

Д. А. Новиков

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ

*Рекомендовано
Учебно-методическим объединением
по естественно-научному образованию
в качестве пособия для студентов
учреждений высшего образования, обучающихся
по специальности 1-31 01 02 «Биохимия»*

УДК 604.4:615(075.8)
ББК 35.66я73-1
Н73

Рецензенты:

кафедра физиологии и биохимии Белорусского государственного
университета физической культуры (заведующий кафедрой
кандидат биологических наук, доцент *И. Н. Рубчяня*);
кандидат биологических наук, доцент *С. В. Федорович*

Новиков, Д. А.

Н73 Фармацевтическая биотехнология : пособие / Д. А. Новиков. –
Минск : БГУ, 2018. – 343 с.
ISBN 978-985-566-571-8.

Рассмотрены особенности биотехнологических процессов получения основных типов лекарственных субстанций, применяемых в медицине, ветеринарии и других областях народного хозяйства, а также методы их выделения, очистки и фракционирования. Проанализирована процедура создания нормативно-технической документации на продукты фармацевтической биотехнологии, приведена их характеристика.

Для студентов учреждений высшего образования, обучающихся по специальности 1-31 01 02 «Биохимия».

УДК 604.4:615(075.8)
ББК 35.66я73-1

ISBN 978-985-566-571-8

© Новиков Д. А., 2018
© БГУ, 2018

ПРЕДИСЛОВИЕ

Фармацевтическая биотехнология является важнейшим разделом современной биологии. В конце XX в. она стала одной из приоритетных областей в мировой науке и экономике.

Развитие исследовательской деятельности в сфере фармацевтической биотехнологии пришлось на 80-е гг. XX в., когда в науке и практике стали применяться новые методологические и методические разработки, возникла реальная возможность извлечь из этого максимальную пользу с точки зрения экономики. По прогнозам, уже в XXI в. биотехнологические товары должны составлять четверть мировой продукции.

В 80-е гг. XX в. в Беларуси значительно расширилась научно-исследовательская база, ее данные стали активно использоваться в производстве. В этот период в стране была разработана и внедрялась первая общенациональная программа по биотехнологии, были созданы межведомственные биотехнологические центры, подготовлены квалифицированные кадры специалистов-биотехнологов, организованы биотехнологические лаборатории в научно-исследовательских учреждениях и вузах.

Однако в дальнейшем внимание к проблемам биотехнологии в целом в стране ослабло, а объемы финансирования в данном направлении сократились. Это привело к снижению в Беларуси уровня развития биотехнологии как науки, особенно такой ее области, как генетическая инженерия.

Что касается более современных биотехнологических процессов, связанных с производством лекарственных веществ, то они основаны на методах рекомбинантных дезоксирибонуклеиновых кислот (ДНК), а также на использовании иммобилизованных ферментов, клеток или клеточных органелл. Современная фармацевтическая биотехнология – это наука о генно-инженерных и клеточных методах и технологиях соз-

дания и использования генетически трансформированных биологических объектов с целью интенсификации производства или получения новых видов продуктов различного назначения.

В пособии рассматриваются основные объекты, общие принципы осуществления биотехнологических процессов, сферы применения продуктов биотехнологии, способы промышленного получения очищенных биологически активных субстанций биотехнологического происхождения в промышленном биотехнологическом производстве.

В издании аккумулируются базовые принципы биотехнологического производства основных групп фармацевтических субстанций, очистки биологически активных соединений, таких как белки, аминокислоты, витамины, органические кислоты, липиды, нуклеотиды и нуклеиновые кислоты, сахара и полисахариды, антибиотики, алкалоиды, различные продукты брожения, гормональные препараты, ферменты, пищевые добавки, антисыворотки, а также основные направления их практического применения.

В настоящее время микробиологическая промышленность использует тысячи штаммов разнообразных микроорганизмов. В большинстве случаев они усовершенствованы путем индуцированного мутагенеза и последующей селекции. Это позволяет вести широкомасштабный синтез различных веществ.

Некоторые белки и вторичные метаболиты могут быть получены только посредством культивирования клеток эукариот. Растительные клетки служат источником ряда соединений: атропина, никотина, алкалоидов, сапонинов и др. Клетки животных и человека также продуцируют биологически активные соединения: например, клетки гипофиза – липотропин, стимулятор расщепления жиров, и соматотропин – гормон, регулирующий рост.

Созданные перевиваемые культуры клеток животных, продуцирующие моноклональные антитела, широко применяются для диагностики заболеваний. В биохимии, микробиологии, цитологии несомненный интерес вызывают методы иммобилизации как ферментов, так и целых клеток микроорганизмов, растений и животных. В ветеринарии широко используются такие биотехнологические методы, как культура клеток и зародышей, овогенез *in vitro*, искусственное оплодотворение. Все это свидетельствует, что биотехнология – источник не только новых продуктов питания и медицинских препаратов, но и энергии и новых химических веществ, а также организмов с заданными свойствами.

Глава 1 РАЗВИТИЕ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ В МИРЕ В XX в.

Фармацевтическая промышленность представляет собой отрасль по разработке, производству и продвижению на рынок лицензируемых лекарственных препаратов и медикаментов. Ее характеризует разнообразие форм законодательного и государственного регулирования в отношении патентирования, тестирования, обеспечения безопасности и эффективности производимых лекарств.

Появление аптек относится к Средним векам. Первая из них открылась в 754 г. в Багдаде, затем они быстро распространились в средневековых арабских странах и Европе. К XIX в. многие аптеки в Европе и Северной Америке превратились в крупные фармацевтические компании. Большая часть нынешних фармацевтических компаний образовалась еще в конце XIX – начале XX в.

В 1920–1930-е гг. были открыты **инсулин и пенициллин**, ставшие лекарствами, производимыми в широком масштабе. В данный период фармацевтическая промышленность была наиболее развита в Швейцарии, Германии, Италии, Великобритании, США, Бельгии и Голландии. К этому же времени относится разработка законодательства, регулирующего тестирование и процесс одобрения лекарств, требующего использования соответствующих брендов. Стало возможным законодательно отделять рецептурные и безрецептурные лекарства.

В 1950-е гг. велись систематические научные исследования, совершенствовались медицинские знания и технологический процесс производства. В этот период было разработано и получило массовое распространение большое количество новых лекарств, включая **кортизон**, различные сердечные средства. В 1960-е гг. появились транквилизаторы и психотропные препараты, такие как **хлорпромазин**, **халоперидол**, **диазепам**, нашедшие исключительно широкое применение.

Одновременно были предприняты попытки усилить государственное регулирование, ограничить финансовые связи фармацевтических компаний с врачами, выписывающими лекарства. В частности, была создана американская Администрация пищевых продуктов и лекарств (FDA). Выяснилось, например, что бесконтрольное использование одного из новых транквилизаторов (**талидомида**) беременными женщинами привело к рождению детей с различными уродствами.

В 1964 г. Международная медицинская ассоциация приняла Хельсинкскую декларацию, устанавливающую стандарты для клинических исследований и обязывающую фармацевтические компании доказывать эффективность новых лекарств в клинических условиях до запуска их в широкую продажу.

1970-е годы были периодом создания противораковых средств. До 1970-х гг. фармацевтическая промышленность оставалась относительно узкой отраслью экономики. Именно с этого времени начинается период ее бурного развития. Большинство стран принимает жесткое патентное законодательство. С 1978 г. Индия становится центром производства фармацевтической продукции без патентной защиты.

К середине 1980-х гг. малые биотехнологические компании в борьбе за выживание стали активно сливаться с крупными фармацевтическими корпорациями либо продавать им свои акции. Шел процесс консолидации самих фармацевтических компаний, крупнейшие из которых заняли доминирующее положение не только на национальных фармацевтических рынках, но и на глобальном. В 1980-е гг. ужесточилось законодательство в области безопасности и экологии, а новые лекарства, направленные на борьбу с ВИЧ-инфекциями и заболеваниями сердца, стали визитной карточкой этого десятилетия.

1990-е годы ознаменовались волной слияний и поглощений на фармацевтическом рынке и резким ростом контрактов с исследовательскими организациями на проведение клинических испытаний и базовых исследований и разработок. Существенно изменился процесс маркетинга. Интернет предоставил возможность прямых покупок медикаментов потребителями, а также исходных сырьевых материалов – производителями лекарств, что изменило характер бизнеса. В США с принятием в 1997 г. нового законодательства, либерализующего требования к рискам, стала широко распространяться реклама лекарственных средств по радио и телевидению. Появилось новое поколение антидепрессантов, включая наиболее популярный флуоксетин. Начали активно развиваться так называемая альтернативная медицина и производство пищевых добавок, которые усилили конкуренцию

в фармацевтической промышленности. Одновременно фармацевтические компании стали объектом все возрастающей серьезной критики со стороны общественности за попытки «навязать» населению новые болезни и, соответственно, лекарства, направленные на «борьбу» с ними.

Для лучшего понимания особенностей функционирования фармацевтической промышленности необходимо обратиться к понятию «создание новых лекарственных препаратов». Под открытием лекарственных препаратов понимается процесс, с помощью которого проектируются потенциальные лекарства. В прошлом большая часть лекарств появлялась в ходе отделения (изоляции) активных ингредиентов от традиционных медикаментов или в результате случайных открытий. Современная биотехнология концентрируется на исследовании метаболических процессов, происходящих во время той или иной болезни или патогенных состояний, и использует молекулярную биологию и биохимию. Ранние стадии разработки новых лекарств традиционно осуществляются университетами и исследовательскими организациями.

Разработка лекарственного препарата начинается после определения его основных составляющих, ее цель – поиск подходящей формулы и дозы, а также безопасность лекарственного средства. Исследования в этих областях обычно включают в себя стадии *in vitro*, *in vivo* и клинические испытания. Поскольку основные этапы разработки новых лекарств требуют значительных объемов инвестиций, этот процесс осуществляется крупными фармацевтическими компаниями.

Транснациональные корпорации нередко проводят вертикальную интеграцию, работая одновременно в разных сегментах, начиная от поиска и разработки новых лекарств и кончая их производством, контролем качества, маркетингом, продажами и дистрибуцией. Более мелкие компании часто фокусируются на специфических аспектах фармацевтики, таких как разработка отдельных лекарственных компонентов или лекарственных формул.

Процесс поиска и разработки новых лекарств является исключительно капиталоемким. Из всех исследуемых лекарственных ингредиентов только небольшая часть проходит этап одобрения государственными органами и получает разрешение на использование. Во всем мире в среднем лишь 25 новых лекарственных препаратов ежегодно получают разрешение на последующий маркетинг.

Такое разрешение можно получить только после огромных инвестиций в доклиническую разработку и клинические испытания, а также в текущий мониторинг безопасности лекарственных средств. Часть

лекарств не может пройти эту процедуру и не обеспечивает возврата затраченных средств. Если принимать во внимание издержки на разработку таких лекарств, стоимость создания одного успешного лекарственного средства (включая затраты на его маркетинг и дистрибуцию) может достигать 2 млрд долл. Подобные оценки достаточно условны, так как в них не учтены издержки регулирования, государственные субсидии, налоговые льготы и федеральные исследовательские гранты. Именно поэтому реальные издержки вывода на рынок новых лекарств могут быть существенно выше.

В США новые фармацевтические продукты проверяются на безопасность и эффективность Администрацией пищевых продуктов и лекарств. Этот процесс включает в себя предоставление большого объема доклинической информации о новом лекарстве, а также три стадии клинических испытаний. На первой выявляется степень токсичности лекарственного препарата с использованием групп здоровых волонтеров. На второй стадии отрабатываются фармакокинетика, способы применения и дозировка. На третьей, самой продолжительной, определяется эффективность воздействия лекарства на конкретных больных. Часто к этому добавляется четвертая, постмаркетинговая стадия, обеспечивающая безопасность лекарства и фиксирующая побочные эффекты.

В США существуют специальные правила для создателей лекарственных средств против редких болезней, которыми охвачены около 200 тыс. жителей страны. Поскольку стоимость исследований и разработок таких лекарств исключительно высока и осуществлять их финансово невыгодно, Соединенные Штаты стимулируют фармацевтические компании с помощью налоговых льгот, субсидий и предоставления эксклюзивного доступа на рынок таких лекарств в течение определенного времени (как правило, семи лет) независимо от того, защищены такие лекарства патентами или нет.

В 2006 г. общий объем мирового фармацевтического рынка оценивался в 640 млрд долл., из которых почти 50 % приходилось на США. Фармацевтическая промышленность остается одной из самых прибыльных отраслей с рентабельностью продаж на уровне 17 %. Самым продаваемым в мире лекарством являются таблетки для снижения уровня холестерина липитор компании *Pfizer*, годовой объем продаж которых составил в 2008 г. 13 млрд долл., более чем вдвое превысив объем продаж плавикса, сердечно-сосудистого средства компании *Bristol-Myers Squibb*, и антиастматического препарата адвер компании *GlaxoSmithKline*.

В табл. 1 приводятся данные по крупнейшим глобальным фармацевтическим и биотехнологическим компаниям. Все они составляют так на-

зываемую группу *Big Pharma*, к которой относятся компании с объемом продаж свыше 3 млрд долл. и затратами на НИОКР свыше 500 млн долл.

Таблица 1

Крупнейшие глобальные фармацевтические компании (2008 г.)

Компания	Страна	Объем продаж, млрд долл.	Объем НИОКР, млрд долл.	Численность занятых, тыс. чел.
<i>Novartis</i>	Швейцария	53,3	7,1	138
<i>Pfizer</i>	США	48,4	7,6	122,2
<i>Bayer</i>	Германия	44,2	1,8	106,2
<i>GlaxoSmithKline</i>	Великобритания	42,8	6,4	106
<i>Johnson & Johnson</i>	США	37,0	5,3	102,7
<i>Sanofi-Aventis</i>	Франция	35,6	5,5	100,7
<i>Hoffmann-La Roche</i>	Швейцария	33,5	5,3	100,3
<i>AstraZeneca</i>	Великобритания	26,5	3,9	50,0
<i>Merck & Co</i>	США	22,6	3,9	74,3
<i>Abbott Laboratories</i>	США	22,5	2,3	66,8
<i>Wyeth</i>	США	20,3	3,1	66,7
<i>Bristol-Myers Squibb</i>	США	17,9	3,1	60,0
<i>Eli Lilly and Company</i>	США	15,7	3,1	50,0
<i>Amgen</i>	США	14,3	3,4	48,0
<i>Boehringer Ingelheim</i>	Германия	13,3	2,0	43,0
<i>Shering-Plough</i>	США	10,6	2,2	43,0
<i>Baxter International</i>	США	10,4	0,6	38,4
<i>Takeda Pharmaceutical Co.</i>	Япония	10,3	1,6	15,0
<i>Genentech</i>	США	9,2	1,8	33,5
<i>Procter & Gamble</i>	США	8,9	н.св.	29,3
Всего		497,5	70,8	1342

Любая фармацевтическая компания может обратиться в соответствующие государственные органы и получить патент на лекарство или процесс изготовления его с эксклюзивными правами, срок действия которого обычно составляет 20 лет. Однако эта процедура включает в себя очень жесткое тестирование, проверки, что занимает 10–15 лет, после чего компания получает разрешение на маркетинг и продажу своего лекарства. Патентная защита дает возможность собственнику патента возмещать затраты на научные исследования и разработки за счет высоких прибылей от реализации брендированных лекарств. После истечения сроков действия патента конкурирующими компаниями обычно разрабатываются так называемые лекарства-дженерики (англ. *generic* – лекарство-копия), создание и процесс одобрения которых менее затратный, что позволяет осуществлять продажу таких лекарств по более низким ценам. Часто компания – собственник брендового лекарства начинает производить соответствующие дженерики еще до момента окончания срока действия патента в целях захвата рынка.

Рынок в этой сфере отличается высокой интенсивностью слияний, поглощений и кооперации, в процессе которых используются взаимодополняющие возможности компаний. Небольшие фармацевтические фирмы могут обладать новыми лекарствами, но не иметь достаточных продажных и маркетинговых мощностей. Наоборот, у крупных корпораций часто имеются незагруженные мощности в этой сфере. Соответственно, и те и другие ищут совместные возможности повышения капитализации за счет синергетического эффекта кооперации.

Обычно фармацевтические компании тратят значительные средства на рекламу, маркетинг и лоббирование своей продукции. В США на цели продвижения лекарств на рынок эти компании ежегодно затрачивают около 20 млрд долл. Реклама осуществляется через медицинские журналы, а также по медиаканалам. В некоторых странах, в том числе в США, с такой рекламой разрешено обращаться непосредственно к населению. Фармацевтические компании обычно нанимают специальный персонал для продвижения лекарств среди врачей и в медицинских учреждениях. В некоторых странах, прежде всего в США, компании лоббируют свои интересы в политических кругах. Маркетинг рецептурных лекарств в США регулируется специальным федеральным законом от 1987 г.

Медицинские работники и практикующие врачи являются одними из наиболее важных участников фармацевтического рынка, поскольку они выписывают рецепты, определяющие, какими лекарствами будут

пользоваться пациенты. Влияние на врачей – ключевой элемент процесса продаж рецептурных лекарств.

Фармацевтическая компания среднего размера обычно имеет около 1 тыс. торговых представителей; в крупных корпорациях их количество достигает десятков тысяч человек. В США численность торговых агентов составляет около 100 тыс. Только за четыре года (1999–2003) число агентов возросло в два раза. На оплату работы своих представителей с медицинскими учреждениями фармацевтические компании ежегодно направляют около 5 млрд долл.

Фармацевтическая промышленность все чаще оказывается в центре противоречивых оценок и подвергается критике со стороны общественности. Поводами для этого, в частности, являются: оказание компаниями давления на врачей и медицинские учреждения с помощью торговых представителей, включая предоставление «маркетинговых подарков» и необъективной информации; агрессивная реклама в журналах и на конференциях; финансирование независимых медицинских учреждений и проведение кампаний по здоровому образу жизни; лоббирование в среде врачей и политиков (особенно в США); спонсирование медицинских школ и лечебных курсов; финансирование постоянных образовательных семинаров с оказанием влияния на содержание резюме медицинских специалистов; наем (привлечение) врачей в качестве платных консультантов в медицинские консультационные советы и др.

Согласно независимым оценкам фармацевтическая промышленность тратит на цели лоббирования больше средств, чем какая-либо другая отрасль экономики США. За период с 1998 по 2006 г. компаниями на это было потрачено около 1 млрд долл. Часто фармацевтические компании обвиняют в «продаже болезней» (чрезмерном использовании медикаментозных средств) для расширения рынка применения лекарств, а также в предоставлении недостоверной информации медикам, которые в результате выписывают больным дорогие лекарства, хотя другие могут быть дешевле и эффективнее.

На рис. 1, 2 отражены положительные и отрицательные стороны восприятия фармацевтической промышленности общественностью в Китае, Великобритании, Японии, Мексике, Южной Африке и США.

Современная наука имеет большие возможности для создания новых лекарств. Сегодня население развитых стран живет в среднем на 30 лет дольше, чем сто лет назад. Сокращение смертности и существенный прогресс в качестве жизни в значительной мере являются заслугами фармацевтической промышленности.

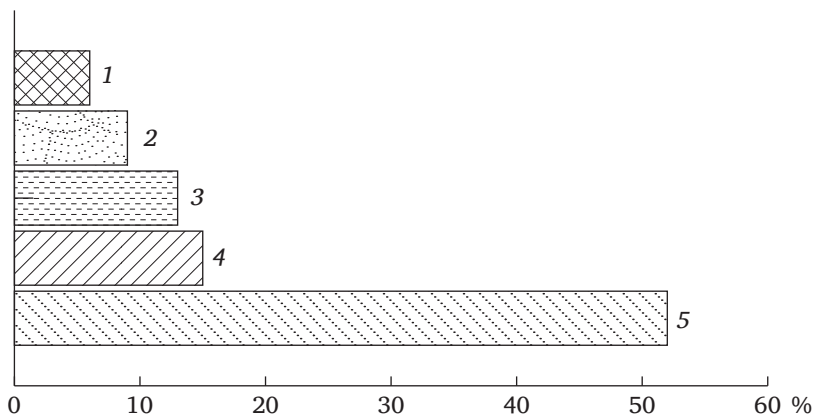


Рис. 1. Важнейшие положительные характеристики фармацевтической промышленности, процент опрошенных: 1 – сотрудничество с медицинским сообществом (6 %); 2 – повышение продолжительности жизни (9 %); 3 – качественные и эффективные лекарства (13 %); 4 – эффективный производственный процесс и дистрибуция (15 %); 5 – высокий уровень инноваций, производство новых лекарств (52 %)

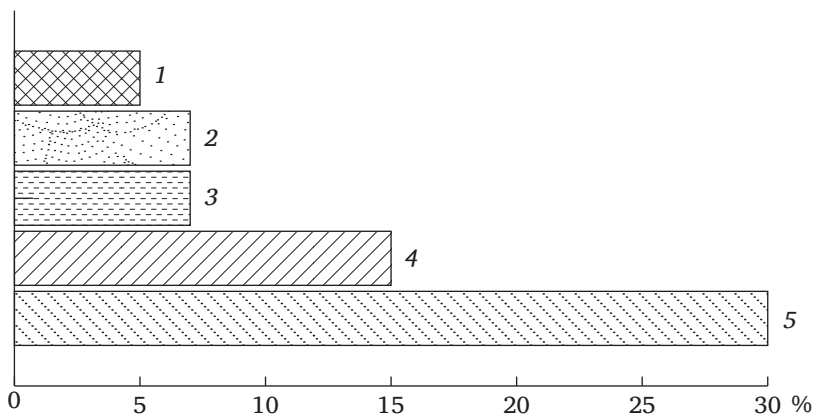


Рис. 2. Важнейшие негативные характеристики фармацевтической промышленности, процент опрошенных: 1 – агрессивный маркетинг (5 %); 2 – отсутствие прозрачности в отношении рисков и клинических испытаний (7 %); 3 – отсутствие социальной ответственности и этики (7 %); 4 – акцент на прибыльности и более дорогих лекарствах в ущерб более дешевым (15 %); 5 – высокие цены и недоступность лекарств (30 %)

Ключевой вклад фармацевтической отрасли в прогресс медицины связан с использованием фундаментальных исследований для создания инновационных лекарственных средств. Более ста лет назад был получен аспирин, с тех пор научные и технологические достижения в фармацевтической индустрии (прежде всего благодаря исследованиям генома человека и индивидуального состава клеток) позволили успешно бороться со многими сложными заболеваниями и устанавливать их причины.

Все новые медицинские препараты, появляющиеся на рынке, – результат длительного, дорогого и рискованного процесса исследований и разработок, проводимых фармацевтическими компаниями. За последние десятилетия издержки вывода новых лекарств на рынок растут экспоненциальными темпами. Как видно из рис. 3, за тридцать лет суммарные издержки вывода новых лекарств на фармацевтический рынок в развитых странах выросли почти в 10 раз. Высокий риск неудачи, расходы на длительные клинические испытания и растущие затраты на получение разрешения от государственных органов – вот главные факторы их быстрого роста.

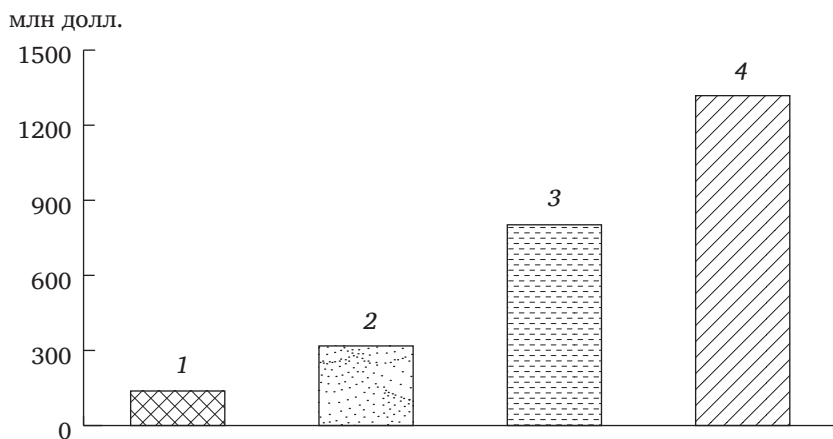


Рис. 3. Стоимость вывода новых лекарственных препаратов на рынок:
1 – 1975 г.; 2 – 1987 г.; 3 – 2001 г.; 4 – 2006 г.

Многие перспективные субстанции, достигая достаточно продвинутой стадии клинических испытаний, затем отвергаются. Процент лекарств, оказывающихся на рыночной стадии реализации, остается очень низким (по разным оценкам, 1–2 на 10 тыс.). Финансирование таких исследований и разработок требует значительных объемов денежной на-

личности, которую фармацевтическая компания способна генерировать только в том случае, если выводит новые лекарственные препараты сразу на несколько национальных рынков в максимально короткие сроки. Иными словами, такие компании неизбежно должны быть глобальными.

Процесс исследований и разработок в фармацевтической промышленности складывается из нескольких стадий. Первая – это получение патента и начало доклинических исследований. Ее продолжительность составляет обычно 4 года. Затем наступает стадия клинических испытаний, включающая в себя три фазы, которая длится около 7 лет. Наконец, последняя стадия (или четвертая фаза) продолжительностью 3 года – это получение разрешения на маркетинг лекарства, формирование цены и другие административные процедуры. Весь процесс занимает в среднем 13–15 лет.

Из общих объемов затрат на НИОКР, составляющих в фармацевтических компаниях 18–20 % от продаж, примерно 27 % направляется на доклинические исследования. Почти 54 % приходится на клинические испытания, 5 % идет на получение различных разрешений от государственных органов и 14 % – на дополнительные испытания, необходимые уже после получения разрешительной документации (табл. 2).

На протяжении многих лет Европа занимала ведущие позиции в разработке новых лекарств. Однако с середины 1990-х гг. роль лидера на фармацевтическом рынке, как и в биотехнологии, перехватили США (рис. 4).

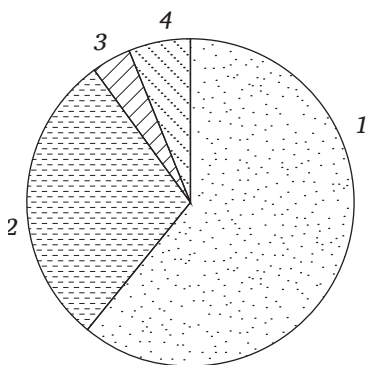


Рис. 4. Продажа лекарств, запущенных в 2005–2009 гг., по регионам, %:

1 – США; 2 – Европа; 3 – Япония; 4 – остальные страны

Как видим, на США приходится 60 % новых лекарственных препаратов, на страны Европы – 29 %, а на Японию – 4 %. Это связано с тем, что в последние годы в США на исследования и разработки направляют значительно большую долю ВВП, чем в странах Европы. В 2008 г. это соотношение составляло 2,76 и 1,90 % ВВП соответственно. Из европейских стран более высокий относительный уровень затрат имеют лишь Финляндия (3,75 %) и Швеция (3,73 %).

Лидирующие позиции США определяются прежде всего более развитой по сравнению с другими странами биотехнологией, которая является ядром современной фармацевтики. Примене-

Структура инвестиций в НИОКР по стадиям фармацевтического процесса

Стадия	Число пациентов	Продолжительность	Содержание	Доля от общих инвестиций в НИОКР, %
Доклинические испытания		4 года	Синтез новых субстанций, биологический скрининг, фармакологическое тестирование	27
Клинические испытания, в том числе:		Всего 7 лет		54
фаза 1	20–100 здоровых волонтеров	До 1 года	Тестирование на токсичность, безопасность. Выбор оптимальной дозы	8
фаза 2	Несколько сотен пациентов	1–2 года	Оценка эффективности и выявление побочных эффектов	13
фаза 3	От нескольких сотен до нескольких тысяч пациентов	2–4 года	Подтверждение эффективности и побочных эффектов при длительном применении	33
фаза 4 (дополнительные испытания)	Обычно несколько тысяч пациентов	Варьируются	Определение новых потребителей, сравнение с другими лекарствами, определение клинического эффекта и долговременной безопасности медикамента на широкой выборке пациентов и соответствие условиям разрешительной документации	14

ние знаний генома человека в клинической практике и разработке новых лекарств позволяет предвидеть реакцию пациента на то или иное лекарство и создавать новые медицинские «персонализированные» препараты в соответствии с особенностями генетической структуры человека. Внедрение таких лекарств не только снижает уровень заболеваемости, но и изменяет саму модель врачебного обслуживания пациентов, перенося акцент на превентивное лечение.

Сравнительные данные об уровне развития биохимии в разных странах и регионах приведены в табл. 3.

Таблица 3

Показатели развития биохимического сектора (2008 г.)

Показатель	Всего	США	Европа	Азия
Объем продаж, млрд долл/%	59,6/100	45,0/75,5	11,2/18,8	3,4/5,7
Объем инвестиций в НИОКР, млрд долл/%	21,1/100	17,2/81,5	3,5/16,6	0,4/1,9
Число занятых, тыс. чел/%	192,7/100	128,2/66,5	49,0/25,4	15,5/8,9
Число компаний, шт/%	704/100	371/52,7	178/25,3	155/22

Из табл. 3 видно, что по уровню развития биотехнологий США занимают ведущие позиции в мире и имеют подавляющее превосходство над конкурентами. Однако по эффективности проводимых исследований и затрат на них США уступают как Западной Европе, так и странам Азии: при меньшем удельном весе этих регионов в затратах на НИОКР их доля в объемах продаж существенно выше (например, это соотношение для стран Азии составляет 1,9 и 5,7 % соответственно).

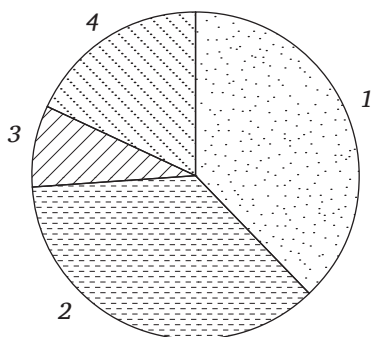


Рис. 5. Региональная структура мирового фармацевтического производства:

1 – США; 2 – Европейский союз; 3 – Япония; 4 – остальные страны

США являются ведущим производителем лекарственных препаратов в мире (38 %), опережая Европу (36 %) и Японию (8 %). На эти три региона приходится 82 % мирового фармацевтического производства (рис. 5).

Согласно международной статистике фармацевтическая промышлен-

ность – наиболее наукоемкий и инновационный сектор мировой экономики: здесь самые высокие показатели условно-чистой продукции на одного занятого и отношение затрат на НИОКР к объемам продаж. Именно этот сектор занимает главные позиции в отраслевой структуре США (табл. 4).

Таблица 4

Отраслевая структура НИОКР в промышленности (2008 г.), %

Отрасль	США	Европейский союз	Япония
Фармацевтика	25	17	8
Производство вычислительной техники	24	13	12
Программное обеспечение и услуги	15	3	2
Автомобильная	9	25	27
Электронная	2	5	13
Химия	3	6	7
Прочие	22	31	31

Как видим, на три наиболее наукоемкие отрасли в США приходится 64 % всех исследований и разработок, в то время как в Европе – 33 %, а в Японии – 22 %. Такое положение обеспечивает США глобальное технологическое лидерство.

Развитые страны, обладающие мощной фармацевтической промышленностью, не оказывают прямой государственной поддержки отрасли, но зато активно стимулируют развитие новых направлений исследований: биотехнологии, генной инженерии и др. В США, например, государственная поддержка отрасли осуществляется преимущественно на региональном уровне через стимулирование развития естественных наук, биотехнологий и инноваций. Так, штат Техас выделил в середине 2000-х гг. почти 1 млрд долл. на расширение существующих и создание новых научно-исследовательских лабораторий в области биотехнологий. В штате Нью-Йорк с помощью специальных центров государственной поддержки науки, технологий и инноваций (*NYSTAR*) финансируется более 20 образовательных учреждений, работающих на нужды фармацевтической промышленности.

Каждый штат использует те или иные традиционные методы налоговой поддержки: налоговые вычеты, налоговые каникулы, сниже-

ние налога и т. п. Применяются также специальные скидки на лекарства и регулирование импорта. Для поддержки НИОКР используются государственно-частные инвестиционные фонды. Например, Институт бионауки в штате Северная Каролина представляет собой венчурный фонд, использующий государственные средства и средства частных инвесторов для финансирования научных и исследовательских организаций. Пенсионный фонд штата Калифорния ежегодно выделяет 500 млн долл. на программу развития биотехнологических НИОКР. В каждом штате созданы банки данных, предоставляющие информационную поддержку и консультационные услуги организациям, занимающимся НИОКР, а также предприятиям малого и среднего бизнеса.

Развивающиеся страны со своей стороны проводят полномасштабную поддержку фармацевтики по всем направлениям: доступ к финансированию, инвестиции в производство, кадровое обеспечение, инфраструктура, инвестиции в исследования и разработки.

Активная государственная поддержка фармацевтической промышленности позволила ряду развивающихся стран, прежде всего Индии и Китаю, не только защитить внутренние рынки, но и успешно осуществить выход на внешние. Удельный вес собственных производителей на фармацевтическом рынке Китая составляет в настоящее время 70 %, Индии – 80 %. Эти государства активно способствовали возрастанию своей роли и на мировом рынке. Так, доля индийских и китайских компаний на глобальном фармацевтическом рынке выросла с 1999 по 2007 г. с 6,5 до 9,4 %.

В Индии меры содействия фармацевтической отрасли эволюционировали от поддержки производства для захвата внутреннего рынка до стимулирования НИОКР в целях усиления конкурентоспособности страны. Развитие в этой стране мер государственной поддержки фармацевтической промышленности можно разделить на несколько этапов. В 1948–1960 гг. рынок лекарственных препаратов полностью зависел от импорта. Поддержка государства проявлялась только в организации государственных компаний. В 1960-е гг. государство стало поддерживать производство фармацевтических субстанций, необходимых для ресурсного обеспечения отрасли, что позволило впоследствии развивать собственную фармацевтическую промышленность.

В 1970-е гг., после подписания документа (*Patent Act*), отменявшего патентование продуктов, зарубежные компании лишились монопольного права на разработанные ими лекарства и начали уходить с индийского рынка. Внутренний рынок продолжал развиваться за

счет собственных производителей, копировавших известные фармацевтические препараты.

В 80–90-е гг. XX в. успешное развитие индийских производителей стало основой для «лекарственной политики», направленной на интенсивный рост и международную экспансию индийской фармацевтики с помощью агрессивного стимулирования экспорта. В 2000 г. обязательства, связанные с членством во Всемирной торговой организации (ВТО), вынудили Индию вернуть патентование фармацевтической продукции. Но одновременно была выработана «фармацевтическая политика», направленная на поддержку НИОКР как важнейшего рычага сохранения конкурентных позиций Индии на глобальном рынке. Активно стали создаваться фонды поддержки НИОКР.

Меры государственной поддержки затрагивали весь комплекс кадрового обеспечения, стимулирования производства, НИОКР и формирования необходимой инфраструктуры.

В области кадрового обеспечения получили развитие система образовательных грантов и поддержка образовательных программ при подготовке исследователей и менеджеров для фармацевтической промышленности.

Меры стимулирования производства включали в себя сокращение перечня препаратов, для которых устанавливается предельный уровень цен, снижение налога на прибыль, финансирование экспортных операций и льготное кредитование, поиск зарубежных партнеров и продвижение продукции на зарубежные рынки. В области стимулирования НИОКР осуществлялась поддержка совместных исследовательских программ отрасли, образовательных и исследовательских учреждений. Государственные гранты составляли до 70 % от стоимости каждого проекта. Предоставлялось льготное кредитование компаниям, участвующим в НИОКР, к работе с индийскими партнерами привлекались международные исследовательские организации, снижались импортные пошлины на оборудование для осуществления НИОКР, малые и средние инновационные компании получали поддержку через специальный орган – Государственный институт инновационных исследований (*Small Business Innovation Research Initiative*).

Инфраструктура фармацевтической промышленности включает в себя создание и поддержание базы данных о ведущихся исследованиях, предоставление информации обо всех программах поддержки экспорта через Экспортную программу клеточной фармацевтики (*Export Promotion Cell in the Pharmaceutical Division*), организацию биотехнологических парков и инкубаторов.

Активная государственная поддержка позволила индийским фармацевтическим компаниям защитить внутренний рынок и существенно увеличить объемы экспорта. В настоящее время на собственных производителей в Индии приходится 80 % рынка фармацевтических препаратов по сравнению с 30 % в 1970 г. Объемы экспорта возросли с 0,7 млрд долл. в 1996 г. до 3 млрд долл. в 2006 г. Сегодня индийская фармацевтическая промышленность состоит из 20 тыс. компаний и обеспечивает рабочими местами 500 тыс. человек. В 1996–2008 гг. темпы ее роста (17 %) были в два раза выше, чем мирового рынка (9 %). Доля индийских производителей на мировом рынке лекарств возросла к 2015 г. до 2,2 % по сравнению с 1,6 % в 2008 г.

В Китае государственное стимулирование фармацевтической промышленности развивалось в русле поддержки конкурентоспособности китайских производителей при либерализации внутреннего рынка и выхода на глобальные рынки. До 1980 г. индустрия фармацевтики находилась полностью под контролем государства. В 1980–90-е гг. в связи с переводом экономики на рыночную основу были приняты законы, регулирующие производство лекарств и их качество, введено патентирование продукции и образовано специальное государственное агентство *State Drug Administration* (позднее преобразованное в *State Food and Drug Administration*) для централизованного регулирования производства, торговли, регистрации, сертификации и контроля качества лекарств. В 2000 г. в связи со вступлением Китая в ВТО ужесточилось законодательство в сфере интеллектуальной собственности, произошла либерализация системы дистрибуции. Была введена единая система качества. В 2006 г. была принята программа инновационного развития фармацевтики с беспрецедентными инвестициями и задачами перехода индустрии от копирования западных препаратов к созданию собственных инновационных лекарств и развитию НИОКР.

В сфере кадрового обеспечения акцент делался на развитии и поддержке образовательных программ подготовки исследователей и менеджеров для фармацевтической промышленности, включая гранты и содействие развитию «фармацевтических школ», число которых увеличилось с 5 в 1952 г. до 240 к 2006 г. В области стимулирования производства практиковалось предоставление грантов и льготных кредитов на расширение производства, финансирование оборотного капитала. Была внедрена более жесткая система контроля качества и снижены налоги для продвижения китайской продукции на экспорт. Государ-

ство также содействует регистрации китайских лекарственных препаратов в других странах.

Государственная поддержка НИОКР осуществляется путем продвижения импорта технологий, льготного кредитования частных компаний, ведущих научные исследования, а также предоставления налоговых льгот для иностранных фармацевтических компаний, создающих совместные предприятия с китайскими компаниями и открывающих в Китае собственные исследовательские центры.

Государственная поддержка фармацевтической промышленности позволила китайским компаниям наращивать объемы продаж темпами, опережающими рост мирового рынка (ежегодный прирост составил 20 %), и увеличить свою долю в мировом обороте лекарственных препаратов за десять лет почти в два раза (с 5 % в 1998 г. до 8,5 % в 2008 г.).

Российский рынок фармацевтической продукции – один из наиболее динамичных в мире. По прогнозам специалистов, в ближайшие годы он продолжит быстро расти и может войти в тройку крупнейших рынков Европы. За 2003–2008 гг. объем российского фармацевтического рынка вырос с 4,3 до 17 млрд долл. (в среднем на 32 % в год), а его доля в общемировом рынке лекарственных средств увеличилась с 1 до 2,2 %. Высокий потенциал роста определяется тем, что в потреблении лекарств на душу населения Россия отстает от среднемирового уровня в три раза (53 и 160 долл. соответственно). Однако в России нет собственных крупных фармацевтических компаний. А существующие вытесняются с рынка иностранными производителями. Так, доля российских производителей на отечественном фармацевтическом рынке сократилась с 28 % в 2003 г. до 20 % в 2008 г., а доля импорта соответственно возросла с 72 до 80 %. Российские компании практически не экспортируют лекарственные препараты: в 2007 г. экспорт фармацевтической продукции из страны составил 0,04 % общемирового объема продаж. Для сравнения: объем экспорта Индии (чей рынок меньше российского) составил 0,6 % общемирового объема продаж, т. е. в 15 раз превысил российский экспорт.

Российские компании занимаются в основном производством продукции с низкой добавленной стоимостью. В структуре потребления инновационных лекарственных препаратов фармацевтического рынка России на отечественное производство приходится лишь 3 %, а 97 % составляет импорт. И лишь в потреблении небрендируемых дженериков удельный вес отечественной продукции достигает 52 %.

Низкая конкурентоспособность российских предприятий по сравнению с зарубежными (как на внешнем, так и на внутреннем рынке) определяется прежде всего незначительными объемами производства. Так, у крупнейшей российской фармацевтической компании «Фармстандарт» объемы продаж составляют менее 0,6 млрд долл., в то время как у глобальной швейцарской корпорации «Новартис» – 53 млрд долл. Бюджеты же расходов на НИОКР вообще несопоставимы: расходы крупнейших пяти российских компаний на эти цели составляют в совокупности 15–20 млн долл., в то время как у «Новартис» – 7 млрд долл.

Глава 2 РАЗВИТИЕ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ

Фармацевтическая промышленность – одна из тех отраслей белорусской экономики, которая развивается в последнее время наиболее динамично и высокими темпами. Это связано со многими обстоятельствами. Отметим некоторые из них.

Во-первых, именно данная отрасль экономики способствует обеспечению национальной безопасности Республики Беларусь в области здравоохранения, лекарственного и медико-технического обеспечения.

Во-вторых, фармацевтическая отрасль – одна из наукоемких, инновационных сфер экономики, развитие которых поддерживается белорусским правительством и государством в целом.

В-третьих, от эффективности, доступности, надлежащего гарантированного качества медицинских препаратов зависит развитие всего отечественного здравоохранения.

В-четвертых, во всем мире фармацевтическая промышленность – это высокодоходный сектор экономики, чистая прибыль в котором достигает 18 % от общего дохода (в среднем по экономике – 5 %), а объемы продаж, темпы роста фармрынка постоянно увеличиваются. Есть объективные причины сложившейся ситуации. С одной стороны, это общемировые тенденции старения населения, повышения уровня доходов и качества жизни, а с другой – общеизвестные побочные отрицательные эффекты экономического развития, происходящего на основе научно-технического прогресса (усиливающееся воздействие техногенных факторов, ухудшение экологической среды обитания и проч.), которые неизбежно приводят к росту заболеваемости.

За годы суверенности нашей страны в фармацевтической индустрии произошли кардинальные изменения. В 1990-е гг. на территории Республики Беларусь работали два фармпредприятия, сейчас – более 20. Все они объединены в концерн «Белбиофарм». Среди них РУП «Белмедпрепараты», ОАО «Борисовский завод медпрепаратов», РУП «Несвижский ЗМП», СП «Минскинтеркапс», СП ООО «Фармлэнд», УП «Диалек», РУП «Экзон», РУП «Завод Изотрон», РУП «Гродненский завод медпрепаратов», ООО «Фармтехнология», РУП «ЭНЗИМ» и др. По экспертным оценкам, объем фармацевтического рынка Беларуси в 2009 г. в расчетно-отпускных ценах составил около 600 млн долл. Доля отечественных производителей лекарственных средств оценивается в стоимостном выражении более чем в 20 %, а в натуральном выражении – 57 %. В настоящее время предприятия концерна «Белбиофарм» выпускают более 600 наименований продукции, из них 500 – лекарственные средства.

Основная цель работы фармацевтической отрасли Республики Беларусь – производство лекарственных средств различных фармацевтических групп и биотехнологической продукции. Государственная политика в области лекарственного обеспечения ориентирована на импортозамещение и выпуск дженериков – аналогов известных зарубежных лекарств. Специалисты отмечают, что на разработку и испытание оригинального препарата требуется не менее 6 лет и 100–200 тыс. долл. Зарубежные компании вкладывают в разработку абсолютно инновационного химического вещества и доведение его до аптеки значительно более крупные суммы – до 2 млрд долл. в США; в Европе – до 70 млн евро. За счет выпуска дженериков удается сэкономить миллионы долларов, так как производители уже не тратят средства на разработку препарата и его испытания, поэтому рынок многих стран ориентирован именно на дженерики. Например, общая стоимость их продаж в Великобритании, Дании, Нидерландах на рынке рецептурных лекарственных средств составляет 50–75 % всех продаж; доля дженериков в Канаде – 85 %; в США и Германии – от 20 до 45 %.

В Беларуси достаточно сложно разработать большой спектр оригинальных лекарственных средств, поскольку для этого необходимы огромные финансовые вложения, которые начнут окупаться, по аналитическим оценкам, только через 10–11 и более лет. В настоящее время Беларусь не может позволить себе такие финансовые затраты, поэтому разработка оригинальных лекарственных средств сейчас не в приоритете. Об этом говорят и статистические данные. Доля оригинальных

нальных препаратов на белорусском фармацевтическом рынке составляет 30 %, а воспроизведенных (дженериков) – 70 %. Таким образом, фармацевтическое производство Республики Беларусь ориентировано на дженерики.

По истечении 20-летнего срока действия патента любая фармацевтическая компания может синтезировать исходные соединения или купить его у химических концернов. Скопированное лекарство тоже подвергается испытаниям, но по сокращенной программе. Расходы на производство дженериков ниже, соответственно, цена их меньше, но это не значит, что качество хуже. Оно доказывается испытаниями химической идентичности и биоэквивалентности.

Политика, проводимая концерном «Белбиофарм», предусматривает создание условий для разработки и производства качественной и конкурентоспособной продукции. В фармацевтической отрасли это достигается сертификацией систем управления качеством на соответствие требованиям международных стандартов ИСО 9000 и правилам надлежащей производственной практики (GMP). Системы менеджмента качества в соответствии с требованиями ИСО 9000 внедрены на девяти фармзаводах. Национальные сертификаты GMP получены Борисовским и Гродненским заводами медпрепаратов, РУП «Белмедпрепараты», РУП «Экзон». Полностью сертифицированы производственные участки на СП «Минскинтеркапс». По нормам GMP (что предполагает полный контроль качества на всех этапах производства) выпускается более 100 наименований лекарств, сертифицированы 11 производственных участков.

Для того чтобы уменьшить долю импорта в отечественной лекарственной продукции, была принята Государственная программа по развитию импортозамещающих производств фармацевтических субстанций, готовых лекарств и диагностических средств на 2010–2014 гг. и на период до 2020 г., которая включает следующие подпрограммы: «Фармсубстанции и готовые лекарственные средства», «Фитопрепараты», «Диагностикумы», «Подготовка кадров для химико-фармацевтической промышленности». Для реализации этой программы потребуются финансовое обеспечение в 600 млрд бел. р. Большая часть ресурсов (около 84 %) пойдет на модернизацию белорусских предприятий и их сертификацию по стандарту GMP. Причем в стране не делается упор на создание оригинальных белорусских препаратов, а поставлена цель создать качественные дженерики, которые не будут уступать зарубежным аналогам.

Таким образом, к экономическим приоритетам развития белорусской фармацевтической промышленности относятся: расширение ассортимента лекарственных средств за счет политики импортозамещения; обеспечение высокого их качества, безопасности, эффективности в соответствии с международными стандартами; увеличение экспорта; стимулирование производства высокоэффективных лекарственных средств; внедрение импортозамещающих технологий; организация импортозамещающих собственных производств фармацевтических субстанций в рамках Государственной программы инновационного развития Республики Беларусь.

Глава 3

ПРЕДМЕТ И ЗАДАЧИ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ

Фармакология (греч. *pharmakon* – лекарство, *logos* – учение) – наука, изучающая условия, процессы и последствия воздействия лекарственных веществ (ЛВ) и иных биологически активных соединений на живые организмы. Фармакология как учебная дисциплина состоит из двух разделов: общей фармакологии и частной фармакологии.

Общая фармакология характеризует фундаментальные закономерности действия лекарственных средств (ЛС) на организм и общие понятия о фармакодинамике и фармакокинетике.

Фармакодинамика исследует локализацию (места и точки приложения) и механизмы, типы, виды и эффекты действия ЛС; зависимость их действия от различных факторов, например химического строения, лекарственной формы, способа введения, дозы, а также от возраста, пола, массы тела, общего состояния больного.

Фармакокинетика определяет пути введения, процессы всасывания ЛВ при различных путях введения, транспорта и распределения их в организме (биотрансформация, метаболизм) и выделения из него.

Частная фармакология изучает фармакодинамику и фармакокинетику конкретных лекарств, показания и противопоказания к применению, особенности дозирования и отпуска. Используя данные медико-биологических дисциплин, фармакология как одна из основных наук о ЛС позволяет составить наиболее полное понятийное представление о них, обосновать создание рациональной лекарственной формы, определить зависимость между химическим строением и действием лекарственных веществ на организм.

Задачи фармацевтической биотехнологии:

- производство высокоэффективных лекарственных препаратов, применяемых в здравоохранении и других отраслях народного хозяйства;
- изыскание новых ЛС для предупреждения и лечения заболеваний;
- изучение:
 - механизмов и эффектов действия лекарственных веществ;
 - особенностей поступления их в организм;
 - способов распределения в органах и тканях, реакций метаболизма и путей выведения;
- создание высокоэффективных лекарственных препаратов для профилактики и лечения заболеваний в целях увеличения продолжительности жизни и периода трудоспособной активности людей.

Современные лекарственные средства позволяют управлять нервно-психической деятельностью, кровообращением, дыханием, обменом веществ, пищеварением и другими функциями организма. Лекарственные средства при бесконтрольном и нерациональном применении могут вызывать нежелательные, а порой и очень тяжелые нарушения жизнедеятельности организма человека, поэтому фармакология, создавая эффективные и безопасные лекарственные средства, одновременно разрабатывает рекомендации по их рациональному применению. Фармакология, используя достижения биологии, микробиологии, физиологии, химии, медицины, фармации и других наук, помогла решить проблемы лечения большинства тяжелых инфекционных заболеваний, ставших причиной смерти миллионов людей. В настоящее время стало возможным лечение некоторых ранее считавшихся неизлечимыми психических заболеваний, сахарного диабета, инфаркта миокарда, отдельных злокачественных новообразований и ряда других. Сегодня невозможно представить себе лечение любого заболевания без применения ЛС.

3.1. Источники получения лекарственных веществ

В арсенале лекарственных средств помимо синтетических препаратов значительное место занимают препараты и индивидуальные вещества из лекарственного сырья (растительного, животного происхождения и из минералов). Таким путем получены многие широко применяемые медикаменты в виде не только более или менее очищенных препаратов (галеновы, новогаленовы, органопрепараты), но и ин-

дивидуальных химических соединений (алкалоиды, гликозиды). Так, из опия выделяют алкалоиды морфин, кодеин и папаверин; из растения раувольфии змеиной – резерпин; из наперстянки – сердечные гликозиды дигитоксин, дигоксин; из ряда эндокринных желез – гормоны.

Некоторые лекарственные вещества являются продуктами жизнедеятельности грибов и микроорганизмов. Из них наибольший интерес представляют антибиотики.

Следует еще раз подчеркнуть, что лекарственные вещества растительного, животного, микробного и грибкового происхождения часто служат основой для их синтеза, а также последующих химических модификаций и получения полусинтетических и синтетических препаратов.

Алкалоиды (*al-qali* (араб.) – щелочь, *eidos* (греч.) – вид) – азотистые органические соединения, содержащиеся главным образом в растениях. Свободные алкалоиды представляют собой основания. В растениях они обычно содержатся в виде солей. Многие алкалоиды обладают высокой биологической активностью (морфин, атропин, пилокарпин, никотин и др.).

Гликозиды – группа органических соединений растительного происхождения, распадающихся при воздействии ферментов или кислот на сахар, или гликон (*glykys* (греч.) – сладкий), и несахаристую часть, или агликон. Ряд гликозидов используется в качестве лекарственных средств (строфантин, дигоксин и др.).

3.2. Основные пути поиска новых лекарственных средств, их клинические испытания

Прогресс фармакологии характеризуется непрерывным поиском и созданием новых, более совершенных препаратов. Их путь от химического соединения до лекарственного средства можно представить в следующем виде:

- химическая лаборатория;
- фармакологическая лаборатория;
- лаборатория готовых лекарственных форм;
- фармакологический комитет;
- клинические испытания;
- управление по внедрению новых лекарственных средств;

- химико-фармацевтическая промышленность;
- внедрение в медицинскую практику.

Создание лекарственных средств начинается с исследований химиков и фармакологов. Поиск новых лекарственных средств развивается по следующим направлениям.

1. *Химический синтез препаратов:*

а) направленный синтез:

- воспроизведение биогенных веществ;
- создание антиметаболитов;
- модификация молекул соединений с известной биологической активностью;
- сочетание структур двух соединений с необходимыми свойствами;
- синтез, основанный на изучении химических превращений веществ в организме;

б) эмпирический путь:

- случайные находки;
- скрининг.

2. *Получение препаратов из лекарственного сырья и выделение индивидуальных веществ:*

- животного происхождения;
- растительного происхождения;
- из минералов.

3. *Выделение лекарственных веществ, являющихся продуктами жизнедеятельности грибов и микроорганизмов.* В настоящее время лекарственные средства получают главным образом с помощью химического синтеза. Один из важных путей направленного синтеза заключается в *воспроизведении биогенных веществ*, образующихся в живых организмах. Так, например, были синтезированы адреналин, норадrenalин, γ -аминомасляная кислота, простагландины, ряд гормонов и другие физиологически активные соединения.

Поиск антиметаболитов (антагонистов естественных метаболитов) также привел к получению новых лекарственных средств. Принцип создания антиметаболитов заключается в синтезе структурных аналогов естественных метаболитов, обладающих противоположным метаболитам действием. Например, антибактериальные средства сульфаниламиды сходны по строению с парааминобензойной кислотой, необходимой для жизнедеятельности микроорганизмов, и являются ее антиметаболитами. Изменяя структуру фрагментов молекулы ацетилхолина, также можно получить его антагонисты.

