигноцеллюлозных материалах. Данные технологии служат примерами низкоэнергетических технологических систем. При этом технологические процессы различаются по типу используемого субстрата или получаемого целевого продукта, а также по степени сложности методологии реализации процесса.

В то время, как большинство процессов получения одноклеточного белка основано на жидкостных ферментациях, многие из современных способов деградации целлюлозы базируются на ферментации с пониженным увлажнением, - «твердофазная ферментация». Во многих странах некоторая часть соломы, образующейся в сельскохозяйственных производствах, традиционно используется для компостирования с лнавозом для получения субстрата, пригодного при выращивании грибов (*Agaricus lisporus*).

Так, ежегодно "грибная" промышленность Великобритании потребляет около 300 тыс. т соломы для получения компоста, применяющегося для выращивания грибов.

Технологии, основанные на использовании микроорганизмов и методов биоинженерии в целях производства больших количеств биомассы, в целом очень напоминают сельскохозяйственное производство. Однако, так называемый "грибной процессинг", рассматриваемый в качестве примера общей биотехнологии, считается незначимой областью "новых" биотехнологических разработок, хотя в настоящее время в различных странах мира в больших масштабах реализуются технологии выращивания «съедобной» грибной биомассы на искусственных питательных субстратах.

Новшества в данную область научных исследований и сферу биотехнологического производства стали проникать сравнительно недавно, однако "награда" в ближайшем будущем окажется, по оценкам специалистов, огромной. Биотехнология, как ни парадоксально, не всегда должна быть высоко технологичной. В развивающихся странах, где дорогостоящие системы могут оказаться неприемлемы в виду высокой стоимости реализации технологий и отсутствия грамотных, подготовленных высококвалифицированных специалистов, различного рода новые биотехнологические разработки целесообразно использовать для совершенствования существующих традиционных микробиологических технологий получения БАВ.

Основными примерами твердофазной ферментации являются различные типы обработки ряда пищевых продуктов, применяющиеся в странах Востока. В данных процессах некоторые материалы, такие как горох, бобы, отруби и т. п., служат объектами микробной переработки (гидролиз крахмала и белков) с целью получения продуктов улучшенного качества (улучшение аромата продукта, обогащение его белками и аминокислотами). В частности, примерами традиционной пищи на Востоке являются мисо, соевый соус и др., обычно изготавливаемые в "домашних" масштабах.

Однако многие из этих традиционных блюд в настоящее время составляют основу крупных промышленных производств, требующих существенного биотехнологического оснащения. Такие блюда и ароматизированные соусы медленно, но верно, распространяются на Запад и несомненно станут в недалеком будущем составной частью ежедневного меню.

Одноклеточный белок из сельскохозяйственного сырья

Концепция производства растительной биомассы в качестве материала для биотехнологических процессов очень актуальна и важна. В настоящее время такого рода программы используются в большей степени для производства этанола, но вполне обоснованно полагать, что маниока, сахарный тростник и некоторые виды пальм могут явиться перспективным сырьем, которое подвержено быстрым ферментативным обработкам с достаточно высоким экономическим эффектом. В случае, если лигноцеллюлоза окажется способной легко и экономически выгодно утилизироваться какими-нибудь микроорганизмами, то большинство регионов мира получат готовые питательные субстраты, пригодные для различных биотехнологических процессов, в том числе и для получения одноклеточного белка.

Одноклеточный белок из водорослей

Одно время существовал повышенный интерес к проблеме использования водорослей в качестве источника одноклеточного белка, поскольку они хорошо растут в открытых прудах и нуждаются только в CO₂ как источнике углерода, а также в солнечном свете как источнике энергии для фотосинтеза. Такие водоросли, как *Chlorella* и *Scenedesmus*, долгое время использовались в пищу в Японии, а *Spirulina* широко применялась в Африке и Мексике.

В некоторых странах мира водоросли выращивают в прудах или лагунах для удаления с их помощью ряда органических загрязнений, а образующуюся биомассу собирают, высушивают и добавляют в порошкообразном виде в корм животным.

Экономические аспекты применения одноклеточного белка

Экономическая целесообразность одноклеточного белка определяется его конкурентной способностью по сравнению с существующими продуктами. Препараты микробного белка могут храниться в течение длительного времени и транспортироваться на значительные расстояния.

Применение одноклеточного белка предполагается в будущем преимущественно в качестве кормовых добавок в пищу сельскохозяйственных животных в целях замены других белковых материалов (таких, как соевая мука или рыбная мука).

Предполагается, что биотехнологическое производство одноклеточного белка в промышленных масштабах не должно нарушать установившиеся в природе экологические равновесия (балансы). С этой целью в биотехнологии его получения устраняется вероятность появления каких-либо синтетических соединений и применяются (по возможности) технологии, основанные на использовании систем рециклизации, для предотвращения загрязнения окружающей среды. Процессы получения одноклеточного белка обычно масштабны, энергоемки, и, кроме того, должны осуществляться в строго асептических условиях, что требует довольно дорогого оснащения, которое должно постоянно очищаться и подвергаться стерилизации.

Обязательным условием является предотвращение попадания в конечный продукт посторонней микрофлоры, особенно патогенной для человека.

Для того, чтобы производство одноклеточного белка было экономически выгодным, масштабы его должны достигать по крайней мере 50000 т в год готового продукта. А это, в свою очередь, требует наличия соответствующего обеспечения сырьевым материалом, который желательно иметь в непосредственной близости от основного производства. Кроме того, биотехнологические производства одноклеточного белка испытывают довольно большие потребности в воде, необходимой и для процессов завершающей обработки целевого продукта и охлаждения.

Широкомасштабные процессы, разрабатываемые для биотехнологического производства одноклеточного белка, в значительной степени зависят от успехов современной биотехнологии. В этой связи, в его производстве участвуют на разных этапах специалисты в области микробиологии, биохимии, генетики, химии и химической инженерии, пищевой технологии, сельского хозяйства, животноводства, экологии и токсикологии, медицины, ветеринарии и конечно экономики.