Наиболее распространенный способ изыскания новых лекарственных средств – *химическая модификация соединений с известной биологической активностью*. Главная задача таких исследований – это создание новых препаратов, выгодно отличающихся от уже известных (более активных, менее токсичных). Исходными соединениями могут служить естественные вещества растительного или животного происхождения, а также синтетические. Например, на основе гидрокортизона, продуцируемого корой надпочечника, синтезированы многие более активные глюкокортикоиды, в меньшей степени влияющие на водно-солевой обмен, чем их прототип.

В последнее время привлекает внимание возможность создания новых препаратов *на основе изучения их химических превращений в организме*. Эти исследования развиваются в двух направлениях. Первое связано с изучением продуктов метаболизма лекарственных веществ. В отдельных случаях образующиеся метаболиты обладают более выраженной активностью, чем исходные соединения. Например, из антидепрессанта имизина (имипрамина) в организме образуется более активный десметилимипрамин (дезипрамин). Последний также используется в качестве лекарственного средства.

Второе направление предусматривает изучение механизмов химических превращений веществ. Знание ферментативных процессов, обеспечивающих метаболизм веществ, позволяет создавать препараты, которые изменяют активность ферментов. Так, например, синтезированы ингибиторы ацетилхолинэстеразы (прозерин и другие антихолинэстеразные средства), которые усиливают и пролонгируют действие естественного медиатора ацетилхолина. Получены также ингибиторы фермента моноаминоксидазы, участвующей в инактивации норадреналина, дофамина, серотонина (к ним относится антидепрессант ниаламид и др.). Известны вещества, которые индуцируют (усиливают) синтез ферментов, участвующих в процессах детоксикации химических соединений (например, фенobarбитал).

Помимо направленного синтеза до сих пор сохраняет определенное значение эмпирический путь получения лекарственных средств. Ряд препаратов был введен в медицинскую практику в результате *случайных открытий*. Так, снижение уровня сахара крови, обнаруженное при использовании сульфаниламидов, привело к синтезу их производных с выраженными гипогликемическими свойствами – бутамида и аналогичных ему препаратов, используемых при лечении сахарного диабета. Действие тетурама (антабуса), используемого при лечении алкоголизма, также было обнаружено случайно в связи с его применением в промышленном производстве при изготовлении резины.

Одной из разновидностей эмпирического поиска является *скрининг*. В этом случае любые химические соединения, которые могут быть предназначены и для немедицинских целей, проверяют на биологическую активность с использованием разнообразных методик. *Скрининг* – весьма трудоемкий и малоэффективный путь эмпирического поиска лекарственных веществ. Однако иногда он неизбежен, особенно если исследуется новый класс химических соединений, свойства которых, исходя из их структуры, трудно прогнозировать.

При фармакологическом исследовании подробно изучается фармакодинамика веществ: их специфическая активность, длительность эффекта, механизм и локализация действия. Важный аспект изучения представляет собой фармакокинетика веществ (всасывание, распределение и превращение в организме, а также пути выведения). Особое внимание уделяется побочным эффектам, токсичности при однократном и длительном введении, тератогенности, канцерогенности, мутагенности. Необходимо сравнивать новые вещества с известными препаратами тех же групп. При фармакологической оценке соединений используют физиологические, биохимические, биофизические, морфологические и другие методы анализа.

Большое значение имеет изучение эффективности веществ при соответствующих патологических состояниях (экспериментальная фармакотерапия). Так, лечебное действие антимикробных веществ испытывают на животных, зараженных возбудителями определенных инфекций, противобластные средства – на животных с экспериментальными и спонтанными опухолями. Кроме того, желательно располагать сведениями об особенностях действия веществ на фоне тех патологических состояний, при которых они могут быть использованы (например, при атеросклерозе, миокардите, воспалении). Это направление, как уже отмечалось, получило название патологической фармакологии. К сожалению, существующие экспериментальные модели редко полностью соответствуют тому, что наблюдается в клинике. Тем не менее они в какой-то мере имитируют условия, в которых назначают лекарственные средства, и тем самым приближают экспериментальную фармакологию к практической медицине.

Результаты исследования веществ, перспективных в качестве лекарственных препаратов, передают на фармакологические испытания. Если проведенные экспериментальные фармакологические исследования являются исчерпывающими, то предлагаемое соединение передают в клиники, имеющие необходимый опыт исследования лекарственных веществ.

Решающая роль в оценке новых лекарственных средств принадлежит клиническим фармакологам, основной задачей которых является клиническое изучение фармакокинетики и фармакодинамики лекарственных веществ, в том числе новых препаратов, и разработка на этой основе наиболее эффективных и безвредных методов их применения.

При *клиническом испытании* новых лекарственных средств следует исходить из ряда принципов. Прежде всего их необходимо исследовать на широком контингенте больных. Во многих странах этому часто предшествует испытание на здоровых людях (добровольцах). Очень важно, чтобы каждое новое вещество сравнивалось с хорошо известными препаратами той же группы (например, наркотические анальгетики – с морфином, сердечные гликозиды – со строфантином и гликозидами наперстянки). Новое лекарственное средство обязательно должно отличаться от имеющихся в лучшую сторону.

При клиническом испытании веществ необходимо применять объективные методы, позволяющие количественно оценить наблюдаемые эффекты. Комплексное исследование с использованием большого набора адекватных методик – еще одно из требований, предъявляемых к клиническим испытаниям фармакологических веществ.

В тех случаях, когда в эффективности веществ существенную роль может играть элемент суггестии (внушения), используют *плацебо*. Плацебо – это лекарственные формы, по внешнему виду, запаху, вкусу и прочим свойствам имитирующие принимаемый медикамент, но не содержащие лекарственного вещества. Состоит плацебо лишь из индифферентных формообразующих веществ.

При так называемом слепом контроле больному в неизвестной для него последовательности чередуют порции лекарственного вещества и плацебо. Только лечащий врач знает, когда больной принимает плацебо. При двойном слепом контроле в известность поставлено еще одно лицо (заведующий отделением или другой врач). Такой принцип исследования веществ позволяет особенно объективно оценить их действие, так как при ряде патологических состояний (например, при некоторых болях) плацебо может вызывать положительный эффект у значительной части больных.

Достоверность данных, полученных разными методами, должна быть подтверждена статистически.

Только в том случае, если вещество имеет очевидные преимущества по сравнению с аналогичными препаратами или представляет новую группу лекарственных средств, его можно рекомендовать для хи-

мико-фармацевтической промышленности и последующего внедрения в широкую медицинскую практику.

Качество препаратов, выпускаемых химико-фармацевтической промышленностью, обычно оценивают с помощью химических и физико-химических методов, указанных в Государственной фармакопее Республики Беларусь (далее – Государственная фармакопея). В отдельных случаях, если строение действующих веществ неизвестно или химические методики недостаточно чувствительны, прибегают к так называемой биологической стандартизации. Имеется в виду определение активности лекарственных средств на биологических объектах (по наиболее типичным эффектам). Таким путем оценивают препараты гормонов, сердечных гликозидов и др. Выражается активность в условных единицах действия (ЕД). Для сравнения используют стандарт, имеющий постоянную активность. Методы биологической стандартизации и вещества, для которых они обязательны, указаны в Государственной фармакопее.

Глава 4 **НОРМАТИВНОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОИЗВОДСТВ**

Нормативные документы, обеспечивающие фармацевтическое биотехнологическое производство:

- технические условия (ТУ) производства;
- технологические регламенты производства (лабораторный, опытно-промышленный, пусковой, промышленный, типовой);
- фармакопейные статьи.

4.1. Технические условия на лекарственные средства

Технические условия на ЛС – совокупность требований к характеристикам ЛС, регламентирующих качественные и количественные показатели и позволяющих его стандартизировать, сертифицировать, декларировать (для права выхода на внешний рынок).

Пример: ТУ 4311-182-38576343-92, где 4311 – код группы продукции по Общелугорусскому классификатору продукции (ОКП), 182 – код продукта, 38576343 – код предприятия по Общелугорусскому классификатору предприятий и организаций (ОКПО), 92 – год разработки ТУ.

Технические условия на ЛС должны состоять:

- из технических требований;
- требований безопасности;
- требований охраны окружающей среды;
- правил приемки;
- методов контроля;

- условий транспортирования и хранения;
- гарантий изготовителя.

Вводная часть должна содержать наименование ЛС, его назначение, область применения, условия (правила) применения.

4.2. Технологические регламенты производства

Технологический регламент – основной технологический документ, часть организационно-распорядительной и организационно-технологической систем документации предприятия, а также системы менеджмента качества, поэтому при его разработке не нарушают соответствие между документами предприятия, разрешительной документацией и регистрационным досье, а также учитывают требования надзорных органов, нормативных и нормативно-правовых документов, действие которых распространяется на производство ЛС.

Технологический регламент производства ЛС используют в качестве *основного технологического документа*:

- при проведении технологических процессов в серийном производстве;
- разработке исходных данных для проектирования или реконструкции промышленного производства;
- установлении технико-экономических нормативов, в том числе норм расхода сырья и материалов;
- разработке технологических инструкций, а также инструкций по технике безопасности, производственной санитарии и противопожарным мероприятиям;
- разработке и осуществлении мероприятий по утилизации отходов производства, обезвреживанию и очистке промышленных стоков и выбросов в атмосферу.

В зависимости от назначения технологические регламенты подразделяют:

- на лабораторные;
- опытно-промышленные;
- пусковые;
- промышленные (типовые).

Технологический регламент разрабатывают и утверждают для каждого вида (формы) лекарственного средства.

Лабораторный регламент – первый нормативный технологический документ, разработкой которого завершаются научные исследования в лабораторных условиях по созданию нового ЛС (новой технологии).

Лабораторный регламент устанавливает методы изготовления продукции и условия, обеспечивающие воспроизводимость технологических процессов в лабораторных условиях со стабильными выходами, а также правила техники безопасности.

Лабораторный регламент разрабатывают в соответствии с теми же правилами, он содержит те же разделы, что и промышленный регламент.

Описываемые в лабораторном регламенте параметры технологических процессов и операций изготовления нового продукта (новой технологии), а также способы (методы) контроля, мониторинга критических точек, сроки и условия хранения продукта определяют в процессе научно-исследовательской работы на основе спланированных сравнительных, контролируемых исследований с математической обработкой результатов.

В лабораторном регламенте совмещают требования надлежащей лабораторной практики (GLP) и производственной деятельности (GMP), поскольку по этому регламенту в лабораторных условиях готовят опытные (экспериментальные) серии препарата, предназначенные для доклинических исследований и клинических испытаний на животных.

Приложением к лабораторному регламенту является краткое технико-экономическое обоснование (или бизнес-план).

В соответствии с «Отраслевым стандартом промышленного регламента производства химико-фармацевтического препарата» ОСТ 59.01.002.40-85 лабораторный регламент получения антибиотика должен включать определенные разделы.

Характеристика ЛС. Включает название антибиотика, основное назначение, краткое описание свойств препарата, описание организма, образующего антибиотик, методы определения биологической активности, условия хранения.

Технологическая схема производства. Отражает последовательность работ по производству антибиотика с подразделением на стадии. Технологическая схема служит основой будущей технологии промышленного получения препарата.

Сырье и материалы. Сообщаются требования, предъявляемые к качеству сырья и материалам, которые используются при получении антибиотика, в целях его максимальных выходов и обеспечения повторяемости результатов. При этом необходимо ориентироваться на сырье и материалы, выпускаемые отечественной промышленностью.

Аппаратурная схема производства. Представляет схему процесса получения антибиотика с указанием аппаратов и приборов, их конструкции, размера и других характеристик, которые могут иметь значение при производстве антибиотика.

Изложение технологического процесса. Отражает описание процесса получения антибиотика на основе завершенных экспериментальных результатов, выполненных в лабораторных условиях. Процесс включается в регламент в том случае, если удастся получить воспроизводимые результаты как по качеству антибиотика, так и по его выходам.

Отходы производства, технологические и вентиляционные выбросы в атмосферу, их использование и обезвреживание. Приводятся перечень возможных отходов и выбросов в атмосферу, перечень ценных веществ в отходах и рекомендации к их использованию, а также вредных с точки зрения загрязнения окружающей среды веществ и способы их обезвреживания.

Контроль производства. Указываются особые требования к оборудованию (герметичность ферментера и всех коммуникаций, исправность и надежность работы мешалки и др.). Проводится анализ качества сырья на соответствие определенным стандартам. Определяются режимы стерилизации сред и отдельных веществ, воздуха. Подбираются методы анализа контроля за ходом процесса биосинтеза антибиотика и готовой продукции.

Техника безопасности, пожарная безопасность и производственная санитария. Приводится перечень веществ, способных воспламениться и взрываться. Все вещества, применяемые в процессе получения антибиотика, должны быть изучены с позиций техники безопасности, пожарной опасности и производственной санитарии.

Перечень производственных инструкций. Приводятся все инструкции, которые должны быть разработаны на основе лабораторного регламента.

Технико-экономические нормативы. Определяются выходы конечного и промежуточных продуктов; удельные нормы расхода сырья и материалов, удельные нормы расхода пара, воды, электроэнергии, сжато-го воздуха.

Информационные материалы. Указываются биологические и физико-химические свойства вещества, степень очистки, фармакологические свойства (преимущества и особенности). Осуществляется сравнение с показателями идентичных зарубежных препаратов, приводятся сведения о патентной чистоте антибиотика и принятого метода его получения с перечислением охраняющих авторских свидетельств (патен-

тов), сведения о вредности применяемых при получении препарата веществ и мерах предосторожности при работе с ними.

Опытно-промышленный регламент – технологический документ, которым завершают научные исследования при разработке нового ЛС (новой технологии) в лабораторных условиях.

Опытно-промышленный регламент, как и промышленный, должен содержать разделы, охватывающие все аспекты технологического процесса.

Основой для разработки опытно-промышленного регламента являются:

- лабораторный регламент;
- результаты исследований и разработок, доклинических и клинических испытаний ЛС.

Опытно-промышленный регламент на новую продукцию должен содержать:

- *данные на проектирование опытно-промышленной технологической линии заданной мощности*, контрольно-измерительного и испытательного оборудования, используемого в технологическом процессе;
- *техничко-экономические показатели* для уточнения и дополнения технико-экономического обоснования (бизнес-плана);
- *данные токсиколого-гигиенических исследований* для обоснования гигиенических нормативов.

Опытно-промышленный регламент на новую продукцию разрабатывается одновременно с фармакопейной статьей или другим нормативным документом на данное лекарственное средство.

В случае организации опытного производства (например, на базе предприятия-разработчика) для выпуска небольших партий нового ЛС в течение длительного периода допускается использование опытно-промышленного регламента в качестве основного технологического документа с пересмотром его через каждые три года и утверждением в порядке, установленном для промышленного регламента.

Пусковой (временный) регламент – технологический документ, на основании которого осуществляют освоение промышленного производства вновь созданного ЛС.

Пусковой регламент разрабатывается предприятием на основе:

- опытно-промышленного регламента;
- проектной документации на новое производство или на основе действующих производств, если в их технологию вносятся принципиальные изменения.

Пусковой регламент должен полностью соответствовать требованиям, предъявляемым к промышленному регламенту.

По мере освоения производства в пусковой регламент вносят изменения и дополнения.

Освоение производства считается *законченным*, когда:

- стабильно выполняются требования нормативной документации на продукцию;
- достигнуты проектные данные как по мощности, так и по основным технико-экономическим показателям производства;
- взамен пускового регламента оформляют промышленный регламент производства.

Дальнейшее серийное производство лекарственного средства осуществляют на основе промышленного регламента.

Срок действия пускового регламента в производстве – не более трех лет.

Промышленный регламент. Серийный выпуск товарной продукции осуществляют на основе промышленного регламента, который оформляют после завершения периода освоения промышленного производства вновь созданного ЛС вместо пускового регламента.

Промышленный регламент включает в себя:

- характеристику готового продукта;
- наименование продукта;
- категорию и номер действующего нормативного документа;
- регистрационный номер;
- сведения об организации (юридическом или физическом лице) – производителе или поставщике;
- основное назначение продукта и его потребительские свойства;
- условия безопасности применения, хранения, транспортирования, утилизации;
- требования к упаковке и маркировке;
- срок годности;
- технологическую схему производства;
- общую схему технологического процесса;
- схемы стадий и операций;
- план производственного цеха (участка);
- аппаратурную схему производства и спецификацию оборудования (этот раздел регламента состоит из чертежа аппаратурной схемы производства и спецификации оборудования (табл. 5), закрепленного за данным конкретным производством);

- характеристику сырья, промежуточных продуктов, исходных и упаковочных материалов (требования к качеству сырья, материалов и промежуточных продуктов в данном производстве);

- подробное описание производственных штаммов микроорганизмов (при производстве иммунобиологических ЛС):

- наименование и обозначение ЛС;
- место получения;
- историю выделения;
- описание метода аттенуации;
- сведения об иммуногенности, патогенности, токсичности;
- полную характеристику морфологических и других свойств;
- условия размножения и приготовления посевного материала;

- условия и сроки хранения, транспортирования и методы консервирования;

- изложение технологического процесса (данные о видах и количестве используемых и получаемых в производстве сырья, материалов, промежуточных продуктов, об отходах, допустимых потерях и выходе готового продукта);

- описание технологических работ (санитарная подготовка персонала, помещений и оборудования; осмотр и подготовка оборудования к работе; подготовка и загрузка сырья; ведение и контроль технологических работ; выгрузка и передача на дальнейшую обработку продуктов (промежуточных продуктов, отходов); упаковка, маркировка и отгрузка готовой продукции);

- материальный баланс (полная информация о теоретическом значении выхода продукции на каждой стадии производства с указанием максимального и минимального показателей выхода, при превышении которых требуется проведение расследования в соответствии с порядком, установленным на предприятии). Пределы приемлемости от 95 до 105 % номинального количества для действующих веществ и пределы от 90 до 110 % номинального количества для вспомогательных веществ не требуют дополнительного обоснования;

- сведения о переработке и обезвреживании отходов производства:

- технологические процессы переработки отходов (ПО);
- обезвреживание отходов (ОБО);
- технологические (вентиляционные) выбросы в атмосферу;

- контроль производства – перечень точек производства, проверка которых обеспечивает надежное соблюдение установленного режима технологического процесса (включает место (шифр стадии или опера-

ции технологического процесса), объект контроля, наименование определяемого параметра и его норматив, методы и средства контроля).
Примеры обязательных для контроля точек:

- требования к оборудованию и помещениям при их подготовке к работе (стерильность, герметичность, целостность антикоррозионного покрытия и др.);
- контроль сырья и материалов перед использованием в процессе производства;
- контроль основных параметров и требований при загрузке сырья и проведении отдельных технологических операций;
- контроль качества полученных промежуточных продуктов;
- контроль показателей, регламентирующих сброс промышленных стоков, и т. д.;
- безопасную эксплуатацию производства. Основополагающими документами являются стандарты, входящие в систему стандартов безопасности труда (ССБТ). Особое внимание обращают на соблюдение:
 - санитарно-противоэпидемического режима;
 - ветеринарно-санитарного режима;
 - норм производственной санитарии;
 - требований биологической безопасности.

Таблица 5

**Условные обозначения оборудования,
применяемые на чертежах**

Оборудование	Обозначение
Средства измерения	СИ
Системы регулирования	СР
Реакторы, автоклавы, ферментеры и т. п.	Р
Фильтровальная аппаратура	Ф
Сушильные установки	СУ
Оборудование для размола и измельчения	М
Емкости (сборники, отстойники)	Е
Компрессоры	К
Насосы	Н
Холодильные установки	Х
Оборудование для фасовки и упаковывания	У

Оборудование	Обозначение
Термостаты	Т
Центрифуги	Ц

Согласно требованиям безопасность труда *при работе с биологическими объектами* обеспечивают:

- производственные процессы;
- производственное оборудование;
- средства защиты;
- система специальных профилактических мероприятий;
- охрана окружающей среды (приводят перечень всех выбросов в окружающую среду (пылегазообразные, жидкие, твердые), обозначают их наименование, источник выброса (аппарат, стадия), количество с допустимыми отклонениями, периодичность, продолжительность, химический состав, физические показатели). Указывают, что система вентиляции и очистки воздуха гарантирует защиту от выбросов инфекционного материала и вредных веществ в окружающую среду. Отражают меры, обеспечивающие надежность охраны водных ресурсов и воздушного бассейна в случае аварийных ситуаций и остановок производства на ремонт. Указывают наличие аварийных и дренажных емкостей, поддонов, факелов, адсорбентов, дезинфицирующих растворов для предупреждения залповых выбросов в окружающую среду;

- перечень производственных инструкций. В данном разделе регламента выделяют обозначения (коды) и названия инструкций, обязательных для ведения технологического процесса, в том числе инструкции:

- по всем рабочим местам в соответствии со штатным расписанием (должностные);
- технике безопасности, производственной санитарии, ветеринарно-санитарному режиму и пожарной безопасности;
- подготовке оборудования к работе, ремонту и приему из ремонта;
- эксплуатации оборудования, средств измерений и средств автоматизации;
- ликвидации аварийных ситуаций;
- предупреждению контаминации сырья и готовой продукции при хранении и производстве;
- фасовке и упаковке;

- уходу и содержанию животных-производителей и животных, используемых для контроля;
- технико-экономические нормативы. Здесь приводят *нормативы затрат*, характеризующие технический уровень производства и ведения технологического процесса по требованиям регламента, в том числе:
 - нормы расхода основных видов сырья и материалов;
 - нормы технологических затрат (пар, вода, электроэнергия, сжатый воздух, инертный газ и др.);
 - трудозатраты на единицу конечного продукта;
- информационные материалы – сведения:
 - о разработчиках препарата и регламентов его производства с указанием даты разработки;
 - об экспериментальных работах предприятий и организаций, подтверждающие правильность выбора оптимальных параметров технологических процессов;
 - о вредности применяемых в производстве веществ и мерах предосторожности при работе с ними;
 - патентной чистоте продукции и принятого метода получения препарата с перечислением охраняющих патентов;
 - показателях качества зарубежных аналогов подобной продукции, обладающих сходством по функциональному значению и условиям применения;
 - литературных источниках и об отчетах о научно-исследовательских, опытно-конструкторских и проектных работах, на которые даются ссылки в тексте регламента; для рукописей указывают места их хранения.

4.3. Фармакопейная статья

Фармакопейная статья (ФС) – это нормативно-технический документ, утверждаемый соответствующим уполномоченным органом исполнительной власти и носящий характер государственного стандарта, в котором устанавливаются требования к качеству лекарственного средства или лекарственного растительного сырья, его упаковке, условиям и сроку хранения, методам контроля качества.

Фармакопейная статья включает название лекарственного растительного сырья как на русском, так и на латинском языке (при этом латинское название выполняет функцию международного).

Виды фармакопейных статей:

1. **Фармакопейная статья предприятия (ФСП)** – это стандарт качества лекарственного средства под торговым названием. Содержит перечень методов и показателей контроля качества лекарственного средства с учетом конкретной технологии данного предприятия, прошедшей экспертизу и регистрацию в определенном порядке в соответствии с Государственной фармакопеей, при этом показатели качества должны быть не ниже требований, содержащихся в Государственной фармакопее.

Срок действия фармакопейной статьи (фармстатьи) предприятия устанавливается при ее утверждении *не более чем на пять лет*, при этом учитывается уровень технологического процесса конкретного производства лекарственного средства

2. **Общая фармакопейная статья (ОФС)** – это государственный стандарт качества лекарственного средства, содержащий основные требования к лекарственной форме, а также описание стандартных методов контроля качества лекарственных средств.

ОФС включает в себя:

- перечень нормируемых показателей и методов испытания для конкретной лекарственной формы;
- описание химических, физических, физико-химических, биологических, биохимических, микробиологических методов анализа лекарственных средств;
- требования к используемым титрованным растворам, реактивам, индикаторам.

Фармакопейная статья, общая фармакопейная статья и фармакопейная статья предприятия утверждаются *руководителем предприятия* с обязательным присвоением обозначения.

3. **Частная фармакопейная статья (ЧФС)** – это нормативно-технический документ, регламентирующий качество и безопасность лекарственного средства. Он создается для лекарственного средства под международным непатентованным названием (если оно имеется) или под наименованием, которое заменяет его в обязательном установленном порядке. Сюда же входят перечень нормируемых показателей и методики испытания данного лекарственного средства, а также ссылки на общие фармакопейные статьи.

4. Временная фармакопейная статья – это нормативно-технический документ, утверждаемый на период освоения промышленного выпуска лекарственного средства и для отработки промышленной технологии методов определения качества или показателей нового лекарственного средства на срок не более трех лет.

Структура фармакопейной статьи:

- *вводная часть*:
 - время сбора сырья (фаза вегетации, иногда календарный срок), обязательная характеристика сырья по режиму его технологической обработки: высушенное, обмолоченное, свежесобранное, свежесамороженное и т. д.;
 - дикорастущее или культивируемое растение;
 - его жизненная форма;
 - название производящего растения и семейства на русском языке и латыни;
- *внешние признаки*:
 - состав сырья;
 - характерные диагностические признаки, запах и вкус (для неядовитых видов), размеры сырья;
- *микроскопия*:
 - диагностические признаки анатомического строения сырья (для некоторых видов приводится люминесцентная микроскопия);
 - вид микропрепарата, на котором проводится исследование;
- *качественные реакции* (приводятся собственно качественные гистохимические реакции или хроматографические пробы подлинности, на основные группы действующих веществ, методика их выполнения и результаты);
- *числовые показатели*:
 - для цельного, резаного или порошковидного сырья (показатели являются стандартом для всех видов лекарственного растительного сырья и определяют его качество);
 - содержание действующих или экстрактивных веществ, золы общей и золы нерастворимой в 10 %-м растворе соляной кислоты, примесей и измельченности;
- *количественное определение* (описывается методика количественного определения основных действующих веществ в виде суммарного содержания в пересчете на какое-либо вещество, содержащееся в данном сырье);
- *упаковка* (указаны виды упаковки и масса сырья в единице упаковки);

- *микробиологическая чистота* (указываются метод определения микроорганизмов и их допустимые пределы);
- *маркировка* (приводится в соответствии с требованиями к графическому оформлению лекарственных средств);
- *транспортирование* (при необходимости указываются требования к погрузке, выгрузке продукции, обращению с ней после транспортирования);
- *хранение* (определяются условия хранения продукции, в том числе требования по защите продукции от влияния климатических факторов);
- *срок годности* (время, в течение которого лекарственное сырье может быть использовано);
- *фармакологическое действие* (фармакологическая группа, к которой отнесено лекарственное сырье).

Глава 5 ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

Биотехнология – это использование культур клеток бактерий, дрожжей, животных и растений, метаболизм и биосинтетические возможности которых обеспечивают выработку специфических веществ.

Биотехнология возникла на стыке нескольких биотехнологических наук, таких как генетика, бактериология, вирусология, молекулярная биология, микробиология, биохимия, растениеводство. Важную роль сыграло открытие способов модификации ДНК и ее переноса из одних организмов в другие (рис. 6).

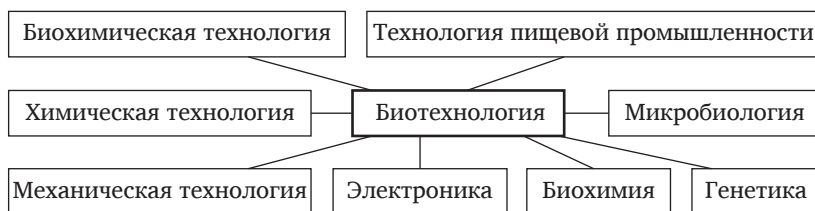


Рис. 6. Связь биотехнологии с другими науками

Исторически биотехнология зародилась на основе традиционных микробиологических производств, таких как производство хлеба, сыра, вина, пива, молочных продуктов. Эти технологии до сих пор имеют большую значимость и постоянно развиваются.

Биотехнологические процессы осуществляются за счет использования бактерий, дрожжей, плесневых грибов, водорослей, культур клеток и тканей растений и животных. В этих процессах используются особенности метаболизма и биосинтетические возможности клеток. Целью может быть наработка клеточной биомассы или продуктов жизнедеятельности клеток – метаболитов.

В настоящее время биотехнология делится на промышленную и прикладную микробиологию, генетическую и клеточную инженерию. Основные направления промышленной микробиологии представлены в табл. 6.

Таблица 6

Основные направления биотехнологии в различных отраслях

Отрасль	Область применения
Сельское хозяйство	Производство белково-витаминных концентратов. Селекция, клонирование и генетическая инженерия животных и растений. Использование антибиотиков для лечения животных и птиц. Производство вакцин. Производство биоинсектицидов. Применение гормонов и других стимуляторов роста
Производство химических веществ и соединений	Производство органических кислот. Получение витаминов, антибиотиков и др. Использование ферментов в составе синтетических моющих средств (СМС)
Контроль за состоянием окружающей среды	Улучшение методов тестирования и мониторинга загрязнений окружающей среды. Использование микроорганизмов для переработки сельскохозяйственных, бытовых и промышленных отходов
Медицина	Применение ферментов в диагностике и микроорганизмов при создании и модификации сложных лекарственных средств. Синтез новых антибиотиков, гормонов и интерферонов. Использование в медицинской практике ферментов и штаммов микроорганизмов
Энергетика	Производство биогаза и этанола
Материаловедение	Выщелачивание руд. Изучение и контроль биоразложения
Пищевая промышленность	Создание новых методов переработки и хранения пищевых продуктов. Применение пищевых добавок, полученных с помощью микроорганизмов. Использование белка одноклеточных. Применение ферментов. Совершенствование спиртового и молочнокислого брожения

Потребность в биотехнологии обусловлена дефицитом продовольствия, энергии, минеральных ресурсов и необходимостью улучшения состояния здравоохранения и охраны окружающей среды.

Биоиндустрия включает в себя отрасли, в которых биотехнология может заменить широко используемые традиционные методы, и отрасли, в которых она всегда играла ведущую роль (см. табл. 6).

Быстрая отдача происходит в следующих биотехнологических отраслях:

- 1) совершенствование сбраживания;
- 2) производство биогаза;
- 3) производство безопасных и недорогих вакцин;
- 4) биоэнергетика;
- 5) улучшение техники компостирования;
- 6) гидролиз целлюлозы;
- 7) повышение уровня фиксации азота с помощью симбионтов.

Из более чем 100 тыс. известных микроорганизмов в промышленности применяются всего несколько сотен видов, так как промышленный штамм должен отвечать ряду строгих требований:

- расти на дешевых субстратах;
- обладать высокой скоростью роста или давать высокий выход продукта за короткое время;
- проявлять синтетическую активность в сторону желаемого продукта; образование побочных продуктов должно быть низким;
- быть стабильным в отношении продуктивности и к требованиям условий культивирования;
- быть устойчивым к фаговым и другим типам инфекций;
- быть безвредным для людей и окружающей среды;
- желательны термофильные, ацидофильные (или алкофильные) штаммы, поскольку с ними легче поддерживать стерильность в производстве;
- интерес представляют анаэробные штаммы, так как аэробные создают трудности при культивировании – требуют аэрирования;
- образуемый продукт должен иметь экономическую ценность и легко выделяться.

На практике применяются штаммы четырех групп микроорганизмов:

- дрожжи;
- мицелиальные грибы (плесени);
- бактерии;
- аскомицеты.

Термин «дрожжи», строго говоря, не имеет таксономического значения. Это одноклеточные эукариоты, относящиеся к трем классам: *Ascomycetes*, *Basidiomycetes*, *Deuteromycetes*.

К аскомицетам относят прежде всего *Saccharomyces cerevisiae*, определенные штаммы которого используются в пивоварении, виноделии, производстве хлеба, этилового спирта.

Аскомицеты *Saccharomyces lipolytica* метаболизируют углеводороды нефти и применяются для получения белковой массы.

Дейтеромицет *Candida utilis* как источник белка и витаминов выращивают на непищевом сырье: сульфитных щелоках, гидролизатах древесины и жидких углеводородах.

Дейтеромицет *Trichosporon cutaneum* окисляет многие органические соединения, в том числе токсичные (например, фенол), и применяется при переработке стоков.

Мицелиальные грибы используют:

- в производстве:
 - органических кислот: лимонной (*Aspergillus niger*), глюконовой (*Aspergillus niger*), итаконовой (*Aspergillus terreus*), фурмаровой (*Rhizopus chrysogenum*);
 - антибиотиков (пенициллин и цефаллоспорин);
 - специальных видов сыров: камамбера (*Penicillium camamberti*), рокфора (*Penicillium roqueforti*);
- процессе гидролиза в твердых средах: в рисовом крахмале при получении сакэ, в соевых бобах при получении темпеха, мисо.

Полезные бактерии относятся к эубактериям.

Промышленное применение с давних времен имеют молочнокислые бактерии родов *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*.

Уксуснокислые бактерии родов *Acetobacter*, *Gluconobacter* превращают этанол в уксусную кислоту.

Бактерии рода *Bacillus* используются в производстве вредных для насекомых токсинов, а также для синтеза антибиотиков и аминокислот. Бактерии рода *Corynebacterium* – для производства аминокислот.

Из актиномицетов наиболее распространенными являются роды *Streptomyces* и *Micromonospora*, применяемые в качестве продуцентов антибиотиков. При росте на твердых средах актиномицеты образуют тонкий мицелий с воздушными гифами, которые дифференцируются в цепочки конидиоспор.

В настоящее время с помощью микроорганизмов синтезируют следующие соединения:

- алкалоиды;
- аминокислоты;
- антибиотики;
- антиметаболиты;

- антиоксиданты;
- белки;
- витамины;
- гербициды;
- ингибиторы ферментов;
- инсектициды;
- ионофоры;
- коферменты;
- липиды;
- нуклеиновые кислоты;
- нуклеотиды и нуклеозиды;
- окислители;
- органические кислоты;
- пигменты;
- поверхностно-активные вещества;
- полисахариды;
- противоглистные агенты;
- противоопухолевые агенты;
- растворители;
- ростовые гормоны растений;
- сахара;
- стеринны и превращенные вещества;
- факторы транспорта железа;
- фармакологические вещества;
- ферменты;
- эмульгаторы.

5.1. Классификация продуктов фармацевтического производства

Биотехнологическое производство основано на использовании жизнедеятельности микроорганизмов. Чтобы управлять микробиологическим процессом, необходимо знать физиологию применяемых культур микроорганизмов. Это позволит контролировать процессы, протекающие в клетке, условия культивирования и влияние основных факторов окружающей среды на направленный биосинтез.

Продуктами биотехнологического производства являются природные макромолекулы – белки, ферменты, полисахариды, полиэфирны, выделенные из клеток микроорганизмов, тканей и органов растений и животных.

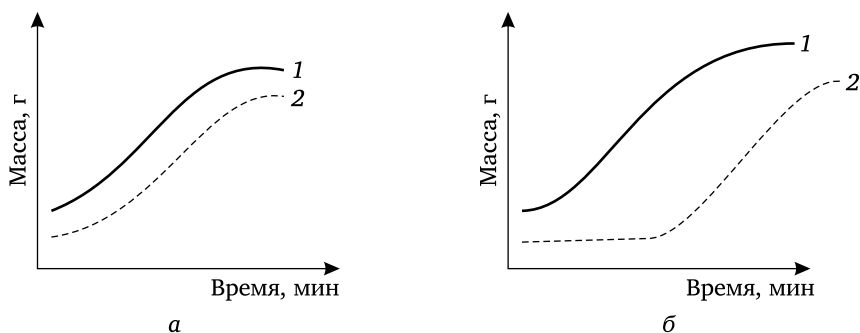


Рис. 7. Динамика изменения биомассы и образования первичных (а) и вторичных (б) метаболитов в процессе роста организма: 1 – биомасса; 2 – продукт

По отношению к процессам роста низкомолекулярные продукты метаболизма живых клеток делятся на первичные и вторичные метаболиты (рис. 7).

Первичные метаболиты – это низкомолекулярные соединения (молекулярная масса менее 1500 Да), необходимые для роста микроорганизмов. Одни из них являются строительными блоками макромолекул, другие участвуют в синтезе коферментов. Среди наиболее важных для промышленности метаболитов можно выделить аминокислоты, органические кислоты, пуриновые и пиримидиновые нуклеотиды, растворители и витамины.

Вторичные метаболиты – это низкомолекулярные соединения, не требующиеся для роста в чистой культуре. Ко вторичным метаболитам относятся антибиотики, алкалоиды, гормоны роста растений и токсины.

5.2. Общая биотехнологическая схема фармацевтического производства

Процессы биотехнологического производства разнообразны, но все они имеют пять основных стадий:

- приготовление питательной среды;
- культивирование микроорганизмов;
- получение посевного материала;

- выделение целевого продукта;
- очистка целевого продукта.

Приготовление питательных сред – стадия, удовлетворяющая два основных требования, которым должна отвечать среда. Во-первых, она должна быть полноценной для питания и недорогой. Углерод и азот в усвояемой форме необходимы для биосинтеза белка; фосфор – для синтеза ДНК и аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ); микроэлементы – для образования ферментов, для нормальной жизнедеятельности нужны также факторы роста и витамины. Во-вторых, среда должна быть стерильной, что достигается температурной, ультрафиолетовой, ультразвуковой и другими видами обработки.

Культивирование (ферментация) представляет собой совокупность последовательных операций от внесения в заранее приготовленную питательную среду посевного материала до завершения процессов роста и биосинтеза вследствие истощения питательных веществ среды. Существует два основных типа ферментаций: получение биомассы микроорганизмов и получение метаболитов.

Получение посевного материала (инокулята) проводится по схеме, представленной на рис. 8:



Рис. 8. Схема получения посевного материала

Качество полученного посевного материала контролируют путем микроскопирования.

Фармацевтические препараты требуют *высокой степени чистоты*. Стоимость очистки тем выше, чем ниже концентрация вещества в клетках. Этапы очистки:

- сепарация;
- разрушение клеточных оболочек (дезинтеграция биомассы);
- отделение клеточных стенок;
- отделение и очистка продукта;
- тонкая очистка и разделение препаратов.

5.3. Сепарация

Сепарация – отделение массы продуцента от жидкой фазы. Предварительно для повышения эффективности может проводиться:

- изменение pH;
- нагревание;
- добавление коагулянтов белков или флокулянтов.

Способы сепарации:

1. *Флотация* (буквально – плавание на поверхности воды) – разделение мелких частиц и выделение капель дисперсной фазы из эмульсий – основана на различной смачиваемости частиц (капель) жидкостью (преимущественно водой) и на их избирательном прилипании к поверхности раздела, как правило «жидкость – газ» (очень редко «твердые частицы – жидкость»).

Основные виды флотации:

- пенная (культуральную жидкость с биомассой микроорганизмов непрерывно вспенивают воздухом, подаваемым снизу вверх под давлением, клетки и их агломераты «прилипают» к пузырькам тонко диспергированного воздуха и всплывают вместе с ними, собираясь в специальном отстойнике);

- масляная;
- пленочная.

2. *Фильтрация* – процесс просачивания, естественного процеживания жидкости через пористые вещества. При этом используются фильтры:

- однократного и многократного применения;
- периодического и непрерывного действия (с автоматическим удалением слоя биомассы, забивающего поры);

- барабанные;
- дисковые;
- ленточные;
- тарелочные;
- карусельные вакуум-фильтры;
- фильтры-прессы различной конструкции;
- мембранные.

3. *Физическое осаждение* – процесс, при котором биомасса осаждается добавлением извести или других твердых компонентов, увлекающих клетки или мицелий на дно.

4. *Центрифугирование* – способ, при котором осаждение взвешенных частиц происходит под действием центробежной силы с образо-

ванием двух фракций: биомассы (твердая) и культуральной жидкости. Этот способ требует дорогостоящего оборудования, но позволяет максимально освободить культуральную жидкость от частиц.

Цетрифугирование и фильтрация могут проходить одновременно в фильтрационных центрифугах.

Высокоскоростное центрифугирование разделяет клеточные компоненты по размеру (более крупные частицы при центрифугировании движутся быстрее) и используется, если искомые продукты находятся внутри клеток продуцента.

5.4. Разрушение клеточных оболочек (дезинтеграция биомассы)

Методы дезинтеграции:

- механические (физические);
- химические;
- комбинированные.

Физические методы – обработка ультразвуком, вращение лопасти или вибратора, встряхивание со стеклянными бусами, продавливание через узкое отверстие под давлением, раздавливание замороженной клеточной массы, растирание в ступке, осмотический шок, замораживание-оттаивание, декомпрессия (сжатие с последующим резким снижением давления). Данные методы экономичны, но при их применении может снижаться качество получаемого продукта.

Химические и химико-ферментативные методы – клетки разрушаются толуолом или бутанолом, антибиотиками, ферментами, отличаются более высокой избирательностью. Примеры:

- клетки грамотрицательных бактерий обрабатывают лизоцимом в присутствии этилендиаминтетауксусной кислоты или других детергентов;
- клетки дрожжей – зимолизой улитки, ферментами грибов, актиномицетов.

5.5. Отделение и очистка продуктов

Выделение целевого продукта из культуральной жидкости или гомогената разрушенных клеток проводят путем его осаждения (высаливания), экстракции или адсорбции.

Осаждение:

- физическое (нагревание, охлаждение, разбавление, концентрирование);
- химическое (с помощью неорганических и органических веществ – этанола, метанола, ацетона, изопропанола).

Механизм осаждения органическими веществами: снижение диэлектрической постоянной среды, разрушение гидратного слоя молекул.

При *высаливании* гидратируются диссоциирующие ионы неорганических солей.

Р е а г е н т ы: сульфат аммония, сульфаты натрия, магния, фосфат калия.

Экстракция – процесс избирательного извлечения одного или нескольких растворимых компонентов из твердых тел и растворов с помощью жидкого растворителя – экстрагента. Типы экстракции:

- твердо-жидкостная (вещество из твердой фазы переходит в жидкую: например, хлорофилл из спиртовой вытяжки переходит в бензин);
- жидко-жидкостная (вещество переходит из одной жидкости в другую: извлечение антибиотиков, витаминов, каротиноидов, липидов);

Э к с т р а г е н т ы: фенол, бензиловый спирт, хлороформ, жидкий пропан или бутан и др.

Способы повышения эффективности экстракции:

- повторная экстракция свежим экстрагентом;
- выбор оптимального растворителя;
- нагревание экстрагирующего агента или экстрагируемой жидкости;
- понижение давления в аппарате для экстракции.

Экстракция хлороформом в лабораторных условиях осуществляется в аппарате «Сокслет», что позволяет многократно использовать растворитель.

Адсорбция – частный случай экстракции (когда экстрагирующий агент является твердым телом) – идет по ионообменному механизму.

А д с о р б е н т ы – иониты на основе целлюлозы:

- катионит – карбоксиметилцеллюлоза (КМЦ);
- анионит – диэтиламиноэтилцеллюлоза (ДЭАЭ);
- сефадексы на основе декстрана и т. д.

5.6. Методы тонкой очистки фармацевтических препаратов

Хроматография (греч. *chroma*, родительный падеж *chromatos* – цвет, краска) – физико-химический метод разделения и анализа смесей, основанный на распределении их компонентов между двумя фазами – неподвижной и подвижной (элюент), протекающей через неподвижную.

Виды хроматографии по технике выполнения:

- *колоночная* – разделение веществ проводится в специальных колонках;
- *плоскостная*:
- тонкослойная (*ТСХ*) – разделение происходит в тонком слое сорбента;
- бумажная – на специальной бумаге.

Для крупномасштабного отделения и очистки продуктов биотехнологических процессов применимы:

- *аффинная преципитация* – процесс, при котором лиганд прикрепляют к растворимому носителю, при добавлении смеси, содержащей соответствующий белок, образуется его комплекс с лигандом, который выпадает в осадок сразу после его формирования или после дополнения раствора электролитом;

- *аффинное разделение* – наиболее высокоэффективный из аффинных методов очистки, основанный на использовании системы, содержащей два водорастворимых полимера;

- *гидрофобная хроматография* – метод, предполагающий связывание белка в результате взаимодействия между алифатической цепью адсорбента и соответствующим гидрофобным участком на поверхности белковой глобулы;

- *электрофорез* – метод разделения белков и нуклеиновых кислот в свободном водном растворе и пористом матриксе, в качестве которого можно использовать полисахариды, например крахмал или агарозу.

По принципу разделения электрофорез бывает:

- нативный;
- SDS (в присутствии додецилсульфата натрия);
- двухмерный и др.

Глава 6 ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ ПОЛУЧЕНИЯ БЕЛКОВ В ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

6.1. Использование микроорганизмов для производства белка

В соответствии с нормами питания человек должен ежедневно получать с пищей от 60 до 120 г полноценного белка.

Для поддержания жизненных функций организма, построения клеток и тканей необходим постоянный синтез различных белковых соединений. Если растения и большинство микроорганизмов способны синтезировать все аминокислоты из углекислого газа, воды, аммиака и минеральных солей, то человек и животные не могут синтезировать некоторые аминокислоты (валин, лейцин, изолейцин, лизин, метионин, треонин, триптофан и фенилаланин). Эти аминокислоты называются незаменимыми, должны поступать с пищей. Их недостаток вызывает тяжелые заболевания у людей, а также понижает продуктивность сельскохозяйственных животных.

В настоящее время мировой дефицит белка составляет около 15 млн т. Наиболее перспективен микробиологический синтез. Если для крупного рогатого скота для удвоения белковой массы требуется 2 мес., для свиней – 1,5 мес., для цыплят – 1 мес., то для бактерий и дрожжей – от 1 до 6 ч. Мировое производство пищевых белковых продуктов за счет микробного синтеза составляет более 15 тыс. т в год.

Рассмотрим пример: время удвоения кишечной палочки составляет 20 мин, т. е. через 20 мин из одной клетки образуется две дочерних, через 40 – четыре «внучки», через 60 – восемь «правнучек», через 80 мин – 16 «праправнучек». Через 10 ч 40 мин из одной бактерии бу-

дет образовано свыше 6 млрд, а через 44 ч из одной бактерии массой $1 \cdot 10^{-12}$ г образуется биомасса в количестве $6 \cdot 10^{24}$ г.

Использование различных микроорганизмов в качестве источников белка и витаминов обусловлено следующими факторами:

- возможностью применения для культивирования микроорганизмов разнообразных химических соединений, в том числе отходов производств;
- относительно несложной технологией производства микроорганизмов, которое может осуществляться круглогодично и автоматизированно;
- высоким содержанием белка (до 60–70 %) и витаминов, а также углеводов, липидов в микробиальных препаратах;
- повышенным содержанием незаменимых аминокислот по сравнению с растительными белками;
- возможностью направленного генетического влияния на химический состав микроорганизмов в целях совершенствования белковой и витаминной ценности продукта.

Для промышленного производства пищевых продуктов на основе микроорганизмов необходимы тщательные медико-биологические исследования. Такие продукты должны пройти всестороннюю проверку для выявления канцерогенного, мутагенного, эмбриотропного действия на организм человека и животных. Токсикологические исследования, усвояемость продуктов микробного синтеза – основные критерии целесообразности технологии их производства.

Для получения белков используются дрожжи, бактерии, водоросли и мицелиальные грибы.

Преимущество дрожжей перед другими микроорганизмами заключается в их технологичности: устойчивости к инфекциям, легкости отделения от среды благодаря крупным размерам клеток. Они способны накапливать до 60 % белка, богатого лизином, треонином, валином и лейцином (этих аминокислот мало в растительных кормах). Массовая доля нуклеиновых кислот составляет до 10 %, что вредно действует на организм. В результате их гидролиза образуется много пуриновых оснований, превращающихся затем в мочевую кислоту и ее соли, которые являются причиной мочекаменной болезни, остеохондроза и других заболеваний. Оптимальная норма добавок дрожжевой массы в корм сельскохозяйственных животных составляет от 5 до 10 % сухих веществ. Дрожжи применяются для пищевых и кормовых целей.

Преимущества бактерий – это высокая скорость роста и способность синтезировать до 80 % белка, который содержит много дефицитных аминокислот: метионина и цистеина. Недостатки – маленькие размеры клеток и низкая концентрация в культуральной среде, что затрудняет процесс выделения. В некоторых бактериальных липидах могут содержаться токсины. Массовая доля нуклеиновых кислот до 16 %. Они используются только в качестве корма.

Преимущества водорослей – значительное содержание полноценного по аминокислотному составу белка, накапливающегося в количестве 65 %, легкое выделение водорослей из культуральной среды, низкое содержание нуклеиновых кислот – 4 % (для сравнения: у высших растений 1–2 %). Водоросли применяются для пищевых и кормовых целей.

Мицелиальные грибы традиционно используются в качестве пищевого продукта в странах Африки, в Индии, Индонезии, Китае и др. Накапливают до 50 % белка, по аминокислотному составу приближающегося к белку животного происхождения, богаты витаминами группы В. Клеточные стенки тонкие и легко перевариваются в желудочно-кишечном тракте животных. Массовая доля нуклеиновых кислот составляет 2,5 %.

С 1985 г. микробиологический белок применяют в пищевой промышленности для изготовления различных продуктов и полуфабрикатов.

В производстве пищевых продуктов употребляют три основные формы микробного белка:

- цельную массу (без разрушения клеточных стенок);
- частично очищенную биомассу (предусматривается разрушение клеточных стенок и удаление нежелательных компонентов);
- выделенные из биомассы белки (изоляты).

Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) сделала заключение, что белок микроорганизмов можно использовать в продуктах питания, но допустимое количество нуклеиновых кислот, вводимых вместе с ним в диету взрослого человека, не должно превышать 2 г в сутки. Введение микробного белка не вызывает отрицательных последствий, но встречается проявление аллергических реакций, желудочных заболеваний и т. п.

6.2. Использование дрожжей для производства белка

В Германии в XIX в. была разработана технология производства хлебопекарных дрожжей, во время Первой мировой войны дрожжи стали использоваться в качестве пищевой добавки при изго-

товлении супов и колбас, также начала развиваться технология производства кормовых дрожжей.

До сих пор культивирование пивных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (*carlsbergensis*) остается важным резервом пищевого белка и витаминов. Организм человека усваивает свыше 90 % всех питательных веществ, содержащихся в них. В составе этих дрожжей обнаружено 14 витаминов, особенно они богаты витаминами группы В.

При переработке биомассы в пищевой белок ее тщательно очищают. Сначала разрушают стенки дрожжевых клеток путем механической, щелочной, кислотной или ферментативной обработки с последующей экстракцией гомогенной дрожжевой массы подходящим органическим растворителем. Затем щелочным раствором растворяют белки и диализом отделяют белковый раствор от клеточной массы. Очищенные от низкомолекулярных примесей белки осаждают и применяют в качестве белковых добавок в различные пищевые продукты – сосиски, колбасы, паштеты, мясные начинки. Также сухой белок можно текстурировать.

Некоторые дрожжевые клетки (родов *Candida*, *Rhodotorula*, *Torulopsis*, *Trichosporon*) в качестве источника углерода для роста способны использовать неразветвленные углеводороды с числом от 10 до 30 углеродных атомов в молекуле. В основном они представлены жидкими фракциями углеводородов нефти с температурой кипения 200...320 °С. Первоначально проект возник из необходимости утилизировать парафины, остающиеся в количестве от 10 до 15 % после очистки газойля. В питательную среду добавляют макро- и микроэлементы, витамины и аминокислоты. В Российской СФСР завод по производству кормовых дрожжей на парафинах нефти был построен в 1971 г. (его продуктивность составила около 1 млн т в год). Высушенная белковая масса гранулируется и используется как белково-витаминный концентрат в кормопроизводстве.

Хорошим субстратом для выращивания кормовых дрожжей родов *Torula*, *Kluyveromyces* служит молочная сыворотка. В 1 т молочной сыворотки содержится около 10 кг белка и 50 кг лактозы. Белки отделяют методом ультрафильтрации, а раствор лактозы используют для культивирования дрожжей.

В качестве источников углерода дрожжевые клетки могут использовать и низшие спирты – метанол и этанол, получаемые из природного газа или растительных отходов. При этом дрожжевая масса содержит больше белков (56–62 % от сухой массы) и меньше вредных примесей (производных бензола, D-аминокислот, аномальных липидов, токсинов, канцерогенов), чем кормовые дрожжи, выращенные на парафинах нефти.

Дрожжи, выращенные на гидролизатах растительного сырья *Candida arborea* и *Candida utilis*, применяются для пищевых целей и в качестве

белковых добавок к различным продуктам. Например, в США на основе *Candida utilis* производят торутеин, который добавляют в продукты питания, после чего они считаются диетическими с высоким содержанием протеина.

6.3. Использование бактерий

Известно более 30 видов бактерий, которые могут быть применены в качестве источников полноценного кормового белка.

Источником углерода при культивировании бактерий могут служить природный и попутный газы, водород, а также спирты – метанол, этанол, пропанол.

Чаще всего на газовых питательных средах выращиваются бактерии рода *Methylococcus*, способные утилизировать от 85 до 90 % метана в специальных ферментерах. Однако производство кормового белка на газовых средах достаточно дорого. Более широко применяется технология выращивания бактерий на метаноле, который легко получают путем окисления метана. Чаще всего используют бактерии родов *Methylomonas*, *Methylophilus*, *Pseudomonas*. Рядом предприятий выпускается кормовой препарат прутин, в России – меприн. В этом препарате содержится до 74 % белков (от сухого вещества), до 5 % липидов, 10 % минеральных веществ, от 10 до 13 % нуклеиновых кислот.

К числу бактерий с высокой интенсивностью синтеза белков следует отнести водородоокисляющие бактерии, способные накапливать до 80 % белка (в расчете на сухое вещество). Для их культивирования в газовой среде должно содержаться от 70 до 80 % водорода, от 20 до 30 % кислорода, от 3 до 5 % углекислого газа. Производство может быть организовано вблизи химических предприятий.

6.4. Использование водорослей

Уже в 1521 г., после завоевания Мексики, появилась информация, что ацтеки едят диковинные пирожки, похожие на сыр. На озере Чад (Африка) туземцы племени канембу употребляют в пищу клубки синезеленых водорослей.

Содержание белков в клетках хлореллы и сценедесмуса составляет около 55 % (в пересчете на сухое вещество), а в клетках спирулины – 65 %. Водоросли хорошо сбалансированы по аминокислотному составу.

ву (кроме метиотина), в них содержится довольно много полиненасыщенных жирных кислот и β -каротина.

При скармливании спирулины животным не обнаружено аномалий и патологических эффектов, обеспечивается норма скорости роста.

Белковая масса из клеток водорослей поступает в продажу в виде суспензии, сухого порошка или пастообразного препарата. Процесс отделения клеток водорослей от массы воды – наиболее трудоемкая стадия.

6.5. Использование грибов

Грибы рода *Rhizopus* sp. применяют для твердофазной ферментизации соевых бобов. Через три дня мицелий гриба разрастается и связывает бобы в корж, содержащий до 40 % белка. В Индонезии такой корж жарят и добавляют в супы как заменитель мяса. Этот продукт называют «темпех». Подобным образом в странах Африки и Востока ферментируют различные зернобобовые культуры.

Преимущество твердофазной ферментизации – снижение энергетических затрат, недостаток – низкая продуктивность.

Различные мицелиальные грибы выращивают на крахмальных (зерновых) материалах, коже цитрусовых, соломе, отрубях, шелухе. Используют их либо для обогащения белками кормов, либо для выделения из полученной биомассы ферментов.

Для получения пищевого продукта микопротеина культивируют гриб *Fusarium graminearum*. Его выращивают на дешевом глюкозном сиропе, изготовленном путем гидролиза пшеничного или кукурузного крахмала. Микопротеин хорошо переваривается. Ему придают консистенцию и аромат мяса, ветчины, рыбы. Продукт долго сохраняет аромат и не дает усушки в процессе кулинарной подготовки. Промышленно выпускается в Великобритании.

6.6. Методы очистки белков

6.6.1. Приготовление экстракта

Исходный материал. При выборе организмов того или иного вида, применяемых для выделения белков и ферментов, руководствуются преимущественно легкостью их выращивания. Из животных наиболее широко используются крысы (особенно при работе с печенью)

и кролик (при работе со скелетными мышцами). Если работа проводится с органами, размеры которых слишком малы у лабораторных животных (сердце, мозг, почки, тимус), то их берут в основном у быков и свиней, поскольку изучение ферментов тканей человека ограничено по понятным причинам. С другой стороны, человеческая кровь вполне доступна и существует множество методов выделения ферментов из эритроцитов и других клеток крови. Плазма крови бедна ферментами, но содержит значительное количество неферментных белков. В последнее время исследование ферментов представителей различных видов стало более обычным. Частично это обусловлено уяснением того, что многие важные особенности метаболического контроля, локализации ферментов и другие их характеристики значительно различаются даже в пределах типа позвоночных.

Белкам и ферментам беспозвоночных уделяют мало внимания в основном из-за того, что в большинстве своем беспозвоночные животные очень малы и для получения необходимого количества исходного материала приходится использовать много особей. Если нужный орган не извлекают из каждой особи (при работе с насекомыми – трудная задача), то очистка гомогената, приготовленного из целого тела, осложняется тем, что в нем содержится большое количество пищеварительного сока с протеолитическими ферментами, которые также высвобождаются в экстракт. Большая часть хорошо известных ферментов беспозвоночных получена из крупных ракообразных, таких как речной рак и краб.

Долгое время биохимия растений была очень слабо связана с биохимией животных главным образом из-за того, что последняя имеет медицинскую направленность, а также потому, что при работе с растениями перед энзимологом встают определенные трудности. Качественные различия, связанные с сезонностью, могут быть преодолены, если выращивать растения в специальных камерах; в противном случае приходится мириться с вариабельностью материала, выращенного под открытым небом. В силу очевидных причин из огромного множества видов для изучения используются в основном те, которые имеют экономическое значение, но, с точки зрения биохимика, это не всегда наилучший выбор. Тем не менее работают преимущественно на одном или двух видах растений вследствие того, что из листьев можно без особого труда приготовить экстракты, из них легко выделить хлоропласты. Наиболее часто используются шпинат *Spinacia oleracea* и в какой-то мере родственная ему свекла *Beta vulgaris*, которые хорошо растут в различных климатических условиях. Растительные клетки имеют множество компарментов (отсеков); в большинстве случаев основной объем

клетки занимает вакуоль, заполненная весьма кислыми растворами, протеазами и целым рядом других вредных для цитоплазмы веществ. Значительная часть цитоплазмы приходится на хлоропласты, гранулы крахмала и другие органеллы; в клетке имеется также объемная клеточная стенка (целлюлоза). Цитоплазма (которая вместе с хлоропластами содержит большую часть ферментов) часто может составлять не более 1–2 % всего объема растительной клетки. Следовательно, растительные экстракты содержат очень мало белка, даже если при их приготовлении добавляют минимальное количество жидкости.

При работе с микроорганизмами возникают другие проблемы. Животный материал можно получить на местной скотобойне или из институтского вивария, растительное сырье приобрести на рынке, а микроорганизмы (за исключением дрожжей) необходимо специально выращивать в определенных условиях и в довольно больших количествах. Для каждой из таких групп микроорганизмов, как водоросли, грибы, дрожжи и бактерии, необходимы особые условия выращивания, сбора клеток и экстрагирования. Особой проблемой, требующей тщательного изучения, является значительное изменение ферментного состава в различные фазы роста клеток. Желательно производить сбор бактериальных клеток и других одноклеточных микроорганизмов в течение логарифмической фазы роста, хотя активность изучаемого фермента может и не быть максимальной в этот период. Следует проводить предварительные исследования организма в целях определения физиологического состояния, при котором содержание нужного фермента наибольшее.

Пекарские дрожжи (*Saccharomyces cerevisiae*) доступны в больших количествах, поэтому если их можно использовать, то проблема сырья решена. Прессованные дрожжи, поступающие в продажу, в конце фазы роста состоят практически на 100 % из дрожжевых клеток. Выращивание дрожжей производят на различных питательных веществах. Основным источником углерода для них служит меласса или какой-либо другой источник сахарозы. При 0 °С дрожжи остаются жизнеспособными (и, следовательно, белки сохраняют нативность) в течение нескольких недель, а при хранении в замороженном виде их можно использовать и через несколько месяцев. В хлебопекарной промышленности и у биохимиков большой популярностью пользуются сухие дрожжи, жизнеспособность которых восстанавливается при добавлении к ним воды. Они служат очень удобным источником многих ферментов, хотя в процессе сушки активность некоторых наиболее чувствительных ферментов может несколько снижаться. При хранении в вакууме или в атмосфере азота при 0...4 °С их можно использовать даже через несколько лет.

Очень важно убедиться в том, что необходимый белок или фермент, присутствующий в исходном материале, экстрагируется из него полностью, для того чтобы можно было достоверно определить его содержание в ткани. При неполном разрушении клеток можно недооценить данный объект как источник ферментов из-за того, что значительная часть ферментативной активности не выходит в раствор, а удаляется вместе с осадком во время получения экстракта. Если фермент выделяют из бактериального материала, то экспериментатор должен учитывать возможность отбора штаммов с аномально высоким уровнем ферментативной активности. Это можно сделать либо путем обычного отбора мутантов, либо используя более сложную технику клонирования, посредством которой множественные копии гена фермента включаются в бактериальный геном с помощью плазмид. Экспрессия гена может быть еще более усилена за счет его слияния с сильным промотором. Эта работа занимает много времени, и выполнить ее может только опытный специалист; не стоит даже пытаться применять такие методы, если на выделение фермента отведено мало времени.

Свежесть сырья и его хранение. Обычно чем быстрее используется сырье, тем лучше, т. е. препарат получается более соответствующим нормальному физиологическому состоянию, так как, если ткань хранилась длительное время, начинаются естественные процессы разложения. Однако бывают случаи, когда абсолютная свежесть может быть помехой. Например, в скелетных мышцах содержится большое количество АТФ. В присутствии фосфокреатина и гликогена высокая концентрация АТФ сохраняется в течение нескольких часов и после смерти. Структурные белки миозин и актин в норме нерастворимы при ионной силе ниже 0,25, но в присутствии АТФ разорванные миофибриллы набухают и часть белков переходит в раствор. Даже при физиологической ионной силе (~0,16) некоторое количество миозина может перейти в растворимое состояние. Впоследствии это может сказаться на качестве ферментных препаратов, так как миозин осаждается и смешивается с фракциями, в которых он не должен присутствовать. Примером особого рода служит получение препарата аденозиномонофосфатдезаминазы. При экстракции совсем свежих мышц буфером с рекомендуемой ионной силой 0,26 в раствор переходит много актина и миозина, что мешает следующему этапу – адсорбции на фосфоцеллюлозе. Препарат лучшего качества можно получить, если мышцам сначала дать возможность перейти в состояние окоченения, что сопровождается потерей АТФ. Это редко встречающийся случай. Обычно работают со свежим материалом.

Возможность получить свежий материал не всегда совпадает с возможностью использовать его. Как полученный материал, так и экстракт из него следует хранить замороженными. В процессе замораживания происходит множество событий. Прежде всего замерзает свободная вода и образуются кристаллы льда. Они разрушают мембраны и органеллы, но не повреждают непосредственно белки и ферменты. По мере приближения температуры к точке эвтектики для различных солей, присутствующих в растворе, эти соли кристаллизуются. Из пары, входящей в состав буфера, первой выпадает наименее растворимая соль, вследствие чего значение рН может сильно измениться еще до того, как раствор полностью замерзнет. Если хранение происходит при температуре $-15...-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ (обычная температура для испарителей в бытовых холодильниках и простых морозильниках), то значение рН оставшегося незамороженным концентрированного раствора будет отличаться от значения рН исходного раствора. В таком концентрированном белковом растворе протеазы, освободившиеся из лизосом в процессе замораживания, могут начать функционировать (хотя и медленно при такой низкой температуре), и хранение материала в течение нескольких недель может сильно ухудшить его качество. Таким образом, при замораживании следует очень быстро снижать температуру до $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ и хранить материал, если возможно, даже при более низкой температуре. Коммерческие морозильники дают температуру до $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Иногда лучше замораживать экстракт, так как его состав можно менять в целях достижения оптимальных условий хранения. После получения экстракта к нему можно добавить ингибиторы протеолитических ферментов и довести его рН подходящим буфером до значения, при котором биомолекулы стабильны. Кроме того, экстракт можно получить из большого количества материала, так что образцы, взятые впоследствии из морозильника, будут различаться лишь временем хранения, их свойства в этом случае не будут обусловлены биологическими различиями замороженного материала.

6.6.2. Разрушение клеток и экстракция

Большая часть белков и ферментов, изученных в ранний период истории белковой химии, была выделена из внеклеточных жидкостей. Причина этого заключается не только в легкости получения материала, но и в том, что внеклеточные белки в основном более стабильны часто благодаря наличию в них дисульфидных мостиков,

а также небольшим размерам молекул. Первоначально исследования структуры белков, естественно, сосредоточивались на этих небольших белках. Так, лизоцим, рибонуклеаза и химотрипсин были самыми первыми детально изученными белками, а все они получены из внеклеточных источников. Однако большинство ферментов локализовано внутри клеток. Часто такие белки менее стабильны – у них обычно отсутствуют дисульфидные связи вследствие того, что внутриклеточная среда обладает восстанавливающими свойствами. Цель данного раздела – дать описание методов разрушения клеток и выделения ферментов в водный экстракт, что является первым этапом очистки ферментов.

Существует множество методов разрушения клеток, что обусловлено разнообразием типов клеток. Большинство имеют присущие только им особенности, которые следует учитывать при их разрушении. Животные ткани широко варьируют по своей прочности: наряду с легко разрушаемыми эритроцитами используется и жесткий коллагенсодержащий материал, встречающийся в кровеносных сосудах и других тканях, которые содержат гладкие мышцы. Растительные клетки обычно труднее разрушаются, чем животные, из-за наличия у них целлюлозной оболочки. Среди бактерий есть и довольно хрупкие организмы, которые могут быть разрушены пищеварительными ферментами или просто под действием осмотического шока, и более устойчивые, с толстой клеточной стенкой. Для разрушения последних необходимо сильное механическое воздействие, которое, однако, не должно быть чрезмерным, так как при этом могут инактивироваться лабильные ферменты.

В табл. 7 приводится перечень методик, используемых для разрушения клеток и выделения ферментов в раствор. Если фермент локализован в органеллах, метод может быть применен только при условии, что органеллы также разрушаются. С другой стороны, может понадобиться предварительное выделение самих органелл, что позволит избежать от загрязнения цитоплазматическими ферментами перед экстракцией фермента из органелл. Для этого требуется менее сильное воздействие. Предварительное растворение поверхностных коллагеновых и целлюлозных структур препаратами гидролитических ферментов позволяет в дальнейшем разрушать клетки более мягкими способами, сохраняя целостность органелл. Примером подобной методики служит получение препаратов митохондрий из таких тканей, как скелетная или сердечная мышцы, под действием протеолитических ферментов. Однако эта методика применима только для получения препаратов в малых количествах и больше подходит для метаболических

исследований органелл, чем для очистки ферментов. Выход очищенных органелл может быть очень низким, поэтому во многих случаях лучше сначала разрушить всю ткань, а затем уже приступить к выделению нужного фермента из сложной смеси белков в экстракте. Таким образом ферменты митохондрий и хлоропластов часто получают из тканевого гомогената, а не из выделенных органелл.

Таблица 7

Способы разрушения клеток

Способ	Пример	Принцип
<i>Мягкое воздействие</i>		
Лизис клеток	Эритроциты	Осмотическое разрушение клеточной мембраны
Разрушение под действием ферментов	Обработка бактерий лизоцимом	Разрушение клеточной стенки приводит к осмотическому разрыву клеточной мембраны
Химическая солиubilизация и автолиз	Экстракция дрожжей толуолом	Клеточная стенка (мембрана) частично растворяется под действием химических веществ, освободившиеся при этом литические ферменты завершают процесс
Гомогенизация вручную	Ткань печени	Клетки продавливают через узкий зазор, что приводит к разрушению клеточной мембраны
Размельчение (растирание)	Мышечная ткань и др.	Клетки разрушаются в процессе размельчения ткани под действием силы сдвига
<i>Воздействие средней силы</i>		
Лопастной гомогенизатор (типа Уоринга)	Мышечная ткань, большинство животных тканей, растительные ткани	Происходит механическое разрушение крупных клеток и отделение друг от друга мелких
Растирание с абразивом (например, с песком или окисью алюминия)	Растительные ткани, бактерии	Разрушение клеточных стенок осуществляется благодаря наличию на частицах абразива микрошероховатостей

Способ	Пример	Принцип
<i>Сильное воздействие</i>		
Пресс Френча	Бактерии, растительные клетки	Клетки продавливают через маленькое отверстие под очень большим давлением; они разрушаются под действием силы сдвига
Ультразвук	Суспензии клеток	Ультразвуковые волны создают высокий локальный градиент давления; в результате клетки разрушаются под действием напряжения сдвига и кавитации
Шаровая мельница	Суспензии клеток	Разрушение клеточной стенки происходит под действием быстрой вибрации стеклянных шариков
Гомогенизатор Мэнтон – Гаулина	Суспензии клеток	Действует так же, как и пресс Френча, но позволяет обрабатывать больше материала

Наконец, фермент может быть нерастворим в буфере, используемом для экстракции.

После разрушения клеток и осаждения нерастворимого материала центрифугированием получают экстракт. Смесь до центрифугирования обычно называют гомогенатом. После центрифугирования в жидкой фазе должна находиться по возможности большая часть фермента, присутствовавшего в исходном материале. Часть жидкости удерживается осадком, и общие потери будут пропорциональны отношению объема осадка к объему жидкой фазы. При получении экстракта потери за счет удерживания жидкости осадком не должны составлять более 20 %, если только сырье не очень легкодоступно и высокая концентрация фермента при малом объеме экстракта не является более важным условием, чем полное выделение фермента из гомогената. Если объем жидкости, удерживаемой осадком, составляет половину объема осадка, то отсюда можно подсчитать, что для выделения 80 % фермента необходимо, чтобы объем надосадочной жидкости в два раза превышал

объем осадка. Большинство животных тканей содержит значительное количество нерастворимого клеточного материала, который связывает большой объем воды. При работе с ними объем осадка получается практически равным исходному объему ткани (в некоторой мере это зависит от условий центрифугирования). Таким образом, когда получают гомогенат, например из печени, необходимо добавить по крайней мере два объема подходящего экстрагирующего буфера. Чем больше буфера будет добавлено, тем большая часть растворимой фракции экстрагируется, но экстракт будет более разбавленным; его большой объем может создать трудности в дальнейшей работе. Для приготовления гомогенатов из печени, сердца и скелетных мышц обычно добавляют 2,5 объема экстрагирующего буфера.

Растительные ткани значительно отличаются от животных. Как упоминалось ранее, внутриклеточное содержимое составляет лишь малую часть объема растительной ткани. Наличие больших вакуолей (рассматриваемых здесь как внеклеточные образования) и межклетников служит причиной высвобождения большого количества жидкости при разрушении ткани. В этом случае практически не требуется добавления экстрагирующей жидкости. Объем осадка после центрифугирования может составлять только 20–40 % объема исходной растительной ткани. Тем не менее использование дополнительного экстрагирующего раствора может быть очень важно для контролирования нежелательных процессов, происходящих во время гомогенизации. Такими процессами могут быть подкисление среды или окисление нестойких соединений. Особую проблему представляют растения, содержащие фенольные соединения, которые окисляются в основном под действием эндогенных феноксидаз с образованием темных пигментов. Эти пигменты ковалентно соединяются с белками и инактивируют многие ферменты. Пригодны два способа решения данной проблемы. Во-первых, добавление какого-либо тиолового соединения, например β -меркаптоэтанола, сводящего до минимума действие феноксидаз. Во-вторых, часто оказывается полезным добавление порошкообразного поливинилпирролидона, адсорбирующего фенольные соединения.

По объему осадка, получаемого после центрифугирования, микроорганизмы больше похожи на животные ткани. Дрожжи и сходные с ними грибы с толстой клеточной стенкой дают осадок, объем которого практически равен исходному объему клеточного материала. То же самое характерно и для бактерий. Если в процессе экстракции действуют значительные силы сдвига, в раствор может перейти большое количество материала клеточной стенки.

Фрагменты клеток легко отцентрифугировать. Это особенно касается крупных остатков животных и растительных тканей. Однако после центрифугирования, например при 10 000 g в течение 15 мин, в суспензии остаются внутриклеточные частицы. Мутность полученного раствора не имеет существенного значения, так как ее можно устранить на этапах фракционирования. Использование более мощных устройств для разрушения клеток, таких как шаровая мельница, дает возможность разрушать клеточные стенки до мельчайших частиц относительно низкой плотности, обусловленной тем, что в них обычно содержатся липиды. Такие частицы трудно осаждаются при доступных для больших объемов величинах g, и экстракт может остаться очень мутным. Методы осветления экстракта описаны ниже.

Ткани животных. Ткань нарезают на кусочки, удаляют, насколько это возможно, соединительную ткань и жир. Разрезанную ткань помещают в лопастной гомогенизатор, добавляют 2–3 объема холодного экстрагирующего буфера в расчете на 1 г ткани. Смесь гомогенизируют в течение 30 с; гомогенизацию повторяют, если остались куски неразрушенной ткани. При доведении pH до нужного значения перемешивают гомогенат 10–15 мин, а затем переносят его в центрифужные пробирки. Центрифугируют при 5000–10 000 g в течение 60 мин ($2 \cdot 10^5$ – $3 \cdot 10^5$ g · мин). Экстракт сливают или через фильтр *Miracloth*, или марлю, или стеклянную вату для удаления частиц жира.

Эритроциты. Экстракт можно легко получить из осажденных центрифугированием эритроцитов после промывания их изотоническим раствором NaCl (0,9 %, 0,15 M) и повторного центрифугирования. Клетки разрушают осмотическим шоком в воде (2 объема воды на 1 объем отцентрифугированных клеток). Однако около 90 % белка, переходящего в раствор, составляет гемоглобин, и если вы занимаетесь очисткой другого белка, то очень полезно применить метод селективного удаления гемоглобина. Для денатурации гемоглобина успешно применяется смесь «этанол – хлороформ».

Мягкие растительные ткани. К растительной ткани добавляют только 0,5–1 объем холодного буфера, содержащего 20–30 mM меркаптоэтанола, и гомогенизируют в течение 30 с или пропускают через бытовую соковыжималку, предварительно промытую буфером. Гомогенат следует отцентрифугировать как можно скорее, чтобы уменьшить его потемнение в результате окисления ($2 \cdot 10^5$ – $3 \cdot 10^5$ g · мин). Жидкость осторожно сливают с поверхности осадка. Для адсорбции фенолов полезно добавить порошкообразный поливинилпирролидон.

Дрожжи. 1. Полностью разрушить клетки можно с помощью гомогенизатора Мэнтон – Гаулина, используя около двух объемов буфера на 1 г сырой массы.

2. *Автолиз толуолом.* Применяют различные методы с использованием толуола; однако не все они пригодны для работы с коммерческими дрожжами. В основе этих методов лежит обработка дрожжей толуолом, обычно при температуре 35...40 °С. Через 20–30 мин дрожжи «разжижаются» вследствие экстракции компонентов клеточной стенки. После этого к дрожжам добавляют буфер и перемешивают их в течение нескольких часов или оставляют на ночь на холоде. Поскольку метод автолитический и структуры клеточной стенки разрушаются под действием ферментов, во время обработки может произойти деградация некоторых клеточных ферментов. Вместо толуола можно взять этилацетат, но он не годится для работы со штаммами дрожжей, имеющими более прочные клеточные стенки.

3. *Цитолиз аммиаком.* Этот метод более всего подходит для работы с сухими дрожжами. Он прост, но некоторые ферменты, не обладающие устойчивостью при рН 10, могут быть полностью утрачены. Активные сухие дрожжи размешивают в 0,5 М растворе NH_4OH (2 объема раствора на 1 г сухого вещества) в течение 16–20 ч при комнатной температуре. Введение небольшого количества толуола (5–10 % от общего объема) иногда способствует растворению белков. Затем добавляют 1–2 объема воды и необходимое количество уксусной кислоты, чтобы снизить рН до нужного значения. После этого центрифугированием удаляют обломки разрушенных клеток.

Бактерии. Бактериальные клетки можно разрушить ультразвуком, с помощью шаровой мельницы или пресса Френча, хотя не все эти способы удобны для приготовления больших объемов экстракта. В случае небольших объемов клетки можно растирать с оксидом алюминия. Грамположительные бактерии обычно чувствительны к лизоциму. Для высвобождения компонентов цитоплазмы бывает достаточно 15-минутного перемешивания суспензии клеток в буфере, содержащем 0,2 мг/мл лизоцима яичного белка, при 37 °С. Обработка полученного экстракта дезоксирибонуклеазой I (10 мкг/мл) улучшает его качество, так как при этом степень вязкости жидкости уменьшается.

Грамотрицательные бактерии, если их предварительно не обрабатывать, менее чувствительны к лизоциму. Недавно описан способ комбинированной обработки клеток неионным детергентом, осмотическим шоком и лизоцимом. Модификацию этого метода использу-

ют при экстракции грамотрицательных микроорганизмов *Zygomonas mobilis* и *Photobacterium phosphoreum*. При этом достигается исчерпывающая экстракция ферментов, хотя полного диспергирования клеточной стенки не происходит.

К 10 г сухой клеточной массы добавляют 0,1 мл 10 %-го (по объему) раствора тритона X-100, 10 мкл меркаптоэтанола и 2,5 мл глицерина. Клетки диспергируют и энергично размешивают в течение 30 мин. Затем быстро добавляют 30 мл экстрагирующего буфера (например, 20 мМ KP_i , рН 7,0 + 1 мМ этилендиаминтетраацетата (ЭДТА)), содержащего 0,2 мг/мл лизоцима и 10 мкг/мл дезоксирибонуклеазы, и продолжают перемешивание еще 30 мин. К смеси добавляют 5 мг фенилметилсульфонилфторида, растворенного в 0,5 мл ацетона, и 0,1 мг пепстатина А, после чего суспензию центрифугируют (15 000 g в течение 20 мин).

Здесь приведено лишь несколько примеров процедур получения экстрактов из различных источников. На практике чаще пользуются опубликованной методикой, но следует помнить, что применяемое сырье так же, как и оборудование, может значительно отличаться от описанных в методике, поэтому иногда возникает необходимость приспособить метод к определенным условиям.

Таким образом, в основе методов экстрагирования лежит размельчение материала в соответствующем буфере с последующим центрифугированием смеси для удаления нерастворимых остатков.

6.6.3. Оптимизация и осветление экстракта

Часто поведение белков при фракционировании зависит не только от их особенностей, но и от состава раствора, в который входят также и другие белки. Неудачи могут быть связаны с неоптимальными условиями гомогенизации (низкое давление в ячейке прессы, износ шариков в шаровой мельнице, затупление лопастей гомогенизатора), что приводит к неполному разрушению клеток. В результате экстракт может быть более разбавленным и состав его будет другим, так как при неполном разрушении клеток не все компоненты переходят в раствор. Для оценки данного экстракта важно точно знать содержание фермента в одном грамме исходного материала. Пожалуй, лучше всего сначала получить экстракт из небольшого количества исходного материала, используя большой объем экстрагирующего буфера (ска-

жем, 10 мл/г), и последовательно определять активность фермента через разные промежутки времени. С увеличением времени обработки активность фермента, вероятно, будет постепенно снижаться, так как сама обработка приводит к денатурации белков либо в результате нагревания, либо под действием сил сдвига в ходе измельчения материала. Часто необходимо охлаждать систему в процессе разрушения клеток. Для этого применяют охлажденный буфер и короткие периоды обработки материала чередуют с периодами охлаждения. Как упоминалось ранее, очень важно учитывать объем экстрагирующего буфера на грамм материала. При использовании больших количеств исходного материала приходится идти на компромисс между желанием добиться максимальной экстракции и стремлением получить минимальный объем экстракта.

Для определенных целей экстрагирующий буфер должен содержать вещества типа β -меркаптоэтанола. Для экстракции можно применять и воду, но она экстрагирует не все белки. Было бы замечательно, если бы нужный фермент полностью экстрагировался водой. Клетки содержат разные соли и много нерастворимого, несущего заряд материала – белки, фосфолипиды, нуклеиновые кислоты. Ионная сила в цитоплазме типичной клетки колеблется в пределах 0,15–0,2 М. В этих условиях цитоплазматические белки растворимы в том смысле, что они могут перемещаться в клетке. При гомогенизации клеток с 2–3 объемами воды ионная сила гомогената может уменьшиться до 0,05 и ниже. В этих условиях заряженные частицы в растворе могут действовать в качестве ионообменников и адсорбировать белки, особенно основные.

Если гомогенат готовится на разбавленном буфере, то, чем больше добавляется буфера, тем большая часть белка переходит в нерастворимую фракцию. Не всегда учитываются ионообменные адсорбционные свойства (в отличие от физиологически важных специфических взаимодействий) клеточных компонентов. Для того чтобы быть уверенным, что все растворимое содержимое клетки перешло в экстракт, следует использовать буфер с ионной силой, близкой к физиологической, и, конечно, с соответствующим значением рН. Если при этом экстрагируется слишком много нежелательных компонентов, лучше пойти на компромисс. Обычно применяют следующие буферы: 20–50 мМ фосфат, рН 7–7,5, 0,1 М трис-НСl, рН 7,5 и 0,1 М КCl с небольшим содержанием в нем буфера; для выделения органелл берут изоосмотические буферные смеси, содержащие наряду с солями и буферными миллимолярными β -меркаптоэтанол-ионами сахарозу, маннит или сорбит. Буфер

может содержать также ЭДТА или цистеин (5–20 мМ) и специфические стабилизирующие агенты для определенных белков, например Zn^{2+} для цинкосодержащих белков или пиридоксальфосфат для ферментов, использующих его в качестве кофактора.

После разрушения клеток в соответствующем буфере желательно проверить рН гомогената. Хотя после гомогенизации действительно свежего материала в буфере гомотенат имеет тот же рН, что и буфер. Это значение может снизиться вследствие метаболических процессов, ведущих к закислению среды. Хорошим примером могут служить скелетные мышцы, в которых гликоген быстро превращается в молочную кислоту и рН гомогената может упасть с 7,0 до 6,0 за 30–60 мин (включая время центрифугирования). В таких случаях перед центрифугированием значение рН можно поднять выше нужной величины (например, 1 М трис-буфером). Кроме того, добавление ингибитора гликолиза может остановить процесс. В этих целях иногда используют фторид (10–30 мМ).

Такие замечания относятся к улучшению условий экстракции всех растворимых компонентов. Экстрагирование какого-то одного фермента или белка лучше осуществлять в среде, в которой не происходит полной солюбилизации всех компонентов, а нужный объект экстрагируется полностью.

Часто экстракт получается мутным. После центрифугирования на его поверхности могут плавать частицы жира. Жир можно удалить грубой фильтрацией через стекловату или плотную фильтровальную ткань. Нерастворимые частицы суспензии содержат органеллы и фрагменты мембран, которые полностью осаждаются только при 100 000 g, – процедура очень неудобная для больших объемов экстракта. Фильтрация в таких случаях обычно бесполезна, так как если фильтр достаточно плотен и задерживает частицы, то он быстро засоряется. Однако если мутность незначительна, но нужен прозрачный экстракт, например для пропускания через адсорбционную колонку, фильтрацию можно провести с помощью целита.

Различные типы экстрактов. При работе с некоторыми животными тканями частицы составляют незначительную часть экстракта и ими можно пренебречь. Они агрегируют при первом же фракционировании сульфатом аммония и затем удаляются. С другой стороны, есть животные ткани, содержащие больше жиров и мембранных структур; при экстрагировании таких тканей образуются суспензии. Подкисление среды до рН 6,0–5,0 обычно приводит к агрегации материала, который можно затем отцентрифугировать при относительно низкой

скорости. Рибосомы и другие нуклеопротеиды обычно удаляются при подкислении, которое можно рассматривать как одну из форм изоэлектрического осаждения; фосфатные группы протонируются и нейтрализуют или по крайней мере снижают заряд частиц суспензии. Этот способ дает очень хорошие результаты при условии, что нужный белок: а) не осаждается изоэлектрически при данном значении рН; б) не адсорбируется на образовавшемся осадке; в) остается стабильным при нефизиологических значениях рН. Экстракт охлаждают и снижают рН соответствующей кислотой (например, 1 М уксусной). После перемешивания в течение 10–20 мин осадок отделяют центрифугированием, а рН надосадочной жидкости доводят, если необходимо, до нужного значения перед тем, как приступить к первому этапу фракционирования. Растительные ткани отличаются прежде всего тем, что реакция среды в них более кислая и содержащиеся в них частицы, такие как фрагменты хлоропластов, агрегируют значительно труднее. К тому же растительные экстракты содержат сравнительно мало корпускулярного материала, если не считать грубых частиц типа зерен крахмала, которые легко осаждаются после приготовления экстракта.

При приготовлении экстрактов из микроорганизмов возникает целый ряд проблем. Во-первых, из быстропролиферирующих клеток экстрагируется много нуклеиновых кислот. Во-вторых, в процессе разрушения клеток материал клеточной стенки либо сильно диспергируется, в результате чего раствор становится мутным, либо частично растворяется, и в растворе наряду с белками и нуклеиновыми кислотами оказывается много камедеподобных полисахаридов. Это создает определенные трудности на первых этапах фракционирования.

Экстракты, приготовленные из бактериального материала при помощи пресси Френча, под воздействием ультразвука или при обработке лизоцимом, получают вязкими из-за присутствия в них ДНК и содержат значительные количества рибосомного материала. Все нуклеиновые кислоты осаждаются в результате их агрегации с макромолекулярными поликатионами. Хорошими реагентами для этого служат протамин лососевых рыб и клупеин молок сельди, поскольку связывание с ДНК – естественная функция этих веществ. С обычно используемым протаминсульфатом следует быть весьма осторожным: он обладает сильными кислотными свойствами, и перед употреблением его необходимо растворить в воде и нейтрализовать. Следует установить, какое количество протаминсульфата потребуется. Оно может достигать 5 мг на 1 г обрабатываемого материала. Протаминсульфат осаж-

дает ДНК, рибосомные нуклеиновые кислоты, матричную РНК (мРНК), транспортную РНК (тРНК) и другие нуклеиновые кислоты. На образовавшемся осадке могут также адсорбироваться некоторые белки. Адсорбцию на протаминовом осадке используют даже как этап в процессе очистки ферментов. Если применение протамин окажется невозможным или нежелательным, вязкость раствора ДНК можно снизить с помощью ДНКазы. Рибосомы можно осадить стрептомицином. Хотя стрептомицин хуже осаждаёт нуклеиновые кислоты, чем протамин, при его использовании теряется меньше белка в результате адсорбции на образующемся осадке.

После удаления нуклеиновых кислот в растворе могут остаться капсульные камедеподобные углеводы. Это создаёт трудности при применении обычных способов осаждения белков. В присутствии этих веществ невозможно использование сульфата аммония и других методов фракционного осаждения. Лучше полностью осадить белок, чтобы камедеподобные вещества остались в растворе. Практически весь белок можно осадить при 80 %-м насыщении сульфатом аммония или 55 %-й концентрации ацетона. В случае использования сульфата аммония для осаждения белка может понадобиться скоростное центрифугирование. Но даже после этого растворенный белковый осадок содержит вещества, снижающие воспроизводимость результатов при работе на колонке или при других методах фракционирования. Недавно найдены два пути преодоления этих трудностей. Первый – это амфифильная адсорбция на геле агарозы, при которой все белки адсорбируются на гранулах агарозы в растворе сульфата аммония 70–80 %-го насыщения, тогда как небелковый материал вымывается. При экстракции гранул агарозы буфером белок переходит в раствор, который далее фракционируют обычным способом. Второй путь – использование соответствующего метода экстракции. При обработке клеток лизоцимом обычно не образуется слишком много капсульных камедеподобных веществ – лизоцим растворяет их, но не разрушает все бактериальные клетки. Для получения достаточно прозрачного экстракта из бактерий успешным оказалось применение лизоцима вместе с неионным детергентом. После удаления нуклеиновых кислот такой экстракт можно непосредственно использовать для фракционирования. Подобные проблемы возникают при работе не со всеми бактериями. Опубликовано множество работ по выделению ферментов из бактериального материала, в которых успешно проводится обычное фракционирование вслед за обработкой экстракта протамином или стрептомицином.

Приготовление экстрактов из дрожжей связано с несколькими проблемами. Главная из них состоит в том, что клеточные стенки у грибов очень толстые и их трудно разрушить, поэтому для получения экстракта требуются более эффективные методы. Если экстракт нужно получить быстро, то единственный надежный способ – применение вибрационной шаровой мельницы или гомогенизатора Мэнтон – Гаулина. При применении этих методов образуется большое количество частиц низкой плотности, которые не полностью удаляются центрифугированием. Мутность может снизить эффективность осаждения белка сульфатом аммония. Однако ее можно устранить путем агрегации частиц в органическом растворителе (ацетон, 20–25 % по объему при 0 °С). В прозрачном растворе остается большинство ферментов, которые осаждаются при повышении концентрации ацетона. Прозрачные экстракты получают так же, используя автолиз толуолом, но в этих условиях может происходить протеолитическое расщепление белков.

Для выделения очень стабильного фермента фосфоглюкомутазы применяют цитолиз под действием концентрированного аммиака. Эта процедура разработана и широко распространена при работе с «активными сухими» дрожжами. Ее используют для получения прозрачных экстрактов, содержащих большую часть гликолитических ферментов. Некоторые ферменты полностью разрушаются при высоких значениях pH. В этом методе протеолиз не представляет серьезной проблемы, так как активность протеаз достаточно низка при pH 9,5–10. Эффективность экстракции может значительно варьировать в зависимости от партии дрожжей.

6.6.4. Методы очистки белков и ферментов, ассоциированных с частицами

Ряд специфических методов широко применяется для выделения белков и ферментов, структурно связанных с нерастворимыми компонентами клетки, такими как митохондрии, хлоропласты, плазмалемма, эндоплазматический ретикулум и ядерные мембраны. Эти методы не применяются в случае водорастворимых белков, заключенных внутри органелл, например к белкам митохондриального матрикса, а лишь для молекул, ковалентно связанных или прочно ассоциированных с частицами. Существенной степени очистки по сравнению с исходным материалом можно добиться, многократно промывая гомогенат буфером, в котором данный белок не растворяется. После этого

возможны два подхода к решению проблемы. Можно фракционировать осадок методом дифференциального центрифугирования (седиментация или градиент плотности), с помощью электрофореза или «молекулярных сит».

Другой способ заключается в солюбилизации белков (субфракционирование может предшествовать солюбилизации). Не все ферменты способны существовать в солюбилизованном состоянии, будучи изолированными от их нормального клеточного окружения; поэтому успех очистки таких соединений зависит от того, насколько полно можно отделить фрагменты частиц, содержащие фермент, от прочего корпускулярного материала.

Белок, связанный с частицами, может быть солюбилизован различными путями. Во многих случаях солюбилизованные белки ведут себя в дальнейшем, как все водорастворимые белки, и их фракционирование может быть проведено с помощью процедур, описанных в разд. 3–5. С другой стороны, иногда возникает необходимость солюбилизовать вещество, используя детергенты. В этом случае детергент, связанный с белком, замещает липидсодержащую мембрану. Если впоследствии детергент удаляют, белок может денатурировать или по крайней мере агрегировать и выпасть из раствора.

Большая часть подробно изученных мембраносвязанных белков и ферментов относится к первой категории: их можно выделить с помощью физических, химических или энзиматических методов; полученный раствор фракционируют далее обычным способом. Много таких ферментов содержится в митохондриях, в том числе ферменты, ассоциированные с системой переноса электронов. Их выделяют посредством таких методов, как:

1) разрушение митохондрий для выделения белков матрикса с последующим выделением мембранных белков из митохондриальных фрагментов с помощью: а) ультразвука, особенно при высоких значениях pH и температуры; б) щелочи (pH 8–11) в присутствии или отсутствии агентов, образующих хелаты металлов (ЭДТА); в) солюбилизации под действием детергентов; г) органических растворителей (например, получение ацетонового порошка, экстракция н-бутанолом, этанолом и т. д.); д) фосфолипазы А для расщепления липидов мембраны;

2) экстракция липидов и получение ацетонового порошка. Суспензию частиц обрабатывают несколькими объемами ацетона при очень низкой температуре (например, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ или ниже). Полученный таким образом обезвоженный порошок может храниться долгое время. Белки

растворяют, диспергируя их в водном буферном растворе. Это классический способ, до сих пор находящий применение.

Большинство мембраносвязанных белков можно экстрагировать из мембран в присутствии детергентов, в состав которых входят липофильные цепи, взаимодействующие с гидрофобными поверхностями белка и вытесняющие его из комплекса с нормальной мембраной. Из детергентов наиболее широко применяются дезоксихолат натрия и тритон. Тритон – это торговое название целой серии в большинстве своем неионных детергентов на основе полиэтиленгликоля. Наиболее часто в различных целях используют тритон X-100, хотя детергенты других типов также находят определенное применение. Детергенты способны вытеснять белок, прочно связанный с мембраной гидрофобными взаимодействиями, благодаря тому, что они, во-первых, растворяют мембрану и, во-вторых, замещают компоненты мембраны алифатическими или ароматическими цепями, которые составляют липофильную часть детергента.

Если белок солюбилизирован и установлено, что его целостность не нарушена, можно провести фракционирование. В большинстве случаев это не представляет особой проблемы. Необходимо сохранить биологическую активность белка; это зависит от выбора подходящего детергента. Неионные детергенты, такие как тритон X-100, очень мягки по своему действию, и большинство белков, как связанных с мембранами, так и свободных, выдерживают концентрации тритона X-100 до 1–3 % (вес/об.). Напротив, некоторые анионные детергенты (например, додецилсульфат) обладают наряду с солюбилизующими свойствами очень сильным денатурирующим действием. Они, по-видимому, не найдут широкого применения при выделении ферментов.

Липопротеины содержат ковалентно или нековалентно связанный липид, который в свою очередь погружен в мембрану и служит связующим звеном между белком и частицей. Экстракция в присутствии детергента может привести к удалению липида и замещению его детергентом. Это может быть причиной потери ферментативной активности, которая восстанавливается при добавлении природного липида – обычно фосфатида. С такими белками особенно трудно работать, так как они очень чувствительны к соотношению в растворе детергента и липида. Удаление детергента неизменно ведет к агрегации и чаще всего к денатурации.

Избыток детергента может мешать фракционированию. Например, высаливание сульфатом аммония приводит к появлению на по-

верхности раствора слоя тритона X-100, в котором часто содержатся нужные белки. Однако эффективного разделения при этом не происходит. Можно провести колоночную хроматографию или отделить белки с помощью гель-фильтрации, но не исключено, что мицеллы детергента будут двигаться в той же зоне, что и белок, и, следовательно, окажутся в одной фракции. Ионообменная хроматография успешно осуществляется в присутствии неионных детергентов. Действительно, тритон X-100 в концентрации до 1 % оказывает незначительное влияние на ионообменные свойства нормальных водорастворимых белков. Но солибулизированные белки мембран могут находиться только в составе детергентных мицелл, что существенно влияет на процесс ионного обмена. Если исследуемый белок удается адсорбировать на ионообменнике, то избыток детергента свободно проходит через колонку. Это позволяет элюировать свободный (относительно) от детергента белок. С другой стороны, если полное удаление детергента приводит к денатурации белка, то чтобы предотвратить это, в буфер вносят небольшое количество детергента ($< 0,1\%$). Собранная фракция будет, конечно, тоже содержать некоторое количество детергента. Однако поскольку обычно из смеси белков выделяют какой-то определенный фермент, присутствие в конечном препарате незначительной концентрации чистого детергента, не загрязненного жирами, не принесет большого вреда.

Белки, связанные с мембранами, отличаются по растворимости от типичных цитоплазм этических ферментов, и для их очистки иногда применяются (и вполне успешно) некоторые необычные эмпирически найденные методы.

6.7. Биотехнология производства интерферона

В 1957 г. Э. Айзекс и А. Линдемман обнаружили, что клетки животных, инфицированных вирусами, выделяют в сферу фактор, который способен вызывать у гентактных (не обработанных вирусом) клеток устойчивость к вирусной инфекции. Этот фактор был назван *интерфероном*.

Интерферон относится к протеинам или гликопротеинам, в состав которых включено 146–166 аминокислотных остатков. Молекулярная масса – 20–80 кДа.

Эффекты интерферона:

1) обладает *антивирусным* действием – стимулирует образование интерлейкина-2, увеличивает синтез ферментов (эндонуклеазы способны «разрезать» молекулы нуклеиновых кислот вирусов на уровне трансляции);

2) вызывает *ингибирование клеточного роста* (используется как *противоопухолевое средство*), способен подавлять деление онкогенных клеток при сохранении функции активации всех звеньев иммунной системы;

3) оказывает *стимулирующее влияние на фагоцитоз*, естественные клетки – *киллеры и макрофаги*; *повышает неспецифическую резистентность клеток*;

4) обладает *антимикробной активностью*;

5) оказывает радиозащитное действие;

6) является *иммуномодулятором*, т. е. регулирует иммунологические реакции, стимулирует иммунную систему организма.

Вырабатывается интерферон клетками позвоночных.

Наиболее активные продуценты интерферона – *лимфоциты и макрофаги*.

Наиболее активные *индукторы среди вирусов* – вирус Ньюкаслской болезни, вирус Сендай, вирус чумы свиней.

Классы интерферона:

1) *лейкоцитарный*, или α -*IFN*, получают из культуры лейкоцитов, выделенных из крови доноров. Различают 20 рекомбинантных вариантов, отличающихся последовательностью аминокислот в полипептидной цепи и биологической активностью;

2) *фибробластный*, или β -*IFN*, выделяют из культуры фибробластов;

3) *иммунный*, или γ -*IFN*, синтезируют сенсibilизированные *T-лимфоциты* при повторном контакте с мутагенами, а также с бактериальными и вирусными антигенами (АГ).

Все три класса интерферонов обладают различными физико-химическими свойствами и отличаются друг от друга серологически.

Существуют следующие виды интерферонизации:

- *экзогенная* – введение готового интерферона в организм, использование мазей, содержащих интерферон;

- *эндогенная* – введение в организм индукторов интерферона, которые стимулируют процесс образования интерферона.

Наиболее активными индукторами интерферона являются *синтетические и природные двуцепочечные РНК*.

Механизм действия индукторов IFN следующий:

- стимулируют фагоцитоз и биосинтез антител;
- тормозят рост и метастазирование опухолей;
- проявляют антиклеточную активность;
- оказывают радиозащитное действие;
- увеличивают чувствительность клеток к действию интерферона;
- принимают участие в регуляции биосинтеза белка в клетке.

Поэтапная биотехнология производства IFN:

• выделение информационной РНК (иРНК), несущей информацию о структуре молекулы интерферона (РНК выделяют после индукции синтеза интерферона);

• получение комплементарной ДНК (кДНК) на матрице иРНК;

• встраивание кДНК в векторную плазмиду с участием ферментов рестриктаз и лигаз и получение рекомбинантной ДНК (рДНК), содержащей ДНК вектора с генетическими маркерами, и ДНК, кодирующей синтез целевого продукта;

• трансформация рДНК в реципиентную (пермиссивную) микробную клетку;

• получение клонов рекомбинантных продуцентов, способных синтезировать интерферон (на плотной питательной среде);

• размножение клоновой культуры – продуцента в жидкой питательной среде;

• отделение клеток из культуральной жидкости центрифугированием;

• выделение целевых белков из нативного раствора или лизата биомассы продуцента, например осаждением сульфатом аммония;

• очистка интерферона после растворения осадка с помощью аффинной хроматографии при использовании сорбента, связанного с моноклональными антителами к интерферону.

При пропускании раствора, содержащего целевой продукт и балластные вещества, через колонку с иммуносорбентом происходит высокоспецифическое связывание антигена (интерферона) с моноклональными антителами к нему, все прочие вещества не задерживаются. Затем интерферон элюируют слабой кислотой, происходит диссоциация комплекса «антиген – антитело».

Для получения 60 мкг лейкоцитарного интерферона нужно 100 л крови или 1 л культуральной жидкости микроорганизма-рекомбинанта.

Существуют и другие способы получения интерферона:

• на основе сконструированных рекомбинантных ДНК, экспрессируемых в клетках *E. coli* (β -, α -IFN);

- при синтезе химическим путем β - и α -интерферона;
- при введении в эукариотическую дрожжевую клетку вектора, на основе которого сконструирована рекомбинантная молекула ДНК с ионами β и α -интерферонов;

- с применением моноклональных антител к соответствующему IFN.

По характеру действия и клинической значимости препараты IFN разделены на четыре основные группы:

- *этиотропные*, действующие на возбудителя заболевания;
- *иммуномодулирующие*, корригирующие нарушения системы иммунитета, возникающие и развивающиеся в процессе болезни;
- *патогенетические*, направленные на борьбу с интоксикацией, обезвоживанием, сосудистыми поражениями, органными нарушениями, аллергическими реакциями, а также на профилактику бактериальных осложнений;
- *симптоматические*, купирующие сопутствующие симптомы заболевания (головная боль, бессонница, кашель и др.).

Антивирусные средства делят на четыре группы:

- химиопрепараты;
- интерфероны;
- индукторы IFN;
- иммуномодуляторы.

Химиопрепараты – главным образом средства этиотропной терапии. Интерфероны (ИНФ) и их индукторы обладают комбинированным эффектом (этиотропным и иммуномодулирующим). Иммуномодуляторы используются для иммунотерапии и иммунокоррекции.

Преимущества применения интерферона:

- широкий спектр действия, что очень важно при терапии вирусных пневмоэнтеритов молодняка;
- действие интерферона обуславливается активацией естественных механизмов защиты организма на ранних стадиях инфекционного процесса;
- эффект проявляется сразу же после введения препарата.

Применение интерферона имеет ряд недостатков:

- короткий период сохранения в организме (до 12 ч);
- препарат применяется в основном только парентерально;
- через 2–3 дня после применения интерферона наблюдается угнетение защитных функций иммунной системы, что может привести к быстрому размножению в организме условно-патогенной микрофлоры;
- возможны аллергические реакции при длительном применении.

6.8. Биотехнология производства интерлейкинов

Интерлейкины (ИЛ) – вещества белковой или гликопротеидной природы, синтезируемые преимущественно иммунокомпетентными клетками.

В настоящее время выделено и охарактеризовано 15 интерлейкинов.

К интерлейкинам, играющим существенную роль в кооперативных взаимодействиях иммуно-компетентных клеток при развитии иммунного ответа, относятся ИЛ 1, ИЛ 2, ИЛ 4, ИЛ 5, ИЛ 6.

ИЛ 1 – цитокин, выделяемый макрофагами, стимулирующий функции Т- и В-лимфоцитов. С участием ИЛ 1 активируются Т-хелперы, синтезирующие *ИЛ 2*, а также В-лимфоциты, трансформирующиеся в плазматические клетки – антителопродуценты. Он служит посредником в обеспечении взаимодействия различных защитных противоинфекционных механизмов на уровне организма.

ИЛ 3 – цитокин, синтезируемый Т-лимфоцитами, стимулирует В-лимфоциты при гуморальном иммунном ответе и созреванию Т-эффекторов в реакциях клеточного иммунного ответа. ИЛ 3 – ключевой фактор развития иммунного ответа.

ИЛ 4 – фактор стимуляции В-клеток и части Т-лимфоцитов. Регулирует аллергические реакции организма. С помощью ИЛ 4 Т-хелперы влияют на продукцию иммуноглобулина Е (Ig E) в процессе развития иммунного ответа. Основные продуценты ИЛ 4 – нормальные Т-лимфоциты и Т-клеточные гибридомы.

ИЛ 5 – мультифункциональный цитокин, активирующий Т- и В-лимфоциты и эозинофилы; продукт активированных Т-лимфоцитов.

ИЛ 6 – один из ранних цитокинов, продуцируемый многими типами клеток (фактор роста гибридом/плазмоцитом, Т-лимфоцитами активирующий фактор), участвует в регуляции функций лимфоцитов, обладает противовирусным действием.

В качестве *продуцентов интерлейкинов* используют:

- культуры нормальных лимфоцитов или макрофагов;
- клоны трансформированных (опухолевых) клеток;
- Т-клеточные гибридомы – продукты гибридизации опухолевых лимфоцитов, способных к нормальному росту, и Т-клеток, синтезирующих определенный ИЛ;
- рекомбинантные микробные клетки, полученные методами генной инженерии.

Продуценты культивируют *in vitro* в сосудах определенного объема, затем ИЛ выделяют из культуральной среды, концентрируют, очищают.

Для увеличения продукции ИЛ культуры клеток стимулируют митогенами (веществами, вызывающими митотическое деление клеток). В качестве митогенов используют глобулярные растительные белки (фитогемаглютинин и др.), а также компонент клеточной стенки бактерий – мурамилдипептид.

Для создания рекомбинантных микроорганизмов – продуцентов ИЛ:

- гены, контролирующие их синтез, вводят в составе вектора в микробную клетку;
- выделяют и размножают клон рекомбинантов;
- культивируют полученный продуцент в целях накопления ИЛ.

В качестве рекомбинантных организмов используют клетки *E. coli* (ИЛ 1, ИЛ 2), *дрожжи-сахаромицеты* (ИЛ 2), причем дрожжи более удобны, так как клетки *E. coli* накапливают ИЛ внутриклеточно, а дрожжи выделяют его в окружающую среду, вследствие чего полученный продукт легче отделяется от клеток и очищается.

Глава 7

ПРОИЗВОДСТВО АМИНОКИСЛОТ

В промышленности аминокислоты получают следующими методами:

- гидролизом природного белоксодержащего сырья;
- химическим синтезом;
- микробиологическим синтезом;
- биотрансформацией предшественников аминокислот с помощью микроорганизмов или выделенных из них ферментов (химико-микробиологический метод).

Для гидролиза могут быть использованы остатки производства мясоперерабатывающей промышленности (отходы обработки животного сырья, кровь и т. д.), яичный белок, казеин молока, клейковина пшеницы, соевый шрот и т. д. При гидролизе белоксодержащее сырье нагревают с растворами кислот и щелочей до температуры 100...105 °С в течение 20–48 ч. При этом аминокислоты переходят в гидролизат и для выделения отдельных аминокислот необходима сложная, многостадийная очистка. Кроме того, само сырье считается дефицитным и дорогим, поэтому аминокислоты имеют высокую себестоимость. Помимо этого может разрушиться часть аминокислот, таких как триптофан, цистеин, метионин, тирозин, а также произойти рацемизация.

Химический синтез аминокислот достаточно эффективен, однако его недостаток заключается в том, что в процессе синтеза образуется смесь из биологически активной *L*-формы и *D*-изомера аминокислоты. *D*-форма является балластом, так как не усваивается животными и человеком, а некоторые *D*-формы аминокислот обладают токсическими свойствами. Разделение изомеров – дорогая и трудоемкая процедура. Синтетически производится незаменимая аминокислота метионин (рис. 9).

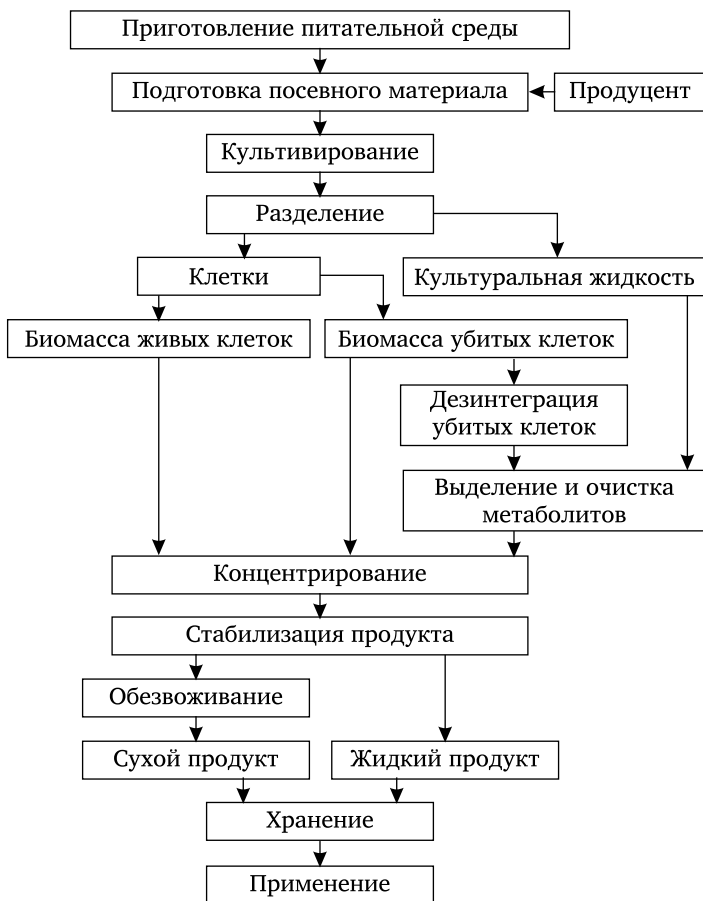


Рис. 9. Принципиальная биотехнологическая схема производства продуктов микробного синтеза

Наиболее перспективен и экономически выгоден микробиологический синтез аминокислот; 60 % высокоочищенных препаратов аминокислот получают именно этим способом. Его преимущество – возможность получения *L*-аминокислот на основе возобновляемого сырья.

В последние годы широко применяется биотрансформация предшественников аминокислот, полученных химическим синтезом, с помощью клеток микроорганизмов или иммобилизованных ферментов.

Среди продуцентов аминокислот используются дрожжи (30 %), актиномицеты (30 %), бактерии (20 %).

Brevibacterium flavum и *Corynebacterium glutamicum* более трети сахаров превращают в лизин.

Для селекции продуцентов используются микроорганизмы, относящиеся к родам *Micrococcus*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Arthro-bacter*.

Глутаминовая кислота – первая аминокислота, полученная микробным синтезом. Она относится к заменимым кислотам, обладает определенными органолептическими свойствами и находит самое широкое применение. Ее продуцентами являются бактерии *Corinebacterium glutamicum*, *Brevibacterium flavum* и др.

Лизин образуют многие микроорганизмы: бактерии, актиномицеты, синезеленые водоросли, некоторые виды микроскопических грибов. В нашей стране в качестве продуцентов лизина используют бактерии родов *Corinebacterium* (*C. glutamicum*), *Micrococcus*, *Brevibacterium*.

Триптофан образуют микроорганизмы бактериального и грибного происхождения: родов *Micrococcus* sp., *Candida utilis*, *Bacillus subtilis*.

Основные потребители аминокислот – сельское хозяйство и пищевая промышленность. Аминокислоты, чаще всего лизин, применяют в качестве обогатителей кормов и пищевых продуктов растительного происхождения для повышения их питательной ценности и сбалансирования пищи по незаменимым аминокислотам. При производстве комбикорма 1 т лизина позволяет экономить от 40 до 50 т фуражного зерна.

Некоторые аминокислоты используют в качестве приправ, так как они обладают определенными вкусовыми свойствами и могут сообщать продукту приятные аромат и вкус. Например, глутаминовая кислота и ее натриевая соль (глутамат натрия) являются эффективными усилителями вкуса мясных и овощных блюд. Данную аминокислоту добавляют во многие продукты при консервировании, замораживании и длительном хранении.

Для улучшения органолептических показателей мясных продуктов, придания им специфического приятного вкуса и аромата применяют цистин, лизин, гистидин. Цистеин и цистин с глутаматом натрия создают имитацию запаха и вкуса мяса, что используется при приготовлении приправ.

Многие аминокислоты (лизин, аланин, пролин, валин и другие) могут снимать неприятные запахи пищевых продуктов.

Аминокислоты обладают оригинальным вкусом и участвуют в образовании вкусовых особенностей пищевых продуктов. Например, аспарагиновая и глутаминовая кислоты, будучи кислыми, в нейтральных растворах имеют очень приятный оригинальный вкус, глицин обладает характерным вкусом «освежающей» сладости, которая по интенсивности близка к сахарозе.

Особый интерес представляет подсластитель аспартам, молекулу которого образуют две аминокислоты – фенилаланин и аспарагиновая кислота. Эти аминокислоты синтезируются микробиологическим путем, а аспартам из этих мономеров – с помощью ферментов. Сладость аспартама в 200 раз превышает сладость сахарозы.

7.1. Биотехнология синтеза аминокислот и их очистка

В последние годы широкое применение в народном хозяйстве и медицине находят различные аминокислоты. Особое значение они имеют для сбалансирования белкового питания. Некоторые пищевые и кормовые продукты не содержат в своем составе необходимых количеств незаменимых аминокислот, в частности лизина. К таким продуктам относятся пшеница, кукуруза, овес, рис и ряд других. Для ликвидации возможного дисбаланса аминокислоты используют в чистом виде или вводят в состав комбинированных кормов, выпускаемых промышленностью. Таким образом, основной сферой применения аминокислот следует считать создание рационов, позволяющих понизить содержание растительных белков в кормах. Показано, что искусственные смеси аминокислот позволяют экономить расход естественных кормов. Кроме добавок к кормам сельскохозяйственных животных аминокислоты используются в пищевой промышленности. Применяются они и при изготовлении ряда полимерных материалов, например синтетической кожи, некоторых специальных волокон, пленок для упаковки пищевых продуктов. Ряд аминокислот или их производных обладают пестицидным действием. Метионин и γ -аминомасляная кислота широко применяются как лекарственные средства. Удельный вес использования аминокислот в различных отраслях хозяйства может быть продемонстрирован на примере Японии, где на долю пищевой промышленности приходится 65 % всех производимых в стране аминокислот, на животноводство – 18, для медицинских целей – 15 и на прочие нужды – 2 %.

Мировой уровень производства аминокислот достигает в настоящее время нескольких миллионов тонн в год. В наибольших объемах в мире вырабатываются *L*-глутаминовая кислота, *L*-лизин, *DL*-метионин, *L*-аспарагиновая кислота, глицин. Основные способы получения аминокислот следующие: экстракция из белковых гидролизатов растительного сырья, химический синтез, микробиологический синтез растущими клетками, при использовании иммобилизованных микробных клеток или ферментов, выделенных из микроорганизмов.

Микробиологический синтез в настоящее время весьма перспективный и экономически выгодный способ получения многих аминокислот. В процессе культивирования продуцентов аминокислот непосредственно синтезируются *L*-аминокислоты. Одна из важных задач микробиологического синтеза аминокислот – получение высокоактивных штаммов-продуцентов, в частности с использованием методов генной инженерии. Именно таким способом был получен высокоактивный штамм-продуцент *L*-треонина.

Кроме микробиологического синтеза аминокислоты можно получать путем гидролиза природного белоксодержащего животного и растительного сырья. Это наиболее старый способ. Основной его недостаток – нерациональное использование сырья, которое с большой пользой может применяться в качестве белковых кормов или пищевых продуктов. Например, в странах Юго-Восточной Азии моноглутамат натрия получают из соевого шрота (обезжиренной соевой муки). В США описан метод получения аминокислот из клейковины пшеницы и кукурузного глютена, остающегося после отмывки крахмала. Могут быть названы и другие белки, но их применение для получения аминокислот экономически невыгодно.

Химический синтез аминокислот достаточно эффективен, позволяет получить соединения любой структуры и организовать непрерывное производство при высокой автоматизации. В нем в основном используется непищевое сырье, достигается высокая концентрация продукта. Однако, как правило, процесс этот многостадийный и требует сложной аппаратуры. Главный недостаток химического синтеза – получение рацемической формы аминокислот. Пока не разработаны достаточно эффективные и дешевые пути разделения соединений на оптические изомеры. Химический синтез рентабелен для получения только тех аминокислот, которые могут быть использованы в виде рацемического продукта. Наиболее хорошо разработан химический синтез *LD*-метионина, главным потребителем которого является птицеводство; *L*- и *D*-изомеры метионина усваиваются организмами одинаково хорошо.

В последние годы достижения в области асимметрического синтеза аминокислот позволяют избежать оптического разделения рацемических аминокислот. Новый подход к этой проблеме стал возможен благодаря открытию гомогенного каталитического гидрирования олефинов с помощью комплексов родия с фосфиновыми лигандами и разработке путей синтеза хиральных фосфинов. Применение комплексов родия с хиральными фосфинами в качестве гомогенных катализаторов для гидрирования N-ациламиноакриловых кислот позволило осуществить асимметрический синтез α -аминокислот с высокой степенью стереоспецифичности и хорошими выходами.

Использование для пищевых, кормовых и медицинских целей аминокислот, полученных химическим синтезом, вызывает еще одну существенную технологическую проблему – полное освобождение готового продукта от возможных токсических полупродуктов синтеза.

С 2000 г. прочные позиции занимает комбинированный химико-микробиологический метод синтеза, при котором исходное соединение получают в результате химических реакций, а конечная стадия осуществляется за счет активности ферментных систем соответствующих штаммов микроорганизмов.

Микробиологический метод синтеза аминокислот основан на способности многих микроорганизмов накапливать в среде значительные количества таких продуктов. Среди микроорганизмов – потенциальных продуцентов глутаминовой кислоты обнаружено много бактерий, ряд дрожжей и других грибов. Большинство обследованных штаммов микроорганизмов независимо от их систематического положения накапливают преимущественно α -аланин и глутаминовую кислоту. Значительно меньше штаммов и в меньшем количестве выделяют аспарагиновую кислоту, лейцин, валин, изолейцин, лизин. Строгой корреляции между видовой принадлежностью микроорганизмов и их способностью накапливать аминокислоты нет.

Несмотря на широкое распространение микроорганизмов, накапливающих аминокислоты в процессе роста, продуцентов, обеспечивающих экономически выгодные выходы этих продуктов, не так много. Получают их обычно путем применения различных мутагенных факторов. Продуцент должен аккумулировать преимущественно одну аминокислоту. Одновременное присутствие нескольких аминокислот, особенно если они близки по своим физико-химическим свойствам, затрудняет их выделение и очистку.

Ауксотрофные мутанты микроорганизмов, лишенные в результате действия мутагенов ряда ферментных систем, признаны наиболее цен-

ными продуцентами. Блокада у таких мутантов соответствующих реакций в цепи обмена веществ приводит к сверхсинтезу одного из метаболитов.

Распространенные продуценты аминокислот – грамположительные беспоровые бактерии, относящиеся к родам *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Brevibacterium* и некоторым другим, но точное таксономическое положение большинства из них определить трудно, так как содержащейся в публикациях информации явно для этого недостаточно.

Одним из наиболее важных научных положений микробиологического синтеза аминокислот считается вопрос об их происхождении: находящиеся в среде аминокислоты – продукты ферментативного распада белков в результате автолитического процесса или результат синтеза из других соединений? При использовании синтетических сред для культивирования продуцентов достаточно определенно показано, что аминокислоты, обнаруживаемые в среде, представляют собой продукты синтеза *de novo*.

Ферментативные реакции синтеза аминокислот протекают внутри клеток. Первоначально аминокислоты накапливаются внутри клеток в виде так называемых свободных аминокислот. На ранних этапах роста культуры свободные аминокислоты включаются в конструктивный обмен микроорганизма. Активное накопление аминокислот в среде в периодической культуре происходит обычно с середины экспоненциальной фазы ее роста, достигая максимума к концу.

7.2. Получение аминокислот с помощью иммобилизованных клеток и ферментов

С 2000 г. внимание исследователей привлекают методы получения аминокислот с использованием иммобилизованных ферментов. Способ имеет ряд преимуществ: в частности, конечный продукт отличается высокой концентрацией и чистотой, нет опасности заражения в ходе реакции посторонними микроорганизмами, в результате синтеза образуются только природные изомеры, имеется возможность осуществления непрерывных технологических процессов.

Микроорганизмы – основные источники ферментов, переводимых в иммобилизованную форму. Несмотря на то что иммобилизованные ферменты всегда дороже растворимых, их внедрение экономически оправданно при удовлетворении даже одного из таких условий, как

повышение стабильности фермента, обеспечивающее его многократное применение и тем самым сокращение расходов на препарат; улучшение качества продукта благодаря отсутствию в нем следов фермента и предотвращению нежелательных побочных реакций.

Из уже перечисленных способов получения аминокислот можно обратиться к превращению *DL*- α -амино- ϵ -капролактама в лизин. Ферменты, участвующие в реакциях гидролиза и рацемизации, могут быть иммобилизованы на ионообменных полисахаридах путем ковалентного связывания. Одно из серьезных технологических затруднений при осуществлении ферментативных реакций на носителях – возможность регенерации кофакторов (если реакция идет при их участии).

Широкое распространение имеет ферментативный метод получения аспарагиновой кислоты из фумаровой и аммония благодаря активности аспартазы, катализирующей эту реакцию.

Поскольку аспартаза, заключенная в полиакриламидный гель, относительно быстро теряет исходную активность, иммобилизации подвергают микробные клетки, обладающие аспартазной активностью. Хорошим продуцентом аспартазы признаны некоторые штаммы *Escherichia coli*, клетки которой фиксируются в полиакриламидном геле. При оптимальных режимах выход аспарагиновой кислоты при таком способе достигает 12–16 тыс. мкМ/ч · г сухих клеток. Отмечено существенное повышение активности аспартазы клеток *E. coli* после их иммобилизации.

Ферментативные методы применяются также при синтезе *L*-аланина декарбоксилированием *L*-аспарагиновой кислоты с помощью *Pseudomonas dacinhae*.

7.3. Получение оптических изомеров аминокислот путем применения ацилаз микроорганизмов

Один из способов разделения рацематов аминокислот на *L*- и *D*-изомеры – это ферментативный путь с использованием микроорганизмов, обладающих специфической *L*-ацилазной активностью. Ацилазы разрывают пептидную связь у ацилпроизводных аминокислот или пептидов, в результате чего образуются соответствующие свободные аминокислоты и пептиды, а также органическая кислота.

При культивировании микроорганизмов, содержащих ацилазы, необходимо соблюдать ряд условий. В частности, вводить в среды ве-

щества, близкие по природе к субстрату действия ацилаз, например в случае превращения *DL*-лизина – ϵ -ацетил-*L*-лизин. Ацилазы грибов находятся внутри клеток, поэтому их клетки необходимо предварительно подвергать дезинтеграции, например с помощью ультразвука. Применение микробных ацилаз для гидролиза ацилпроизводных аминокислот основано на специфичности их действия относительно оптической конфигурации и структуры субстрата. В зависимости от характера асимметрического деацетилирования субстрата различают *L*- и *D*-ацилазы, причем у микроорганизмов наиболее часто обнаруживаются *L*-ацилазы. По характеру отщепляемого ацильного радикала различают ацетил-, бензоил-, хлорацетил-, сукцинил- и другие производные аминокислот. Поскольку наиболее распространенными являются ацетил- и бензоилацилазы, именно эти производные аминокислот предпочтительно использовать в реакциях. Необходимо иметь в виду специфичность ацилазы к аминокислотному остатку. Указанные особенности ацилаз позволяют применять их для выделения нужной аминокислоты из смеси многих ацилпроизводных.

Остающиеся ацил-рацемат и ацил-*D*-аминокислота легко отделяются от оптически активной аминокислоты вследствие различий в физико-химических свойствах, например растворимости в органических растворителях и воде, способности сорбироваться на ионитах. Использование *D*-изомеров теоретически возможно, если применять рацемазы или химические способы. Например, некоторые *N*-ацетил-*D*-аминокислоты могут легко превращаться в *N*-ацетил-*DL*-аминокислоты путем нагревания в присутствии уксусного ангидрида. Процесс рацемизации может быть реализован также путем применения иммобилизованных ферментов.

Глава 8 **ПРОИЗВОДСТВО ИММУННЫХ АНТИСЫВОРОТКОВ**

Иммуногенность антигена – способность антигена вызывать образование антител в организме иммунизированного животного.

Иммуногенность веществ обусловлена рядом факторов:

1) молекулярной массой: чем выше молекулярная масса, тем выше иммуногенность. *Сшивка биополимеров между собой и другими белками повышает иммуногенность:*

- при возрастании молекулярной массы антигена увеличивается его время пребывания в организме;
- у высокомолекулярных антигенов существенно возрастает способность взаимодействовать с макрофагами;
- в антигене увеличивается как общее количество антигенных детерминант, так и их разнообразие, что повышает эффективность взаимодействия антигенов как с В-, так и с Т-лимфоцитами;

2) плотностью расположения и количеством антигенных детерминант на поверхности антигенов: по мере увеличения этих показателей иммуногенность вначале растет, а затем начинает уменьшаться (например, из конъюгатов, содержащих 3, 16 и 28 групп на молекулу бычьего альбумина, максимальной антигенностью обладал конъюгат, содержащий 16 молекул гаптена). В иммунном ответе против антигенов, имеющих повторяющиеся антигенные детерминанты, участвуют только В-лимфоциты; такие антигены называются *независимыми*;

3) чужеродностью иммуногена: чем больше антиген отличается по своей структуре от гомологичного антигена иммунизируемого животного, тем выше его иммуногенность (*генетическая чужеродность антигена*). Чем менее чужероден антиген, тем большее количество животных следует брать для иммунизации. Смесь антисывороток против

данного антигена от разных животных одной группы называют *пулом*. Из лабораторных животных для иммунизации чаще всего берут кроликов, морских свинок или мышей в зависимости от количества имеющегося антигена, доступности животного и т. д. Иммунизировать удобнее самцов, так как у них иммуногенный ответ менее подвержен влиянию гормональных циклов. Для получения антител против вирусов эффективными оказались куры, у которых антитела накапливаются в яйцах. Большие объемы антисывороток получают иммунизацией крупных животных: козлов, баранов, ослов, лошадей;

4) гомогенностью антигена (примеси чужеродных антигенов могут обладать большей иммуногенностью, чем основной антиген), поскольку это свойство имеет большое значение для получения специфических антисывороток;

5) степенью иммунного ответа, зависящего от количества введенного антигена. При определенных концентрациях антигена, как высоких, так и низких, наступает торможение гуморального иммунного ответа, называемое *толерантностью*, что является причиной выбора *оптимальной дозы*. Доза иммуногена для одной инъекции кролику или морской свинке составляет в среднем 100–300 мкг на 2 кг массы.

Доза для овец – 0,25–5 мг иммуногена на инъекцию, для осла – 0,5–10 мг;

6) способом и периодичностью введения антигена, влияющими на иммунологическую активность антисывороток (иммунный ответ формируется в организме постепенно – первичный ответ и вторичный ответ). Обычно высокоактивные антисыворотки получают после нескольких циклов иммунизации. Но очень длительные иммунизации могут привести к снижению специфичности из-за увеличения титра антител к примесным антигенам.

Адьюванты (АД) – это соединения, которые при введении в организм вызывают неспецифическое усиление иммунного ответа и тем самым повышают способность организма реагировать на любой иммуноген. Адьювантными свойствами обладают *масла, липосомы, клетки бактерий, полимеры* и др. Адьюванты, введенные в организм вместе с иммуногеном, выполняют две функции. Во-первых, они способствуют более медленному освобождению иммуногена из участков инъекции, в результате чего увеличивается вероятность встречи иммуногена с иммунокомпетентными клетками, а также резко снижается его токсичность. Во-вторых, адьюванты вызывают сильное воспаление в месте введения иммуногена, при этом активируется фагоцитоз и стимулируется местная циркуляция лимфоцитов, происходит неспецифическая стимуляция

иммунокомпетентных клеток (для усиления неспецифической иммуностимуляции в состав адьювантов дополнительно включают препарат из бактерий).

История создания адьювантов. В 1916 г. Ле Мойже опубликовал данные о том, что эмульсии минеральных масел способны повышать иммунный ответ на антиген (АГ).

Термин «иммунологический АД» был впервые использован в 1920-е гг. Г. Раймоном для описания субстанции, которая при введении в комбинации со специфическим АГ позволяла получить более выраженный иммунный ответ, чем чистый АГ.

Адьювантная активность соединений алюминия была впервые продемонстрирована в 1926 г. на примере дифтерийного анатоксина, адсорбированного на гидроксиде алюминия, что позволило значительно снизить дозы антигенов при иммунизации и увеличить тем самым безопасность. С тех пор гидроксид алюминия или фосфат алюминия широко применяется при создании антисывороток и вакцин для иммунизации людей.

В настоящее время в целях иммунизации широко используется препарат *полного адьюванта Фрейнда*, в состав которого входят:

- смесь минеральных масел;
- эмульгатор;
- убитые микобактерии.

Препарат адьюванта можно приготовить в лабораторных условиях, смешав:

- три части минерального масла;
- одну часть безводного ланолина;
- четыре части 0,15 М К-фосфатного буфера;
- препарат микобактерии до конечной концентрации 10 мг/мл так, чтобы частички микобактерии равномерно распределились по всему объему.

АД смешивают с водным раствором иммуногена в отношении 2 : 1 до образования нераспадающейся эмульсии, в которой водный раствор иммуногена находится в мицеллах.

Использование в иммунизации адьюванта:

- снижает возможность появления толерантности;
- позволяет расширить диапазон вводимого иммуногена от 50 до 200 мкг на одну инъекцию.

После введения адьюванта у животных часто образуются гранулемы. В случае ухудшения самочувствия очередную инъекцию пропускают и лишь после выздоровления животного продолжают иммунизацию.

8.1. Способы иммунизации

Наиболее эффективно вводить иммуноген малыми порциями в большое количество точек.

Внутрикожное введение. На очищенном от шерсти участке кожи животного делают скальпелем несколько царапин, а затем втирают в это место раствор иммуногена.

Плюс этого способа в том, что высокий иммунный ответ наблюдается уже после однократного введения, в результате чего значительно сокращается расход иммуногена, а минус – в трудоемкости исполнения и сильных болевых ощущениях у животного от обширных участков изъязвлений в местах введения иммуногена.

Подкожная иммунизация. В точки, расположенные вдоль позвоночника животного, вводят 5–6 порций раствора иммуногена объемом приблизительно 2 мл.

Внутримышечное введение. Одновременно часть иммуногена вводят в мышцу задних лап животного небольшими порциями.

Внутрибрюшинное введение. Этот способ используют для иммунизации мелких лабораторных животных, таких как мыши или морские свинки.

Прямое введение иммуногена в лимфатические узлы. Иммуноген инъецируют в лимфатические узлы, расположенные в подколенной ямке задних лап кролика. В результате количество иммуногена уменьшается до 10–50 мкг, а объем вводимого раствора – до 25 мкл. Способ сложный в техническом исполнении (разрез кожи, поиск лимфоузла и введение иммуногена без его повреждения).

Внутривенное введение. Обычно применяется для повторных инъекций, после которых проводят отбор крови у животного. Раствор иммуногена вводят непосредственно в кровоток. Адьювант в этом способе введения антигена не применяется, поскольку животное может погибнуть.

Введение иммуногена в подушечки лап или в конъюнктиву глаза. Иммунизацию начинают с иммуногена в смеси с полным адьювантом Фрейнда, а для повторных инъекций применяют неполный адьювант Фрейнда. Перед отбором крови за 7–9 дней проводят 1–3 внутривенных инъекции для повышения уровня антител. Вызывает сильные болевые ощущения у животного.

В процессе иммунизации у животных отбирают небольшие пробы крови для оценки количества антител.

Максимальный уровень иммунного ответа на введение большинства растворимых антигенов достигается через 40–60 дней после первой инъекции.

В случае когда иммуноген – клетки микроорганизмов, максимально высокий уровень антител наблюдается раньше.

После окончания первого цикла иммунизации животному в течение 30 дней дают восстановить здоровье и проводят реиммунизацию (1–3 внутривенные инъекции).

8.2. Получение антисывороток морских свинок к инсулину свиньи

Многоточечные инъекции инсулина подкожно, внутримышечно и внутрибрюшинно проводят по следующей схеме:

1) 1, 8, 15-й день – 200 мкг инсулина в 0,5 мл физиологического раствора смешивают с 0,5 мл полного адьюванта Фрейнда и вводят животному, затем 30 дней отдыха;

2) 45, 46, 47-й день – 150 мкг инсулина в 0,7 мл физиологического раствора;

3) отбор крови проводят через 7–9 дней из сердца.

Второй цикл иммунизации осуществляется после 30 дней отдыха животных по схемам 45, 46 и 47 дней.

Для получения антисывороток с титром, удовлетворительным для проведения иммуноферментного анализа (ИФА), часто требуется 4-, 5-кратное повторение циклов иммунизации.

Отбор крови каждый раз проводится на 7–9-й день после последней инъекции.

Иммунизация кроликов конъюгатом тироксина с бычьим сывороточным альбумином (БСА). Проводят многоточечные инъекции вдоль позвоночника и внутримышечно в область микроузлов задних лап по следующей схеме:

1) 1-й день – 1–2 мг конъюгата Т4-БСА в 0,7 мл физиологического раствора смешивают с 0,7 мл адьюванта Фрейнда и полученную эмульсию вводят животному;

2) 31, 32, 33-й или 45, 46, 47-й дни – внутривенно вводят 0,7–1 мл физиологического раствора, содержащего 1–2 мг Т4-БСА.

Кровь берут из сердца на 7–9-й день после последней инъекции.

Через месяц цикл внутривенной иммунизации повторяют.

Отбор крови и получение антисыворотки. Иммунизированное животное используется в качестве донора иммунной сыворотки в течение 5–7 мес. (5–6 циклов иммунизации).

Животных, прошедших несколько циклов иммунизации, называют *гипериммунными*.

Кровь отбирают из вены уха, из сердца (путем кардиальной пункции) в объеме 50–70 мл у кролика и 5–10 мл у морской свинки в стерильные пробирки, промытые стерильным буферным раствором.

Кровь, лишенная клеточных элементов, называется *плазмой*. В ней содержится фибриноген, приводящий к образованию во всем объеме пробирки *сгустка фибрина*, который осторожно удаляется центрифугированием при 1000–2000 об/мин в течение 15 мин. Плазма, лишенная фибрина, называется *сывороткой*.

Для удаления белков системы комплемента сыворотку прогревают в течение 30 мин при 56 °С, при этом антитела сохраняют свою активность.

Обработку крови и получение сыворотки надо проводить с максимальной осторожностью, избегая *разрушения* эритроцитов.

Наличие внутриклеточных белков и ферментов в сыворотке может приводить к появлению дополнительного фона в некоторых модификациях иммуноферментного анализа.

8.3. Хранение антисывороток

Нативную иммунную сыворотку можно хранить 3–6 мес. без потери иммунологической активности в замороженном состоянии при –20 °С, предварительно разливая ее во флаконы по 0,5–1 мл. Отмораживание/замораживание ведет к снижению иммунологической активности сыворотки.

Антисыворотку удобно хранить в лиофилизованном состоянии в ампулах под вакуумом. В сухом виде она сохраняет иммунологическую активность при комнатной температуре в течение 1–2 лет.

Размороженную или разведенную сухую сыворотку в растворе можно хранить при +4 °С в течение недели, предварительно добавив в нее консервант – хлороформ, 0,1 % азида натрия или 0,01 % мертнолата.

Консерванты могут быть ингибиторами ферментов-маркеров в иммуноферментном анализе.

В настоящее время в качестве *адъювантов* в вакцинах наиболее широко используются *соединения алюминия*. Помимо них в качестве АД

при производстве вакцин применяются и другие вещества, такие как эмульсии, липосомы и виросомы.

Эмульсии – «масло в воде» и «вода в масле», такие, например, как неполный АД Фрейнда.

Липосомы – это синтетические сферические частицы, состоящие из бимолекулярного слоя липидов, удерживающего антиген в капсуле, и выполняющие двойное действие, выступая в качестве носителя АГ вакцины и иммуномодулятора.

Виросомы – липосомы, включающие кроме антигена (вирусный капсид) еще белки, способствующие слиянию мембран липосом и клеток.

К новым иммуномодуляторным молекулам относятся:

- CpG-содержащие олигонуклеотиды (CpG)1;
- монофосфорил липид А (MPL);
- экстракт коры мыльного дерева (QS21).

CpG (*CpG-олигодезоксинуклеотиды*) – короткие одноцепочечные синтетические молекулы ДНК, содержащие цитозин С, гуанин G, Р-фосфодиэфирный компонент ДНК, – действуют как сигналы опасности для клеток иммунной системы позвоночных и активируют врожденный и приобретенный иммунный ответ. CpG, содержащие олигодезоксинуклеотиды, существенно более активны по сравнению с адьювантом Фрейнда.

QS-21 – очищенный растительный экстракт, увеличивающий способность иммунной системы реагировать на антигены. Его получают из коры мыльного дерева (*Quillaja saponaria*). Экстракт содержит растворимые в воде тритерпеновые глюкозидные соединения, относящиеся к сапонинам.

Адьювантная система AS04 состоит из иммуномодулятора MPL – монофосфориллипид А, *стимулятора иммунной системы, адсорбированного на различных соединениях алюминия.*

Вакцина, содержащая адьювант AS04, разрешенная к применению у людей, – это вакцина с поверхностным АГ вируса гепатита В. Она позволяет получить высокий титр специфических антител и повышенный уровень серопротекции при меньшем количестве необходимых доз по сравнению с классической вакциной от гепатита В в комбинации с соединениями алюминия.

При использовании вакцины с адьювантной системой AS04 защитный уровень антител сохраняется дольше при меньшем количестве необходимых доз.

Вакцина против рака шейки матки, папилломавируса человека (HPV) 16 и 18-го типов, также содержит адьювантную систему AS04.

8.4. Выделение и очистка антител

Для увеличения относительного количества антител обычно используют γ -глобулиновую или иммуноглобулиновую (Ig G) фракции иммунной сыворотки. Наиболее полное выделение γ -глобулиновой фракции без снижения ее иммунологической активности достигается при осаждении сульфатом аммония, после чего осадок длительно диализуется с частой сменой буферных растворов.

Другим широко распространенным способом является осаждение полиэтиленгликолем с ММ = 4000–6000. В 10 %-м растворе полиэтиленгликоля происходит агрегация всех белков с ММ = 150 000, в результате чего осаждаются белки γ -глобулиновой фракции, а белки меньшей молекулярной массы остаются в растворе. Этот метод позволяет очень быстро получить препарат γ -глобулиновой фракции антисыворотки. Способ достаточно эффективный, если препарат не подвергается хранению при низких температурах. Длительное хранение полученного препарата с сохранением иммунологической активности возможно после предварительного тщательного диализа.

Антитела в большей части антигенов относятся к IgG-фракции иммунной сыворотки. В целях повышения чувствительности и специфичности анализа во многих случаях полезно использовать для сорбции на твердой фазе и для получения конъюгатов Ig G-фракцию нативной сыворотки. Наиболее простой и доступный способ выделения Ig G – метод ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-сефадексе или ДЭАЭ-целлюлозе.

Выделение Ig G-фракции кроличьей антисыворотки:

1) 10 мл антисыворотки кролика разбавляют в 2 раза 0,15 М NaCl, добавляют 6,26 г Na_2SO_4 , перемешивают и инкубируют 12–16 ч при 4 °С;

2) выпавший осадок удаляют центрифугированием, растворяют в 10 мл фосфатного буфера и затем диализуют против того же буфера в течение 24 ч при комнатной температуре;

3) после удаления осадка центрифугированием раствор наносят на колонку с ДЭАЭ-целлюлозой, уравновешенную фосфатным буфером;

4) Ig G-фракцию определяют, измеряя оптическую плотность элюата при 280 нм, концентрацию рассчитывают, используя коэффициент молярного поглощения $e = 1,5 \text{ г/л см}^{-1}$.

Для выделения Ig G кролика применяют 50 мМ фосфатный буфер, содержащий 20 мМ этилендиамин-тетраацетат Na. 8 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ и 7,4 г ЭДТА-Na растворить в 900 мл воды, довести pH до 1 М NaOH и затем добавить воды до 1 л.

Выделение антител методом иммуносорбции. Специфичность сыворотки проверяется в реакциях с используемым для иммунизации препаратом антигена и с набором близких ему по структуре химических соединений. В случае недостаточно очищенного антигена возможны неспецифические реакции, обусловленные наличием антител к применяемым антигенам. Перекрестные реакции с другими соединениями могут наблюдаться при наличии у них химических структур, близких к структуре антигенных детерминант иммуногена.

Удаление неспецифических антител из антисыворотки обычно осуществляют с помощью метода адсорбции на соответствующем неспецифическом антигене. Адсорбция неспецифических антител в реакции преципитации с растворимой фракцией путем центрифугирования может привести к появлению в антисыворотке или растворимых комплексов «адьювант – антитело» (АД–АТ), или избытка добавленного АД, присутствие которых влияет на способность антисыворотки реагировать со специфическим антигеном в ИФА. Наиболее удобно для адсорбции антисыворотки использовать антиген, иммобилизованный на твердой фазе. Добавляя такой иммуносорбент в антисыворотку или пропуская антисыворотку через колонку с иммуносорбентом, можно быстро освободиться от перекрестно реагирующих антител. Метод аффинной хроматографии на иммуносорбентах применяется для получения препаратов очищенных антител. Наиболее широкое распространение получили иммуносорбенты на основе CNBr-активированной сефарозы. Выпускаемая в нашей стране CNBr-активированная агароза по своим основным параметрам не уступает зарубежному аналогу.

Основные операции, используемые для получения иммобилизованных на CNBr-агарозе антигенов или антител, приведены в табл. 8.

Таблица 8

**Ковалентное связывание
с CNBr-активированной сефарозой**

Операция	Условия
1. Взвесить требуемое количество CNBr-активированной сефарозы	1 г высушенного препарата дает около 4,5 мл геля
2. Промыть на стеклянном фильтре и дать набухать гелю	Взять для промывки раствор 1 мМ HCl, а затем для уравнивания и набухания – боратный или гидрокарбонатный буфер

Операция	Условия
3. Растворить в буфере белок	Использовать гидрокарбонатный (0,1 М NaHCO ₃ , содержащий 0,5 М NaCl) или обратный буфер
4. Смешать белковый раствор с суспензией геля	Раствор должен содержать 5–10 мг антигена
5. Блокировать оставшиеся активные группы	Два часа при комнатной температуре или при +4 °С в течение 12 ч гель промывается буфером, содержащим блокирующие соединения, например 1 М этаноламина или 0,2 М глицина, pH 8,0
6. Отмыть от несвязавшегося антигена	Используется буфер, в котором осуществлялось ковалентное связывание, затем 0,1 М ацетатный буфер, pH 4, содержащий 0,5 М NaCl, после чего гель опять уравнивается боратным или гидрокарбонатным буфером

Следует отметить, что при работе с иммуносорбентами на основе CNBr-активированной сефарозы нельзя использовать буфер, содержащий аминокислоты.

Получение фрагментов антител. При разработке некоторых модификаций ИФА может возникнуть необходимость использования конъюгатов фермента не с целой молекулой иммуноглобулина, а ее фрагментом, который специфически связывается с молекулой антигена – Fab-фрагментом. Обусловлено это прежде всего тем, что Fc-фрагмент молекулы, ответственный за эффекторные функции иммуноглобулина, обладает способностью неспецифически взаимодействовать с другими белками, сорбированными на носителях при проведении твердофазного ИФА. Эффект неспецифической сорбции определяется природой антигена, концентрацией сорбированного на носителе белка и рядом других факторов.

Получение Fab-фрагментов:

1) готовят раствор, содержащий 0,1–3 мг P₂-фрагмента в 0,45 мл 0,1 М Na-фосфатном буфере, pH 6,0;

2) добавляют 0,05 мл 0,1 М 2-меркаптоэтанола в том же буфере, содержащем 5 мМ/ЭДТА;

3) смесь инкубируют при 37 °С в течение 1,5 ч;

4) антисыворотки тестируют.

Антисыворотки, полученные даже от одного животного, значительно различаются по своей способности связывать антиген. Для сравни-

тельной характеристики и оценки качества антисывороток их тестируют, что позволяет решить две важные задачи: во-первых, произвести отбор именно тех сывороток, которые по своим свойствам удовлетворяют требованиям иммунохимического анализа; во-вторых, осуществить стандартизацию антисывороток при их промышленном производстве для иммуноферментных наборов.

Первичный отбор антисывороток проводят на основании нахождения их титра, который представляет собой интегральный параметр, характеризующий взаимодействие с антигеном. Более детальные сведения о сыворотке получают, определяя аффинность и концентрацию антител. Следующий этап – это установление антигенной специфичности антител, т. е. возможности взаимодействовать со структурно сходными антигенами.

Принципиальное различие этих этапов заключается в том, что при определении титра исследуют связывание выбранной концентрации антигена при различных разведениях антисыворотки. При определении аффинности и концентрации антител анализируют связывание антисыворотки с различными концентрациями меченого антигена. При изучении специфичности антисывороток в соответствующем разведении и при постоянной концентрации меченого антигена добавляют различные концентрации перекрестно реагирующего антигена.

Во всех случаях используют концентрации антигена либо близкие к минимально детектируемым в данном виде анализа, либо в том диапазоне, который соответствует их концентрации в образце.

Определение титра антисыворотки. Титр – это эффективная величина, характеризующая связывающую способность антител, зависящая от их концентрации и аффинности. Абсолютное значение титра также зависит от метода и условий проведения эксперимента и от начальной концентрации свободного антигена.

Количественно титр находят как предельное разведение сыворотки, при котором еще наблюдается положительный регистрируемый данным методом эффект взаимодействия антисыворотки с антигеном (например, если титр устанавливают методом преципитации свободного антигена в геле и для первой сыворотки образование преципитата наблюдается при разведении в 2 раза, а для второй – в 4 раза). Иногда оперируют понятием «50 %-й титр», подразумевая под этим разведение сыворотки, вызывающее 50 %-е связывание антигена. Рабочим титром называют то начальное разведение сыворотки, которое используют непосредственно в эксперименте (табл. 9).

Схема тестирования сывороток

Этап исследования	Цель
Титр	Отбор высокоактивных иммунных антисывороток, определение конечного и рабочего титров
Аффинность	Оценка аффинности и концентрации фракции высокоаффинных антител
Специфичность	Определение специфичности антител

Титр антисыворотки сильно зависит от концентрации антигена, используемого для тестирования, и от способа его определения. Например, одна и та же сыворотка может иметь титр 100 в тесте иммунопреципитации и 100 тыс. – в тесте иммуноферментного анализа. Поэтому при тестировании сыворотки и определении титра лучше всего применять тот же метод, что и при анализе, а концентрация антигена должна быть близкой к минимальной в том диапазоне, который выбран для анализа. Кроме того, следует учитывать, что в иммуноферментном анализе используют как гомогенные, так и гетерогенные методы определения концентрации антигена, которые могут сильно отличаться по структуре образующихся иммунных комплексов. В частности, в твердофазных методах вероятность образования циклических комплексов «антиген – антитело» значительно меньше, чем в гомогенных, а следовательно, и наблюдаемая аффинность антител в обеих системах будет разная.

При разработке методов ИФА обычно пользуются значением титра антисыворотки, определенным в непрямом методе, в котором на стенках лунок микроллаты первоначально сорбируют антиген и затем изучают связывание с ним иммунной сыворотки в последовательных разведениях. Связывание исследуемых антител с иммобилизованным антигеном регистрируют с помощью антивидового конъюгата к иммуноглобулиновой фракции сыворотки животного, используемого для иммунизации.

Результаты в этом случае обычно оценивают с помощью понятия «50 %-й титр». Максимальный сигнал, регистрируемый по оптической плотности продукта реакции окисления перекисью водорода 5-аминосалициловой кислоты, составляет ~1,4 оптической единицы. За титр сы-

воротки принимается такое разведение, при котором оптическая плотность, регистрируемая в ИФА, имеет значение, близкое к 0,7.

Обычно такой подход используется на первом этапе оценки качества полученных иммунных сывороток и позволяет отобрать высокоактивные иммунные сыворотки. Однако для более глубокой оценки полученных антител проводят определение их аффинности. При разработке методов ИФА ряда антигенов, присутствующих в биологических жидкостях в низких концентрациях порядка 10^{-10} – 10^{-11} М, должны быть использованы антисыворотки, имеющие не только высокий титр, но и достаточное содержание антител, обладающих высокой константой связывания.

Аффинность антител. В основном в таких экспериментах применяются иммобилизованные антитела и антигены, меченные радиоактивной меткой.

Титрование антисывороток к инсулину методом непрямого твердофазного ИФА: по оси абсцисс – разведение разбавленной в 100 раз сыворотки, по оси ординат – оптическая плотность при 430 нм продукта пероксидазного окисления 5-аминосалициловой кислоты перекисью водорода. В качестве контроля применена сыворотка крови неиммунизированного животного.

При использовании ферментных меток химическая структура меченого антигена может существенно отличаться от немеченого. В этих случаях полученные значения констант связывания характеризуют, как правило, взаимодействие в данной конкретной системе, вследствие чего иммунная сыворотка, обладающая высокой аффинностью в реакции с конъюгатом одной структуры, может иметь значительно более низкие значения константы связывания с конъюгатом, полученным другим способом.

Если исследователь имеет дело с разработкой конкурентных методов ИФА, т. е. располагает набором иммунных сывороток и конъюгатом «антиген – фермент», то важным этапом создания тест-системы является выбор пары «антитело – конъюгат», характеризующейся необходимой константой взаимодействия. Для проведения скрининга γ -глобулиновую фракцию каждой антисыворотки иммобилизуют на поверхности микропланшета и изучают ее связывание с имеющимся набором конъюгатов. Эффективное значение связи – величина, обратная значению концентрации конъюгата, при которой связывается 50 % активных центров на носителе.

Получение такого конъюгата для широкого круга антигенов представляется непростой задачей. Более универсальный реагент – анти-

тела, меченные ферментом, поэтому остановимся на общем подходе к определению аффинности антител в сыворотке или асците, основанном на твердофазном ИФА. Этот метод, предложенный Б. Фриге, позволяет определять константу связывания антител с антигеном при их взаимодействии в растворе.

Постановка метода включает две основные стадии:

- 1) проведение реакции «антиген – антитело» в растворе;
- 2) определение концентрации антител после установления равновесия с помощью метода твердофазного ИФА.

Глава 9 БИОТЕХНОЛОГИЯ ПРОИЗВОДСТВА ВАКЦИН

Развитие иммунной биотехнологии было вызвано необходимостью получения большого количества биопрепаратов для профилактики, диагностики и лечения как инфекционных, так и инвазионных заболеваний. Используя достижения иммунологии, микробиологии, биотехнологии, генной инженерии, современная ветеринарно-медицинская биопромышленность получает и производит широкий спектр биопрепаратов, включая вакцины, диагностикумы, микробы-антагонисты (пробиотики), антибиотики, иммунные сыворотки и их производные. Удельный вес вакцинации животных в системе противоэпизоотологических мероприятий определяется многими факторами, в том числе и наличием эффективных и безвредных биопрепаратов. Ветеринарная статистика показывает, что имеется тенденция нарастания масштабов применения специфических средств защиты животных при многих инфекционных болезнях. По этой причине развитие современной биопромышленности иммунных препаратов вызвано практической необходимостью получения большого количества (по объему и перечню) иммунопрепаратов для профилактики, диагностики и лечения животных.

В настоящее время в арсенале иммунопрофилактики находится целый ряд вакцин, различающихся:

- по виду и характеру технологии производства, способу применения и эффективности, а именно: *живые, инактивированные, корпускулярные, химические и анатоксины;*
- числу антигенов: *моновакцины и ассоциированные.*

Большинство из названных вакцин по-прежнему получают апробированными классическими способами и лишь часть из них конструируют по новым, нетрадиционным принципам – *это вакцины искусственных антигенов, субклеточные (рибосомальные), субъединичные и генно-инженерные вакцины.*

Производство вакцин делится на несколько технологических этапов, включая в себя *накопление биомассы* организмов или продуктов их жизнедеятельности, *концентрацию* и *очистку антигенов*, в отдельных случаях их *инактивацию*, *добавление сорбирующих и адьювантных субстанций*, *лиофилизацию*, *расфасовку* и т. д.

Во всех случаях применяется универсальная *принципиальная схема получения*, апробации и внедрения в производственную практику новых вакцин. Она состоит из следующих этапов:

- получение автором вакцинного (аттенуированного) или производственного (вирулентного) штамма;
- авторское изготовление вакцины в лабораторных условиях и экспериментальное изучение стерильности, токсичности, безвредности, реактогенности и иммуногенности *in vitro* и на животных;
- экспериментально-производственное изготовление опытной серии препарата, оценка безвредности антигенных и иммуногенных свойств в лабораторных условиях и в ограниченном эпизоотологическом опыте в условиях производства;
- государственное комиссионное испытание нового биопрепарата в целях определения безвредности, реактогенности, иммуногенности и эпизоотологической эффективности в широком производственном опыте. Утверждение нормативных документов (технических условий) по изготовлению и контролю вакцин и инструктирование по их применению.

9.1. Живые вакцины

Живые вакцины – иммунопрепараты, содержащие наследственно измененные формы возбудителей инфекционных болезней (вакцинные штаммы), которые потеряли вирулентные свойства, но сохранили способность индуцировать выработку иммунитета.

Живые вакцины, как правило, готовят из аттенуированных (слабовирулентных) штаммов патогенных микробов, не способных вызывать заболевание, но сохранивших свойство размножаться в организме прививаемого животного и таким образом вызывать вакцинальную реакцию – доброкачественный вакцинальный процесс в виде местного специфического воспаления или общей бессимптомной инфекции. Такая реакция в обоих случаях при локальном или общем воздействии должна вызвать специфическую перестройку иммунореактивности организма и формирование иммунитета.

Вакцинные штаммы, предлагаемые для производства живых вакцин, должны:

- относиться к *авирулентным* или *слабовирулентным* штаммам независимо от способа их получения. Эти свойства должны быть достаточно прочными при производстве и использовании вакцины. Следовательно, живая вакцина должна быть безвредной, что, в свою очередь, зависит от степени вирулентности и генетической стабильности вакцинного штамма, а также от общего иммунологического статуса приживаемых животных;

- обладать *высокой антигенностью и иммуногенностью*. Для живых вакцин критерием иммуногенности является ее способность вызывать образование напряженного иммунитета не менее чем у 70 % однократно вакцинированных животных;

- иметь *способность размножаться в определенных органах*, а также кратковременную персистенцию в организме привитого животного;

- являться носителями *генетической стабильности фенотипических свойств*, в особенности низкой вирулентности и высокой антигенности, даже при быстро следующих друг за другом пассажах на естественно-восприимчивых видах животных;

- обладать *генетическими маркерами*, позволяющими отличить их от эпизоотических (полевых) штаммов возбудителей (более двух и независимых друг от друга);

- характеризоваться *отсутствием инфекционности* (контагиозности) в случае выделения вакцинного штамма из организма привитого животного, быть безвредными для других видов животных;

- иметь *стабильность при хранении* и большой диапазон в дозировании между минимальной и максимальной иммуногенными дозами. Прививочную (оптимальную) дозу вакцины выражает количество живых микроорганизмов, содержащихся в единице объема. Объем прививочной дозы должен быть не очень большим и не очень малым, чтобы обеспечить удобство введения препарата животному и точность дозирования.

Вакцинные штаммы вирусов должны иметь определенные *титры активности* (инфекционности) в конкретной биологической системе (макроорганизмы, эмбрионы птиц, культуры клеток и проч.). Для определения иммуногенности и степени напряженности иммунитета у вакцинированных животных используют тщательно изученные со стабильными свойствами контрольные (вирулентные) штаммы соответствующих возбудителей, против которых применяют живые и инактивированные вакцины. Вакцинные штаммы, отвечающие вышеперечис-

ленным требованиям, больше не являются возбудителями болезней. За сохранение таких штаммов и поддержание их свойств несут ответственность соответствующие государственные учреждения.

Аттенуированные микроорганизмы с высокой остаточной вирулентностью и инфекционной способностью, не соответствующие вышеназванным критериям вакцинных штаммов, являются «псевдовакцинными», и для них «прививочное сродство» весьма условно.

Принципы аттенуации бактерий и вирусов. Термин «*аттенуация*» (лат. *attenuatio* – уменьшение) означает искусственное стойкое ослабление, уменьшение вирулентности возбудителей инфекционных болезней.

Явление аттенуации было открыто в 1880 г. Л. Пастером. Аттенуация вирусов и бактерий широко используется при приготовлении живых вакцин, а говоря точнее – при селекции штаммов, предназначенных для изготовления живых вакцин. Аттенуацию микроорганизмов осуществляют различными методами, основанными на адаптации возбудителя к организму невосприимчивых или маловосприимчивых в естественных условиях животных или на приспособлении микроорганизма к неблагоприятным условиям культивирования, при которых он подвергается воздействию химических, физических, биологических и других факторов. При любом методе аттенуации снижается вирулентность микроорганизма для естественно-восприимчивых к нему животных, и это вновь приобретенное свойство возбудителя должно быть наследственно закреплено.

Примерами вакцинных штаммов, которые аттенуированы путем воздействия на микроорганизмы физических или химических факторов, могут служить:

- сибиреязвенные штаммы, вирулентность которых Л. Пастер и Л. С. Ценковский ослабляли, выращивая культуры возбудителя при высокой температуре (42,5 °С);
- бескапсульные штаммы сибиреязвенных вакцин (СТИ) (Н. Н. Гинсбург) или ГНКИ (С. Г. Колесов), полученные направленным воздействием условий культивирования и последующей селекцией штаммов;
- штамм для вакцин СТИ, полученный в результате посева вирулентной культуры на чашках, – бескапсульный авирулентный иммуногенный мутант СТИ-1;
- штамм для вакцины ГНКИ, произведенный путем чередующихся пересевов на свернувшуюся нормальную лошадиную сыворотку и агар, не содержащий пептона, в результате чего было получен слабовирулентный бескапсульный мутант «Щуя-15»;

- французские ученые А. Кальмет и К. Герен ослабили вирулентность туберкулезной палочки путем длительного (230 пассажей в течение 18 лет) культивирования на картофеле с желчью, в результате чего получили авирулентный вакцинный штамм БЦЖ (BCG);

- вакцинный штамм *Br. abortus* получили американские ученые Д. Бек и У. Э. Коттон путем многолетнего культивирования вирулентного штамма на картофеле.

Вакцинные штаммы из вирусов получают, как правило, длительным пассированием их в организме одного и того же вида животных, не являющегося естественными хозяином данного вируса. При этом вирулентность вируса для другого вида животных усиливается, а для хозяина – ослабляется и становится в достаточной степени постоянной и низкой, что дает возможность использовать данный штамм в качестве вакцинного. Так, Л. Пастер антирабическую вакцину получил путем многократного пассирования вируса уличного бешенства через мозг кролика, в результате чего резко возросла вирулентность вируса для кролика и утратилась вирулентность для других видов животных, а также для человека. Английские ученые С. Айер и Н. Лобсон посредством последовательных пассажей на куриных эмбрионах получили аттенуированный штамм вируса псевдочумы птиц (Ньюкаслский вирус – штамм Н), из которого готовили живую вакцину против этой болезни. Г. Хадсон добился значительного ослабления вирулентного вируса чумы свиней путем пассажей его через организмы кроликов, этот слабовирулентный штамм используют в качестве живой вирусной вакцины. Аналогичным образом ослабили вирус чумы свиней и американские исследователи Х. Капровский и Дж. Бейкер.

Метод пассирования микроорганизмов через виды, не являющиеся естественными хозяевами возбудителя, применим и для бактерий. Так, Д. Ф. Конев культуру возбудителя рожи свиней ослаблял путем пассирования его через организм кроликов с последующей проверкой ее вирулентности на голубях. Казанский ветеринарный институт предложил в качестве вакцинного штамма *Br. melitensis* № 89, который аттенуировали посредством 25-кратного пассажа через организм куриного эмбриона.

Аттенуацию можно вызвать воздействием бактериофага, антибиотиков, лучистой энергии. Аттенуированные штаммы можно получить селекцией диссоциирующих культур. Возможна естественная аттенуация возбудителей инфекционных болезней в природе и лабораторных условиях при хранении коллекции микроорганизмов. На все штаммы микроорганизмов, применимые для изготовления и контроля биопре-

паратов (вакцины, анатоксины, диагностикумы), составляют подробные паспорта. В паспортах приводят: лимиты вирулентности, за пределами которых эти штаммы для изготовления указанных препаратов непригодны; виды сельскохозяйственных, промысловых и лабораторных животных, чувствительных к ним в естественных условиях; основные пути и методы заражения этих животных; сведения о продолжительности инкубационного периода, а также о степени опасности для человека; подробную характеристику серологических свойств штаммов, в которой указывается время образования специфических антител у вакцинированных животных и их титров в РСК, РДСК, РП, РДП в агаровом геле, РА, РТГА (РЗГА), РН, РНГА и др. при постановке как микро-, так и макромеходами. Для определения титров антигенов необходимо иметь стандартные специфические сыворотки, знать методики изготовления антигенов и методики проведения серологических реакций и их оценки (учета).

Живые вакцины считаются одними из наиболее эффективных прививочных препаратов, что обусловлено высокой приживаемостью вакцинных штаммов и более полным сохранением в них набора протективных антигенов. Иммунизация живыми вакцинами несложна и в большинстве случаев однократна. Однако живые вакцины могут вызвать поствакцинальные осложнения, их трудно стандартизировать и хранить.

9.2. Инактивированные корпускулярные вакцины

Инактивированные корпускулярные вакцины, в отличие от живых, получают из производственных, предварительно отселекционированных или свежeweыделенных вирулентных и иммуногенных штаммов возбудителей.

Государственная служба контроля ветеринарных препаратов предъявляет определенные требования к штаммам микроорганизмов, которые могут быть использованы для изготовления средств специфической иммунопрофилактики, включая инактивированные корпускулярные вакцины. Такие штаммы называют *производственными*. Наряду с ними в учреждениях биопромышленности имеются такие же штаммы микроорганизмов, используемые только для заражения подопытных животных при контроле активности вакцин и иммунных сывороток. Эти штаммы называют *контрольными*. Производственные и контрольные штаммы микроорганизмов должны быть классифицированы, т. е. должна быть

установлена их видовая принадлежность, клонирование, они должны представлять собой однородную популяцию, происходящую из одной клетки или вирусодержащей бляшки, с характерными для нее генетически закрепленными признаками: морфологическими (размер, форма, пигментация колонии; размер и форма клеток или вирионов; наличие или отсутствие жгутиков, капсул, спор); биохимическими (приобретение или утрата клетками способности использовать определенные аминокислоты, фактор роста, способность утилизировать углеводы); антигенными (утрата тех или иных антигенов или их наличие); другими признаками (например, степень чувствительности к физическим, химическим факторам воздействия на бактериальную клетку или вирион).

Общебиологической закономерностью считается появление диссоциантов в потомстве даже одной микробной клетки или вириона. Поэтому в популяции производственных и контрольных штаммов микроорганизмов допускают присутствие диссоциированных форм микроорганизмов в количестве, не превышающем 5 % от общего числа клеток (вирионов), при условии, если они не влияют отрицательно на фенотипические свойства штамма.

Штаммы, предназначенные для изготовления инактивированных вакцин, анатоксинов или диагностикумов, должны представлять собой культуру определенного рода и вида микроорганизмов, обладать четко очерченным набором свойств, позволяющих отнести штамм к этому роду и виду. В живом состоянии такие штаммы должны сохранять высокую вирулентность (меру патогенности). Вирулентность определяют в каждом случае на конкретных восприимчивых крупных и лабораторных животных, на развивающихся эмбрионах птиц или культурах клеток. Вирулентность выражают летальная доза (ЛД) 50, инфицирующая доза (ИД) 50, тканевая цитопатогенная доза (ТЦД) 50.

Производственные штаммы, используемые для приготовления инактивированных вакцин, анатоксинов и диагностикумов, по антигенности и другим свойствам должны быть идентичными большинству культур, циркулирующих в естественных условиях и вызывающих инфекционные заболевания (эпизоотические штаммы). Кроме того, такие штаммы микроорганизмов должны обладать высокими иммуногенными свойствами, т. е. вызывать состояние невосприимчивости к заражению живыми вирулентными культурами вида или серологического варианта у соответствующих сельскохозяйственных и лабораторных животных. Наиболее достоверные сведения об иммуногенных свойствах штамма получают при постановке опытов по прямому заражению предварительно вакцинированных этим штаммом лабораторных животных или есте-

ственно-восприимчивых сельскохозяйственных и домашних животных. Перечисленные требования должны быть общими для всех производственных и контрольных штаммов независимо от того, какой препарат готовится на их основе. Кроме этих основных требований имеются дополнительные, предъявляемые к штаммам, которые применяются при изготовлении живых и инактивированных вакцин.

В зависимости от методов инактивации производственных штаммов микроорганизмов различают:

- *гретые вакцины*, полученные прогреванием суточной бульонной культуры микробов при температуре 56...60 °С в течение 0,5–2,0 ч;
- *анавакцины*, полученные при воздействии на культуру формалином (0,3–0,5 %) и теплом (39...40 °С) в течение 28–30 сут.

Кроме того, в зависимости от применяемого химического вещества, способного вызвать инактивацию клеток, бывают *спиртовые, ацетоновые, мертиолятовые, хлороформенные, карболовые* вакцины.

Для получения инактивированных (убитых) вакцин необходимо сохранить антигенные свойства исходной культуры, что требует сложных питательных сред и щадящих способов инактивации микробов.

Убитые корпускулярные вакцины менее эффективны по сравнению с живыми, для достижения напряженного иммунитета их нужно вводить в организм многократно. Это на длительное время продлевает иммунизацию, что особенно нежелательно в условиях неблагоприятной эпизоотической обстановки.

Наличие у инактивированных вакцин большого количества балластных веществ является причиной аллергических и других побочных реакций и отклонений при их введении.

9.3. Химические вакцины

Химические вакцины готовят из молекулярных антигенов, извлеченных из микробной клетки тем или иным способом (чаще с помощью химических средств или ультразвука), поэтому их и называют молекулярными вакцинами. К ним относят вакцины, полученные из растворимых дериватов микробной клетки, например токсинов, но описывают как анатоксины.

Химические (молекулярные) вакцины могут быть получены как методом биосинтеза, так и химическим синтезом. До сих пор в практике начиная с 40-х гг. XX в. применяют лишь биосинтетический метод. Однако эксперименты последних лет показывают, что довольно скоро можно

будет использовать и химически синтезированные вакцины. Несомненно, что современные химические вакцины, полученные из очищенных антигенов, по иммуногенности все же уступают живым вакцинам, но в то же время при их применении уменьшается опасность поствакцинальных осложнений, а также они менее реактогенны, более стандартны, есть возможность концентрировать антигены в небольшие объемы, адсорбировать их на различных веществах, применять адъюванты и таким образом повышать антигенные свойства биопрепаратов.

Более того, *химические вакцины* могут быть использованы в ассоциированных препаратах, т. е. возможно конструирование многокомпонентных препаратов против многих возбудителей.

Для создания химических вакцин необходимо прежде всего расшифровать структуру микробной клетки, особенно специфичность антигенных структур. Из микробной клетки выделяют протективные антигены – это иммунологически активные вещества, имеющие различную химическую природу, способные при введении в организм обеспечивать формирование специфического иммунитета. Протективные антигены состоят из тех структурных элементов, которые обеспечивают патогенность микроорганизма, но в то же время определяют антигенность и специфическую иммуногенность. Они находятся или на поверхности микробной клетки, или на цитоплазматической мембране (ЦПМ), или в клеточной стенке, и также могут быть внеклеточными продуктами жизнедеятельности микробных клеток.

С химической точки зрения протективные антигены – это макромолекулы. Они являются высокомолекулярными полимерами – гликопротеидами, белково-полисахаридно-липидными комплексами. У всех микроорганизмов – бактерий, вирусов, риккетсий – природа протеиновых антигенов общая. Известно, что антигенность вещества в значительной степени обусловлена его макромолекулярностью. Она, в свою очередь, зависит от молекулярной массы антигена. При конструировании химических вакцин имеется возможность укрупнения молекул антигена путем агрегации, образования ковалентных химических связей. Считается общепризнанным, что полимеризация антигена – один из практических путей повышения его иммуногенности.

Получение химической вакцины биосинтетическим путем представляет собой:

- подбор соответствующего микроорганизма, максимально продуцирующего протективный антиген;
- выбор питательной среды, обеспечивающей прирост биомассы и выход протективного антигена. Самые приемлемые – это синтетические и полусинтетические среды (отсутствие балластных веществ);

- отработку условий культивирования, в том числе и глубинного, в биореакторах большой скорости;
- отработку методов промышленного извлечения антигена из биомассы и его очистку, позволяющую сохранить первоначальную антигенную структуру препарата и обеспечить достаточную степень чистоты препарата при удовлетворительном содержании антигена (экстрагирование биомассы цельных и лизированных клеток: ферментативный лизис, длительное замораживание и быстрое оттаивание, озвучивание, механическая обработка, щелочной лизис).

Очистку антигена производят в зависимости от его свойств и применяют изоэлектрическое осаждение кислотами и щелочами, высаливание нейтральными солями, осаждение спиртов, сорбцию и элюцию, ультрафильтрацию, хроматографические способы и т. д.

Антигены выделяют из живой и инактивированной культуры. Для инактивации используют те же физические и химические методы, которые применяют для получения убитых вакцин (формальдегид, фенол, глутаральдегид, солянокислый гидроксилламин, перекись водорода, азид натрия и др.).

Главный принцип получения антигена – применение щадящих физико-химических методов, возможное сокращение числа этапов в технологической цепи и повышение иммуногенности препарата. Принципиально важным является обеспечение безвредности вакцины, ее стерильности (фильтрация, 0,3 %-й формалин при 40 °С в течение 5 сут, β-пропиолактон и др.). Для сорбции антигенов чаще используют гель гидроксида алюминия, который одновременно обладает и адьювантным действием. Сорбированные вакцины создают в организме депо, из которого постепенно всасываются антигены, обеспечивающие пролонгированное действие препарата. Это дает возможность уменьшить кратность вакцинации при сохранении высокого профилактического эффекта.

9.4. Анатоксины и ассоциированные вакцины

К химическим вакцинам относятся и *анатоксины* – препараты, полученные из бактериальных экзотоксинов. Они полностью лишены токсических свойств, но сохраняют антигенные и иммуногенные свойства.

Метод получения анатоксинов был разработан и предложен французским ученым А. Рамоном в 1923 г. Первым этапом получения анатоксина является выращивание токсигенных культур бактерий, вызывающих у пораженных животных токсинемические инфекции (столбняк, ботулизм, анаэробные раковые инфекции, стафилококкоз и др.). Микроорганизмы культивируют в жидких питательных средах в определенном режиме для максимального накопления экзотоксина, затем экзотоксин отделяют от бактерий и обезвреживают (инактивируют). Для получения анатоксина (по Рамону) на токсин комбинированно воздействуют формалином (0,3–0,5 %) при температуре 39...40 °С в течение 28–30 сут. Эффективность и безвредность анатоксина зависят от степени его очистки. Наличие в препарате бактериальных протеинов, белков питательной среды увеличивает его реактогенность и сенсибилизирующие свойства. Очищенные анатоксины в значительной степени лишены указанных отрицательных свойств. Кроме того, их можно концентрировать в небольшом объеме жидкости и адсорбировать. В настоящее время в качестве детоксицирующего средства наряду с формальдегидом широко используют β-пропиолактон. Предложена также обработка токсина протеолитическими ферментами – пепсином, трипсином, пролазой и папаином с последующей фильтрацией на колонках с сефадексом Y-100 и Y-200. Эффективность анатоксинов зависит не только от качества антигена, но также от формы препарата и метода применения.

Анатоксины могут быть приготовлены в виде *жидких, сухих, эмульгированных и сорбированных препаратов*.

Ассоциированные вакцины – препараты, в состав которых входят несколько синергических, сбалансированных между собою антигенов. Их преимущество перед моновакцинами – возможность обеспечить одновременную выработку иммунитета против нескольких инфекций при введении в организм одного комплексного препарата. Условием конструирования и производства ассоциированных вакцин является эпизоотологические показатели для одновременной иммунизации против соответствующих болезней, возможность устранения конкурентного действия антигенов в ассоциации, данные об отсутствии повышенной реактогенности и сенсибилизирующей активности сложной вакцины по сравнению с монопрепаратом. Применение ассоциированных вакцин облегчает организацию иммунопрофилактики, сокращает число инъекций и в ряде случаев повышает их иммуногенность и эпизоотологическую эффективность.

9.5. Новые принципы конструирования вакцин

Начиная с 70-х гг. XX в. появились новые тенденции в области конструирования вакцин. Наряду с совершенствованием классических технологий изготовления традиционных (старых) вакцин усиленно развивалось создание искусственных вакцин, или вакцин искусственных антигенов. В это же время были получены еще два принципиально новых типа вакцин – из отдельных структур микроорганизмов, или субклеточные вакцины из бактерий, и субъединичные вирусные вакцины, а также были сконструированы генно-инженерные вакцины искусственных антигенов.

Создание вакцин искусственных антигенов предусматривает синтез аналогов природных антигенных детерминант, ответственных за индукцию иммунитета. Иммуногенные свойства искусственных антигенных детерминант определяют два фактора: расположение на поверхности молекулы и их конформационная структура.

Практически процесс получения искусственных антигенов складывается:

- из выделения биологически активного антигена;
- расшифровки его молекулярной структуры;
- искусственного ресинтеза химическим или генно-инженерным

путем.

Этот метод перспективен для создания вакцин против возбудителей, антигены которых обладают иммуногенными и протективными свойствами.

Существует *два типа современных искусственных вакцин*:

• из искусственных иммунизирующих молекул, синтезированных по принципу природных аналогов:

- конъюгированные антигены (гаптен-носитель);
- синтетические белки;
- синтетические полиаминокислотные антигены;
- конъюгенты синтетических полиаминокислотных антигенов с синтетическими адъювантами;
- синтетические полисахариды;

• из искусственных иммунизирующих молекул, не имеющих аналогов в природе: искусственные комплексы или конъюгенты антигенных детерминант с синтетической неприродной молекулой с иммуномодулирующим действием.

Принципиальная новизна современного этапа конструирования вакцин не только в том, что начато создание искусственных макромолекул, обладающих необходимыми антигенными детерминантами.

Сейчас открыты *гены иммунного ответа* (Ir-гены), и доказано, что их действие проявляется на уровне Т-системы лимфоцитов. Главное – это нахождение путей фенотипической коррекции контроля иммуногенеза. В результате может быть получен иммунный ответ и в том случае, если организм не реагирует на данный антиген. По этой причине наиболее перспективным путем в области создания новых вакцин признают конструирование таких микромолекулярных комплексов, в состав которых входят как необходимые антигенные детерминанты, так и структура-носитель, обеспечивающая фенотипическую коррекцию. Другими словами, *иммуногенность вакцин можно увеличить, используя специальные адъюванты*.

В настоящее время созданы синтетические низкомолекулярные соединения – химические аналоги бактериальных структур, обладающих иммунорегуляторной активностью.

Первым из этого типа соединений был синтезирован *мурамилдипептид* (МДП). Известно, что основу клеточной стенки бактерий образует муреин – сложное макромолекулярное соединение, обладающее выраженным иммуномодулирующим действием. МДП вызывает усиление гуморального ответа на введение вакцины. Это дает основание считать, что наиболее перспективными являются вакцины, представленные антигеном, связанным с синтетическим иммуномодулятором.

В качестве носителя антигенной детерминанты, обладающего свойствами адъюванта, можно использовать такие неприродные полимерные объединения, как, например, *поливинилпириды* (класс синтетических полуэлектrolитов). Они усиливают функцию Т-хелперов и способствуют взаимодействию В- и Т-лимфоцитов, увеличивая число антителобразующих клеток.

К настоящему времени расшифровано действие и других адъювантов, в частности: *адъюванта Фрейнда, липополисахарида (ЛПС)*, которые, как и МДП, стимулируют активность Т-лимфоцитов; *БЦЖ и ЛПС*, активирующих макрофаги.

На основе конъюгации синтетических антигенных детерминант (бактериальных и вирусных) с синтетическими носителями (МДП) созданы первые полностью синтетические вакцины против дифтерийного токсина, стрептококков, вируса гриппа, вируса гепатита В. Получены синтетические антигены вируса ящура, субклеточные (рибосомальные) вакцины. В последние годы началась разработка вакцинных препаратов нового типа, состоящих из рибосом соответствующего возбудителя. Эти

вакцины получили название рибосомальных или субклеточных. Они имеют некоторые преимущества перед живыми вакцинами или изолированными антигенами микробной клетки.

Иммуногенность бактериальных рибосом была открыта в 1965 г. Исследуя протективную активность субклеточных фракций микобактерий, Э. Доуманс и другие ученые выделили рибосомы, содержащие рРНК, и экспериментально доказали их иммуногенность. Эти результаты послужили толчком для продолжения исследования и разработки рибосомальных вакцин в ряде стран (вакцины против сальмонеллеза, эшерихий, стрептококков, гемофилл, франциселл, бруцелл, лептоспир и др.). Для дезинтеграции бактериальной клетки применяются следующие методики: жидкостный пресс, механическое разрушение, обработка ультразвуком. Рибосомы выделяются и очищаются при разных режимах дифференциального ультрацентрифугирования или высаливания сернокислым аммонием. Используется также обработка рибосом детергентами, полиэтиленгликолем.

Преимуществами рибосомальных вакцин являются следующие их особенности:

- бактериальные рибосомы не обладают токсичностью для животных и малореактогенны;
- вакцины имеют более выраженную иммуногенность по сравнению с корпускулярными вакцинами;
- рибосомальные вакцины способны индуцировать перекрестный иммунитет к разным серотипам и серогруппам в пределах вида возбудителя.

Механизм действия рибосомальных вакцин окончательно не расшифрован. По мнению исследователей, в рибосомальных вакцинах микобактерий протективный эффект оказывает бактериальная РНК, репродуцирующаяся в клетках с помощью обратной транскриптазы (сходство с РНК-вирусами).

Таким образом, предлагается новая гипотеза возникновения резистентности к бактериям, независимой от антител и факторов клеточного иммунитета. Однако доказать подобное действие в других случаях не представляется возможным. Наоборот, при других экспериментальных инфекциях защитный эффект рибосомальных препаратов имеет явно иммунологическую природу с участием как гуморальных, так и клеточных факторов иммунитета. Неэффективным оказалось и введение высокоочищенных препаратов РНК-бактерий.

Вторая гипотеза о механизме действия рибосомальных вакцин была сформулирована на основании данных, полученных при изучении дей-

ствия вакцины на *S. typhimurium*, и согласно ей главным иммуногенным фактором является видоспецифический рибосомальный белок 30S.

Существует и третье мнение. В составе рибосомальных препаратов часто обнаруживаются антитела клеточной оболочки бактерии – капсульные полисахариды, белки клеточной стенки и т. д. Можно предположить иммуногенное действие и этих «контаминирующих» агентов.

Таким образом, вопрос о протективном факторе рибосомальных вакцин весьма противоречив и далек от решения. Неясно, выполняют ли рибосомы роль носителя, адсорбирующего молекулу антигена и изменяющего условия его контакта с иммунокомпетентными клетками, или они являются адьювантами. Наиболее вероятными представляются образование и совместное действие комплексов «РНК – антиген», что требует специальных неизвестных пока условий. Иммунологическая специфичность определяется антигеном, а РНК участвует в представлении антигена иммунокомпетентным клеткам или влияет на операцию клеток иммунитета.

В настоящее время разработана рибосомальная вакцина против возбудителей пневмоний человека – *Str. pneumoniae*, *H. influenzae*, *Kl. pneumoniae*, *Str. piogenes*. В качестве адьюванта использован пептидогликан клебсиеллы. Приготовлена вакцина из шигелл Зонне.

9.6. Субъединичные вирусные вакцины

Живые и инактивированные вакцины во многих случаях обеспечивают надежную защиту организма животных. Однако они не лишены недостатков – у привитых могут возникать поствакцинальные осложнения, аллергические реакции и т. п. Именно поэтому была начата работа по усовершенствованию вирусных вакцин.

Субъединичные вакцины – это дальнейший путь улучшения расщепленных вирусных вакцин.

Для того чтобы их получить, нужно иметь в очищенной форме антигены, необходимые для иммунизации. По этой причине действие субъединичных вакцин направлено против тех возбудителей инфекций, у которых известна антигенная структура, определены протективные антигены и их можно отделить и сконцентрировать как субъединицы биопрепарата. В процессе формирования иммунитета к вирусам критически полными антигенами являются наружные белки. Именно этот факт использовался как основа для создания субъединичных вакцин.

Наиболее перспективная модель для создания субъединичных вакцин – так называемые оболочечные вирусы, имеющие липопротеидную мембрану. Субъединичные вакцины можно отнести к третьему поколению инактивированных вирусных вакцин. Традиционными являются культуральные вакцины (первое поколение). Современные вакцины характеризуются высокой степенью очистки и концентрации (третье поколение). Типичный пример использования различных типов вакцин – вакцинация человека против гриппа. В наши дни применяется несколько типов инактивированных очищенных вакцин – субвирионных из полностью разрушенных вирионов (сплит-вирусные вакцины) и субвирионных субъединичных вакцин с наивысшей степенью очистки от балластных веществ.

Таким образом, субъединичные вакцины против гриппа и парагриппа животных должны содержать в качестве субъединиц гемагглютинин и нейрамидазу. Определены и выделены в чистом виде субъединицы возбудителей ящура, адено- и герпесвирусных инфекций, против которых также получены субъединичные вакцины. Но надо помнить, что вирусные субъединичные вакцины активны только тогда, когда они индуцируют вируснейтрализующие антитела.

Технологический процесс изготовления субъединичных вакцин состоит из следующих этапов:

- получение вируса зараженных культур клеток или эмбрионов;
- очистка вируса с помощью пластинчатого сепаратора или на колонке с сефадексом;
- микрофльтрация;
- концентрирование (примерно в 50 раз) на фильтрах;
- дополнительная очистка ультрацентрифугированием в градиенте плотности сахарозы;
- расщепление концентратов детергентами;
- извлечение гликопротеинов вирусов путем ультрацентрифугирования или ультрафльтрации;
- диализ;
- стерилизующая фильтрация концентрата субъединиц;
- стандартизация концентрата субъединиц;
- контроль биопрепарата.

В настоящее время разрабатываются также и бактериально субъединичные вакцины, в которых в качестве протективных субъединиц используются очищенные Н- и О-антигены из клеточной стенки капсулы, ЦПМ, жгутиков, пили и т. д. Получены также вакцины про-

тив пневмококкоза, пастереллеза, колибактериоза и ряда других болезней. Все последователи отмечают биотехнологические сложности получения субъединичных вакцин и одновременно перспективность научного направления и большие возможности биопрепаратов этого типа.

9.7. Генно-инженерные вакцины

В 70-е гг. XX в. успехи генетической клеточной инженерии позволили разработать новую технологию получения противовирусных вакцин, получивших название генно-инженерных. Необходимость таких разработок диктовалась недостатком природных источников сырья (подходящих животных), невозможностью размножить вирус в классических объектах (культуры ткани и пр.).

Принцип создания генно-инженерных вакцин включает в себя:

- выделение природных генов антигенов или их активных фрагментов;
- встройку этих генов в простые биологические объекты – бактерии, дрожжи;
- получение необходимого продукта в процессе культивирования биологического объекта – продуцента антигена.

Геномы вирусов по сравнению с геномом клетки (прокариотической или эукариотической) ничтожно малы по размерам. Гены, кодирующие протективные белки, можно клонировать у ДНК-содержащих вирусов непосредственно, у РНК-содержащих вирусов – после обратной транскрипции их генома (для вирусов с непрерывным геномом) или даже отдельных генов (у вирусов с фрагментированным геномом).

На первом этапе развития новой биотехнологии ученые занимались преимущественно клонированием вирусных генов, кодирующих синтез белков, несущих главные антигенные детерминанты. Вскоре были получены рекомбинантные бактериальные плазмиды, несущие гены или геномы вирусов гепатита В, гриппа, полиомиелита.

Следующий этап – получение антигена. Вопрос оказался сложным, так как экспрессия вирусных генов в прокариотной системе была ничтожной. Это можно объяснить тем, что вирусы в ходе эволюции приспособились к паразитированию в организме человека. Однако со временем были получены экспрессии антигенов. Один из наиболее типичных примеров, показывающих необходимость создания генно-ин-

женерных вакцин, – гепатит В. Проблема состоит в том, что до сих пор не найдены чувствительные к вирусу культуры клеток или животных, поэтому разработка генно-инженерного метода получения вакцин стала необходимостью.

Метод заключается в том, что геном клонируют в клетках *E. coli* с использованием плазмидных и фаговых векторов. Бактерии, несущие рекомбинантные плазмиды, продуцируют белки, специфически реагирующие с антителами против самого вируса. В 1982 г. в США была получена первая экспериментальная вакцина против гепатита В. Для продукции вирусспецифических белков (антигенов) используют и эукариотические клетки (дрожжи, клетки животных).

Интенсивно ведутся работы по созданию и других генно-инженерных вакцин, в частности против гриппа, герпеса, ящура, клещевого энцефалита и других вирусных инфекций. Новейшим подходом в создании вирусных вакцин является включение генов, отвечающих за синтез вирусных протеинов, в геном другого вируса. Таким образом создаются рекомбинантные вирусы, обеспечивающие комбинированный иммунитет. В заключение необходимо подчеркнуть, что все вакцины независимо от происхождения должны отвечать нескольким основным требованиям, без которых они не могут быть использованы для активной иммунизации животных, а именно: обладать специфической стерильностью, безвредностью, стандартностью, умеренной реактогенностью, иметь высокую антигенную и иммуногенную активность.

9.8. Контроль вакцин

Вакцины всех типов после приготовления проверяют по следующим параметрам:

1) *стерильность* (инактивированные) или чистоту роста (живые) контролируют посевом на питательные среды;

2) *безвредность* проверяют введением вакцины лабораторным животным. Вакцина не должна вызывать заболевание и гибель животных;

3) *активность* (иммуногенность) контролируют следующим образом: вакцину вводят группе лабораторных животных и через промежуток времени, достаточный для выработки активного иммунитета (15–20 сут), эту группу вместе с контрольной группой непривитых животных заражают заведомо летальной дозой возбудителя. Контрольные животные должны погибнуть, 80 % и более вакцинированных – выжить.

В некоторых случаях об иммуногенности препарата судят по косвенным показателям: количеству агглютининов у привитых животных (лептоспирозная вакцина), антитоксинов в РН (вакцина против ботулизма);

4) *реактогенность* – побочные местные и общие реакции на введение вакцины, которые оценивают на животных и в процессе прививок людям;

5) *пирогенность* – способность вещества вызывать повышение температуры тела;

6) *контроль* сухой живой вакцины против рожи свиней ВГНКИ из штамма ВР-2 осуществляют следующим образом. Для контроля чистоты сухую (лиофилизированную) вакцину разводят стерильным физиологическим раствором в соотношении 1 : 10. Из суспензии бактерий готовят мазки, красят по Граму, микроскопируют. В препарате должны быть типичные мелкие грамположительные палочковидные клетки при отсутствии посторонних микроорганизмов. Одновременно проводят высевы на среду Китта – Тароци и агар Сабуро. Посевы выдерживают при 37...38 °С 10 сут, посевы на грибы – при 20...25 °С 15 сут. Рост посторонней микрофлоры в указанные сроки на всех питательных средах должен отсутствовать при наличии типичного роста на МПА и в МПБ культуры возбудителя рожи. В целях контроля вакцины на безвредность и активность 20 белым мышам массой 17–18 г вводят подкожно 0,2 мл препарата. Вакцину считают безвредной, если погибает не более 5 мышей. Через 14 дней всех оставшихся в живых вакцинированных и пять контрольных мышей заражают культурой вирулентного штамма возбудителя рожи свиней в заведомо летальной дозе. Вакцину признают активной, если в течение трех – четырех суток погибают контрольные и выживает не менее 75 % вакцинированных мышей.

Причины биологической реакции на вакцину:

- неполная аттенуация вирусного или бактериального компонента. Наблюдается редко, но это известное явление, о котором необходимо сообщить производителю вакцины;

- встречаются животные, особо восприимчивые к инфекции аттенуированным патогеном. Например, живая вакцина введена очень маленькому щенку, котенку или иммуносупрессивной особи, которая недавно перенесла иммуноподавляющее заболевание (лейкемия кошек, чума собак и т. д.);

- вакцина введена неправильным путем. Живая вакцина «кошачьего гриппа», аттенуированная для подкожного введения, часто вызывает инфекцию при интраназальном введении (кошка лижет место инъекции или вдохнула жидкость из полного шприца);

- во время вакцинации животное инфицировано или инкубирует инфекцию;

- животное является носителем клинически скрытой инфекции. Стресс вакцинации может вызвать выделение патогена и развитие клинических симптомов, например кошка с латентной инфекцией герпес-вирусом-1;

- обычно живые вакцины могут провоцировать легкие клинические симптомы. Подкожное введение живой вакцины часто дает начало легким системным клиническим симптомам, таким как депрессия, летаргия и отсутствие аппетита, которые продолжаются около суток. Интраназальная вакцина часто вызывает легкие симптомы респираторного заболевания – чихание, иногда незначительные выделения из глаз и носа.

Глава 10 ПРОИЗВОДСТВО ВИТАМИНОВ

10.1. Общая характеристика витаминов

Основоположник учения о витаминах русский врач Н. И. Лунин в 1880 г. установил, что при кормлении белых мышей только искусственным молоком, состоящим из казеина, жира, молочного сахара и солей, животные погибают. Следовательно, в натуральном молоке содержатся и другие вещества, незаменимые для питания. В 1912 г. польский врач К. Функ, предложивший название «витамины», обобщил накопленные к тому времени экспериментальные и клинические данные и пришел к выводу, что такие заболевания, как цинга, рахит, пеллагра, бери-бери, – болезни пищевой недостаточности, или авитаминозы. С этого времени наука о витаминах (витаминология) начала интенсивно развиваться, что объясняется значением витаминов не только для борьбы со многими заболеваниями, но и для познания сущности ряда жизненных явлений. Метод обнаружения витаминов, примененный Луниным (специальная диета для животных – провоцирование экспериментальных авитаминозов), был положен в основу исследований. Было выяснено, что не все животные нуждаются в полном комплексе витаминов. Отдельные их виды могут самостоятельно синтезировать те или иные витамины. В то же время многие плесневые и дрожжевые грибы и различные бактерии развиваются на искусственных питательных средах только при добавлении к этим средам вытяжек из растительных или животных тканей, содержащих витамины. Таким образом, витамины необходимы всем живым организмам.

Изучение витаминов не ограничивается их обнаружением в естественных продуктах с помощью биологических тестов и другими методами. Из этих продуктов получают активные препараты витаминов, изучают их строение и, наконец, получают их синтетически. Исследована химическая природа всех известных витаминов. Оказалось, что многие из них встречаются группами по 3–5 и более родственных соединений, различающихся деталями строения и степенью физиологической активности. Было синтезировано большое число искусственных аналогов витаминов в целях выяснения роли функциональных групп. Это способствовало пониманию действия витаминов. Так, некоторые производные витаминов с замещенными функциональными группами оказывают на организм противоположное действие по сравнению с витаминами, вступая с ними в конкурентные отношения за связь со специфическими белками при образовании ферментов.

Витамины имеют буквенные обозначения, химические названия или названия, характеризующие их по физиологическому действию. В 1956 г. принята единая классификация витаминов, ставшая общепотребительной.

Наличие химически чистых витаминов дало возможность подойти к выяснению их роли в обмене веществ организма. Витамины либо входят в состав ферментов, либо являются компонентами ферментативных реакций. При отсутствии витаминов в организме нарушается деятельность ферментных систем, в которых они участвуют, а следовательно, и обмен веществ. Известно несколько сот ферментов, в состав которых входят витамины, и огромное количество катализируемых ими реакций. Многие витамины – преимущественно участники процессов распада пищевых веществ и освобождения заключенной в них энергии (витамины B_1 , B_2 , PP и др.). Участвуют они и в процессах синтеза: B_6 и B_{12} – в синтезе аминокислот и белковом обмене; B_3 (пантотеновая кислота) – в синтезе жирных кислот и обмене жиров; B_C (фолиевая кислота) – в синтезе пуриновых и пиримидиновых оснований и многих физиологически важных соединений – ацетилхолина, глутатиона, стероидов и др.

Таким образом, витамины имеют огромное физиологическое значение. Выяснение физиологической роли витаминов позволило использовать их для витаминизации продуктов питания, в лечебной практике и в животноводстве. Особенно широко стали применяться витамины после освоения их промышленного синтеза.

Витамины не образуются у гетеротрофов. Способностью к их синтезу обладают лишь автотрофные организмы.

Микробиологическим способом можно получить практически все известные витамины. Однако экономически более целесообразно получать витамины выделением из природных источников или посредством химического синтеза. С помощью микроорганизмов целесообразно получать сложные по строению витамины: β -каротин (провитамин А), B_2 , B_{12} и предшественники витамина D.

Витамин B_{12} (цианокобаламин) в тканях животных имеет очень низкую концентрацию витамина (в печени быка 1 мг/кг) для того, чтобы использовать этот источник в промышленных целях. Химический синтез очень сложен. Синтезировать витамин B_{12} способны уксуснокислые бактерии, грибы и пропионовокислые бактерии. Наибольшее промышленное значение имеют *Propionibacterium* и *Pseudomonas (P. denitrificans)*.

Концентрат витамина B_{12} предназначен для обогащения кормов животных. Для обогащения кисломолочных продуктов витамином B_{12} применяют пропионовокислые бактерии как в чистом виде, так и в виде концентрата, приготовленного на молочной сыворотке.

Витамин B_2 (рибофлавин) в небольших количествах можно выделять из природного сырья. Больше его в моркови и печени трески. Наиболее активные продуценты витамина B_2 – дрожжеподобные грибы рода *Eremothecium ashbyii*, входящие в класс аскомицетов, а также бактерии *Bacillus subtilis*. Витамином B_2 обогащают некоторые сорта белого хлеба, его используют для окраски пищевых продуктов в оранжево-желтый цвет.

Каротиноиды – это предшественники витамина А, среди которых наиболее активен β -каротин. В организме человека каротиноиды не синтезируются, поэтому должны поступать извне. В печени каротин превращается в витамин А. Продуцентами каротиноидов могут быть грибы и дрожжи. В промышленности β -каротин чаще всего получают с помощью микроскопического гриба рода *Blakeslea trispora*.

β -Каротин используют при изготовлении пищевых продуктов как краситель. Его применяют при производстве колбас вместо нитрита натрия, чтобы обеспечить высокую интенсивность и устойчивость цвета, при производстве леденцов, пищевых паст, кексов и других кондитерских изделий. Во многих странах β -каротин применяют для подкрашивания сливочного масла. Кроме того, он обладает антиокислительными свойствами, которые способствуют продлению срока хранения продукта.

Витамин D₂ промышленно синтезируют с помощью дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, он применяется для лечения и профилактики рахита человека и животных.

Перспективно микробиологическое получение биотина, используемого в рационе кур и свиней. В настоящее время на Западе в большую часть комбикормов для свиней включают биотин, получаемый путем химического синтеза. В результате химического синтеза образуется рацемическая смесь, а биологической активностью обладает лишь D-форма витамина, которую синтезируют микроорганизмы.

В мире существует 40 крупных промышленных производителей витаминов; 18 из них в США, 8 – в Японии, 14 – в Западной Европе. Ведущее место в производстве витаминов занимает швейцарский концерн *Hoffman La Roche*, выпускающий 50–70 % всех витаминов.

10.2. Получение водорастворимых витаминов

Витамины получают главным образом синтетически, и лишь в некоторых случаях отдельные стадии в цепи синтеза выполняются биологическими способами. Производство концентратов витаминов из продуктов растительного или животного происхождения почти полностью потеряло свое значение.

Получение витаминов относится к тонкому органическому многостадийному синтезу. Химическими методами синтезируют следующие водорастворимые витамины: В₁, В₂, В₃, В₆, В_С, С, РР, а В₁₂ – ферментативными методами микробиологического синтеза. Ферментацией пользуются также на одной из стадий синтеза витамина С. Этот витамин в виде индивидуального кристаллического вещества высокой степени чистоты образуется при восстановлении D-глюкозы в D-сорбит. Последний ферментативно окисляют в L-сорбозу, которую после ряда операций превращают в витамин С (рис. 10, 1).

Производство **витамина В₁** (тиамина) (рис. 10, 6) основано на конденсации 2-метил-4-амино-5-хлор (бром) метилпиримидина с 4-метил-5-β-оксиэтилтиазолом. Кофермент витамина В₁ – кокарбоксилаза (рис. 10, 7), или дифосфорный эфир тиамина, применяемый для лечения заболеваний сердца, получают фосфорилированием тиамина с последующей очисткой на ионообменных смолах и кристаллизацией.

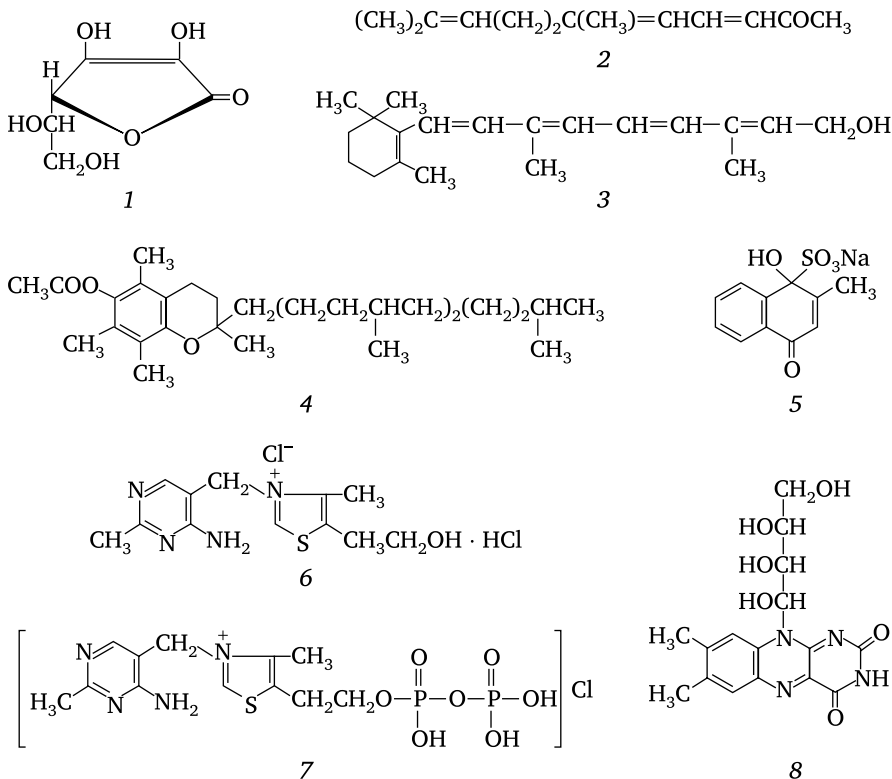


Рис. 10. Структура водорастворимых витаминов:

1 – витамин С (аскорбин); 2 – линолевая кислота; 3 – витамин А (ретинол);

4 – витамин Е (токоферол); 5 – витамин К; 6 – витамин В₁ (тиамин);

7 – фосфорный эфир тиамина; 8 – рибофлавин (В₂)

Витамин В₂ (рибофлавин) (рис. 10, 8) образуется при культивировании *Eremothecium ashbyii* и других микроорганизмов без выделения в виде сухой биомассы (с использованием только для кормления сельскохозяйственных животных), а синтетический рибофлавин (применяемый в медицине) получают в виде кристаллического продукта деструктивным окислением *D*-глюкозы (из кукурузного крахмала) в *D*-арабовую кислоту и рядом других операций превращают в конечный продукт – желто-оранжевые кристаллы высокой степени чистоты. Важное производное рибофлавина – его кофермент рибофлавин-5'-фосфат натрия (R = Na) (рис. 11, 1), применяемый для инъекций, – получают фосфорилированием рибофлавина, а другой кофермент – ФАД

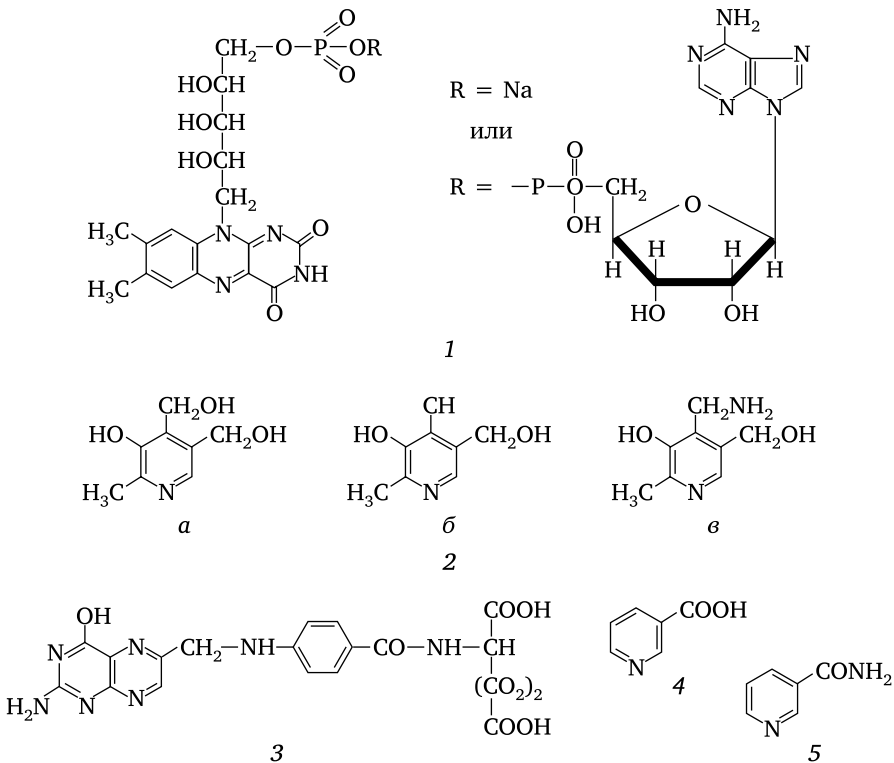


Рис. 11. Строение коферментных форм витаминов:

- 1 – рибофлавин-5'-фосфат натрия, R – ФАД; 2 – витамин B₆ (а – пиридоксин; б – пиридоксаль; в – пиридоксамин); 3 – фолиевая кислота (B₉); 4 – никотиновая кислота (PP); 5 – никотинамид

(R – остаток аденозин-5'-фосфата) (рис. 11, 1) – создают конденсацией рибофлавина-фосфата и аденозин-5'-фосфата.

Витамин B₂ содержится в клетках различных микроорганизмов, будучи коферментом в составе флавопротеинов (прежде всего соответствующих ферментов из класса оксидоредуктаз – ФМН, ФАД). Поэтому в качестве продуцентов рибофлавина (флавопротеинов) могут быть бактерии, дрожжи и нитчатые грибы. Однако наиболее заманчивыми являются те штаммы, которые образуют на жидких средах 0,5 г и более рибофлавина в 1 л среды. К подобным организмам относятся *Ashbyii gossypii*, *Eremothecium ashbyii* и *Candida guilliermondii*. Учитывая изменчивость активных продуцентов названных видов по спо-

способности синтезировать витамин В₂, необходим систематический отбор культур в процессе их эксплуатации на производстве. Обычно активные продуценты первых двух видов формируют ярко-оранжевые колонии на агаризованных средах. Методами генной инженерии удалось получить штамм сенной палочки, образующий около 6 г рибофлавина в 1 л среды, включающей мелассу, белково-витаминный концентрат и его гидролизат.

Высокий выход рибофлавина у *E. ashbyii* коррелирует с азотом пуринов и другими азотистыми источниками, содержание которых должно быть достаточным. В качестве источников углерода применяют глюкозу или сахарозу, практикуют использование дрожжевого и кукурузного экстрактов, соевой муки, масла (жира). Ферментационная среда обычно включает кукурузную и соевую муку, сахарозу, кукурузный экстракт, калия дигидрофосфат, кальция карбонат, натрия хлорид и ненасыщенный жир.

Обычно ферментацию проводят в течение 5 сут при рН 5,5–7,7. После использования сахарозы (примерно через 30 ч) витамин В₂ начинает заметно накапливаться, вначале – в мицелии, а затем – в культуральной жидкости. Всю биомассу можно подвергнуть высушиванию, и полученный сухой продукт с остаточной влажностью 8 %, содержащий 1,5–2,5 % рибофлавина, 20 % белка, тиамин, никотиновую кислоту, пиридоксин, цианкобаламин, микроэлементы и другие вещества, рекомендуют для кормления животных.

В случае высоких выходных показателей по рибофлавину витамин можно выделять в индивидуальном состоянии и наряду с синтетическим рибофлавином использовать в медицине.

Для *Candida guilliermondii* важно регулировать содержание железа в питательной среде; оптимальные концентрации колеблются в среднем от 0,005 до 0,05 мкг/мл. При этом определенные штаммы дрожжей могут образовывать за 5–7 дней до 0,5 г/л и более витаминов. Однако для целей промышленного производства рибофлавина предпочитают использовать более продуктивные виды и штаммы грибов – *E. ashbyii* и *Ashbyii gossypii*.

Витамин В_С (фолиевую кислоту) (рис. 11, 3) синтезируют одностадийной конденсацией 2,4,5-триамино-6-оксипиримидина, 1,1,3-трихлорацетона и *n*-аминобензоил-*L*-глутаминовой кислоты.

Витамин РР (никотиновую кислоту) (рис. 11, 4) получают окислением β-пиколина (выделяемого из каменноугольного дегтя), ресурсы которого ограничены, а также окислением хинолина или 2-метил-5-

этилпиридина. В медицинских целях кроме никотиновой кислоты используются никотинамидом (рис. 11, 5).

Витамин В₃ (оптически активная D-пантотеновая кислота) в медицине применяется в виде кальциевой соли:



Для нужд животноводства нет необходимости в разделении на промежуточных ступенях синтеза рацемата пантолактона на оптические антиподы. Синтез рацемического пантотената кальция состоит в альдольной конденсации изобутирала и формальдегида с последующим превращением в пантолактон, затем в его конденсации с β-аланином, приводящей к образованию конечного продукта.

Витамин В₆ (пиридоксин) (рис. 11, 2, а) синтезируют, конденсируя метоксиацетил-ацетон с циануксусным эфиром в присутствии аммиака в 2-метил-4-метоксиметил-5-циан-6-оксипиридин, который подвергают нитрованию, затем рядом операций превращают в пиридоксин. Известен также и другой способ получения пиридоксина – через 4-метил-5-пропоксиоксазол диеновым синтезом с формалем бутен-2-диола-1,4. Другими формами В₆ являются пиридоксол (рис. 11, 2, б) и пиридоксамин (рис. 11, 2, в).

Витамин В₁₂ (цианкобаламин) получают только микробиологическим синтезом. Его продуцентами являются прокариоты и прежде всего пропионовые бактерии, которые и в естественных условиях образуют этот витамин. Мутанты *Propionibacterium shermanii* М-82 и *Pseudomonas denitrificans* М-2436 продуцируют на жидкой среде до 58–59 мг/л цианкобаламина.

Учитывая важную функцию витамина в организме человека (он является противонаемическим фактором), его мировое производство достигло 10 т в год, из которых 6,5 т расходуют на медицинские нужды, а 3,5 т применяется в животноводстве.

Отечественное производство цианкобаламина базируется на использовании культуры *P. freudenreichii* var. *shermanii*, культивируемой в периодическом режиме без доступа кислорода. Ферментационная среда обычно содержит глюкозу, кукурузный экстракт, соли аммония и кобальта, рН около 7,0 поддерживают добавлением NH₄OH; продолжительность ферментации 6 сут; через 3 сут в среду добавляют 5,6-диметилбензимидазол (предшественник витамина В₁₂) и продолжают ферментацию еще 3 сут.

Цианкобаламин накапливается в клетках бактерий, поэтому операции по выделению витамина заключаются в следующем: сепариро-

вание клеток, экстрагирование водой при pH 4,5–5,0 и температуре 85...90 °С в присутствии стабилизатора (0,25 % раствор натрия нитрита). Экстракция протекает в течение часа, после чего водный раствор охлаждают, нейтрализуют раствором гидроксида натрия, добавляют коагулянты белка – хлорид железа трехвалентного и алюминия сульфат с последующим фильтрованием. Фильтрат упаривают и дополнительно очищают, используя методы ионного обмена и хроматографии, после чего проводят кристаллизацию витамина при 3–4 °С из одноацетонового раствора.

Кристаллический цианкобаламин можно получать с помощью резорцина или фенола, образующих с ним аддукты, которые сравнительно легко разлагаются на составляющие компоненты.

При реализации данного биотехнологического процесса нельзя забывать о высокой светочувствительности витамина В₁₂, поэтому все операции необходимо проводить в затемненных условиях (или при красном свете). На ацетонобутиловой и спиртовой бардах с добавлением солей кобальта и метанола в нашей стране получают кормовой препарат КМБ 12 – концентрат, содержащий витамин В₁₂ и другие ростовые вещества.

Витамин С (аскорбиновая кислота) – это противогинготный витамин, имеющийся у всех высших растений и животных. Только человек и бактерии не синтезируют аскорбиновую кислоту, но людям она необходима, а бактерии не нуждаются в ней. И тем не менее определенные виды уксуснокислых бактерий причастны к биосинтезу полупродукта этой кислоты – *L*-сорбозы. Таким образом, весь процесс получения аскорбиновой кислоты является смешанным, т. е. химико-ферментативным.

Биологическая стадия процесса катализируется мембраносвязанной полиолдегидрогеназой. Последняя стадия – химическая – включает в себя следующие этапы: конденсацию сорбозы с диадетоном и получение диацетон-*L*-сорбозы, окисление диацетон-*L*-сорбозы до диацетон-2-кетогулоновой кислоты, подвергаемой затем гидролизу с получением 2-кето-1-гулоновой кислоты; последнюю подвергают энוליзации с дальнейшей трансформацией в *L*-аскорбиновую кислоту (рис. 12).

Ферментацию *Glucanobakter oxydans* проводят на средах, содержащих сорбит (20 %), кукурузный или дрожжевой экстракт, при интенсивной аэрации (8–10 г О₂/л/ч). Выход *L*-сорбозы может достичь 98 % за одни – двое суток. При достижении культурой лог-фазы можно дополнительно внести в среду сорбит, доводя его концентрацию до 25 %. Установлено также, что *G. oxydans* может окислять и более высокие концентрации по-

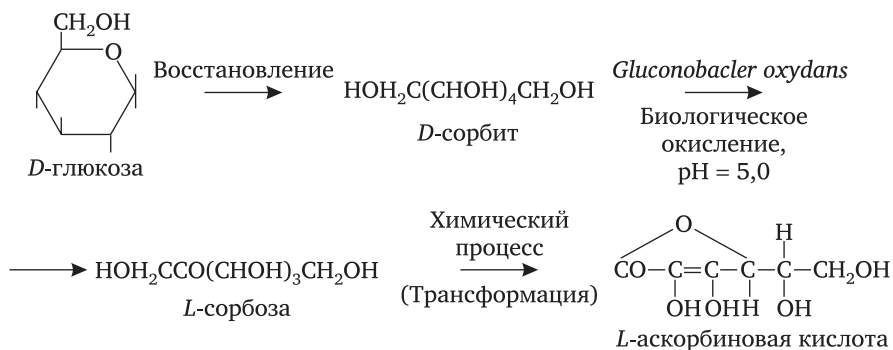


Рис. 12. Схема получения аскорбиновой кислоты (витамина С)

лиспирта (30–50 %), создаваемые на последних стадиях процесса. Это происходит благодаря полиолдегидрогеназе, содержащейся в клеточной биомассе. Ферментацию бактерий проводят в периодическом или непрерывном режиме. Принципиально доказана возможность получения L-сорбозы из сорбита с помощью иммобилизованных клеток в полиакриламидном геле (ПААГ).

10.3. Получение жирорастворимых витаминов

Получение и применение эргостерина. В промышленности эргостерин получают, используя дрожжи *Sacch. cerevisiae*, *Sacch. carlsbergensis*, а также мицелиальные грибы. Засев производят большим количеством инокулята. Культивирование ведут при высокой температуре и сильной аэрации в среде, содержащей большой избыток источников углерода по отношению к источникам азота.

Дрожжи, а также грибы рода *Aspergillus* и *Penicillium* применяют для получения кристаллического витамина D_2 или концентрата. В качестве концентрата в животноводстве используют облученные сухие дрожжи.

Максимум поглощения эргостерина отмечен при 280 нм. Именно это излучение возбуждает отдельные связи колец А и В в молекуле эргостерина и вызывает его превращение в витамин D_2 . Облучение производят ультрафиолетовыми лампами с длиной волны 280–300 нм (сухие дрожжи) или в тонком слое 5 %-й суспензии дрожжей. При более

коротковолновом и длинноволновом излучении повышается выход других соединений стеривой природы.

На выход витамина D₂ (и образование других соединений) оказывают влияние длительность облучения, температура, наличие примесей. По этой причине облучение эргостерина, используемого в качестве пищевых добавок, производят с большой осторожностью.

Промышленность СССР выпускала препарат под названием «Кормовые гидролизные дрожжи, обогащенные витамином D₂». В 1 г абсолютно сухих дрожжей содержатся 5000 ИЕ витамина D₂, не менее 46 % сырого белка и незаменимые аминокислоты, в том числе лизин, метионин, триптофан.

Для получения кристаллического витамина D₂ дрожжи или мицелий грибов подвергают гидролизу раствором соляной кислоты при 110 °С. Гидролизованную массу обрабатывают спиртом при 75...78 °С и после охлаждения до 10–15 °С фильтруют. Фильтрат упаривают до содержания в нем 50 % сухих веществ и используют как концентрат витаминов группы В.

Витамин D₂ получают из массы, оставшейся после фильтрации. Массу промывают, сушат, размельчают и дважды обрабатывают при 78 °С трехкратным объемом спирта.

Спиртовые экстракты сгущают до 70 % содержания сухих веществ. Таким образом получают липидный концентрат. Его омыляют раствором NaOH, а стерины остаются в неомыленной фракции. Кристаллы эргостерина выпадают из раствора при 0 °С. Очистку кристаллов проводят путем перекристаллизации, последовательным промыванием 69 %-м спиртом, смесью спирта и бензола (80 : 20) и повторной перекристаллизацией. Полученные кристаллы эргостерина сушат, растворяют в эфире, облучают, после чего эфир отгоняют, а раствор витаминов концентрируют и кристаллизуют.

Для получения масляного концентрата раствор витамина после фильтрации разбавляют маслом до стандартного уровня.

Источником получения эргостерина может служить мицелий грибов, остающийся как отход антибиотической промышленности и производства лимонной кислоты.

Промышленное получение эргостерина налажено из липидной фракции, использующей *n*-алканы. Сухую массу дрожжей для извлечения остаточных углеводов экстрагировали петролейным эфиром, из получаемой при этом липидной фракции (микробный жир) – побочного продукта микробиологической промышленности – выделяли эргостерин, убихинон-9 и другие жирорастворимые соединения.

Обогащенные эргостерином, облученные ультрафиолетовым излучением дрожжи применяют в животноводстве как кормовую добавку.

Эргостерин – исходный продукт для получения некоторых стероидных гормонов, лечебных и пищевых препаратов, производимого количества которого недостаточно для нужд народного хозяйства, и внедрение новых производственных мощностей – задача ближайшего будущего.

Получение каротиноидов. Каротиноиды производят с помощью химического синтеза и путем выделения из природных источников – растений и микроорганизмов. Химическим путем синтезируют β-каротин, витамин А, β-апо-8-каротиналь, этиловый эфир β-апо-8-каротиновой кислоты, кантоксантин и ряд других каротиноидов, синтез которых осуществляется в заводских масштабах. Традиционные источники каротиноидов представляют собой и некоторые растения (морковь, тыква, трава, шиповник, облепиха и др.).

В этих же целях все шире применяют мицелиальные грибы и дрожжи. Как продуценты каротиноидов представляют интерес также бактерии и водоросли.

Перспективными в данном отношении являются некоторые фототрофные бактерии, у которых в зависимости от интенсивности света можно регулировать выход каротиноидов. Биомассу пурпурных бактерий, богатую каротиноидами, в Японии употребляют в качестве добавок в рацион кур, что способствует более интенсивному окрашиванию желтка. В значительном количестве каротиноиды могут быть получены также из некоторых водорослей (например, *Spongiosoccus excentricum*, *Chlorella sp.*).

Среди хемотрофов для получения каротиноидов используют дрожжи *Rhodotorula gracilis*, *R. rubra*, *Rhodospiridium diobovatum*, а также актиномицеты (*Act. chrestomycetes* var. *aurantioideus*, *Act. chrysomallus* var. *carotinoides*), микобактерии (*Mycobacterium phlei*, *M. carotenum*), грибы (*Mucoraceae*, *Dacrymycetaceae* и др.). Интерес представляют некоторые штаммы *Flavobacterium*, синтезирующие пигмент зеаксантин, который пока еще не может быть получен с помощью химического синтеза.

Продуцентами β-каротина, широко применяемыми в промышленном производстве этого пигмента, служат гетероталлические мукооровые грибы *Blakeslea trispora* и *Choanephora conjuncta*. При совместном культивировании разнополюх штаммов этих грибов на специально подобранных средах выход каротина составляет около 3–4 г/л среды.

Получение β-каротина с помощью *B. trispora* осуществляют в сложных по составу средах, например кукурузно-соевой, содержащей расти-

тельные масла, керосин, поверхностно-активные вещества и некоторые специальные стимуляторы. В целях экономии начинают применять вторичные продукты отхода – кукурузный экстракт и гидрол. В качестве стимуляторов синтеза каротина используют β -ионон, который можно заменить более дешевой цитрусовой пульпой и цитрусовой мелассой. Заменителями β -ионона служат также изопреновые димеры или тримеры, а также циклогексан, циклогексанон и их триметилпроизводные, среди которых наиболее эффективен 2,6,6-триметил-1-ацетилциклогексан (ТАЦ). Активаторами каротиногенеза у *B. trispora* могут быть также α -пирролидон, сукцинимид, нембутал и изониазид. Добавление этих активаторов, особенно последнего, на фоне действия β -ионона или ТАЦ позволяет значительно увеличить выход каротиноидов. Стимуляторы добавляются к культуре продуцента после окончания периода интенсивного роста биомассы.

Процесс производства β -каротина с помощью гриба *B. trispora* многостадийный. Согласно одному из способов сначала выращивают отдельно (+)- и (-)-штаммы гриба. Следующая стадия – совместное выращивание разнополюх штаммов в ферментере при 26 °С и достаточно интенсивной аэрации. Третья стадия выращивания – внесение в большой ферментер смешанной культуры *B. trispora* и инкубация в течение 6–7 сут при той же температуре и аэрации.

С помощью соответствующих стимуляторов можно не только значительно увеличить выход β -каротина, но и изменить состав каротиноидов у *B. trispora*. Под влиянием некоторых производных пиридина (2-аминопиридина, 4-аминопиридина) вместо β -каротина преобладающим пигментом становится ликопин, выход которого может составлять более 60 % от всех каротиноидов, синтезированных *B. trispora*. При добавлении 4-аминопиридина наряду с ликопином образуется γ -каротин, причем оба каротиноида синтезируются почти в равных количествах. Таким образом, *B. trispora* интересен в практическом отношении не только потому, что это один из самых активных продуцентов β -каротина, но и потому, что с помощью этого организма можно получать и другие каротиноиды (γ -каротин, ликопин, α -каротин, β -зеакаротин), также имеющие практическое применение.

Проводятся исследования, направленные на дальнейшее удешевление стоимости каротиноидов, образуемых микробиологическим способом. Показано, например, что синтез каротиноидов у *B. trispora* можно увеличить почти в семь раз, если источником углерода в среде будет целлюлоза. Для удешевления производства с этой целью можно приме-

нять отходы, остающиеся при производстве целлюлозных материалов. На таких средах *B. trispora* синтезирует кроме β -каротина еще и такой практически важный фермент, как β -глюкозидаза. Получение одновременно двух ценных продуктов значительно удешевляет производство β -каротина.

Для практического применения предложен также высокопродуктивный мутант дрожжей *Rhodospiridium diobovatum*. На основе данного штамма произведен каротинсодержащий белковый препарат. Разработан также метод получения каротинсодержащего препарата с помощью высокоактивного мутанта *Mycobacterium rubrum*; препарат содержит α -, β - и γ -каротины, ликопин и ксантофиллы (лютеин, торулин и др.). Для производства ксантофиллов используют гриб *Dacrymyces deliquescens*, культивируемый на среде, содержащей глюкозу, глицерин и кукурузный экстракт при интенсивном освещении. Выход ксантофиллов в этом случае может составлять около 40 мг на 1 л среды.

Глава 11 **ПРОИЗВОДСТВО ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ**

Органические кислоты широко применяют в пищевой и фармацевтической промышленности, в технике и в качестве химического сырья. Отдельные органические кислоты (лимонная, яблочная) можно получать экстракцией из природного растительного сырья; другие (уксусная, молочная) – в процессах органического синтеза. Более 50 органических кислот могут быть синтезированы на основе микробиологического синтеза. К настоящему времени детально разработаны биотехнологические методы их получения. Считается, что органические кислоты, полученные в результате микробиологического синтеза, более предпочтительны для употребления человеком, чем синтетические. Для технических нужд органические кислоты получают химическим путем, применяемые в пищевой и фармацевтической промышленности – в результате биотехнологических процессов (производство лимонной, молочной, уксусной, итаконовой, пропионовой и глюконовой органических кислот (молочная и уксусная производятся также и химическим путем)).

Органические кислоты в системе микробного метаболизма представляют собой продукты деградации источника энергии и углерода. Так, лимонная, изолимонная, кетоглутаровая, янтарная, фумаровая и яблочная кислоты – интермедиаты цикла трикарбоновых кислот у большинства аэробных микроорганизмов. Глюконовая, кетоглюконовая и винная кислоты – промежуточные продукты прямого окисления глюкозы (без фосфорилирования) некоторых аэробных бактерий и грибов. Молочная, масляная и пропионовая кислоты являются конечными продуктами метаболизма углеводов у анаэробных бактерий. Уксусная кислота – продукт окисления этанола, а алифатические моно- и дикарбоновые кислоты – промежуточные продукты окисления нормальных алканов.

Таким образом, возможности микроорганизмов для получения на основе их метаболизма органических кислот велики. Для сверхсинтеза отдельных кислот нужны селективные, строго определенные условия. При сбалансированном росте микроорганизмов на полноценной среде накопления органических кислот не происходит, так как, являясь промежуточными продуктами в системе микробного метаболизма, органические кислоты – это исходный материал для синтеза других макромолекул. Время максимальной скорости образования в клетке органических кислот, как и многих других метаболитов, не совпадает со временем скорости размножения клеток и накоплением биомассы. Сверхсинтез органических кислот наблюдается при снижении скорости роста продуцента и блокировании процессов биосинтеза, требующих участия кислот в качестве субстрата, т. е. при нарушении процессов диссимиляции имеющегося эндогенного субстрата и процессов синтеза основных (азотсодержащих) компонентов клетки. Такие условия обеспечиваются, как правило, при полном или избыточном содержании в среде источника углерода и энергии и дефиците биогенных элементов, ограничивающих рост клеток. Большинство органических кислот получают, лимитируя рост клеток-продуцентов дефицитом азота или фосфора при избытке углеродсодержащего субстрата, поэтому микробиологические процессы производства органических кислот двухфазные. На первом этапе происходит так называемый сбалансированный рост при максимальном накоплении биомассы и потреблении углеродного и энергетического субстрата, а также лимитирующего биогена, на втором – замедление скорости роста клеток. В результате этого прирост биомассы прекращается и начинается интенсивное кислотообразование. Длительность фазы интенсивного кислотообразования определяется наличием углеродсодержащего субстрата в среде. Важное условие образования большинства органических кислот (за исключением молочной) – хороший режим аэрации, а также величина pH среды.

Способность продуцировать ту или иную кислоту – широко распространенное среди микроорганизмов свойство. В качестве производных культур используют специально подобранные штаммы, продуцирующие целевую кислоту в виде монопродукта с высокими выходами и эффективным усвоением углеродного субстрата. При многих производствах органических кислот экономический коэффициент по углероду достигает 90 % и выше. Продуцентами служат бактериальные, дрожжевые и грибные культуры (*Lactobacillus*, *Arthrobacter*, *Alcaligenes*, *Candida*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*). Способы ферментации в микробиологических процессах производства органических кислот разнообразны.

Среди них – поверхностные жидко- и твердофазные процессы, а также глубинные, включая проточные культуры. В последние годы разработаны принципиально новые и эффективные биотехнологии с применением иммобилизованных целых клеток и ферментов. Разнообразны также и субстраты, используемые в производстве органических кислот. Применяемые в начале XX в. глюкоза и сахароза со временем стали заменять более доступными комплексными средами (меласса, гидролизный крахмал). В 1960-е гг. были разработаны новые процессы производства органических кислот на жидких парафинах нефти.

В настоящее время биотехнологическими способами в промышленных масштабах получают ряд органических кислот. Из них лимонную, глюконовую, кетоглюконовую и итаконовую кислоты получают только микробиологическим способом; молочную, салициловую и уксусную – как химическим, так и микробиологическим путем, яблочную – химическим и энзиматическим. Уксусную кислоту продуцируют *Acetobacter* и *Gluconobacter*, лимонную – *Aspergillus niger*, *Aspergillus wentii*, молочную – *Lactobacillus delbrueckii*.

В качестве сырья для производства пищевого уксуса используется виноградное вино, пивное сусло, мед, соки различных фруктов и ягод после спиртового брожения, а водный раствор этилового спирта – для белого уксуса. Кроме спирта среда содержит уксусную кислоту и минеральные соли, в состав которых входят азот, фосфор, сера, марганец, калий. Иногда добавляют источники витаминов в виде различных экстрактов. Спирт служит источником углерода и энергии для бактерий.

Уксусная кислота стала первым микробиологическим продуктом, полученным с помощью иммобилизованных клеток. Этот способ может быть непрерывным и периодическим. В течение длительного времени применяется адсорбирование уксуснокислых бактерий на древесной стружке, древесном угле, коксе и других субстратах. Пропуская раствор этанола через генераторы с иммобилизованными бактериями, получают 10–15 %-й раствор уксусной кислоты. При этом из 100 л безводного спирта теоретически образуется 103 л уксусной кислоты. На практике выход уксуса из 100 л этанола редко превышает 90 л, что связано с переокислением и неполным окислением этанола бактериями, а также с его испарением.

Уксус, полученный при брожении, имеет приятные аромат и вкус, которые обуславливают побочные продукты брожения: сложные эфиры (этилацетат и другие), высшие спирты, органические кислоты.

В столовом уксусе содержится от 5 до 9 % уксусной кислоты. Уксус с концентрацией кислоты от 20 до 30 % получают путем выморажива-

ния исходного раствора, путем перегонки – 70–80 %-ю уксусную кислоту, называемую уксусной эссенцией. Ледяная уксусная кислота содержит от 98,0 до 99,8 % кислоты.

Уксусную кислоту, или уксус, широко используют в пищевой промышленности. Уксус, синтезированный микробиологическим путем (пищевая уксусная кислота, столовый уксус), различается по сортам в зависимости от характера сброживаемого субстрата. Известен яблочный, виноградный, грушевый и другие сорта уксуса. Его также применяют для растворения органических красителей, при получении медикаментов, пластмасс и т. д.

Лимонная кислота широко распространена в природе, относительно много ее содержится в некоторых ягодах, фруктах, особенно в цитрусовых (в лимоне от 5 до 10 %), в листьях и стеблях некоторых растений.

Ранее лимонную кислоту выделяли в виде лимоннокислого кальция из продуктов переработки листьев хлопчатника, стеблей махорки, хвои ели и в значительных количествах из плодов лимонов. Однако это производство крайне недешевое и небольшое по объему, поэтому лимонная кислота была дефицитным и дорогим продуктом.

В настоящее время лимонная кислота по объему производства – один из главных продуктов микробного синтеза, ее общий выпуск в разных странах достигает 400 тыс. т в год.

Для получения лимонной кислоты используют микроскопические грибы родов *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Ustina* и др. Сегодня основными продуцентами лимонной кислоты служат различные штаммы гриба *Aspergillus niger*.

Сверхсинтез лимонной кислоты происходит при лимитировании роста грибов-продуцентов минеральными компонентами среды и одновременном избыточном содержании источника углерода. В условиях лимитирования роста гриба из-за недостатка железа и марганца после полного поглощения из среды дефицитного элемента он прекращает расти, однако продолжает потреблять имеющийся в среде источник углерода. При этом в клетках гриба начинает накапливаться лимонная кислота, которая в дальнейшем выделяется в среду.

Посевной материал в виде спор (конидий) выращивают на меласной среде поверхностным или глубинным способом.

Лимонную кислоту выделяют из культуральной жидкости в виде плохо растворимой соли – цитрата кальция, которая образуется при добавлении мела. Перевод лимонной кислоты в свободное состояние достигается при добавлении строго определенного количества серной кислоты:



Гипс удаляют фильтрованием. Раствор лимонной кислоты осветляют активированным углем, упаривают, кристаллизуют.

Лимонная кислота применяется в кондитерской промышленности для подкисления карамели, пастилы, вафель, так как она хорошо подчеркивает фруктовый вкус. Данную органическую кислоту в целях подкисления добавляют в мороженое, пищевые концентраты, маргарин, некоторые сорта колбас и сыра.

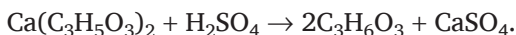
Лимонную кислоту используют для торможения образования меланоидинов в сгущенном молоке с сахаром, ее раствором промывают и дезодорируют жировое сырье, обрабатывают перед холодным хранением свежее мясо, рыбу, фрукты с целью стабилизации их цвета, вкуса и запаха. Соли лимонной кислоты применяют для изготовления шампуней и других моющих средств, так как они стимулируют вспенивание и обеспечивают механическую устойчивость пен.

Молочная кислота с 1881 г. производится промышленным способом с помощью молочнокислых бактерий. Для промышленного изготовления молочной кислоты пригодны только гомоферментативные молочнокислые бактерии, образующие до 98 % молочной кислоты. Применяются штаммы *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus bulgaricus*.

Молочнокислые бактерии преобразуют в молочную кислоту самые разные углеводы, поэтому для промышленного получения этой кислоты используют мелассу, молочную сыворотку, глюкозу, мальтозу, сахарозу, лактозу, осахаренный крахмал и пр.

Молочную кислоту в промышленных условиях получают методом анаэробной глубинной ферментации. Во время ферментации pH среды поддерживают, добавляя мел. Через 6–7 сут культивирования в среде остается от 0,5 до 0,1 % сахаров и от 11 до 14 % лактата кальция. Из 100 г сахаров получают от 80 до 90 г лактата кальция.

Осадок мела и коллоиды отделяют фильтрацией. Фильтрат упаривают, охлаждают и кристаллизуют. Кристаллы лактата отделяют центрифугированием. Молочную кислоту из лактата получают разложением серной кислотой. Реакция идет при температуре от 60 до 70 °С в соответствии с уравнением



Молочную кислоту обрабатывают активированным углем, фильтруют и фасуют. Конечный продукт имеет вид жидкого концентрата молочной кислоты.

Молочную кислоту применяют для приготовления джемов, в которых она способствует хорошей консистенции. Молочная кислота регулирует pH, улучшает вкус продуктов и применяется при изготовлении

многих видов сыров, при квашении капусты, в сухом концентрате кваса. Молочная кислота и лактаты увеличивают объем мякиша хлебобулочных изделий и повышают качество корки хлеба при использовании муки низкого качества. Способность лактатов удерживать влагу применяют при изготовлении колбас, сыров, детского питания. Молочную кислоту также используют для более быстрого получения молочно-белкового сгустка при производстве творога.

11.1. Получение лимонной кислоты

Лимонная кислота – трехосновная оксикислота, широко распространенная в плодах и ягодах. Она широко применяется в пищевой промышленности при производстве кондитерских изделий и напитков, в фармацевтической, химической и текстильной промышленности. Лимонная кислота была идентифицирована в качестве продукта метаболизма плесневых грибов в 1893 г. С. Вемером. В настоящее время по объемам производства (свыше 350 тыс. т/г) она занимает первое место среди всех органических кислот.

У микроорганизмов синтез лимонной кислоты реализуется в цикле дикарбоновых кислот и осуществляется в результате конденсации кислоты с четырьмя атомами углерода и двумя карбоксильными группами и кислоты с одной карбоксильной группой. Образующаяся в результате гликолиза пировиноградная кислота связывается с углекислотой; синтезируемая при этом щавелево-уксусная кислота реагирует с уксусной с образованием лимонной кислоты, т. е. образование лимонной кислоты включает реакции гликолиза и ряд реакций цикла Кребса. При каждом обороте цикла молекула щавелево-уксусной кислоты взаимодействует с уксусной, образуя лимонную кислоту.

Производство лимонной кислоты методом ферментации плесневых грибов принадлежит к числу давних биотехнологических процессов (конец XIX в.). Совершенствование процедуры получения лимонной кислоты тесно связано с разработкой многих фундаментальных аспектов микробиологии (борьба с микробным загрязнением производственной культуры, оптимизация состава питательных сред, селекция высокопродуктивных штаммов и др.).

В промышленном производстве лимонной кислоты в качестве продуцента в основном используют *Aspergillus niger*, но также применяют и *A. wentii*. Процесс ферментации достаточно сложен, так как лимон-

ная кислота – продукт первичного метаболизма грибов, и даже незначительное выделение его в окружающую среду свидетельствует о выраженном дисбалансе клеточного метаболизма. Рост продуцента и синтез кислоты обычно регулируют составом среды (сахара, P, Mn, Se, Zn). Сверхсинтез лимонной кислоты происходит при больших концентрациях сахаров в среде (14–24 %) и является ответной реакцией продуцента на дефицит фосфора, а также других металлов, хотя их роль до конца не ясна: это, видимо, и подавление анаболизма, и влияние на свойства поверхности и морфологию гиф. Оптимум pH на стадии кислотообразования составляет 1,7–2,0. В более щелочной среде процесс сдвигается в сторону накопления щавелевой и глюконовой кислот. В качестве основы среды обычно выступает глюкозный сироп, гидролизаты крахмала или меласса. Последнюю предварительно разбавляют до требуемого уровня сахаров и обрабатывают в целях снижения содержания металлов. Источником азота служат соли аммония (0,2 %), концентрация фосфатов (0,01–0,2 %). В качестве пеногасителей применяют природные масла с высоким содержанием жирных кислот. Существенное значение имеет уровень аэрации культуры.

В производстве лимонной кислоты применяют несколько способов. Поверхностный способ осуществляется на твердой сыпучей среде и в жидкой фазе. При жидкофазной поверхностной ферментации питательную среду разливают в кюветы слоем от 8 до 18 см. Кюветы размещают на стеллажах бродильной камеры, предварительно простерилизованной парами формалина. Через специальные воздухопроводы с током стерильного воздуха поверхность среды засевают исходной музейной культурой. В качестве посевного материала используют предварительно полученные также в условиях поверхностной культуры и высушенные споры (конидии) из расчета 50–75 мг конидий на 1 м² площади кювет. Известно несколько вариантов протекания процесса: бессменный, бессменный с доливками и метод пленок. При бессменном режиме процесс осуществляется на одной среде от момента засева спор до завершения стадии кислотообразования.

При использовании метода пленок через 7 сут после завершения кислотообразования сброженный раствор мелассы сливают из кювет, мицелий промывают стерильной водой и в кюветы заливают новую среду. Бессменный способ с доливкой характеризуется дробными добавками мелассы под пленку гриба на стадии кислотообразования (30–35 % от исходного объема) – режим с подпиткой субстратом. Это позволяет повысить выход лимонной кислоты на 15–20 % с единицы поверхности при сокращении затрат сахаров на 10–15 % по сравнению с други-

ми методами. В стадии ферментации на первом этапе (первые 24–36 ч) происходит интенсивный рост мицелия. Температура среды в этот период стабилизируется на уровне 32...34 °С, интенсивность аэрации составляет 3–4 м³/ч воздуха. Во время активного кислотообразования подачу воздуха увеличивают в 5–6 раз. В результате более интенсивного термогенеза температуру снижают до 30...32 °С. По мере снижения скорости процесса кислотообразования режим аэрации становится менее интенсивным. Контроль процесса ведут по показателям титруемой кислотности среды. Процесс считают законченным при остаточной концентрации сахаров около 1–2 % и уровне титруемой кислотности 12–20 %. Содержание лимонной кислоты достигает 94–98 % уровня всех кислот. Сброженный раствор сливают в сборник и направляют на обработку, промытый мицелий – на корм скоту.

Твердофазная ферментация имеет много общего с поверхностно-жидкофазным процессом. Разработанный в Японии процесс Коджи предусматривает использование в качестве среды пористого материала (багаса, картофель, пульпа сахарной свеклы, пшеничные отруби). Материал предварительно стерилизуют, после охлаждения инокулируют суспензией спор. Ферментация происходит в лотках при 25...30 °С в течение 6–7 дней. Образованную лимонную кислоту экстрагируют водой. В Японии 20 % общего объема этой кислоты получают методом Коджи.

Начиная с 1950 г. промышленные процессы получения лимонной кислоты стали переводить в условия глубинной культуры. Стабильный процесс возможен при его организации в две стадии: первая – рост мицелия на полной среде, вторая (при отсутствии фосфора в среде) – образование лимонной кислоты. Глубинная ферментация проводится в аппаратах емкостью 50 м с заполнением на 70–75 %. Посевной материал – мицелий, подрощенный также в условиях глубинной культуры. В производственном аппарате, куда подрощенный мицелий передается по стерильной посевной линии, питательная среда содержит 12–15 % сахаров. Ферментацию проводят при 31...32 °С при непрерывном перемешивании. В ходе процесса кислотообразования (5–7 сут) реализуют интенсивный режим аэрации (до 800–1000 м³/ч) с дробным добавлением сахаров, 2–3 подкормки. Выход лимонной кислоты составляет от 5 до 12 %, остаточная концентрация сахаров – 0,2–1,5 %, доля цитрата – 80–98 % от суммы всех органических кислот. В 60-е гг. XX в. начали разрабатывать способы получения лимонной кислоты на основе жидких углеводов (C₉–C₃₀), используя в качестве продуцентов дрожжи (*Candida*) и бактерии (*Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Arthrobacter*), а также метод проточных культур. Эти технологии, пока не реализо-

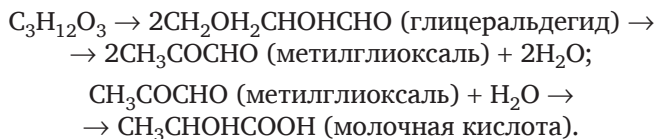
ванные в промышленных масштабах, в будущем имеют определенные перспективы.

Готовый продукт – высокоочищенную кристаллическую лимонную кислоту – получают в ходе постферментационной стадии. В сброженных растворах помимо целевой кислоты содержатся также глюконовая и щавелевая кислоты, остатки несброженных сахаров и минеральные соли. Для выделения лимонной кислоты из данного раствора ее связывают гидроксидом кальция с образованием трудно растворимого цитрата кальция.

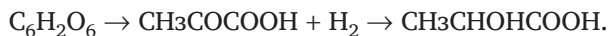
Одновременно образуются кальциевые соли глюконовой и щавелевой кислот, глюконат кальция ($C_{12}H_{22}CaO_{14}$) и оксалат кальция (CaC_2O_4). Кальциевые соли лимонной и щавелевой кислот выпадают в осадок, а глюконат кальция и основная часть органических и минеральных компонентов мелассы остаются в растворе. Осадок отделяется на вакуум-фильтре, промывается и высушивается. Далее для перевода лимонной кислоты в свободное состояние и освобождения от оксалата кальция осадок обрабатывают серной кислотой с последующей фильтрацией. Раствор лимонной кислоты фильтруют, концентрируют вакуум-выпаркой и затем подвергают кристаллизации при медленном охлаждении до 8–10 °С. Полученные кристаллы отделяют в центрифуге от маточника и высушивают в пневматических сушилках при 30...35 °С. Готовый продукт содержит не менее 99,5 % лимонной кислоты (в пересчете на моногидрат), зольность не выше 0,1–0,35 %.

11.2. Получение молочной кислоты

Молочная кислота – органическая одноосновная кислота, образуемая в результате анаэробного превращения углеводов молочнокислыми бактериями. В 1847 г. С. Блодно доказал, что данная кислота является продуктом брожения, а Л. Пастер установил, что этот процесс вызывают бактерии. Образование молочной кислоты из глюкозы возможно несколькими путями. Первый способ – сбраживание гомоферментными молочнокислыми бактериями:



Второй путь, гетероферментный, включает распад глюкозы до пириновинградной кислоты и восстановление последней до молочной кислоты:

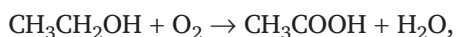


Для промышленного получения молочной кислоты используют го-моферментные молочнокислые бактерии. У этого вида бактерий только 3 % субстрата превращается в клеточный материал, а остальной транс-формируется в молочную кислоту, выход которой достигает до 1,5 %. Теоретически из 1 моля глюкозы должно образоваться 2 моля лакта-та. На практике эта величина несколько ниже – 1,8 моля, т. е. выход продукта из субстрата достигает 90 %. Применяют молочную кисло-ту в пищевой промышленности для получения напитков, мармеладов, при консервировании, а также в кормопроизводстве. Ее соли использо-уют в фармацевтике. Промышленное производство молочной кислоты начато в конце XIX в. с участием молочнокислых бактерий *Lactobacillus delbrueckii*, *L. leichmannii*, *L. bulgaricus*. Молочнокислое брожение проте-кает в анаэробных условиях, однако лактобациллы относятся к факультативным анаэробам, поэтому при ферментации из ферментеров пол-ностью не удаляют воздух. Сырьем служат сахарная и тростниковая меласса и гидролизаты крахмала, при этом концентрация сахаров в ис-ходной среде в зависимости от характера брожения составляет пример-но от 5 до 20 %. Используют восстановленные формы азота, сульфаты или фосфаты аммония, а также солод и кукурузный экстракт в качестве источника факторов роста. Возможно использование сульфитного ще-лока с участием бактерий *L. delbrueckii*. Ферментацию проводят в глу-бинной культуре при pH 6,3–6,5 и строго постоянной температуре 50 °C. Длительность процесса составляет до 7–11 сут. В ходе процес-са брожения для коррекции изменяющегося pH в культуру 3–4 раза в течение суток вносят мел. Конечная концентрация образующегося лактата кальция составляет 10–15 %, остаточная концентрация саха-ров – 0,5–0,7 %. На стадии получения готового продукта культуральную среду нагревают до 80...90 °C, затем нейтрализуют гашеной известью до слабощелочной реакции. После отстаивания в течение 3–5 ч взве-шенные частицы декантируют. Далее раствор лактата кальция подают на фильтр-пресс. Фильтрат упаривают до концентрации 27–30 %, ох-лаждают до 25...30 °C и подвергают кристаллизации. Промытый лактат кальция отделяют центрифугированием и расщепляют серной кисло-той при 60...70 °C. Сырую молочную кислоту 18–20 %-й концентрации упаривают в несколько этапов в вакуум-выпарных аппаратах до 70 %-й концентрации. Отфильтрованную кислоту после фильтр-пресса пода-

ют на розлив с внесением небольших количеств мела, при этом около 10 % кислоты превращается в кристаллический лактат, который связывает молочную кислоту.

11.3. Получение уксусной кислоты

Уксусная кислота широко используется в пищевой, химической, микробиологической промышленности, в медицине. Ее получение из спиртосодержащих жидкостей было известно более 10 тыс. лет назад. В те времена древние греки и римляне употребляли уксус в качестве освежающего напитка, а получали его главным образом, оставляя вино открытым. В больших масштабах уксус долго производили в плоских открытых бочках, в которых пленка бактерий плавала на поверхности. В XIX в. поверхностные способы заменили на более эффективные. Был разработан процесс в струйном генераторе, в середине XX в. – глубинные методы ферментации. В настоящее время используется усовершенствованный генератор Фрингса. Уксуснокислое брожение основано на способности уксуснокислых бактерий окислять спирт кислородом воздуха с участием алкогольдегидрогеназы в уксусную кислоту:



при этом из 1 моля этанола образуется 1 моль уксусной кислоты, а из 1 л 12 об. % спирта получается 12,4 % уксусной кислоты.

Данный процесс могут реализовать многие бактерии, но в промышленных технологиях для получения уксуса используют уксуснокислые бактерии рода *Acetobacter*, интерес представляют также бактерии *Gluconobacter*. Большую часть уксуса получают как поверхностным, так и глубинным способом, используя разведенный спирт. Поверхностный режим протекает в струйных генераторах, наполненных древесной стружкой, объемом до 60 м. Исходный питательный раствор с бактериями распыляют по поверхности стружек, и он стекает, собираясь в нижней части аппарата. После этого жидкость собирают и вновь закачивают в верхнюю часть аппарата. Процедуру повторяют 3–4 раза, в результате в течение трех дней до 90 % спирта трансформируется в ацетат. Этот старый способ более эффективен в генераторах Фрингса с автоматическим поддержанием температуры и принудительной подачи воздуха. По такой технологии производят до 400 млн л уксусной кислоты в год. Современные промышленные методы получения уксу-

са реализуют в глубинной культуре в специальных аэрационных аппаратах с термостабилизацией и механической системой пеногашения. Скорость аэрации составляет $3,4 \text{ м}^3/\text{ч}$, вращение ротора – 1500 об/мин, температура $30 \text{ }^\circ\text{C}$. Исходная инокулируемая смесь содержит этанол и уксусную кислоту около 5 и 7 % соответственно; конечная концентрация уксуса через 1,5 сут составляет 12–13 %. Процесс – полупроточный, отливно-доливной. Каждые 30–35 ч до 60 % культуры заменяют на свежее сусло. При глубинной ферментации выход продукта на 1 м^3 в 10 раз выше по сравнению с поверхностной ферментацией. К началу 1990-х гг. таким способом производили до 715 млн л 10 %-й уксусной кислоты в год. Разработан и внедрен эффективный непрерывный способ получения уксусной кислоты в батарее последовательно работающих ферментеров (обычно пять аппаратов). Температура культивирования составляет $28 \text{ }^\circ\text{C}$ для *Acetobacter* и $35 \text{ }^\circ\text{C}$ при использовании в качестве продуцента культуры *Bact. schutzenbachii*.

Наилучшим сырьем для процесса служит этиловый спирт, полученный из зерно-картофельного сырья, при его концентрации около 10 %. Оптимум pH для развития бактерий – около 3. При увеличении содержания уксусной кислоты в культуре свыше 8 % рост бактерий замедляется, при 12–14 % прекращается. По этой причине процесс проходит в батарее последовательно соединенных аппаратов. Первый выполняет роль инокулятора, поэтому в него непрерывно подают свежую среду и поддерживают условия, оптимальные для быстрого образования биомассы бактерий. Культура из первого аппарата поступает во второй и далее в последующие, при этом транспортировка культуральной жидкости осуществляется воздухом. В каждом аппарате условия ферментации стабилизируются в соответствии с требованиями хода ферментации при постепенном понижении температура среды от $28 \text{ }^\circ\text{C}$ в первом аппарате до $25 \text{ }^\circ\text{C}$ – в последнем. Режим аэрации также изменяется от 0,4 до $0,15 \text{ м}^3/(\text{м}^3/\text{мин})$. Концентрация спирта со второго по четвертый аппарат стабилизируется на требуемом уровне подачи в них среды с 40 %-м этанолом. Из последнего аппарата выводится культуральная жидкость с содержанием ацетата не ниже 9,0 и не выше 9,3 %.

Выход кислоты составляет до 90 кг из 100 л безводного спирта. На постферментационной стадии после отделения бактериальной биомассы раствор уксуса фильтруют, освобождая от окрашенных и взвешенных частиц, и далее подвергают пастеризации. Для повышения концентрации исходные растворы вымораживают до 20–30 %. Дальнейшее концентрирование до получения ледяной уксусной кислоты (98,0–99,8 %) проводят методом перегонки.

11.4. Получение пропионовой кислоты

Пропионовая кислота синтезируется грамположительными пропионовокислыми бактериями (*Propionibacterium*), используется в химико-фармацевтической промышленности, при получении косметических средств, в качестве фунгицида для сохранения зерна. Химизм образования пропионовой кислоты заключается в следующем: пировиноградная кислота при участии биотина и углекислоты карбоксилируется в щавелево-уксусную, которая через яблочную и фумаровую кислоты восстанавливается до янтарной кислоты. Янтарная кислота при участии АТФ и КоА превращается в сукцинил-КоА, последний под воздействием метилмалонилКоА-изомеразы и при участии кофермента В превращается в метилмалонил-КоА. В результате карбоксилирования метилмалонил-КоА расщепляется с образованием свободного КоА и пропионовой кислоты. Среди промышленных штаммов-продуцентов – бактерии *Pr. Arabinosum*, *Pr. shermanii*, *Pr. rubrum* и др. В качестве субстрата брожения бактерии используют различные сахара (лактоза, глюкоза, мальтоза, сахароза, органические кислоты – яблочная и молочная).

Получают пропионовую кислоту в глубинной аэробной культуре на средах, содержащих: сахара – 2 %, органического азота – 0,4 % (источник – дрожжевой экстракт), а также соли молочной кислоты. Процесс реализуется за 12 сут при 30 °С и рН 6,8–7,2; при этом свыше 70 % сахаров трансформируется в органические кислоты, на образование углекислоты расходуется менее 20 % углеродного субстрата.

11.5. Получение итаконовой кислоты

Итаконовая кислота – ненасыщенная двухосновная кислота. Ее образование плесневыми грибами открыл в 1931 г. Киношита. Данная кислота – важный промежуточный продукт для получения полимеров. Она образует сополимеры с эфирами и другими мономерами, поэтому используется при производстве синтетических волокон и смол, ряда адгезивных средств, поверхностно-активных веществ (ПАВ), красителей и других сложных органических соединений.

Синтез итаконовой кислоты связан с реакциями цикла Кребса. Ее исходным продуктом является цисаконитовая кислота, которая при декарбоксилировании в результате перемещения электронов и перехода двойной связи из положения 2,3 в положение 3,4 превращается в итаконовую кислоту.

Получение итаконовой кислоты осуществляют поверхностным и глубинным методами ферментации. В качестве продуцентов используют отобраные грибные штаммы (*Aspergillus itaconicus*, *Asp. terreus*). Процесс аналогичен процессам получения лимонной кислоты. Среды содержат высокие концентрации сахаров, обычно используют мелассу при дефиците фосфора и железа. Особенность процесса получения данной кислоты – высокая потребность продуцента в солях цинка, магния и меди. При поверхностной ферментации в течение 10–12 сут образуется около 60 % продукта в пересчете на сахар, доля целевой кислоты в смеси (синтезируются также янтарная, щавелевая и фумаровая кислоты) – свыше 90 %. Содержание итаконовой кислоты достигает 15–20 %, остаточная концентрация сахаров не превышает 0,6 %. В отличие от лимонной итаконовая кислота – токсичный продукт, при ее концентрации около 7 % рост продуцента угнетается и скорость продукции кислоты снижается. Токсичность итаконовой кислоты нейтрализуют дробными добавками гидроксиаммония, рН среды при этом стабилизируется на уровне 3,5–3,8. При глубинной ферментации конечная концентрация итаконовой кислоты ниже 4–6 %. Товарный продукт – кристаллическая итаконовая кислота 92 %-го содержания, остальное – влага (3–6 %) и другие кислоты (1–3 %).

11.6. Получение глюконовой кислоты

Глюконовая кислота – одноосновная пентокислота, получаемая при ферментативном окислении глюкозы с участием глюкозооксидазы. Глюконовая кислота имеет много областей применения. Комплексообразователь с металлами – глюконат натрия – применяют при производстве моющих средств; кальций, железо и калийные соли глюконовой кислоты – в медицине и пищевой промышленности.

Продуценты глюконовой кислоты – грибы (*Penicillium*, *Aspergillus*). Ферментацию в промышленных масштабах осуществляют поверхностным и глубинным способами; используют среды с высоким (до 30–35 %) со-

держанием глюкозы, в составе сред – сульфат магния, фосфат калия, источник азота, а также углекислый кальций. Процесс завершается при остаточной концентрации сахара около 1 %. Готовый продукт – кристаллические соли – глюконаты.

11.7. Получение фумаровой кислоты

Фумаровая кислота применяется при производстве синтетических смол, красок, лаков, а смолы – для изготовления печатных красок. Магниевые и натриевые соли фумаровой кислоты используют в медицине.

Фумаровая кислота – метаболит цикла трикарбоновых кислот, присутствует во всех живых клетках, однако редко экскретируется в среду. Продуцентом данной кислоты являются различные грибы (*Penicillium*, *Aspergillus*, *Rhizopus*). Наиболее активны *Rhizopus*. Среды для получения фумаровой кислоты содержат глюкозу в концентрации 5–10 %, лимитирующий фактор – азот, цинк. Ферментация происходит в условиях интенсивной аэрации поверхностным или глубинным способом. При этом в ходе ферментации проводят нейтрализацию среды углекислым кальцием или раствором щелочи. Максимальный выход кислоты – 58 % от потребленной глюкозы. Биотехнологические методы производства органических кислот совершенствуются. Недавно в Японии был разработан способ получения 2-кетоглюконовой кислоты на основе биосинтеза бактерий *Pseudomonas*, выход кислоты достигает 90 % использованного сахара. Разработана технология получения щавелевой кислоты на средах с сахарами на основе грибов *A. ozyzae*, а на основе селективированных штаммов дрожжей (*Candidalipolytica*) созданы технологии получения лимонной и изолимонной кислот. Специально отселектированные штаммы дрожжей рода *Candida* синтезируют на средах с нормальными парафинами фумаровую, яблочную, янтарную кислоты. Процесс на данном сырье постоянного состава более стабилен, чем на комплексных природных средах на основе мелассы; упрощена и стадия выделения и очистки готового продукта.

Глава 12 ИСТОЧНИКИ ПОЛУЧЕНИЯ ЛИПИДОВ И ОСНОВНЫЕ СПОСОБЫ ИХ ВЫДЕЛЕНИЯ

Липиды – большая группа природных веществ, разнообразных по химической структуре и физико-химическим свойствам. Существует несколько трактовок понятия «липиды» и различных схем их классификации, основанных на свойствах этих веществ. Общее свойство липидных соединений – способность растворяться в эфире, хлороформе и других органических растворителях (но не в воде).

Липиды по строению можно разделить на две большие группы:

- простые липиды, или нейтральные жиры, представленные у большинства организмов ацилглицеринами, т. е. глицериновыми эфирами жирных кислот (свободные жирные кислоты встречаются в клетках лишь как минорный компонент);

- сложные липиды, содержащие фосфорную кислоту в моно- или диэфирной связи, – это фосфолипиды, в число которых входят глицерофосфолипиды и сфинголипиды. К сложным липидам относятся соединения, связанные гликозидной связью с одним или несколькими остатками моносахаридов, или гликолипиды, а также соединения стероидной и изопреноидной природы, в том числе каротиноиды.

До 20-х гг. XX в. липиды, особенно нейтральные, рассматривались лишь как запасной материал, который возможно без особого ущерба для жизнедеятельности организма заменить другими, равными по калорийности веществами. Первое доказательство того, что липиды содержат физиологически необходимые для высших животных соединения, было получено в 1926 г. голландскими исследователями Ивансом и Буром. Несколько позднее было установлено, что для большинства живых организмов этими соединениями являются полиненасыщенные жирные кислоты (линолевая, линоленовая и арахидоновая) – витамин F.

В дальнейшем было установлено, что и в клетках микроорганизмов липиды выполняют самые различные биологические функции. Они входят в состав таких ответственных структур, как клеточная мембрана, митохондрии, хлоропласты и другие органеллы. Липопротеиновые комплексы играют важную роль в процессах метаболизма. С ними в значительной мере связаны активный перенос различных веществ через пограничные мембраны и распределение этих веществ внутри клетки. С составом липидов во многом связаны такие свойства организмов, как термотолерантность и термофильность, психрофильность, кислотоустойчивость, вирулентность, устойчивость к ионизирующей радиации и другие признаки. Кроме того, липиды могут выполнять функцию запасных продуктов. К ним относятся поли- β -гидроксимасляная кислота, образуемая многими бактериями, и ацилглицерины, в частности триацилглицерин, накапливаемый в больших количествах некоторыми дрожжами и другими представителями грибов.

12.1. Промышленное получение липидов

Вопросам промышленного получения липидов с помощью микроорганизмов уделяется пристальное внимание как в нашей стране, так и за рубежом. Микроорганизмы можно использовать для получения фосфолипидов, гликолипидов, незаменимых жирных кислот и препаратов на их основе, необходимых в медицинской практике, сельском хозяйстве, пищевой и других отраслях промышленности.

Ряд дрожжей и мицелиальных грибов рассматривается как потенциальные продуценты липидов, в том числе липидов – аналогов некоторых типов растительных масел. В мировой практике пока нет производств с целевым назначением получения микробных липидов. Однако изменение конъюнктуры на мировом рынке не исключает целесообразности организации выделения липидов путем микробиологического синтеза.

В настоящее время в небольших объемах получают липиды только с помощью дрожжей, причем липиды представляют собой побочный продукт основного производства (при получении белково-витаминных концентратов на углеводородах нефти). Производство липидов из мицелиальных грибов, а также бактерий, водорослей и простейших пока не вышло за рамки лабораторных исследований. Одной из причин медленного решения вопросов получения бактериальных липидов следует признать наличие в их составе соединений, токсичных для макроорганизма.

С помощью дрожжей возможно получение липидов на различных субстратах: гидролизатах растительного сырья, сульфитных щелоках, углеводородах нефти и др. Эффективность производства дрожжевого жира во многом связана с количеством основного сырья, необходимо-го для получения определенной единицы массы дрожжей, и его стоимостью. Кроме того, сырье, на базе которого готовится питательный субстрат для выращивания дрожжей, должно обеспечивать получение липидов, отвечающих требованиям, которые предъявляются промышленностью, перерабатывающей липиды в различные продукты.

Наиболее отработаны технологические схемы получения липидов с помощью дрожжей на гидролизатах верхового торфа малой степени разложения и углеводородах нефти. Эти схемы различаются тем, что при получении липидов на гидролизатах торфа дрожжевой жир – это основной продукт, а при использовании углеводородов дрожжевой жир – побочный продукт, образующийся в результате очистки дрожжевой биомассы от остаточных углеводородов. В связи с этим и фракционный состав получаемых этими путями липидов весьма различен: доминирующая фракция углеводородных дрожжей – фосфолипиды, основная фракция при получении липидов на гидролизатах торфа – триацилглицерины. Например, в Российской Федерации получение дрожжевых липидов в условиях специализированной установки осуществляется на Кстовском опытно-промышленном заводе белково-витаминных концентратов, вырабатывающем сотни тонн этого продукта биосинтеза. В ближайшие годы планируется ввод в строй нескольких установок по получению липидов из дрожжей способом, аналогичным кстовскому.

Способ получения липидов на гидролизатах верхового торфа малой степени разложения включает в себя несколько основных операций: получение гидролизата торфа, отдувку фурфурола и нейтрализацию гидролизата до pH 5,5–6,0, введение в гидролизат минеральных источников питания, выращивание дрожжей – продуцентов липидов, отделение биомассы и экстракцию из нее липидов. Следовательно, весь процесс аналогичен методу получения кормовых дрожжей, за исключением дополнительных операций, связанных с извлечением липидов. Система растворителей, применяемая для этой цели, идентична используемым в масло-жировой промышленности. Оставшаяся после экстракции липидов биомасса (биошрот) пригодна для кормления сельскохозяйственных животных.

Продуцентами липидов на гидролизатах торфа являются выделенные в институте микробиологии НАН Беларуси штаммы *Lipomyces lipoferus*, биомасса которых содержит до 40 % липидов и более. Из од-

ной тонны абсолютно сухого торфа можно получить 50–70 кг дрожжевых липидов, содержащих до 70–75 % триацилглицеринов.

Кроме гидролизатов торфа для культивирования липидообразующих дрожжей и получения липидов по указанной выше схеме могут быть использованы другие гидролизные среды, например гидролизаты древесины или смешанные субстраты древесины и торфа.

12.2. Практическое применение липидов

Посредством многочисленных экспериментов установлено, что дрожжевые липиды и продукты их переработки могут использоваться в самых различных отраслях народного хозяйства: в текстильной, керамической, кожевенной, металлообрабатывающей (прокат стального листа, протяжка проволоки, лужение жести) промышленности. Дрожжевые липиды применяются при производстве каучука, резины, фармацевтических препаратов, косметики, мыла, олиф, в процессах флотации руд и др. Наконец, как показали эксперименты, дрожжевые липиды могут быть использованы в кормлении сельскохозяйственных животных и птиц. В этом случае из схемы производства липидов исключается процесс их экстракции из клеток – для кормовых целей применяется богатая жиром биомасса микроорганизмов.

После Второй мировой войны значительное количество работ было направлено на изыскание возможности получения микробных липидов для пищевых целей. Шведский исследователь С. Лундин показал, что богатый физиологически необходимыми жирными кислотами дрожжевой жир (*Rhodotocula gracilis*) может с успехом использоваться кроме технических и в пищевых целях. Рацион из 25 г жировых дрожжей может обеспечить организм человека 10 г липидов, 6 г белка и многими другими необходимыми веществами, что на 20 % удовлетворяет дневную потребность в этих соединениях.

Производство микробного жира для пищевых целей уже имело место в Германии во время Первой мировой войны. Питательной средой служила меласса или другие сахарсодержащие субстраты, продуцентом – дрожжеподобный гриб *Endomycopsis vernalis*. В пищу употребляли богатую жиром биомассу, из которой готовили пасту, известную под названием «Эвернал» или «Мицета».

Комбинируя питательные среды, а также подбирая продуцент и условия его культивирования, можно получать липиды, по составу отве-

чающие требованиям различных отраслей промышленности и сельского хозяйства. Например, при кормлении птиц предпочтение отдается липидам, в состав которых входит до 65–70 % ненасыщенных жирных кислот. Микробные липиды, содержащие значительное количество жирных кислот с двумя двойными связями, можно использовать для приготовления лаков, красок, а также медицинских препаратов, способствующих предотвращению атеросклероза и тромбоза. Липиды с преобладанием насыщенных жирных кислот можно употреблять в производстве технических смазок. В первом случае таким требованиям отвечают липиды мицелиальных грибов и дрожжей *Lipomyces lipoferus*, а во втором – липиды *Candida humicola*, выращенных на гидролизате древесины.

Резюмируя сказанное, следует отметить, что состав липидов (а отсюда и область их возможного использования) в большой мере обусловлен систематическим положением организма-продуцента. В то же время соотношение отдельных компонентов в составе липидов определяется спецификой сырья и физико-химическими условиями культивирования. Эти закономерности липидогенеза весьма существенны при организации промышленного производства микробного жира, так как в конкретных условиях позволяют получать продукт строго определенного состава и свойств. Такой управляемый микробный синтез может удовлетворить требованиям, предъявляемым к липидам различными отраслями народного хозяйства.

Глава 13 ПОЛУЧЕНИЕ НУКЛЕОТИДОВ И НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Микробиологический синтез нуклеотидов и их производных пока довольно ограничен. Сферы применения этих соединений узкие, за исключением нуклеотидов, используемых как вкусовые пищевые добавки, в особенности при производстве искусственной пищи. Нуклеотиды и их производные могут применяться как лечебные препараты, в лабораторной биохимической практике. Характерная особенность большинства способов получения нуклеотидов – необходимость внесения метаболического предшественника в среду для культивирования микроорганизмов или в реакцию смесь.

Получение аденозиндифосфата (АДФ) и аденозинтрифосфата (АТФ) основано на осуществлении культурой микроорганизма реакции фосфорилирования аденина или адениловой кислоты (5'-АМФ).

В случае использования *Brevibacterium ammoniagenes* ATCC 6872 эту бактерию выращивают на среде, содержащей высокую концентрацию глюкозы, мочевины, дрожжевой экстракт, соли фосфора, магния, кальция и биотин. В процессе культивирования в среду вносят аденозан, который подвергается ферментативному фосфорилированию с образованием адениловой кислоты, АДФ и АТФ. При аналогичных условиях культивирования, но при внесении гуанозина можно получить гуаниловую кислоту, гуанидиндифосфат (ГДФ) и гуанидинтрифосфат (ГТФ). Фосфорилирующим агентом, по-видимому, выступает АТФ. Накопить АТФ в сфере реакции без передачи на акцепторную молекулу внесенного извне аденозина не удается.

Другим источником ферментных систем, осуществляющих фосфорилирование 5'-АМФ, могут служить пекарские дрожжи (*Saccharomyces cerevisiae*), взятые в виде гомогената или ацетонового порошка. Реакционная смесь содержит 5'-АМФ, глюкозу, фосфатный буфер (рН 7,0) и дрож-

жи, подготовленные, как описано выше. Вслед за истощением глюкозы при минимальном количестве неорганического фосфата отмечается максимум накопления АТФ. После достижения максимума АТФ наблюдается его распад до АДФ и АМФ при одновременном повышении уровня неорганического фосфата. На выход продукта существенное влияние оказывает концентрация фосфата, присутствующего в виде фосфатного буфера. Отклонение от оптимальной величины может привести к ряду нежелательных реакций: вызвать образование инозиновой кислоты, инозина и гипоксантина. Вероятно, вносимый извне аденозин необходим для осуществления «затравочной» реакции. В равной мере это относится и к 5'-АМФ. Отсюда очевидна необходимость в высокой концентрации глюкозы и сбалансированного количества фосфата во время реакции.

По несколько иному пути происходит синтез АТФ при введении в среду аденина (вместо аденозина). В этом случае ключевой реакцией является N-рибозидация аденина. Процесс обычно проводят как типичную аэробную ферментацию с добавлением предшественника. Продуктами служат *Brevibacterium ammoniagenes* или *Corynebacterium* sp. При этом также требуется среда с высокой концентрацией глюкозы. На первом этапе синтеза происходит образование АМФ из внесенного в конце экспоненциальной фазы роста культуры аденина и синтезированного клеткой фосфорибозилпирофосфата (ФРФФ). Реакцию осуществляет аденинфосфорибозилтрансфераза.

Дальнейший процесс происходит так же, как и при наличии АМФ. ФРФФ в клетках образуется в результате реакции между рибозо-5-фосфатом (Р-5-Ф) и АТФ при посредстве АТФ: D-рибоза-5-фосфат пирофосфаттрансферазы. АТФ и Р-5-Ф образуются вследствие катаболизма глюкозы: Р-5-Ф в ходе функционирования ГМФ-пути, а АТФ – как продукт гликолиза.

Микробиологический синтез никотинамиддинуклеотида (НАД) происходит путем культивирования *Brevibacterium ammoniagenes* АТСС 6872 с предшественником. Выращивание продуцента рекомендуется проводить на средах, содержащих глюкозу, мочевины, дрожжевой экстракт, фосфаты, соли магния, кальция и биотин. Предшественниками НАД в среде могут быть никотиновая кислота и никотинамид, которые в условиях опыта обычно вводят на вторые сутки роста культуры. К пятым суткам в среде накапливается НАД и культура вступает в фазу стационарного роста. Помимо НАД в среде содержится промежуточный продукт его синтеза – моонуклеотид никотиновой кислоты. Никотиновая кислота включается непосредственно в синтез, и если в среду вводят ее амид, происходит ферментативное дезаминирование с обра-

зованием кислоты. Для получения НАДФ предложена также система, использующая в качестве ферментного препарата экстракт из клеток *Proteus mirabilis* IFO 3849, а компонентами служат НАД, *n*-нитрофенилфосфат, никотинамид, сульфат цинка, ацетатный буфер (рН 4,0). Однако в данном случае помимо НАДФ происходит синтез НАД-дифосфата и некоторых НАД-аналогов.

Инозиновая кислота – метаболический предшественник важнейших пуриновых нуклеотидов – адениловой и гуаниловой кислот. По этой причине накопление инозиновой кислоты может происходить, если продуцент имеет блок в ферментных системах, осуществляющих дальнейшие ее превращения.

Очевидно, что не следует лишать структуру столь необходимых и важных метаболитов (адениловая и гуаниловая кислоты). Введение их в среду для восполнения дефицита возможно, но довольно дорого, поэтому предпочитают вводить в сферу реакции нуклеозид – инозин (нуклеозид). Для получения 5'-инозиновой кислоты (5'-ИМФ) необходимо иметь источник фермента, фосфорилирующего инозин в 5'-положении рибозного остатка. Источниками фосфорилирующего фермента – нуклеозиддифосфаттрансферазы – могут служить многие микроорганизмы, относящиеся к родам *Flavobacterium*, *Serratia*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*. Донорами фосфора в этой реакции могут быть нуклеотиды, а также неприродные соединения – *n*-нитрофенилфосфат (*n*-НФФ), бензилфосфат, фенилфосфат.

В СССР в качестве источника фосфорилирующего фермента был предложен штамм *Pseudomonas*. Культуру предварительно выращивают на среде, содержащей глюкозу, пептон, дрожжевой экстракт. В качестве ферментного препарата, осуществляющего реакцию, используют живые клетки, высушенные под вакуумом или ацетоном, а также замороженные клетки, поскольку локализация фермента внутриклеточная. Из названных выше доноров фосфата лучшим считается *n*-нитрофенилфосфат. Реакция происходит в ацетатном буфере при рН 4,0 в присутствии ионов меди и цинка, заметно усиливающих выход продукта.

Наиболее важными факторами, определяющими активность реакции фосфорилирования инозина, являются концентрация донора (фосфора), акцептора (инозина) и количество клеток. При оптимальных соотношениях *n*-НФФ и инозина клетки *Ps. trifolii* могут фосфорилировать до 90 % инозина в реакционной смеси. Выход инозиновой кислоты можно увеличить, если к реакционной смеси добавить поверхностно-активные вещества, в частности различные твины. Концентрации добавок подбирают опытным путем.

Как и во всех других случаях использования в качестве ферментных препаратов клеток микроорганизмов, возникает необходимость оценить активность и условия ее проявления у ферментов, разрушающих целевой продукт синтеза. Наиболее нежелательно для синтеза инозиновой кислоты наличие активных фосфомоноэстеразы и 5'-нуклеотидазы. Если невозможно подавить их активность ингибиторами, то следует выбрать условия, при которых она будет минимальной. В первую очередь к наиболее легко регулируемым условиям относятся температура и рН среды. Инозиновую кислоту выделяют в виде бариевой соли и путем ионообменной хроматографии.

Рассмотрим также *синтез гуанозинполифосфатов*. У микроорганизмов среди продуктов обмена веществ нуклеотидной природы обнаружены гуанозинполифосфаты. Преимущественно это тетра- или пентафосфаты. Они выполняют функции регуляторов в многочисленных биохимических реакциях, поэтому на их получение обращено внимание многих специалистов.

Накопление гуанозинполифосфатов обнаружено в культуре *Brevibacterium ammoniagenes* KV 13510 в присутствии гуанозин-5'-монофосфата (Г-5'-Ф) или ксантозин-5'-монофосфата (Кс-5'-Ф). Штамм представляет собой мутант, для выращивания которого требуется наличие в среде дорогостоящих для промышленного производства компонентов: дрожжевого экстракта, биотина, тиамина, пантотеновой кислоты и др.

Ксантозин-5'-монофосфат – метаболический предшественник гуаниловой кислоты, образующейся после амидирования пуринового основания глутаминов в присутствии АТФ.

Собственно процесс ферментативного превращения метаболических предшественников (Г-5'-Ф или Кс-5'-Ф) в нуклеозидполифосфат происходит в среде, содержащей глюкозу, а также высокий уровень фосфатов и магния. Помимо полифосфатов в среде накапливается 5'-ГМФ, 5'-ГДФ, 5'-ГТФ, однако гуанозинполифосфаты образуются в более узком интервале рН и при ином температурном оптимуме.

Фермент АТФ-нуклеотидпирофосфаттрансфераза, осуществляющий перенос пирофосфатных остатков из АТФ на акцепторные молекулы, выделен из *Streptomyces adaphospholyticus* A-4668. Продуктами реакции могут быть нуклеозид-3'-дифосфат-5'-моно(ди- и три-)фосфаты, такие как rrrGpp, ppGpp, pGpp, а также производные аденина и инозина – rrrApp, ppApp, pppIpp.

Глава 14 ПОЛУЧЕНИЕ САХАРОВ И ПОЛИСАХАРИДОВ

Полисахариды (или гликаны) – полимеры, построенные не менее чем из 11 моносахаридных единиц. Они могут состоять из одного или нескольких типов моносахаров. Соответственно этому различают гомополисахариды и гетерополисахариды. Полисахариды – обязательные компоненты всех организмов – составляют большую часть углеводов, встречающихся в природе, преобладающую долю в биомассе растений, а следовательно, основную массу органического вещества на Земле.

Полисахариды встречаются в виде самостоятельных полимеров, а также в комплексах с нуклеиновыми кислотами, белками, липидами, фосфатом. Они отличаются мономерным составом и структурой. Особым разнообразием обладают полисахариды микроорганизмов. Некоторые из них близки или идентичны полисахаридам растений и животных. Но подавляющее большинство микробных полисахаридов имеет уникальную структуру, специфическую для вида или для серологической группы вида. В микробных гликанах часто обнаруживаются ранее неизвестные моносахара, которые не встречаются ни у животных, ни у растений.

О том, что слизь, образуемая многими микроорганизмами, может иметь углеводную природу, знали еще во времена Л. Пастера. Однако особое внимание микробным полисахаридам стали уделять лишь с начала 20-х гг. XX в., когда узнали, что вещества, определяющие серологическую специфичность пневмококков, являются полисахаридами. В настоящее время исследование микробных полисахаридов приобрело особое значение в связи с открывшейся возможностью широкого применения их в медицине и ряде областей народного хозяйства.

Полисахариды микроорганизмов в соответствии с локализацией делятся на внутриклеточные и внеклеточные. К внутриклеточным обычно

относят полисахариды цитоплазмы, мембран и клеточных стенок, а к внеклеточным – полисахариды капсул, чехлов (пристеночные структуры) и свободной слизи, не прилегающей к клеточной стенке. Иногда к внеклеточным причисляют также полисахариды, локализованные снаружи от цитоплазматической мембраны. В этом случае в группу внеклеточных попадают и полисахариды клеточных стенок. У ряда микроорганизмов действительно трудно различить границу между капсулой и клеточной стенкой.

Нередко по локализации выделяют три группы полисахаридов: внутриклеточные (цитоплазмы, мембран, периплазмы), полисахариды клеточных стенок и внеклеточные (капсул, чехлов и свободной слизи).

Термин «экзогликаны» применяют в основном к полисахаридам свободной слизи. Иногда экзогликанами называют также капсульные полисахариды.

Микробные полисахариды объединяют в группы и по функциям: резервные, участвующие в активном транспорте, опорные, участвующие во взаимодействии между клетками, защитные и др.

Некоторые исследователи классифицируют полисахариды, учитывая их топологию и функции. В соответствии с этим клеточные полисахариды подразделяются на две группы. Одна включает в себя резервно-энергетические и модификаторы (внутриклеточные), вторая – структурные и структурно-метаболические (в клеточной стенке). К внеклеточным относятся выделяющиеся при гиперпродукции структурно-метаболические гликаны и собственно экзогликаны.

14.1. Полисахариды цитоплазмы и мембранных структур

Полисахариды цитоплазмы обнаруживаются в двух формах: они могут быть диспергированы в ней или объединены в гранулы. Обычно в цитоплазме бактерий содержится 20–30 % полисахаридов, а в условиях, способствующих их накоплению, до 50–60 % от массы сухих клеток. Чаще всего в цитоплазме микроорганизмов обнаруживают гомогликаны, из которых особенно распространены глюканы типа гликогена. Их выделяли из цитоплазмы многих прокариотных и эукариотных микроорганизмов: представителей разных родов бактерий *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Escherichia*, *Mycobacterium*, *Nostoc*, *Rhodospseudomonas*, *Rhodospirillum*, *Streptococcus*, а также дрожжей, мицелиальных грибов, ресничных и жгутиковых простейших, некото-

рых водорослей. Кроме гликогенopodobных полисахаридов в цитоплазме ряда микроорганизмов найдены крахмал, маннаны, леваны, арабаны и ксиланы. Гликоген и другие гомогликаны цитоплазмы могут образовывать комплексы с ДНК, РНК, белками, липидами, фосфатом. Гетерополисахариды обнаруживаются в цитоплазме реже. Однако у представителей *Streptomyces* и *Mycobacterium* они оказываются преобладающими. Функции полисахаридов цитоплазмы до конца не выяснены. До недавнего времени считали, что основное или даже единственное их назначение – быть резервным источником углерода и энергии для клетки. Они расходуются, например, при созревании эндоспор у бактерий родов *Bacillus* и *Clostridium*. Но теперь ясно, что полисахариды цитоплазмы могут выполнять ряд других важных функций. Предполагается, что комплексы гомогликанов с другими компонентами цитоплазмы участвуют в механизмах клеточной регуляции, контролирующей синтез различных веществ, рост и деление клеток. Так, гликогенрибосомные комплексы контролируют синтез белков. Гликоген может оказывать радиозащитное действие на связанные с ним молекулы нуклеиновых кислот.

В мембранах микроорганизмов обнаруживается в среднем от 2 до 5 %, иногда (у *Micrococcus luteus*) до 15–20 % углеводов от массы мембраны. В некоторых случаях эти углеводы полностью или частично представляют собой остаточный материал цитоплазмы или клеточных стенок. Тем не менее достоверно доказано, что в мембранах грамположительных и некоторых грамотрицательных бактерий содержатся гликолипиды и гликопротеины.

Все грамположительные зубактерии, за исключением микрококков и некоторых стрептококков, а также дрожжи и мицелиальные грибы содержат в области цитоплазматической мембраны тейхоевые кислоты (1–2 % от сухой биомассы). Тейхоевые кислоты относят к кислым полисахаридам необычного строения. При их гидролизе наряду с моносахаридами образуются вещества, относящиеся к другим классам соединений. Разнообразие тейхоевых кислот определяется в основном числом присутствующих в них остатков сахаров и наличием связей различных типов. Мембранные тейхоевые кислоты – это всегда глицерофосфатные полимеры, часто связанные с гликолипидами и фосфолипидами (липотейхоевые кислоты). У некоторых микроорганизмов выявляются только липотейхоевые кислоты, а свободных тейхоевых кислот нет. В мембранах грамотрицательных бактерий тейхоевые кислоты не обнаружены.

Мембранные гликолипиды участвуют в биосинтезе полисахаридов и транспорте сахаров. Тейхоевые кислоты, видимо, регулируют ионный обмен (связывают двухвалентные катионы, что необходимо для

нормального функционирования ферментов, локализованных в мембране), действуют на связывание аминокислот с тРНК, осуществляют связь между мембраной и клеточной стенкой, проявляют антигенную активность.

14.2. Полисахариды клеточных стенок

У грамположительных эубактерий полисахариды составляют от 30 до 60 % сухой массы клеточной стенки. Значительная их часть входит в состав муреинового комплекса, содержание которого у грамположительных эубактерий достигает 50–90 % веществ клеточной стенки. Линейные полисахаридные цепи муреина построены из повторяющихся β -1,4-связанных единиц N-ацетилглюкозамина и N-ацетилмурамовой кислоты. Мурамовая кислота – производное глюкозамина, содержащее D-молочную кислоту.

Клеточные стенки некоторых архебактерий, дающих положительную окраску по Граму, содержат псевдомуреин, гликановая часть которого состоит из N-ацетилглюкозамина, N-ацетилгалактозамина и N-ацетилталазаминуруновой кислоты. Мурамовая кислота в псевдомуреине не найдена. У ряда грамположительных архебактерий клеточная стенка построена только из кислого гетерополисахарида, в состав которого входят галактозамин, нейтральные сахара и уроновые кислоты. В клеточных стенках подавляющего большинства грамположительных эубактерий, за исключением микобактерий и коринебактерий, содержатся тейхоевые кислоты. Их количество обычно достигает 50–90 % от массы клеточной стенки, у стрептомицетов оно колеблется от 4 до 50 %. Как правило, у микроорганизмов обнаруживается либо глицеринтейхоевая, либо рибиттейхоевая кислота. Однако у *Streptococcus faecalis* и у одного штамма *Streptomyces* sp. найдены тейхоевые кислоты обоих типов.

Другие полисахариды, содержащиеся в клеточных стенках грамположительных бактерий, отличаются большим разнообразием; чаще всего это гетерогликаны. В их составе обнаруживаются нейтральные моносахара, аминсахара, уроновые кислоты, ацетильные группы, остатки фосфорной кислоты.

В клеточных стенках грамотрицательных бактерий от 1 до 50 % полисахаридов. Среди них полисахариды муреинового комплекса не занимают доминирующего положения, так как его содержание составляет в среднем всего около 5 % веществ клеточной стенки. Тейхоевые

кислоты выявляются только у отдельных представителей грамотрицательных бактерий.

Особенно характерны для клеточных стенок грамотрицательных бактерий липополисахариды (ЛПС) – биологически активные вещества, участвующие в формировании наружной мембраны. Число различных липополисахаридов велико, и, несмотря на интенсивное изучение, строение и состав многих из них известны не до конца. В полисахаридной части комплекса различают базисную структуру и O-специфические боковые цепи. Моносахаридный состав, варьирование связей и их структура в основном и определяют биологическую активность липополисахаридов, выполняющих функцию соматических антигенов. Углеводный компонент липополисахарида – это обычно гетерополисахарид. У различных бактерий в его составе обнаружены нейтральные сахара, аминсахара, уроновые кислоты, металльные и ацетильные группы и, что особенно характерно, 3,6-дидезоксипроизводные сахаров, которые в других природных объектах встречаются редко. Из них наиболее распространены абеквоза (3,6-дидезокси-D-галактоза), колитоza (3,6-дидезокси-L-галактоза), тивелоза (3,6-дидезокси-D-манноза), аскарилоза (3,6-дидезокси-L-манноза) и паратоза (3,6-дидезокси-D-глюкоза). Эти сахара часто определяют серологическую специфичность бактерий. В O-специфической боковой цепи липополисахарида одного из видов рода *Pasteurella* обнаружена 6-дезоксидезокси-D-манногептоза – первая 6-дезоксигептоза, найденная в природе. Моносахариды особого типа – гликолактиловые кислоты – выявлены в составе O-антигенных полисахаридов представителей рода *Shigella*. Полисахаридные компоненты ЛПС ряда бактерий отличаются сложностью. Они могут содержать до 6 и более различных незамещенных и замещенных моносахаров. У энтеробактерий молекулы ЛПС могут образовывать комплексы с пептидогликаном, кислыми капсульными гликанами и другими гетерополисахаридами клетки.

Полисахариды – главные компоненты клеточной стенки дрожжей и мицелиальных грибов. Они могут составлять до 90 % массы клеточной стенки (*Saccharomyces cerevisiae*). У дрожжей часто обнаруживаются гомогликаны: глюканы, маннаны, хитин (полимер N-ацетилглюкозамина). В дрожжевых маннанах нередко содержатся остатки фосфорной кислоты и (или) метильные группы, а в глюканах – ацетильные и аминогруппы. У многих дрожжей в клеточной стенке выявлены гетерополисахариды – галактоманнаны и глюкоманнаны, а также кислые гликаны, построенные из 3–4 мономеров. По-видимому, в клеточных стенках дрожжей присутствует несколько полисахаридов. Гликаны клеточных стенок дрожжей могут быть связаны с пептидами.

Основным полисахаридным компонентом клеточных стенок большинства исследованных мицелиальных грибов служит хитин. Обнаруживаются также неацелированный или частично ацелированный полимер глюкозамина хитозан, глюканы (иногда целлюлоза), галактаны и различные гетерополисахариды, включающие незамещенные и замещенные сахара, уроновые кислоты.

Структурные микрофибриллы клеточных стенок большинства микроформ водорослей состоят из целлюлозы, а у отдельных представителей – из других гомополисахаридов, часто из ксиланов и маннанов. Количество их может достигать 50–80 % массы сухой клеточной стенки. Полисахариды матрикса представлены в основном гетерогликанами. Обнаруживаются и сульфатированные полисахариды.

Полисахариды клеточных стенок выполняют разнообразные функции. Многие из них определяют механическую прочность клеточных стенок, поэтому их часто называют скелетными. Липополисахариды, тейхоевые кислоты, а также гетерополисахариды ряда грамположительных бактерий ответственны за антигенную активность клеток. ЛПС значительного числа грамотрицательных бактерий – токсины. ЛПС энтеробактерий защищают клетки от ингибирующего действия длинноцепочечных жирных кислот, позволяя этим бактериям выживать в кишечнике животных. С наличием О-специфических боковых цепей ЛПС связана способность шигелл прикрепляться к надмембранному покрову эпителиальных клеток. Многие полисахариды определяют устойчивость бактерий к литическим ферментам и фагам. Полианионные полисахариды способствуют транспорту из клетки заряженных метаболитов и веществ, поступающих в нее из окружающей среды. Кроме того, такие полисахариды сообщают клетке отрицательный заряд, в результате чего происходит взаимное отталкивание клеток, диспергирование их в среде. Потеря О-боковых цепей ЛПС снижает гидрофильность клеток и приводит к их спонтанной агглютинации. Полисахариды клеточных стенок микроорганизмов, растущих на средах с n-алканами, обычно являются хорошими эмульгаторами и тем самым способствуют проникновению углеводов в клетку.

14.3. Внеклеточные полисахариды

Внеклеточные полисахариды, как уже отмечалось, обнаруживаются в виде капсул и чехлов, прилегающих к клеточным стенкам, а также свободной слизи. Капсулы, имеющие толщину менее 0,2 мкм, не различимы в световом микроскопе, но хорошо видимы

в электронный микроскоп, называют микрокапсулами. Микрокапсулы обычно связаны с клеточной стенкой прочнее, чем капсулы. У многих микроорганизмов капсулы имеют определенную структуру и четко отграничены от слизи. У некоторых бактерий капсульный материал рыхлый, бесструктурный, легко отторгается от клеток, поэтому границу между капсулой и свободной слизью в этом случае определить трудно. Такие аморфные капсулы называют слизистыми слоями. Чехлы в отличие от капсул имеют сложную структуру. В них нередко различают несколько слоев с разным строением. Количество внеклеточных полисахаридов может во много раз превышать биомассу клеток. Капсулы, чехлы и слизь не всегда состоят только из полисахаридов. Кроме гликанов они могут включать в себя белки, полипептиды, нуклеиновые кислоты, липиды, образующие или не образующие комплексы с полисахаридами. У *Sphaerotilus natans* они содержат глюкозу, глюкозамин, белок, липид и фосфат. Чехлы бактерий, окисляющих восстановленные соединения металлов, часто содержат включения их оксидов. Иногда неуглеводные полимеры – единственные компоненты капсул и слизи. Так, капсулы некоторых видов рода *Bacillus* построены из полипептида, слизь некоторых штаммов *Pseudomonas aeruginosa* состоит из ДНК.

Внеклеточные полисахариды, капсульные или свободные или те и другие, образуют многие микроорганизмы. Пожалуй, нет такой группы микроорганизмов, представители которой не обладали бы этой способностью. Однако синтез внеклеточных полисахаридов не обязательная функция клетки, и проявляется она лишь в определенных условиях. Встречаются микроорганизмы, у которых никогда не удавалось наблюдать ни капсул, ни слизи.

Внеклеточные полисахариды микроорганизмов чрезвычайно разнообразны по составу и строению. К настоящему времени исследован состав около 200 экзогликанов, установлены первичная структура и детали строения многих из них. В составе внеклеточных полисахаридов различных микроорганизмов обнаружено более 20 моносахаров и их производных. Наиболее часто встречаются гексозы: глюкоза, галактоза, манноза и 6-дезоксигексозы: фукоза и рамноза. Реже выявляются пентозы: арабиноза, ксилоза, рибоза. Распространены уроновые кислоты: галактуроновая, маннууроновая и особенно глюкуроновая. Многие содержат аminosахара: глюкозамин, галактозамин и маннозамин. Часто в экзогликанах присутствуют неуглеводные заместители – пируват и ацетат, встречаются также сукцинат и глицерин. Для ряда внеклеточных гликанов характерно наличие редких мономеров: 2,6- или 3,6-дидезоксисахаров, у некоторых найдены ранее неизвестные моно-

сахариды, например гликолактиловые кислоты (у сапротрофных микробактерий). Иногда обнаруживаются теихоевые кислоты, фосфатные и сульфатные ионы.

Внеклеточные полисахариды большинства видов бактерий – кислые гетерогликаны разнообразного состава, построенные из 2–5, иногда 6–7 мономеров, линейные и разветвленные, имеющие регулярную структуру из повторяющихся олигосахаридных звеньев. Так, например, *Xanthomonas campestris* синтезирует полианионит ксантан, включающий глюкозу, маннозу, глюкуроновую кислоту и О-ацетильную группу и пируват.

Некоторые бактерии образуют нейтральные гетерополисахариды.

Весьма распространены у микроорганизмов различные гомополисахариды, особенно глюканы, из которых наиболее известны декстраны (группа более или менее близких по строению нейтральных глюканов). Они могут содержать до 200 тыс. остатков глюкозы, бывают линейными и разветвленными. Линейная (основная) цепь построена при участии α -1,6-связей, ветвление обусловлено α -1,2-, α -1,3- и α -1,4-связями. Молекулярная масса декстранов колеблется от 12 до 600 млн. Наиболее активные продуценты декстранов – представители молочнокислых бактерий *Leuconostoc mesenteroides* и *L. dextranicum*. Декстраны синтезируются также некоторыми видами *Streptococcus* (*Str. sanguis*, *Str. mutans*), *Brevibacterium*, *Lactobacillus*. Практически каждый продуцент синтезирует свой, несколько отличный от других видов декстран. Некоторые штаммы образуют одновременно два различных по структуре декстрана.

Внеклеточную целлюлозу – полисахарид, распространенный в растениях, – из бактерий синтезируют некоторые представители *Pseudomonas*, *Zooglea*, *Azotobacter*, подавляющее число видов *Rhizobium* и *Agrobacterium*, *Acetobacter xylinum*. β -(1→3)-Глюкан, называемый курдланом, образуют *Alcaligenes faecalis* var. *typhogenes* и виды *Rhizobium*. Сильно разветвленный α -(1→4)-глюкан с боковыми цепочками, присоединенными α -(1→6)-связями, – полимер типа гликогена, резервного полисахарида животных, многих бактерий и дрожжей – можно обнаружить в культуральной жидкости *Neisseria perflava*. Нигеран – α -глюкан с чередующимися (1→4)- и (1→3)-связями – образует гриб *Aspergillus niger*.

Разветвленные полимеры фруктозы – леваны с (2→6)-связями – синтезируют уксуснокислые бактерии *Gluconobacter oxydans*, *Acetobacter aceti*, некоторые виды *Pseudomonas*, *Erwinia* (подгруппы *Herbicola*), *Aeromonas*, *Bacillus*. Фруктаны типа инулина (резервный полисахарид растений семейства сложноцветных) с (2→1)-связями в основной цепи и ответвлениями в положении С6 образуют штаммы *Str. mutans*.

Маннаны обнаружены в культурах некоторых видов *Bacillus* и *Corynebacterium*, а также у многих дрожжей.

Чаще всего микроорганизмы, способные к образованию внеклеточных полисахаридов, синтезируют капсулы и свободную слизь. Мономерный состав слизи и капсул в большинстве случаев одинаковый.

Но не всегда можно определить, какие именно полисахариды свойственны той или иной группе микроорганизмов. В ряде случаев филогенетически близкие бактерии синтезируют внеклеточные гликаны, сходные по составу и строению. К ним относятся, например, бактериальный альгинат *Pseudomonas aeruginosa* и *Azotobacter vinelandii*, курдлан *Rhizobium* и *A. faecalis* var. *myxogenes*, кислые гетерогликаны *Corynebacterium* и *Arthrobacter*, декстраны *Streptococcus* и *Lactobacillus* и др. Однако нередко микроорганизмы, далеко отстоящие в таксономическом отношении, образуют гликаны сходного состава или одинаковые. Обычно в этом случае полимеры проявляют и функциональное сходство. Так, очень близки по составу экзогликаны различных фитопатогенных бактерий и возбудителей менингита. У ряда бактерий цементирующим материалом при образовании клеточных агрегатов служит внеклеточная целлюлоза.

Известно, что не только разные виды одного рода микроорганизмов, но часто и разные штаммы одного вида синтезируют неодинаковые экзополисахариды. Так, *E. coli* имеет около 70 серотипов, различных по составу и структуре капсульных полисахаридов и, соответственно, по иммунохимическим свойствам. Экзогликаны эффективных и неэффективных штаммов клубеньковых бактерий различаются по мономерному составу, а разных штаммов дрожжей рода *Lipomyces* – по соотношению моносахаров. Неодинаковыми по моносахаридному составу могут быть внеклеточные гликаны *M*-, *S*- и *R*-форм бактерий.

Отмечены случаи, когда в культуральной жидкости одного микроорганизма накапливается несколько различных гликанов. Например, *L. mesenteroides* образует декстран и леван, у *Serratia marcescens* обнаружены три экзополисахарида: кислый глюкорамнан, содержащий глюкуроновую кислоту, рамноглюкан и гептоглюкан. Гриб *Aureobasidium* (*Pullularia*) *pullulans* образует два гомоглюкана: аубазидан – разветвленный полимер с α -(1→4), β -(1→3) и β -(1→6)-связями, причем в боковой цепи может быть от одного до четырех остатков глюкозы на одно звено триозы, и пуллулан – линейный глюкан, состоящий из мальтотриозных и мальтотетраозных фрагментов, соединенных α -(1→6)-связями.

Внеклеточные полисахариды не являются жизненно необходимыми для микроорганизмов. В природе есть виды, никогда их не образу-

щие. Экспериментально показано, что клетки, лишенные капсул, столь же жизнеспособны, как и капсулированные. Тем не менее внеклеточные полисахариды выполняют определенные функции, способствующие поддержанию условий, благоприятных для жизнедеятельности продуцента. Одни из них универсальны для всех полисахаридов, поскольку определяются общими для этих веществ свойствами, другие специфичны для определенного полисахарида, что связано с особенностями состава и строения данного полимера.

Внеклеточные полисахариды предохраняют клетки от высушивания, губительного действия ультрафиолетовых лучей и различных химических агентов, в том числе тяжелых металлов и лекарственных препаратов. Замечено, что капсулированные бактерии устойчивее к химиотерапевтическим средствам, чем бескапсульные варианты. Располагаясь поверхностно, капсулы защищают клетки от бактериофагов и поглощения их простейшими, предупреждают денатурацию клеточного белка.

Многие внеклеточные гликаны биологически активны и определяют иммунологические свойства и вирулентность штаммов. Как правило, чем толще капсула, тем выше вирулентность и патогенность бактерий. Некоторые патогенные бактерии, лишенные капсул, становятся авирулентными. *K*-антигены являются агг्रेसинами, подавляющими фагоцитоз бактерий и тем самым создающими условия для их размножения.

Одно из характерных проявлений биологической активности полисахаридов – способность модифицировать ферменты различных организмов, в результате чего стимулируется или снижается их активность. Экзополисахариды фитопатогенных бактерий – фитотоксины, участвующие в специфическом взаимодействии бактерий с растительной тканью. К ним относится, например, ксантан.

В некоторых случаях внеклеточные гликаны служат резервным источником углерода и энергии, а азотсодержащие полисахариды – источником азота для продуцента. Полианионные полисахариды концентрируют катионы из окружающей среды и способствуют их транспорту в клетку. Полисахаридно-липидные комплексы микроорганизмов, растущих на средах с *n*-алканами: псевдомонад, нокардий, коринебактерий, дрожжей – хорошие эмульгаторы. Они снижают поверхностное натяжение, увеличивают поверхность соприкосновения углеводорода и воды, образуют мицеллы и тем самым способствуют проникновению углеводородов в клетку.

Нейтральные внеклеточные полисахариды поддерживают целостность нитчатых форм и различных скоплений клеток. Полисахариды,

несущие определенный заряд, напротив, способствуют диспергированию клеток. Экзогликаны некоторых бактерий ответственны за прикрепление клеток к поверхности. Так, *Str. mutans*, вызывающий кариес зубов, прикрепляется к зубной эмали с помощью декстрана.

14.4. Использование полисахаридов

В настоящее время полисахариды микроорганизмов находят применение в самых различных сферах человеческой деятельности: в медицине, фармацевтической, пищевой, химической и текстильной промышленности, в гидрометаллургии, при добыче нефти и в ряде других областей народного хозяйства. При этом внимание исследователей и практиков привлекают и внутриклеточные и внеклеточные гликаны, однако в технико-экономическом плане предпочтительнее последние – масштаб их производства и применения значительно шире.

Возможность и перспективность использования полисахаридов в медицине в значительной мере определяется их биологической активностью.

Многие микробные полисахариды обладают лечебным и профилактическим действием: повышают устойчивость организма к бактериальным и вирусным инфекциям, характеризуются противоопухолевой активностью, способствуют заживлению ран и регенерации тканей, благоприятно влияют на течение и исход воспалительных процессов, устраняют болевой синдром, снижают побочное действие лекарственных препаратов и рентгенотерапии. Лечебное и защитное действие полисахаридов определяется прежде всего их способностью повышать неспецифическую иммунобиологическую реактивность организма, влиять на различные защитные реакции, поддерживающие постоянство его внутренней среды. Преимущества многих полисахаридных препаратов перед другими средствами, повышающими неспецифическую резистентность организма, определяются тем, что они свободны от примесей, оказывающих нежелательное действие на организм. Некоторые микробные полисахариды уже нашли применение в лечебной практике различных клиник мира.

В нашей стране для лечения последствий травм и нарушений проводимости нервной системы, для предупреждения образования грубых послеожоговых или посттравматических рубцов успешно применяли пирогеналь – препарат, выделяемый из клеток *Salmonella typhi* и *Pseudomonas aeruginosa*. В ФРГ и США с этой же целью использовали липополисахара-

риды, изолированные из различных патогенных бактерий. Бактериальные ЛПС обладают также и противолучевой активностью.

В клиниках применяют продигиозан – гетерополисахаридный комплекс с липидами, выделенный из клеток *Serratia marcescens*, и зимозан – препарат из оболочек клеток *Sacch. cerevisiae*, состоящий из глюкоана, глюкоманнана и минорных количеств тейхоевых кислот. Эти препараты нормализуют ряд сдвигов в иммунобиологических реакциях, оказывают положительное действие при лечении опухолей, инфекционных и неинфекционных заболеваний. Перспективны в качестве противоопухолевых агентов ЛПС грамотрицательных бактерий внутриклеточный глюкан парамилон (астазиян) фитофлагеллят *Astasia longa*, внеклеточные полисахариды различных дрожжей родов *Lipomyces*, *Cryptococcus*, *Bullera*, бактерий родов *Alcaligenes* и *Agrobacterium*. Перечисленные соединения рекомендованы для клинических испытаний. Противовирусную активность проявляет продигиозан. Модифицированный (сульфатированный) полярный маннан – внеклеточный полисахарид *Rhodotorula rubra* – может применяться как средство профилактики и лечения атеросклероза.

Полисахариды, обладающие антигенной специфичностью, начинают использоваться в медицинской практике в качестве диагностических средств. К ним относятся, например, полисахаридные препараты патогенных и условно патогенных видов дрожжей рода *Candida*, облегчающие диагностику заболеваний кандидозной природы. Показана возможность использования модифицированных ЛПС-антигенов сальмонелл в диагностике сальмонеллезов.

Очищенные специфические полисахариды менингококков групп А и С (полимеры N-ацетил, O-ацетилманнозаминфосфата и N-ацетил, O-ацетилнейраминовой кислоты соответственно) применяются для получения менингококковых вакцин. Микробные полисахариды могут быть основой для создания искусственных вакцин. Достигается это изменением их конфигурации или конъюгацией с синтетическими полиэлектролитами. Нейтральные декстраны с молекулярным весом около 75 тыс., продуцируемые *L. mesenteroides*, широко применяются у нас в стране и за рубежом в качестве заменителей плазмы крови. Перспективны как плазмозаменители пуллулан, леваны, синтезируемые *G. oxydans* и *Vac. polytuxa*. Декстраны определенного строения, как и многие другие полисахариды, способны стимулировать защитные реакции организма. В клиниках они применяются в комплексе с другими препаратами для лечения различных заболеваний брюшной полости. Сульфаты декстрана обладают антикоагулирующим действием, заменя-

ют гепарин и могут применяться как антитромбогенное средство. В качестве антикоагулянта перспективен также хитин.

Широкое применение микробных полисахаридов в фармацевтической, парфюмерной, пищевой и других отраслях промышленности определяется их свойствами: вязкостью, реологическими характеристиками, способностью к набуханию, взаимодействием с определенными структурами. В фармацевтике они используются в качестве основы для изготовления лекарственных форм: как мягчители, эмульгаторы и стабилизаторы суспензий, как склеивающие агенты и разрыхлители в мазах, пилюлях, таблетках. Они обеспечивают длительную устойчивость лекарственных препаратов, стабилизируют и пролонгируют их действие. На базе некоторых микробных полисахаридов (аубазидан, декстран) созданы стабильные в течение нескольких лет лекарственные препараты бутадиона, серы, сульфаниламидов, суспензии сульфата бария для рентгеноскопии и др. Макромолекулярные конъюгаты модифицированных декстранов с ферментами (стрептокиназа, трипсин, фибринолизин) пролонгируют активность ферментов и снижают их алергизирующее действие. Микробные полисахариды применяются как гелеобразующие агенты при изготовлении косметических изделий, для создания гидрофильного буфера в кремах, в качестве набухающих веществ при производстве кремов, шампуней, лосьонов. Некоторые гликаны можно использовать вместо натрий-карбоксицеллюлозы, применяемой в качестве связующего и биологически активного компонента в зубных пастах.

В пищевой промышленности полисахариды микроорганизмов используются в виде пленок – покрытий для продуктов, например сыров для их защиты от высыхания и плесневения, в качестве стабилизаторов мороженого, фруктовых соков, приправ к салатам, загустителей сиропов, джемов, подливок, желе и других кулинарных изделий. Особенно перспективным в этом плане считается ксантан. Слизиобразующие штаммы *Streptococcus lactis* применяют в Швейцарии при производстве густых кефиrow, сметан и некоторых мягких сыров. Экзополисахариды дрожжей родов *Saccharomyces* и *Cryptococcus*, бактерий родов *Azotobacter* и *Arthrobacter* могут использоваться для улучшения качества хлеба. Добавление их к муке при выпечке хлеба повышает газодерживающую способность теста, улучшает его реологические свойства. Хлеб, выпеченный из такого теста, отличается высоким удельным объемом, хорошей пористостью, медленнее черствеет.

Как гелеобразующие агенты экзогликаны применяются при производстве ядерного топлива, фотографических и рентгеновских пленок, как заменители альгиновой кислоты водорослей в пищевой, текстиль-

ной, фармацевтической и бумажной промышленности (полиурониды *Azotobacter*, *P. aeruginosa* и ряда других микроорганизмов), они могут заменять агар (гетерополисахариды *Bac. subtilis* и *Ps. elodea*, состоящие соответственно из глюкозы, галактозы, фукозы, глюкуроновой кислоты и глюкозы, рамнозы, глюкуроновой кислоты и О-ацетильных групп).

Анионные полисахариды (ксантан, занфло – внеклеточный гетерогликан *Erwinia tahitica*, состоящий из глюкозы, галактозы, фукозы, уроновой кислоты и ацетильных групп, и др.) стабилизируют и предохраняют от высыхания катионные водные эмалевые краски. Некоторые гликаны, например гетерополисахарид *Corynebacterium equi* var. *mucilagenosus*, обладают высокой вязкостью и могут заменять дорогие клеящие средства. Сульфаты ксантана используются как загустители клеев. С другой стороны, способность ряда полисахаридов к образованию поверхностных пленок позволяет применять их в качестве антисклеивающих веществ, например при освобождении слепков из отливочных форм. Декстран рекомендуется применять и в качестве смазочного средства.

Полисахариды, водные растворы которых отличаются особой стабильностью при резких изменениях температуры и в условиях агрессивной среды, используются в нефтяной и газодобывающей промышленности как стабилизаторы и структурообразователи промывных жидкостей, предназначенных для бурения нефтяных и газовых скважин, и обеспечивают более полное извлечение нефти из нефтеносных пластов. С начала 2000-х гг. более половины нефти в США добывали с помощью полисахаридов, главным образом ксантана. Промышленные испытания проходит склероглюкан – капсульный линейный нейтральный глюкан, образуемый несовершенными грибами, преимущественно рода *Sclerotium*. В качестве стабилизатора буровых глинистых суспензий перспективен линейный внеклеточный гетерогликан облигатно-метилотрофных бактерий *Methylobacillus methylophilus*, состоящий из глюкозы, галактозы, маннозы, рамнозы и глюкуроновой кислоты. Применение полисахаридов в нефтедобывающей промышленности перспективно в техническом отношении.

Полисахариды ряда микроорганизмов (пуллулан *A. pullulans*, гетерополисахарид бактерий рода *Methylomonas* и др.) являются флокулирующими агентами и используются в гидрометаллургии для получения металлических компонентов в виде гелей, включающих его нерастворимые осадки. Процесс реализован при очистке, разделении и концентрации металлов из растворов их солей или смесей солей.

На основе декстранов получают сефадексы, широко применяемые в лабораторной практике для гель-фильтрации. Полианионные глика-

ны, например ксантан, хитин, рекомендуется использовать для очистки воды от тяжелых металлов, а также при промышленном синтезе полимеров для извлечения их из органических растворителей. Хитин может применяться и для очистки сточных вод.

В качестве носителя иммобилизованной α -амилазы используют аубазидан. Перспективны для иммобилизации ферментов курдлан и хитин.

Микробные леваны – источники получения чистого препарата фруктозы, хитин – *D*-глюкозамина и *N*-ацетил-*D*-глюкозамина – соединений, используемых в химическом синтезе. Из маннанов дрожжей можно получить маннозу.

Полисахариды некоторых бактерий, например леван *Vac. polytuxa*, оказались полезными в сельском хозяйстве. При внесении в почву они повышают выживаемость семян культурных растений, способствуя сохранению в них влаги. Альгинатными пленками покрывают корни и семена растений для предохранения их от высыхания во время хранения и перевозок.

Возможности практического применения полисахаридов микроорганизмов полностью еще не раскрыты. Всестороннее изучение гликанов в этом плане открывает новые перспективы и, несомненно, приведет к расширению соответствующей области микробиологической промышленности.

14.5. Промышленное получение полисахаридов микроорганизмов

Расширение спектра микробных полисахаридов, имеющих практическое значение, обусловило успехи в области организации их производства. В настоящее время микробиологическая промышленность многих стран выпускает ряд ценных экзогликанов: декстран, ксантан (США, Франция), пуллулан (Япония), склероглюкан, или «политран» (США), занфло (США), курдлан (Япония). Уже решены или решаются вопросы внедрения в производство ряда других полисахаридов, детально изученных в лабораторных условиях, проверенных на практике и производимых в полупромышленном масштабе. Производство различных полисахаридов не универсально. Для каждого гликана оно имеет свои особенности, определяемые физиологией продуцента, локализацией и физико-химическими свойствами полимера, областью его применения.

Получение экзополисахаридов имеет преимущества перед получением внутриклеточных, так как экзогликаны образуются, как правило, в значительно большем количестве, легче отделяются от биомассы и очищаются от примесей. Однако при производстве экзогликанов имеются свои технологические трудности. Накопление полисахарида в среде приводит к ограничению доступа кислорода к клеткам. У аэробных микроорганизмов это снижает энергетический баланс и тормозит синтез полисахарида. Повышенная вязкость среды делает невозможным отделение полисахарида от клеток продуцента из нативной культуральной жидкости. Ее приходится разбавлять в десятки раз, а после удаления клеток концентрировать до первоначального или меньшего объема. Решение этих проблем связано с дополнительными затратами.

Приведем основные этапы производства наиболее широко применяемых сейчас полисахаридов – декстрана и ксантана.

Плазмозаменители из декстранов выпускают под названиями: клинический декстран, полиглюкин, синкол, макродекс, плазмодекс, хемодекс и др. Для получения декстранов используют штаммы *Leuconostoc mesenteroides*. Ферментацию проводят на среде с 10–30 % сахарозы, декстраном-«затравкой», дрожжевым экстрактом, минеральными солями. Создают условия, способствующие синтезу той формы декстрана, которая используется в качестве плазмозаменителя: линейного глюкана, имеющего более 90 % α -1,6-связей, с молекулярной массой 60–80 тыс. Для этого ограничивают содержание в среде магния, стимулирующего синтез разветвленных декстранов, вносят «затравку» в виде декстрана, имеющего молекулярную массу 20–30 тыс. Такой акцептор обеспечивает преимущественное образование необходимого полимера.

Наивысшей биологической активностью обладают декстраны, содержащие менее 70 % α -1,6-гликозидных связей, т. е. более разветвленные. Синтезу биологически активных декстранов способствует кроме магния замена сахарозы мелассой. Оптимальное значение pH для роста продуцента лежит в пределах 6,5–8,0, а для накопления декстрансахаразы – около 7,0. Обычно значение pH среды задают в интервале 7,0–8,0.

Бактерии расщепляют сахарозу на глюкозу и фруктозу. Фруктоза сбраживается по типу гетероферментативного молочнокислого брожения с образованием молочной и уксусной кислот, маннита и CO₂. Глюкоза полимеризуется в декстран. Процесс идет быстро, и продукт можно выделить уже через 24 ч.

Декстран выделяют из культуральной жидкости, например, метанолом. Используя определенные приемы, можно осаждать фракции кли-

нического декстрана с молекулярной массой 60–80 тыс. даже из смеси декстранов разной молекулярной массы. Можно осадить весь продукт, растворить его в воде и изолировать требуемый декстран фракционированием. При необходимости выделенный декстран деполимеризуют (ферментативно, термической обработкой или ультразвуком). Для очистки декстран неоднократно растворяют в воде, переосаждают метанолом и фракционируют.

Поскольку декстрансахараза в значительной степени выделяется в среду и синтез полимера идет вне клетки, декстраны получают и ферментативным путем. Для этого продуцент выращивается в условиях, обеспечивающих наиболее высокую активность внеклеточного ферментного комплекса. В период максимальной активности декстрансахаразы культуральную жидкость отделяют от клеток и консервируют, снижая значение рН до 5,0–5,2. При такой кислотности и температуре около 15 °С декстрансахараза, содержащаяся в культуральной жидкости, сохраняет активность не менее месяца. В 80-е гг. XX в. разработана технология получения частично очищенной декстрансахаразы. Ферментационная среда должна содержать сахарозу и декстран-«затравку». Процесс синтеза продолжается около 8 ч. Ферментативный способ удобнее микробиологического, так как он поддается более надежному контролю и регулированию, позволяет одним только варьированием исходных концентраций сахарозы и фермента, а также температуры процесса сразу получать декстран необходимой молекулярной массы. Это значительно упрощает и удешевляет последующие технологические операции. Широкое применение в промышленности может найти использование иммобилизованных декстрансахараз.

Ксантан, продуцируемый *Xanthomonas campestris*, выпускают под названиями: биополимер Хс, келцан, ксантан, келтрол. Бактерии культивируют на среде, содержащей 1–5 % углеводов (кукурузный крахмал, сахар-сырец, меласса и др.), органическое соединение азота, двузамещенный фосфорнокислый калий и микроэлементы, рН среды 6,5–7,2. Инкубацию проводят в аэробных условиях при 28 °С в течение 72 ч. Для улучшения свойств полисахарида в среду во время ферментации добавляют формальдегид. Добавка позволяет получать гликан с повышенной устойчивостью к различным неблагоприятным факторам, в том числе к температуре и засолению. Полимер используют в виде раствора вязкой культуральной жидкости или в виде порошка, высушенного в струе горячего воздуха. В последнем случае полисахарид отделяют от клеток центрифугированием и очищают осаждением этанолом, метанолом или ацетоном в присутствии электролита.

Интенсивные поиски продуцентов полисахаридов типа ксантана ведутся в различных странах. Разработана технология получения отечественного ксантана в промышленном масштабе.

Нередко нативные полисахариды не обладают желаемыми качествами. Они могут быть, например, недостаточно активны, или плохо растворимы, или токсичны, что препятствует их применению, и т. д. Чтобы улучшить действие полисахаридных препаратов, устранить или снизить нежелательные явления, т. е. получить препарат с нужными свойствами, выделенные полисахариды иногда подвергают химической модификации. Так, декстран сульфатируют, чтобы придать ему антикоагулирующую активность. Обработка нативного гликана *A. faecalis* var. *tyrocyticus* солюбилизирующими агентами позволяет получить производные, образующие гели без предварительного нагревания. Растворимость глюкана *A. pullulans* и маннана *R. rubra* удается повысить карбоксиметилированием. Снижение токсичности противоопухолевого препарата белково-липополисахаридного комплекса из культуральной жидкости *Serratia piscatorum* достигается обработкой его щелочью. Получение производных полисахаридов связано с дополнительными технологическими операциями.

Все более широкое применение для производства экзогликанов находит метод непрерывного культивирования продуцентов. С его помощью в ряде стран уже получают многие перспективные в практическом отношении полисахариды (ксантан, курдлан и др.). Этот способ весьма эффективен и экономичен, поскольку позволяет длительно получать продукт в период его максимального накопления и наиболее полно использовать субстрат. Подсчитано, что процент конверсии углеродного субстрата в экзополисахариды при проточном культивировании в 2–3 раза выше, чем при периодическом. Обычно в качестве лимитирующего фактора в хемостате используют азот, а также фосфор и серу. Это обеспечивает интенсивное накопление экзогликанов. Благодаря правильному подбору условий ксантан получают при непрерывном культивировании продуцента в течение многих сотен часов.

В настоящее время разрабатывается производство ряда других практически ценных полисахаридов. На опытной установке Красноярского завода медпрепаратов получают аубазидан и суспензии сульфата бария на аубазидане. Создается опытно-промышленная установка для наработки маннана, развивается деятельность по получению продигозана и группоспецифических полисахаридов менингококков (вакцин).

Перед микробиологическим производством полисахаридов стоит ряд задач, важнейшая из которых – замена дорогостоящих сахаров тра-

диционного источника углерода для получения многих полисахаридов более дешевым сырьем. В связи с этим ведутся поиски микроорганизмов, развивающихся и образующих полисахариды при использовании углеводов, этанола, метанола. Спирты как источники углерода, несомненно, удобнее углеводов, так как они хорошо растворимы в воде, что значительно упрощает технологию выделения и очистки продукта. Для культивирования микроорганизмов возможно использование более простых по составу сред – синтетических или диализованных, необходимых при получении высокоочищенных антигенов. Дешевый субстрат – гидролизат торфа – предлагается применять для производства пуллулана.

В целях получения гликанов с повышенной продуктивностью необходимы поиск новых продуцентов полисахаридов с полезными свойствами, особенно внеклеточных, и селекционно-генетические исследования перспективных микроорганизмов. Метод экспериментальной селекции активных штаммов нередко оказывается более быстрым и экономичным в сравнении с их поиском в природных условиях. Так, в результате действия низкой температуры с последующим облучением быстрыми нейтронами удалось отобрать варианты *X. campestris*, обладающие повышенным синтезом ксантана.

Поскольку микроорганизмы поистине неиссякаемый источник полисахаридов, можно не сомневаться, что среди этих полимеров будут обнаруживаться вещества, оригинальные в химическом отношении и представляющие большую ценность для практики.

Глава 15 ПОЛУЧЕНИЕ АНТИБИОТИКОВ

Принципы получения вторичных метаболитов основаны на особенностях их образования клетками микроорганизмов. Биосинтез вторичных метаболитов фазоспецифичен и происходит после завершения стадии роста, в идиофазе, благодаря чему их и называют идиолитами.

Антибиотики – самый большой класс фармацевтических соединений, синтез которых осуществляется микробными клетками. К этому же классу относятся противогрибковые агенты, противоопухолевые лекарства и алкалоиды. В мире ежегодное производство антибиотиков составляет 20 млрд долл. США. Еще более широко, чем в медицине, они используются в растениеводстве, животноводстве, ветеринарии, пищевой промышленности.

В 1928 г. английский микробиолог Флеминг установил способность зеленой плесени *Penicillium notatum* вызывать гибель микроорганизмов, а во время Второй мировой войны был начат промышленный выпуск антибиотиков. Следует отметить, что лечебные свойства плесени были описаны русским дерматологом А. Г. Полотебновым в 1871 г.

К антибиотикам относятся низкомолекулярные эффекторы изначально природного происхождения, способные подавлять рост живых клеток. В настоящее время описано 12 тыс. антибиотичных препаратов, из которых в клинике применяется около 200. Около 97 % известных антибиотиков токсичны, поэтому в практике не используются. В химическом отношении они представляют собой сборную группу органических веществ.

По типу действия антибиотики делят на бактерицидные, вызывающие гибель микроорганизмов, и бактериостатические, нарушающие способность микроорганизмов делиться. По спектру действия разли-

чают антибиотики узкого и широкого действия. К последним относят тетрациклины, макролиды, амилогликозиды, назначаемые в случае неидентифицируемых возбудителей болезней. При длительном применении они вызывают дисбактериоз.

Особенностью антибиотиков является специфичность их действия: они подавляют один или несколько процессов лишь у некоторых микроорганизмов. В зависимости от этого на молекулярном уровне различают следующие группы соединений, вызывающие у бактерий:

- нарушение биосинтеза пептидогликанов клеточной стенки;
- нарушение отдельных этапов процесса трансляции (трансляция – реализация генетической информации);
- повреждение цитоплазматической мембраны;
- нарушение биосинтеза нуклеиновых кислот;
- нарушение энергетического обмена.

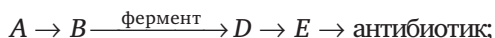
Антибиотики широко используются для расшифровки механизмов биосинтеза белка, нуклеиновых кислот и структуры клеточных стенок бактерий.

Изыскание новых антибиотиков обусловлено и потребностями практики, и накоплением резистентных форм микроорганизмов по отношению ко многим антибиотикам. Устойчивость микроорганизмам придает фермент лактамаза, превращающий пенициллин в пенициллиновую кислоту. По этой причине новые аналоги антибиотиков получают, применяя природные ингибиторы β -лактамазы – клавулановую и оливановую кислоты.

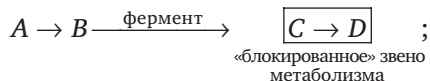
Химические методы получения антибиотиков очень сложны и не могут конкурировать с их биосинтезом методами биотехнологии.

Существует несколько способов получения как природных, так и полусинтетических антибиотиков:

- ферментация микроорганизма-продуцента с подходящим предшественником, что индуцирует синтез антибиотиков в идиофазе;
- использование для биосинтеза «блокированных» мутантов. У таких мутантов блокирован синтез нужного антибиотика. Применяя низкую субстратную специфичность ферментов вторичного метаболизма и аналоги предшественников антибиотика, их переводят в аналоги самого антибиотика. Этот процесс называется биосинтезом или мутасинтезом:
- предполагается последовательность реакций, ведущая к синтезу антибиотика:



- отсутствие синтеза антибиотика у «блокированного» мутанта:



- синтез модифицированного антибиотика после введения аналога предшественника (D^*):



Антибиотики продуцируются плесневыми грибами, актиномицетами, эубактериями и другими микроорганизмами. Шесть родов филаментозных грибов производят около 1 тыс. различных антибиотиков, в том числе пенициллин и цефаллоспорин, а три рода актиномицетов – 3 тыс. антибиотиков. Среди актиномицетов наибольший вклад вносит род *Streptomyces*, один из видов которого – *S. griseus* – синтезирует более 50 антибиотиков.

Процесс культивирования идиоцитов состоит из двух фаз (двухступенчатое культивирование). В первой фазе происходит накопление достаточного количества биомассы, которая выращивается на подходящей для роста микроорганизма среде. Этот этап должен быть быстрым, а питательная среда – дешевой. Во второй фазе осуществляется запуск и активный синтез антибиотика. Здесь ферментацию ведут на продуктивной среде. Образование антибиотиков регулируется условиями культивирования микроорганизмов, поэтому оптимизация питательной среды является главным фактором в повышении выхода продукта.

Большинство антибиотиков получают при глубокой аэробной ферментации периодического действия в асептических условиях.

15.1. Принципы получения антибиотиков

Широкое применение антибиотиков в медицине, сельском хозяйстве и других отраслях народного хозяйства поставило задачу получения этих биологически активных веществ в массовых масштабах. Решение этой задачи стало возможным благодаря созданию мощной антибиотической промышленности.

В основе промышленного производства антибиотиков лежит ряд последовательных этапов: получение высокопродуктивных штаммов-продуцентов, разработка наиболее благоприятных условий культивирования продуцента антибиотика с максимальным биосинтезом этого вещества,

подбор и внедрение в практику соответствующих методов выделения и очистки антибиотика, создание готовых препаратов и контроль их качества. Каждый из этих этапов должен обеспечиваться соответствующими специалистами (генетики, микробиологи, технологи и др.).

Сегодня производство антибиотиков представляет мощную, хорошо развитую отрасль, входящую в фармацевтическую (в нашей стране в медицинскую и микробиологическую) промышленность. Она занимает одно из ведущих мест в производстве лекарственных препаратов. Особенно широко данная отрасль развита в США, Англии, Японии, Франции, Италии и других странах. Например, в США ежегодно выпуск антибиотиков и их производных составляет сотни миллионов долларов. По общему производству антибиотиков страны СНГ занимают ведущее место в мире. По данным Лове и Эландера, только 5-лактамы антибиотиков (пенициллин и цефалоспорин) составляют половину общего объема производимых антибиотиков.

Промышленный способ получения антибиотиков – сложный, многоступенчатый процесс, включающий ряд технологических стадий. Далее будут рассмотрены основные из них.

Большое значение для получения разнообразных модификаций уже известных антибиотических веществ, обладающих более ценными свойствами по сравнению с исходными препаратами, имеет так называемый полусинтетический способ производства антибиотиков. Этой проблеме стали уделять заметное внимание с начала 60-х гг. XX в.

В основе полусинтетического способа получения антибиотиков лежит следующий принцип. В результате биосинтеза получают исходные антибиотики (пенициллин, цефалоспорин, тетрациклины, рифамицин), которые затем подвергаются химической модификации. В ряде случаев основным исходным полуфабрикатом служит не вся молекула антибиотика, а лишь ее основное ядро. Так, при получении полусинтетических пенициллинов и цефалоспоринов используют соответственно 6-аминопенициллановую кислоту и 7-аминоцефалоспоровую и 7-аминодезацетоксицефалоспоровую кислоты, которые подвергаются затем химическому воздействию.

6-Аминопенициллановую кислоту (6-АПК) получают тремя способами: в результате развития продуцента пенициллина в среде, не содержащей предшественника; химической обработкой (гидролизом) бензилпенициллина; ферментативным гидролизом бензилпенициллина.

На возможность получения 6-АПК в результате изменения условий культивирования продуцента пенициллина впервые указал О. Като в 1953 г. С. Бетчел и др. в 1959 г. установили, что пенициллинообра-

зующие штаммы гриба способны при развитии в среде, не содержащей предшественника, образовывать 6-АПК. Однако практического, тем более промышленного значения такое получение 6-аминопенициллановой кислоты не имеет. Связано это с тем, что, во-первых, при развитии продуцента пенициллина в средах без предшественника образуется относительно небольшое количество 6-АПК. Во-вторых, довольно трудно выделять из культуральной жидкости эту кислоту и очищать ее от сопутствующих веществ.

Более эффективный способ получения 6-АПК – химический, в основе которого лежит обработка бензилпенициллина пятихлористым фосфором с получением легкогидролизуемого соединения. Из него затем и получают 6-АПК. В данном случае выход 6-АПК составляет до 95 %.

Наиболее рациональным способом получения 6-аминопенициллановой кислоты следует назвать ферментативный гидролиз молекулы пенициллина.

Фермент пенициллинацилаза осуществляет гидролиз молекулы бензилпенициллина с образованием 6-АПК и фенилуксусной кислоты.

6-Аминопенициллановая кислота практически лишена антибиотической активности.

Пенициллинацилазу способны образовывать различные виды микроорганизмов, в том числе и грибы, продуцирующие пенициллин. Фермент, выделяемый бактериями и проактиномицетами, осуществляет гидролиз бензилпенициллина быстрее других типов пенициллинов.

В настоящее время получение 6-аминопенициллановой кислоты проводят с помощью иммобилизованной пенициллинацилазы, что обеспечивает большой выход продукта и его высокую степень чистоты.

Важнейшим этапом после ферментации антибиотиков является их выделение и очистка из культуральной жидкости. В культуральной жидкости наряду с антибиотическим веществом, как правило, содержится огромное количество посторонних примесей, очень часто близких по своим химическим и физико-химическим свойствам к антибиотику. Примеси, сопутствующие антибиотическому веществу, – это либо вещества минерального или органического характера, либо продукты биосинтеза, либо компоненты питательной среды, либо вещества, добавляемые в культуральную жидкость для ее предварительной обработки. Их концентрация часто достигает нескольких процентов и превышает концентрацию антибиотиков в десятки и сотни, а иногда и тысячи раз.

Выделение и очистка антибиотиков представляет собой сложный технологический процесс. Малая стабильность многих антибиотиков и возможность потери их активности при выделении и чистке приве-

ли к преимущественному использованию физико-химических приемов разделения веществ, включая сорбцию, экстракцию и кристаллизацию, т. е. таких процессов, которые не сопровождались резким химическим воздействием на молекулу антибиотика.

Для разделения, выделения и очистки антибиотиков применяются как равновесные, так и кинетические методы. Однако для производственных задач равновесные методы оказались более экономически выгодными и эффективными. Наибольшее значение приобрели здесь сорбционные и экстракционные методы. Равновесные методы могут быть одностадийными и многостадийными. При промышленном применении, а также при изучении свойств антибиотиков имеют большое значение многостадийные процессы, позволяющие значительно улучшить степень чистоты выделяемого препарата.

Предварительная обработка и фильтрация культуральных жидкостей антибиотиков. Предварительная обработка культуральной жидкости и удаление мицелиальной массы – первая стадия перед выделением и очисткой. Собственно, уже на ней начинается частичная очистка культуральной жидкости от примесей. В зависимости от свойств антибиотика и методов его выделения и очистки выбирается способ предварительной обработки культуральной жидкости. Основная задача этого процесса – получение нативного раствора (а в случае нахождения антибиотика в мицелии – мицелиальной массы) с наибольшей степенью чистоты и наименьшими потерями, что позволяет обеспечить успешное проведение дальнейших операций выделения и химической очистки антибиотика. Большинство антибиотиков выделяются и очищаются из нативного раствора тремя методами: экстракционным, ионообменным, осаждением нерастворимого соединения. При экстракционном методе извлечения антибиотиков из жидкости (пенициллин, эритромицин, новобиоцин) нативный раствор при предварительной обработке должен быть максимально освобожден от примесей, способных образовывать стойкие эмульсии с органическим растворителем. Белковые примеси, как правило вызывающие образование стойких эмульсий, удаляются или вместе с мицелием с помощью различных химических способов, или нагревом жидкости, или обоими способами одновременно. Если мицелиальная масса удаляется легко без предварительной обработки, то к нативному раствору добавляют дезэмульгаторы, удерживающие белковые вещества в растворенном состоянии в условиях экстракции. При выделении и очистке пенициллина в качестве дезэмульгатора используется «контакт Петрова» (керосиновый контакт, катексол, ультравет, цетазол). При выделении и очистке эритромицина необходимо

удалять из нативного раствора ионы кальция, которые могут при экстракции способствовать выпадению антибиотика в осадок.

В случае применения ионообменного метода выделения антибиотика из нативного раствора последний должен быть максимально освобожден от конкурирующих ионов в случае сорбции на катионитах ионов кальция, магния, железа. Для удаления кальция применяется щавелевая кислота, для удаления магния – фосфаты, для удаления железа – желтая кровяная соль. Если антибиотик выделяется из нативного раствора с помощью осаждения, то из нативного раствора желательно удалить все примеси, способные в этих условиях перейти в осадок.

Одна из основных задач предварительной обработки культуральной жидкости – коагуляция частиц, находящихся во взвешенном состоянии. Важность этой задачи проявляется при коагуляции и фильтрации культуральной жидкости актиномицетного или бактериального происхождения. Отделение мицелиальной массы от нативного раствора в большинстве случаев связано со значительными трудностями. Это объясняется спецификой осадка, который обычно имеет аморфный, слизистый, бесструктурный характер и быстро забивает поры фильтрующего материала. Большое влияние на процесс фильтрации оказывают качество сырья и сырьевой состав питательной среды. Например, применение соевой муки, жмыхов в составе среды ухудшает фильтрацию жидкости. Использование гидрола вместо глюкозы как источника углевода снижает скорость фильтрации (производство стрептомицина). Неполное потребление питательных веществ, применение жировых пеногасителей на последних этапах ферментации также приводят к ухудшению фильтрацию. Для улучшения процесса фильтрации очень важно вовремя прекращать ферментацию – желательно при полном потреблении углеводов, но до наступления разрушения микробной клетки, так как процесс фильтрации автолизированной культуры обычно идет плохо. Кроме того, увеличение длительности ферментации ухудшает качество нативного раствора, увеличивает его пигментацию, содержание белковых примесей. Для коагуляции культуральные жидкости антибиотиков специально обрабатываются. В зависимости от свойства антибиотика, происхождения мицелиальной массы и метода выделения и очистки антибиотика культуральная жидкость для улучшения фильтруемости обрабатывается: кислотной коагуляцией; введением в жидкость электролитов; тепловой коагуляцией; применением наполнителей; образованием наполнителя непосредственно в жидкости. Иногда сочетаются два метода. Кислотная и тепловая коагуляции применяются в том случае, если антибиотики устойчивы при изменении pH раствора

и температуры. Нагревание жидкости увеличивает скорость фильтрации вследствие свертывания и коагуляции белков при высокой температуре, а также значительного уменьшения вязкости фильтрата. Тепловая коагуляция увеличивает пигментацию нативного раствора и тем самым может ухудшить качество готового продукта.

Для улучшения фильтрации часто берутся такие наполнители, как диатомит или инфузорная земля, перлит и т. д. Хороший метод коагуляции культуральных жидкостей антибиотиков – это образование наполнителя непосредственно в жидкости при добавлении реагентов, образующих в ней нерастворимый осадок. Выпадающий в жидкости осадок предотвращает слипание частиц мицеллия, способствует образованию гранул, благодаря чему мицелий приобретает комковатую структуру и образует при фильтрации хорошо проницаемый слой. Эффективность этого метода высока и при правильном выборе условий позволяет увеличить скорость фильтрации в 3–10 раз.

Исключительно большое влияние на эффективность коагуляции культуральной жидкости оказывают гидродинамические условия процесса. Обработка при слабом перемешивании позволяет получать хорошо фильтруемые осадки в виде маленьких комочков. С усилением перемешивания коагуляция становится менее отчетливой, жидкость отстаивается медленнее. Осадки после фильтрации получаются более влажными, липкими. Гидродинамические условия при обработке культуральных жидкостей оказывают большое влияние на их фильтруемость. Так, например, при увеличении скорости фильтрации культуральной жидкости от 1 до 2 м/сек фильтруемость суспензии и степень ее дисперсности практически одинаковы. Дальнейшая интенсификация гидродинамического режима (до $\omega = 10$ м/сек) приводит к ухудшению фильтрационных характеристик суспензии. Следовательно, при фильтрации культуральных жидкостей имеет большое значение не размер кристаллов, а величина гранул, которые образуются при агрегации частиц коагулянта-наполнителя и мицеллия. Для фильтрации коагулированного раствора очень важна продолжительность выдержки после обработки. Ее уменьшение ниже определенного предела вызывает снижение скорости фильтрации и может в некоторых случаях привести к опалесценции фильтрата. Движущая сила процесса фильтрации – разность давлений по обе стороны слоя осадка, а одна из важнейших его характеристик – скорость фильтрации, т. е. количество фильтрата, получаемого с единицы поверхности в единицу времени. Скорость фильтрации зависит от давления, толщины слоя осадка, структуры и характера осажденного вещества, вязкости жидкой фазы суспензии и других факторов.

15.2. Экстракционные процессы

Экстракция широко применяется для выделения и очистки многих химических соединений, в том числе и антибиотиков (особенно когда они или продукты их соединения с переносчиками не ионизированы в водной фазе). Несмотря на существенный недостаток экстракционных процессов, а именно использование все же вредных, взрывоопасных органических растворителей, они находят широкое применение в промышленности. Во-первых, экстракционные процессы по времени протекают значительно быстрее, чем ионообменные, коэффициенты распределения для некоторых систем очень велики, и это позволяет резко сокращать объемы перерабатываемых растворов. Аппаратурно этот процесс очень легко осуществить непрерывным способом. Особенно интересна экстракция с переносчиком. Часто этот вид экстракции называют жидким ионным обменом.

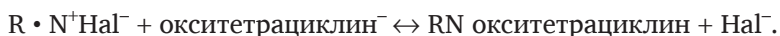
Экстракция с переносчиком. Перенос вещества осуществляется с образованием комплексного соединения с гидрофобным переносчиком не только за его счет, но и вследствие подавления полярных групп в молекуле антибиотика переносчиком. В качестве переносчиков используются олеиновая кислота, ундециленовая кислота, из оснований – цетазол (цетилпиридиний бромид). Кислота (например, олеиновая) взаимодействует с основанием стрептомицина, образуя соль с большей энергией сольватации в органической фазе, и вещество переходит в органическую фазу. Переносчик может находиться как в водной, так и в органической фазе.

Наиболее ярким представителем антибиотиков, при производстве которого до сих пор успешно применяется экстракционный метод выделения и очистки антибиотиков, является пенициллин. После предварительной обработки культуральной жидкости и отделения осадка она направляется на экстракцию, которая осуществляется с помощью бутилацетата при $\text{pH} = 2$; коэффициент распределения при этих условиях может достигать 30. Добавляемая при этом серная кислота доводит pH раствора до 2, тем самым подавляя степень диссоциации пенициллина в водной фазе, превращая его в недиссоциированную пенициллиновую кислоту, которая легко переходит в органическую фазу. Затем бутилацетатный экстракт обрабатывается слабым раствором щелочи, и пенициллин в виде соли снова переходит в водную фазу.

Экстракция повторяется еще раз для более полной очистки и концентрирования антибиотика.

Антибиотики, которые выделяются и очищаются с помощью переносчиков, принадлежат к тетрациклиновой группе (тетрациклин, окситетрациклин). Наличие в их группе одной основной и двух кислых групп позволяет использовать в качестве переносчиков этих соединений вещества основного и кислого характера. В качестве кислых переносчиков можно применять сульфокислоты, фенолы, жирные кислоты, а в качестве жидких анионитов – четвертичные аммониевые основания с длинной углеводородной цепью (C₁₀–C₃₀).

Схематически химические реакции при этом можно представить следующим образом:



Проведенные исследования С. И. Каплана и других ученых говорят о том, что максимальная степень экстракции (95–97 %) достигается при применении 5 % цетазола в растворителе, взятом в количестве 15 % от объема нативного раствора при pH водной фазы 9,5–10,2. Весьма существенный фактор, определяющий процесс извлечения антибиотика, – длительность контактирования двух жидких фаз. Вышеуказанные исследования показали, что при оптимальном значении pH равновесие в системе достигается уже в течение первой минуты перемешивания. Важным моментом является последующая реэкстракция окситетрациклина из органической фазы. Использование для этой цели соляной, фосфорной, лимонной кислот позволяет получать растворы с концентрацией антибиотика 40–50 тыс. ЕД/мл, но они имеют интенсивную темную окраску. Реэкстракция окситетрациклина 4–5 %-м раствором щавелевой кислоты позволяет получить растворы с концентрацией антибиотика 35–45 тыс. ЕД/мл со светлой окраской реэкстракта. Вероятно, это явление можно объяснить различной степенью диссоциации окрашенных примесей и свойством щавелевой кислоты взаимодействовать с ними.

Аппаратура для экстракции антибиотиков. Современное производство антибиотиков развивается в условиях усилившегося внедрения нового прогрессивного технологического метода выделения (очистки) – ионообменного. В связи с этим в аппаратурном оформлении экстракционного метода особенно актуален рациональный выбор конструкций аппаратов и режима их работы с применением экономических показателей.

В химической промышленности используется много принципов экстракции и типов аппаратов, пригодных для экстракции антибиотиков. Если в прежние годы выбор экстракторов производился интуитив-

но, то в настоящее время благодаря работам Пратта, Г. П. Питерских и Е. Р. Валашека, Д. Е. Шкоропада и И. В. Лысковцева выбор экстракторов может быть сделан довольно строго путем рациональной оценки достоинств и недостатков каждого типа экстракторов.

Своеобразие физико-химических свойств антибиотиков – пенициллина, тетрациклина, эритромицина, бацитрацина и их нативных растворов – позволяет выбирать лишь исключительно строгие режимы их экстракции.

Описание конструкций экстракторов. Процесс экстракции складывается из двух элементов, проводимых либо в одном, либо в разных аппаратах:

- эмульгирования одной жидкости в другой и их взаимного движения, при которых происходит экстракция;
- разделения жидкостей.

Современные центробежные жидкостные экстракторы непрерывного действия по способу их работы делят на прямоточные и противоточные. В прямоточных экстракторах раствор и экстрагент, подводимые непрерывными потоками, смешиваются в отдельном аппарате-смесителе или в смесительном устройстве экстрактора-сепаратора, затем транспортируются к сепаратору или сепараторному барабану экстрактора-сепаратора. В противоточных экстракторах-сепараторах экстрагент и раствор движутся противоточно в роторе аппарата.

При раздельном непрерывном экстрагировании и сепарировании в качестве прямоточных смесителей-экстракторов применяют:

- аппарат емкостью 10–20 л с мешалкой или центробежный насос;
- трубчатый экстрактор, известный под названием трубы Питерских, длиной порядка 10 м, в котором создан развитый турбулентный режим движения жидкости;
- струйный смеситель типа инжектора.

Смеситель с мешалкой наименее эффективен, поскольку в отличие от двух других экстракторов длительность пребывания частиц жидкости в нем различна. Кроме того, концентрация антибиотика в растворе из-за работы мешалки выравнивается во всем объеме и не отличается от концентрации удаляемого раствора. Это уменьшает движущую силу процесса (Г. П. Питерских и Е. Р. Валашек). Для разделения полученных эмульсий применяют тарельчатые сепараторы антибиотических жидкостей САЖ-3М, снабженные сдвоенными центробежными насосами с напором 1 ат. Производительность сепараторов $2,5 \text{ м}^3/\text{ч}$. За рубежом применяют сепараторы *PSBS* (Германия), *De Laval* (Швеция) и др. При меньших объемах производства используют сверхцентрифуги СГС-100.

15.3. Сорбционные процессы

Сорбционные методы выделения и очистки антибиотиков находят самое широкое распространение в промышленности. Они имеют целый ряд преимуществ по сравнению с другими методами. Первые сорбционные методы выделения и очистки антибиотиков были основаны на применении молекулярных сорбентов (активированный уголь, оксид алюминия и т. д.), которые обладают универсальной сорбционной способностью, т. е. одинаково хорошо сорбируют выделяемое вещество и целый ряд других примесей. Большие возможности синтеза ионообменных сорбентов, сорбентов с различной избирательностью и особенно со специфической по отношению к отдельным антибиотикам быстро выдвинули их на первый план.

Ионообменные сорбенты принадлежат к классу высокомолекулярных соединений, макромолекулы которых имеют сетчатую или пространственную структуру и в большинстве случаев представляют собой аморфные вещества. Отдельные атомы этих гигантских молекул соединены друг с другом ковалентными связями. Такая структура ионообменных сорбентов и связанное с этим отсутствие растворимости в известной степени нарушают общепринятое представление об электролитах и ионообменных процессах между ними. Диссоциация растворимых в воде кислот или оснований вызывает изменение концентрации водородных ионов. Ионообменные сорбенты также содержат кислотные и основные группы, но их погружение в воду не вызывает изменения в ней концентрации водородных ионов.

Катиониты представляют собой особый класс солей и кислот, которые характеризуются многовалентностью и, обладая громоздкой структурой, практически лишены подвижности. Катион, входящий в состав ионита, подвижен, и только сила электростатического притяжения препятствует его отделению в растворитель, поэтому вокруг адсорбента создается ионная атмосфера. Катионы в ионной атмосфере неравноценны по силе их электростатического сцепления с анионом адсорбента, поэтому процесс ионного обмена представляет собой многоступенчатую реакцию.

Ионы водорода или гидроксильные группы ионита свободно диффундируют в фазе сорбента. Вся остальная часть этого нерастворимого электролита, отдельные атомы и группы которого соединены между собой ковалентными связями, лишена подвижности, представляя собой гигантский анион (в случае катионита) или катион (в случае ани-

онита). Таким образом, процесс ионного обмена можно рассматривать как взаимодействие двух электролитов, один из которых (сорбент) содержит практически неподвижный анионный (или катионный) комплекс. Процесс ионного обмена складывается из диффузии ионов растворенного электролита к поверхности зерна сорбента, диффузии ионов растворенного электролита внутрь сорбента, вытеснения подвижного иона из сорбента и диффузии вытесненного подвижного иона из фазы сорбента в раствор.

Классификация сорбентов. Иониты в зависимости от наличия в них ионогенных групп можно разделить на два класса: ионообменные сорбенты, содержащие в своей структуре кислотные группы – катиониты (нерастворимые кислоты); ионообменные сорбенты, содержащие в своей структуре основные группы – аниониты (нерастворимые основания). Разграничение ионитов на кислоты и основания не исключает возможности существования ионитов амфолитов, ионогенные группы которых могут вести себя как кислоты или как основания в зависимости от pH среды. Существуют также иониты, содержащие одновременно кислотные и основные группы. Все применяемые для сорбции антибиотиков материалы могут быть отнесены к одному из следующих классов: молекулярным сорбентам, минеральным ионитам или ионообменным смолам. Среди последних наибольшее значение имеют карбоксильные смолы и сульфокатиониты, а также аниониты различной степени основности.

Самыми распространенными молекулярными сорбентами, применяемыми в производстве антибиотиков, являются активированный уголь и оксид алюминия.

Полимерные смоляные сорбенты могут быть синтезированы на основе процессов полимеризации или поликонденсации. Первые из них обычно обладают большей механической прочностью. Тем не менее ряд полимерных сорбентов, полученных путем поликонденсации, также с успехом применяются в лабораторной практике и промышленности.

Основные требования, предъявляемые к ионитам. Обычно качество ионитов отражают условной оценкой сорбционных свойств ионита (полная емкость сорбента, емкость сорбента при различных pH среды, скорость установления сорбционного равновесия, объем десорбирующего раствора и полнота десорбции); физических свойств ионита в определенных условиях (набухаемость и прочность зерен, теплостойкость и химическая стойкость и т. д.). Весьма желательно, чтобы ионит, применяемый для извлечения ценных ионов из раствора или для очистки того или иного вещества, обладал максимальной емкостью. Для вы-

полнения этого условия необходимо, чтобы в синтезируемом сорбенте содержалось как можно большее число ионогенных групп на единицу веса, полностью ионизированных в данных конкретных условиях сорбции. Следует при этом помнить, что ионизация оксифенильных групп становится заметной при pH выше 9, ионизация карбоксильных групп – при pH выше 5, сульфогруппы полностью ионизированы в кислой среде, amino- и иминогруппы вступают в реакцию ионного обмена в кислой среде, четвертичные аммониевые основания проявляют свойства ионообменного сорбента в нейтральных и даже слабощелочных средах. Иониты, применяемые для хроматографического анализа, должны содержать однотипные кислотные или основные группы. В этом случае легко достигнуть четкого разделения смеси соответствующих антибиотиков или других биологически активных веществ.

При выборе ионитов необходимо также учитывать относительную прочность связи подвижных ионов с ионитом, с тем чтобы десорбция их осуществлялась столь же легко, как и сорбция. Чем больше энергия ионной связи между подвижными и неподвижными ионами сорбента, тем труднее сместить равновесие в период десорбции.

Для набухающих ионитов большое значение приобретает степень набухания его в сорбируемых растворах. С увеличением набухаемости возрастает доступность ионогенных групп, что в свою очередь увеличивает емкость сорбента и скорость установления сорбционного равновесия. Со значением набухаемости тесно связана прочность зерен сорбента. С повышением набухаемости она уменьшается. В условиях резкого изменения степени набухания внутренние напряжения, возникающие в зернах, вызывают их разрушение. Механическую прочность ионита D определяют как отношение объема ионита после отсева пыли V_2 к объему до встряхивания (%):

$$D = V_2/V_1 \cdot 100.$$

Аппаратура для ионообменной сорбции антибиотиков. Аппаратура для сорбционных ионообменных процессов, несомненно, более проста по сравнению с экстракционной и доступна по стоимости.

Конструкция ионообменного фильтра, называемого также колонной, для сорбции в динамических условиях должна обеспечивать:

- постоянное нахождение смолы под слоем раствора;
- минимальный унос мелких зерен смолы с уходящим фильтратом;
- минимальную слеживаемость слоя смолы;
- отсутствие мертвых пространств в сорбенте;
- незначительное разбавление водой обрабатываемых растворов.

Конструкция, размеры колонн и гидродинамический режим ее работы зависят от механических свойств смолы, ее сорбционной емкости и стоимости. Иониты, применяемые для умягчения и обессоливания воды, например сульфогли, – это обычно твердые частицы, устойчивые к истиранию, создающие низкое сопротивление потоку жидкости в насадке. Высокая прочность смолы позволяет применить в качестве фильтров обычные емкостные аппараты с эллиптическими крышками и днищем, снабженные поддерживающими устройствами, распределителями и сифонами. Такие фильтры благодаря малой емкости смолы и большой производительности имеют диаметр и высоту слоя смолы порядка 1,5 м. Вода в эти фильтры подается сверху, снизу же – лишь для периодического взрыхления слоя ионита после регенерации.

Для деминерализации элюата стрептомицина и других антибиотиков применяют ионообменные фильтры аналогичной конструкции, хотя и меньшего размера, поскольку используемые в этих целях недорогие смолы, например СБС-1 и ЭДЭ-10, обладают механическими свойствами такого же высокого уровня.

Для сорбции антибиотиков применяются более дорогостоящие ионообменные смолы, например катиониты КБ-4П-2, КБ-2 слабосшитых крупнопористых ионообменных смол, обладающих сравнительно небольшой механической прочностью. В набухшем состоянии, находясь в толстом слое, они деформируются под действием силы тяжести и давления нисходящего потока раствора. При этом порозность насадки становится значительно меньше порозности шарообразных недеформируемых частиц (равной 0,4), вследствие чего увеличивается гидравлическое сопротивление для потока раствора и уменьшается площадь контакта зерен смолы с раствором. В связи с этим отечественные предприятия перешли к использованию восходящего потока раствора. Раствор подается с линейными скоростями (отнесенными к полному сечению аппарата) немного больше критической, при которой сопротивление слоя становится равным погруженному весу слоя и зерна переходят во взвешенное состояние. Сорбция в таком псевдооживленном слое протекает быстрее, увеличивается сорбционная емкость смолы и чистота элюатов.

Для полидисперсного слоя вычисляется эквивалентный диаметр зерен. Критическая скорость имеет порядок десятых долей мм/сек. Для предупреждения уноса мелких частиц смолы применяется конструкция фильтра в виде колонны диаметром 0,4–0,7 м с расширенной открытой верхней частью, изготовленной из органического стекла. В верхней части колонны скорость раствора снижается до величин, которые значи-

тельно меньше критической. Унесенная потоком смола улавливается в желобах и возвращается в рабочую часть колонны.

Восходящий поток используется также при регенерации, когда переход смолы в другую форму, например из водородной формы катионитов в натриевую, сопровождается набуханием смолы и увеличением ее объема примерно в два раза. При подаче раствора сверху такое набухание смолы может разрушить колонну. Восходящий поток полезен также при промывке и взрыхлении слоя смолы. Десорбция антибиотиков, сопровождаемая сжатием смолы, производится нисходящим потоком для увеличения концентрации элюата.

Любой ионитовый фильтр имеет дренажный или опорный слой, нижний и верхний распределитель и устройство (сифон) для поддержания уровня раствора на 0,1–0,15 м выше уровня смолы. Дренажный слой служит для поддержания слоя смолы. Для фильтров с диаметром более 1,5 мм он состоит из слоя гравия, антрацита или другого инертного материала. При меньшем диаметре фильтров применяют пористые пластинки или конические колпачки из пластмассы со щелями, имеющими поперечник, равный мелкой фракции зерен смолы, которые укреплены в дырчатом ложном днище. Фильтрующую ткань используют реже. Такой дренажный слой служит и распределителем. Распределитель в виде дырчатой трубы, установленный непосредственно над слоем смолы (с учетом набухания), служит для равномерного распределения потока жидкости по сечению фильтра. Неравномерное распределение сильно ухудшает эффективность сорбционного процесса, ведет к возникновению мертвых зон, не омываемых раствором.

Ионообменные фильтры изготавливают обычно из углеродистой стали. Для защиты от коррозии, вызываемой растворами кислот и щелочей, применяется гуммирование или стеклянная футеровка корпуса аппарата и трубопроводов. Такая защита эффективна благодаря отсутствию органических растворителей и повышенных температур растворов. Колонны с диаметром меньше 0,3 м целесообразно сделать из винилпласта, органического или обычного стекла. Прозрачные корпуса колонн очень удобны в работе. Трубопроводы из винилпласта имеют недостаточную прочность, поэтому при длительной работе их следует избегать.

Ионообменная аппаратура и технология развиваются по пути ускорения процесса сорбции, автоматизации приготовления растворов для регенерации, автоматизации контроля концентрации раствора, вытекающего из колонны, перевода процесса ионного обмена на непрерывный.

15.4. Кристаллизация

Процесс кристаллизации в производстве антибиотиков, как правило, является завершающим этапом и поэтому требует тщательного исследования.

Качество выпускаемого препарата в целом зависит от того, каким образом прошло выделение и химическая очистка его из культуральной жидкости, и, в частности, от правильного соблюдения условий кристаллизации на завершающей стадии.

В настоящее время требования к качеству выпускаемых препаратов повышаются, и это заставляет еще глубже вникать в процессы кристаллизации и искать пути и возможности их использования для получения препаратов в готовом виде. Твердые тела могут быть кристаллическими и аморфными. Кристаллическое состояние отличается от аморфного расположением молекул, атомов или ионов в определенном и строгом порядке. Рентгеновский анализ показал, что многие вещества, которые когда-то считались аморфными, имеют правильное расположение молекул, но термин «кристаллический» чаще всего применяется для обозначения высокой степени внутренней упорядоченности, приводящей к образованию определенных наружных граней кристалла. В газах и жидкостях движение молекул свободно и беспорядочно, поэтому физические свойства этих веществ одинаковы по всем направлениям, большинство же кристаллов обладает различными механическими, электрическими и магнитными свойствами в разных направлениях.

Различные вещества, имеющие при кристаллизации почти одинаковые кристаллические формы, называются изоморфными. Они часто аналогичны по химическому составу и имеют одинаковые химические формулы. Вещества, способные кристаллизоваться в различные, но химически идентичные формы, называются полиморфными.

Основные условия процесса кристаллизации – получение пересыщенного раствора; находящийся в равновесии с твердой фазой раствор считается насыщенным этой твердой фазой. Из насыщенного раствора сравнительно легко можно получить раствор, содержащий более высокий процент растворенной твердой фазы. Такой раствор называется пересыщенным.

Если раствор охлаждается без потери растворителя, то самопроизвольной кристаллизации не произойдет до тех пор, пока не будут достигнуты необходимые условия. В этой точке кристаллизация может протекать спонтанно, либо ее можно вызвать затравкой, перемешивани-

ем или механическим ударом. Для начала кристаллизации может потребоваться дальнейшее охлаждение до некоторой новой точки, особенно если вещество обладает хорошей растворимостью. Несмотря на то что склонность к кристаллизации увеличивается после того, как пройдена лабильная зона, все же иногда кристаллизация не происходит из-за увеличения вязкости раствора и перехода в стеклообразное состояние. Пересыщение раствора может достигаться при удалении из него некоторого количества растворителя испарением. Переход через кривую пересыщения в лабильную зону осуществляется редко, так как поверхность, от которой идет испарение, обычно пересыщена в большей степени, чем основная масса раствора. Кристаллы, образующиеся на этой поверхности, в конце концов попадают в раствор и затравляют его, прежде чем в основной массе раствора достигаются нужные условия.

На практике чаще всего применяют сочетание охлаждения и испарения.

Кристаллизация и растворение. Обычно процессы кристаллизации и растворения считают равновеликими и взаимосвязанными, и если бы они были по природе диффузионными, то скорость кристаллизации равнялась бы скорости растворения при данной температуре и при одинаковых движущих силах, т. е. при одинаковых отклонениях от равновесных насыщенных состояний; все грани кристалла должны расти и растворяться с одинаковой скоростью. Такие условия редко достигаются на практике. Кристаллы обычно растворяются быстрее, чем растут, и различные грани обычно растут или растворяются с различными скоростями, хотя это наблюдается не всегда. Некоторые исследователи считают, что кристаллы растворяются быстрее, так как открытые твердые поверхности неодинаковы в каждом случае. Когда кристалл растет, грани его плоские, а когда растворяется, грани его обычно испещрены ямками, что приводит к увеличению площади контакта между твердой и жидкой фазами. Растворимость кристаллов зависит от их размеров. Растворимость весьма малых кристаллов значительно повышается, и при слишком малых размерах кристаллов мелкие кристаллы будут исчезать из системы, а крупные – расти. Это явление вызывает некоторые затруднения в начальной фазе кристаллизации. Первые кристаллы (зародыши) не могут образовываться из-за весьма малых размеров, имеют высокую растворимость. Величина кристаллов зависит от поверхностного натяжения раствора, которое может изменяться в зависимости от содержания присутствующих примесей. Чем больше поверхностное натяжение, тем сильнее его действие в направлении уменьшения общей межфазной поверхности на границе «твердое

вещество – жидкость». Это условие ведет к образованию более крупных кристаллов, так как их удельная поверхность (на единицу веса) меньше удельной поверхности мелких кристаллов.

Следует заметить, что крупные кристаллы не могут обладать высокой степенью чистоты. Вследствие агломерации они содержат включения маточного раствора, в то время как мелкие кристаллы отличаются однородностью, но обширная поверхность затрудняет их промывку.

Рост кристаллов. Как только в пересыщенной или переохлажденной системе образовались устойчивые зародыши, т. е. частицы больше критического размера, они начинают расти, превращаясь в кристаллы видимого размера. Рост кристаллов зависит от очень многих причин. Остановимся на некоторых из них.

Целый ряд кривых для многих систем был получен Д. Тамманом. Для всех изученных систем было установлено, что оптимальная температура зарождения центров кристаллизации была гораздо ниже той, которая требовалась для максимального роста кристаллов. При температуре ниже оптимальной вязкость увеличивалась до такой величины, которая препятствовала кристаллизации, в то время как выше оптимальной температуры зарождению центров кристаллизации мешает интенсивное молекулярное движение жидкости.

Влияние перемешивания. Скорость роста кристаллов при данной температуре в постоянных условиях пересыщения может значительно изменяться при перемешивании жидкости или вращении кристалла относительно жидкости. Скорость роста существенно увеличивается на первых стадиях, но вскоре достигаются такие условия, когда дальнейшее перемешивание не оказывает никакого влияния. Из целого ряда подобных исследований был сделан вывод, что диффузия не является единственным и наиболее важным фактором, который следует рассматривать при изучении процесса кристаллизации. Следует также отметить, что в кристаллизаторе, в котором кристаллы поддерживаются во взвешенном состоянии путем перемешивания, большие кристаллы будут расти быстрее, чем маленькие, так как для первых окажутся благоприятными более высокие относительные скорости реакции между твердым веществом и раствором.

Форма кристаллов. Форма кристаллов зависит от очень многих факторов: например, свойств растворителя, pH раствора, наличия примесей, степени пересыщения или переохлаждения, скорости охлаждения, температуры кристаллизации, интенсивности перемешивания и т. д. Быстрое охлаждение раствора часто вызывает предпочтительный рост кристалла в одном направлении, что приводит к образованию иголок.

Наиболее частым случаем, вероятно, следует считать изменение формы кристалла в присутствии примесей в кристаллизирующемся растворе. Изменение формы под влиянием примесей представляет собой, в сущности, поверхностное явление: молекулы примесей или ионы притягиваются к различным граням кристалла и поглощаются на поверхности физически или химически. Это явление уменьшает площадь, пригодную для зарождения центров кристаллизации на поверхности для осаждения растворенного вещества, и рост на той грани замедляется.

Кристаллизация тетрациклинов. Наличие в молекуле антибиотиков тетрациклиновой группы двух кислых и одной основной группировок делает возможным их получение в виде основания, соли какой-либо кислоты, а способность к комплексообразованию с тяжелыми металлами позволяет осаждать их даже из нативных растворов в виде кальциевых солей. Растворимость этих соединений в воде различна и находится в зависимости от рН водной фазы. Тетрациклин и окситетрациклин имеют наименьшую растворимость при значениях рН от 4,0 до 7,0. Это свойство антибиотиков тетрациклиновой группы позволяет осаждать их из водных растворов в виде нерастворимых кристаллических соединений. Например, осаждение основания окситетрациклина производят следующим образом. Реэкстракт с предыдущей стадии обрабатывают активированным углем в количестве 1 % для удаления остатков экстрагента и пигментных веществ. Уголь отделяют, а к прозрачному фильтрату при перемешивании добавляют 10 %-й раствор гидроксида натрия до получения устойчивого значения рН водной фазы 4,2–4,5. Выпавший кристаллический осадок основания окситетрациклина отфильтровывают от маточника, промывают водой и высушивают в вакууме при 50°.

Высокая гидрофильность хлоргидрата окситетрациклина препятствует его выделению из водных растворов даже больших концентраций. По этой причине для получения кристаллического хлоргидрата окситетрациклина необходимо применять органический растворитель, в частности метиловый спирт.

Согласно полученным данным, растворимость основания окситетрациклина в метаноле при 20 °С составляет 7,5 тыс. ЕД/мл. Известно также, что растворимость основания окситетрациклина в метаноле возрастает в присутствии хлористого кальция. Вероятно, это повышение растворимости основания окситетрациклина в присутствии хлористого кальция можно объяснить способностью антибиотиков тетрациклиновой группы к образованию комплексных соединений с тяжелыми металлами (типа хелатов).

Отмечено, что растворимость основания окситетрациклина в метиловом спирте сильно возрастает с увеличением концентрации хлористого кальция. Однако с повышением концентрации окситетрациклина возрастает вязкость раствора, вследствие чего уменьшается скорость его фильтрации и ухудшаются условия кристаллизации. С другой стороны, растворимость гидрохлорида окситетрациклина в кислом метаноле уменьшается с повышением концентрации хлористого кальция. Сопоставление этих данных позволило сделать вывод, что оптимальным условием для получения кристаллического гидрохлорида окситетрациклина является концентрация основания 100–120 тыс. ЕД/мл в 7–9 %-м растворе хлористого кальция в метаноле. При подкислении такого раствора соляной кислотой происходит быстрая кристаллизация гидрохлорида, растворимость которого в метанольном растворе данного состава минимальна.

Процесс кристаллизации осуществляется следующим образом. Техническое основание окситетрациклина растворяют в 8 %-м метанольном растворе хлористого кальция до получения указанной выше концентрации. К раствору, обработанному активированным углем, при 3...5 °С прибавляют концентрированную соляную кислоту. Смесь перемешивают в течение 30 мин при этой же температуре, после чего выпавший кристаллический осадок гидрохлорида окситетрациклина отфильтровывают и на фильтре промывают охлажденным метанолом. Осадок сушат в вакууме при 35...38 °С и получают гидрохлорид окситетрациклина в виде кристаллов лимонно-желтого цвета с активностью 900 ЕД/мг. Аналогичным образом протекает и осуществляется процесс кристаллизации двух представителей антибиотиков тетрациклиновой группы (тетрациклин, хлортетрациклин) с небольшими деталями и изменениями в каждом частном случае.

Следует указать также, что процесс кристаллизации как в случае получения основания, так и в случае получения гидрохлорида окситетрациклина – это кристаллизация с химической реакцией.

Кристаллизация пенициллина. Исключительно высокая гидрофильность калиевой и натриевой солей пенициллина не позволяет проводить кристаллизацию их из водных растворов. Кристаллизация калиевой соли пенициллина осуществляется из бутилацетатного экстракта при добавлении насыщенного водного раствора ацетата калия. При этом пенициллин, находясь в бутилацетате в виде пенициллиновой кислоты, реагирует с ацетатом калия. В результате химической реакции образуется калиевая соль, которая вследствие малой растворимости в бутилацетате выпадает в осадок. В данном случае кристаллизация протекает с химической реакцией. Выпавшие кристаллы промывают

ся бутанолом для удаления ацетата калия и высушиваются. Натриевая соль пенициллина кристаллизуется методом азеотропной отгонки растворителя. В вакуум-выпарной аппарат к водному раствору пенициллина добавляется бутанол, который с водой образует азеотропную смесь, состоящую из 68 частей бутанола и 32 частей воды. Отгонка азеотропной смеси бутанола с водой производится при 20 °С и остаточном давлении 10 мм рт. ст. При полном удалении воды из кубового остатка и охлаждении кристаллизуется Na-соль пенициллина, которая затем также промывается бутанолом и высушивается.

15.5. Сушка антибиотиков

Вследствие нестабильности антибиотиков даже в слабо увлажненном состоянии необходимо осуществлять сушку препаратов до остаточной влажности 0,5–2,0 %. В зависимости от агрегатного состояния антибиотика в конце очистки и его стабильности при повышении температуры применяют четыре метода сушки.

1. Осажденные в виде кристаллов антибиотики, имеющие сравнительно высокую стабильность (например, тетрациклиновые), подвергаются сушке при атмосферном давлении и температуре до 90 °С в камерных или пневматических сушилках.

2. Осажденные малостабильные антибиотики (пенициллины) высушиваются в вакуумных сушилках при техническом вакууме и температуре около 40 °С в шкафах, сушилках-венулет и др. Антибиотики, полученные при выделении-очистке в виде концентрата, т. е. 5–15 %-го водного раствора (стрептомицин, антибиотики группы неомицина), весьма нестабильные в растворенном состоянии, подвергаются сушке двумя методами, исключаящими инактивацию и ухудшение качества препаратов.

3. Медленная сушка (в течение нескольких часов) осуществляется при отрицательной температуре путем сублимации воды из замороженного раствора под средним или глубоким вакуумом. Такую сушку называют молекулярной.

4. Скоростная сушка (в течение долей секунды) происходит при высоких температурах порядка 130 °С в виде аэрозоля, образованного из раствора в токе горячего воздуха. Эту сушку называют распылительной.

Молекулярная сушка. Метод сублимационной сушки, впервые открытый и запатентованный в 1921 г. советским инженером Г. И. Лап-

па-Старженецким, заключается в том, что влажный материал или раствор (бактериальная масса, сыворотка крови, раствор антибиотика, фруктовый сок, фрукты, мясо, рыба), замороженные до температуры $-20...-40$ °С, сушатся в вакууме с остаточным давлением около 0,01 мм рт. ст. путем возгонки воды из кристаллов льда.

При этом благодаря вакууму средняя длина свободного пробега молекул воды в порах высушиваемого материала (≈ 5 мм) значительно больше поперечника капиллярных пор ($10^{-4}-10^{-2}$ мм) замороженного материала, по которым удаляются пары воды. В этих условиях молекулы воды движутся в порах в виде молекулярных пучков (эффузия), поэтому сублимационный метод сушки по предложению А. В. Лыкова назван молекулярной сушкой.

Технология такой сушки заключается в следующем. Раствор антибиотика, чтобы не допустить его вспенивания в сублимационной камере и выброса в вакуумную систему, предварительно замораживают в камерах обычных холодильных установок до температуры -40 °С. Перед замораживанием раствор стерилизуют фильтрацией и разливают во флаконы с помощью полуавтоматического дозатора по 3–5 мл в зависимости от клинической дозы антибиотика. Чем быстрее идет замораживание, тем более мелкокристаллической и более гомогенной по концентрации антибиотика становится структура образующегося льда и тем быстрее происходит последующая сушка благодаря более развитой поверхности сублимации.

Удаление влаги в период сублимации осуществляется с постоянной скоростью и при сохранении формы замороженного материала или раствора. Поскольку сушка осуществляется с поверхности тела, то чем мельче дозировка, тем быстрее заканчивается сушка. Ее оптимальный режим соответствует такой температуре и вакууму, при которых скорость сублимации наибольшая. Это достигается сушкой при постоянной температуре, которая немного меньше температуры плавления продукта – криогидратной точки. Плавление продукта недопустимо, так как вспенивание раствора вызывает его выброс из флакона или частичный вынос на стенки флакона. Такие «вспененные флаконы» выбраковываются при контроле качества сушки. В период сублимации (5–8 ч) удаляется около 80 % влаги при температуре замороженного продукта $-35...-40$ °С и остаточном давлении 10–30 мм рт. ст. В конце периода сублимации температура внутренних слоев материала повышается до 0 °С, и начинается период испарения остаточной влаги. На этом этапе материал постепенно нагревается до температуры окружающей среды (температуры теплоносителя), а скорость сушки постепенно уменьшается до нуля.

Стерильные растворы антибиотиков сушатся в открытых флаконах, помещенных в кассеты и прикрытых тканью. Кассеты размещают на нескольких лодках прямоугольного или цилиндрического шкафа – сублиматора. В полые полки шкафа после создания в системе вакуума подают вначале холодную, а затем подогретую воду для подвода теплоты, необходимой для сублимации. В конце сушки температура воды повышается до 80 °С. Вакуум в шкафу создается двумя ступенями насосов. Форвакуумный (или газобалластный) по конструкции ротационно-масляный насос, включаемый в начале сушки, создает остаточное давление в несколько миллиметров ртутного столба. Затем пароструйный диффузионный насос снижает остаточное давление до 10–50 мк. Для уменьшения нагрузки на насос и защиты его от конденсата водяного пара в схеме предусмотрен скребковый или при больших мощностях установки трубчатый конденсатор. В скребковом конденсаторе на цилиндрической поверхности, охлаждаемой хладагентом до температур, более низких, чем в сублиматоре, пары воды конденсируются и замораживаются, образуя слой льда. Лед непрерывно снимается скребком в льдоприемник, откуда периодически удаляется.

Распылительная сушка. Сушка распылением – один из наиболее современных и перспективных методов обезвоживания лекарственных растворов термолabileй природы и пищевых продуктов (молоко, яйца). Принцип такого метода заключается в том, что высушиваемый раствор распыляется с помощью форсунок, струи сжатого воздуха или быстро вращающегося диска до частиц размером 5–25 мк в токе протекающего через сушильную камеру воздуха, нагретого до температуры порядка 160 °С. Величина поверхности частиц около 0,5 млн м² на 1 м³ раствора обеспечивает сушку в течение долей секунды. Высушенный продукт в виде порошка отделяется от отработавшего теплоносителя в специальных пылеотделителях.

Киносъёмка процесса сушки одиночных капель раствора стрептомицина, проведенная О. А. Кремневым и соавторами, позволила выявить пять этапов сушки капель коллоидных растворов: прогрев капли; сушку с постоянной скоростью при температуре, равной температуре мокрого термометра (около 40 °С); образование при влажности 20,0–25,0 % на поверхности капли корки из сухого стрептомицина, препятствующей выходу пара, и повышение температуры капли до температуры кипения (≈ 105 °С); сушку капли с постоянной скоростью при температуре кипения; сушку с падающей скоростью, приближающейся к температуре окружающей среды.

Такой характер кинетики сушки капель позволил сделать вывод о целесообразности разделения процесса обезвоживания высоковолаж-

ных растворов антибиотиков на два этапа в целях интенсификации и удешевления процесса.

1. Поскольку на этапе испарения от начальной влажности, равной 16,0–20,0 %, до влажности коркообразования капля имеет низшую температуру, длительность ее пребывания в камере можно выбирать произвольно. Теплоноситель целесообразно использовать в максимальной степени, т. е. удалять его с температурой на 3–5 °С выше температуры раствора, а относительную влажность доводить до 90 %. Скорость теплоносителя по сечению камеры для интенсификации процесса можно брать в 3–8 раз больше, чем в сушильной камере, а размеры камеры делать в 1,5–2 раза меньше размера факела распыленного материала.

2. Сушка от влажности коркообразования (20,0–25,0 %) до конечной влажности 1,5 % осуществляется в течение минимального времени, так как испарение термолabile раствора происходит при температуре его кипения. Это достигается применением очень сухого воздуха (конечная относительная влажность 4–6 %) и малым расходом высококонцентрированного раствора. Такие условия позволяют также увеличить скорость теплоносителя по сравнению с одноступенчатой сушилкой. Отработанный теплоноситель со ступени сушки с температурой 100...105 °С подается на испарительную ступень и полностью используется.

Применение такого двухступенчатого испарительно-сушильного метода обезвоживания стрептомицина при внедрении на Киевском заводе медицинских препаратов позволило по сравнению с одноступенчатой распылительной сушилкой датской фирмы *Niro atomizer* увеличить коэффициент использования тепла теплоносителя с 25 до 75 %, повысить выход антибиотика (с учетом потерь на вакуум-выпарке, необходимой при одноступенчатом режиме) с 85 до 93 % и снизить себестоимость процесса обезвоживания стрептомицина с 0,98 до 0,34 р/кг стрептомицина.

Воздух всасывается из атмосферы через тканевой фильтр грубой очистки вентилятором и нагнетается через фильтр Петрянова, паровой калорифер и электрокалориферы в испарительную ступень емкостью 7 м³. Воздух с температурой 165 °С подается в камеру через газораспределительное устройство. Стерильный раствор стрептомицина подается на диск, вращающийся со скоростью 18 тыс. об/мин. Поток воздуха, проходя между потолком камеры и радиальным факелом распыляемого раствора, предупреждает оседание раствора на потолке камеры. Затем воздух поворачивает вниз. Испарение раствора уменьшает его объем в четыре раза. Раствор влажностью 25,0–30,0 % отделяется на 98–99 % от воздуха в мокром циклоне. Воздух выбрасывается в атмосферу, а рас-

твор немедленно распыляется на диске сушильной камеры емкостью 17 м³. Подача теплоносителя в сушильную камеру производится из аналогичной системы стерилизации и нагрева атмосферного воздуха. Порошок антибиотика отделяется от отработанного воздуха в циклоне и выгружается в герметичное устройство для стерильной фасовки антибиотика в контейнеры. Отработанный воздух, содержащий около 7 % порошка антибиотика, направляется в испарительную камеру, где благодаря малой влажности используется как вторичный сушильный агент.

Сушильные камеры изготавливаются из полированной нержавеющей стали и имеют форму цилиндра с конусным дном.

Производительность сушилки составляет 200 л/ч испаренной влаги. Система автоматических приборов регулирует температуру теплоносителя на входе в камеры и расход раствора.

Сравнение молекулярной и распылительной сушки. С экономической точки зрения оба метода в настоящее время приблизительно равноценны. Молекулярная сушка требует в 2,7 раза больше производственной площади и в 2,1 раза большего расхода электроэнергии, а также более высоких трудовых затрат. Вместе с тем выход антибиотиков при молекулярной сушке (97–98 %) выше, чем при распылительной (92–94 %). Если же учесть потери при фасовке порошка антибиотиков, то снижение выхода ниже 90 %, наблюдающееся в практической работе предприятий, сводит к нулю экономические преимущества распылительного метода. При более тщательной отработке режима недавно освоенной двухступенчатой распылительной сушилки и устранения конструктивных недостатков ее экономические показатели станут, несомненно, выше показателей молекулярной сушки.

Однако молекулярная сушка имеет преимущества в качестве препаратов – более важным показателем для антибиотиков медицинского парентерального применения, чем экономический. Сушка при отрицательной температуре под вакуумом обеспечивает сохранение качества – растворимость, бесцветность, апиrogenность, отсутствие опалесценции растворов и пр. Отпадает необходимость последующей фасовки, а это обеспечивает сохранение стерильности.

При распылительной сушке 7 % антибиотика, возвращаемые со второй ступени на первую, сушатся повторно. Этот и некоторые другие технические особенности процесса (например, полидисперсность распыла) снижают качество продукта. По мере освоения распылительной сушки качество сухого продукта будет повышаться.

В производстве антибиотиков перспективны оба рассмотренных метода сушки растворов антибиотиков.

15.6. Применение антибиотиков

Антибиотические вещества широко используются в медицине, сельском хозяйстве, пищевой промышленности, как специфические ингибиторы в биологических исследованиях.

Антибиотики в медицине. Открытие антибиотиков вызвало переворот в медицине. Многие антибиотические вещества оказались незаменимыми лечебными препаратами при лечении инфекционных заболеваний, которые ранее считались неизлечимыми или сопровождались высокой степенью летального исхода. К ним относятся некоторые формы туберкулеза, и прежде всего туберкулез менингитный, который до применения антибиотиков вызывал 100 %-й летальный исход, чума, азиатская холера, брюшной тиф, бруцеллез, пневмония, различные септические процессы и др.

Некоторые антибиотики способны подавлять развитие злокачественных опухолей и проявлять активность в отношении ряда вирусов.

К настоящему времени в медицинской практике применяется около сотни антибиотиков. Поиски новых антибиотических веществ, получение ценных полусинтетических препаратов антибиотиков расширяют возможность их практического применения в медицине.

Антибиотики в сельском хозяйстве. Прежде всего в сельском хозяйстве антибиотики используются в качестве препаратов в ветеринарии для лечения различных заболеваний сельскохозяйственных животных. В этом случае они, как и в медицине, оказались весьма эффективными средствами. Антибиотические вещества применяются также в борьбе с фитопатогенными организмами – возбудителями заболеваний растений, наносящими ощутимый урон сельскохозяйственному производству. При выборе антибиотика, используемого в растениеводстве, руководствуются следующими основными требованиями к препарату:

- наличие специфической биологической активности к возбудителю заболевания растений;
- способность легко проникать в ткани растений и проявлять внутри них биологическую активность;
- безвредность лечебных доз для растения;
- при нахождении на поверхности и внутри тканей растения относительно длительное время проявления биологической активности, а также легкая и быстрая инактивация при попадании в почву.

Одним из самых главных требований к антибиотикам, используемым в сельском хозяйстве, должен быть факт того, что эти препараты не применяются в медицинской практике. Это принципиальное условие обеспечивает снижение уровня появления резистентных форм микроорганизмов, патогенных для человека.

Для борьбы с фитопатогенными организмами могут применяться различные антибиотики.

Гризеофульвин образуется плесневыми грибами из рода *Penicillium* (*P. urticae*, *P. nigricans*, *P. rustriichi*). Его применяют против фитопатогенных грибов, прежде всего грибов, относящихся к роду *Botrytis*. Он активен в отношении возбудителя ржавчины, мучнистой росы, килы капусты.

Трихотецин продуцируется плесневым грибом *Trichothecium roseum* и подавляет развитие ряда фитопатогенных грибов, в том числе *Botrytis cinerea*, *Helminthosporium*. Попадая в почву, трихотецин инактивируется ферментом трихотециназой, образуемой почвенными грибами из рода *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*.

Касугамицин, продуцируемый *Streptomyces kasugaensis*, активен против грибного заболевания риса пирикулярриоза, широко распространенного в Японии. Заболевание вызывается грибом *Pericularia oryzae*.

Полиоксины-антибиотики, относящиеся к своеобразным соединениям пептидил-пиримидин-нуклеозидам, обладают противогрибковой активностью. Образуются культурой *Streptomyces cacaoi*, подавляют рост фитопатогенных грибов из родов *Alternaria*, *Cochliobalus*, *Pirularia*.

Валидамицин А, образуемый *Streptomyces hygrosopicus* var. *limoneus*, обладает биологической активностью против фитопатогенного гриба *Rizoctonia solani* – возбудителя заболевания риса. Известна суммарная формула валидамицина А: $C_{20}H_{35}NO_{13} \cdot H_2O$. Антибиотик легко разлагается почвенными микроорганизмами.

Тетранастин – антибиотическое вещество актиномицетного происхождения. Его продуцент – *Streptomyces aureus*. Обладает специфической активностью против паразитарных паучков и клещей плодовых деревьев.

Гербицидины А и В, синтезируемые *Streptomyces saganensis*, подавляют развитие возбудителя заболевания риса, вызываемое *Xanthomonas oryzae*. Гербицидин А задерживает прорастание семян риса и китайской капусты, обладает избирательной гербицидной активностью против двудольных растений. По химическому строению и биологической активности гербицидины А и В близки к тойокамицину, образуемому культурой *Str. toyocaensis*.

Антибиотики в пищевой промышленности. При борьбе с микроорганизмами, вызывающими порчу продуктов питания, наряду с фи-

зическими и химическими методами применяются и антибиотики. Однако для этих целей не могут быть использованы антибиотики, применяемые в медицине. Это правило введено в нашей стране и других государствах и связано с предупреждением процесса возникновения и распространения устойчивых к антибиотикам форм микробов.

Среди антибиотиков, применяемых в пищевой промышленности, можно назвать субтилилин, низин и некоторые другие.

Субтилилин образуется культурой *Bacillus subtilis* и представляет собой полипептид. Он активен в отношении грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов, в том числе и кислотоустойчивых бацилл. Применяя субтилилин при консервировании овощей, можно значительно смягчить их термическую обработку, что имеет большое значение для сохранения витаминов, вкусовых качеств и консистенции продукта.

Низин – высокомолекулярный пептид, а может быть, даже низкомолекулярный белок, образуемый *Streptococcus lactis*.

Низин не используется в медицинской практике. Его применяют при консервировании томатов, зеленого горошка, цветной капусты и других продуктов. Хорошие результаты получены при сохранении сыров.

Антибиотик подавляет развитие ряда термофильных спорообразующих бактерий, не токсичен для человека.

Применение антибиотиков в растениеводстве, пищевой промышленности должно происходить под постоянным и строгим контролем специалистов и соответствующих компетентных органов.

Глава 16 **ПРОИЗВОДСТВО МЕЛАНИНОВ**

Меланины (греч. *melanos* – черный) – обычно черные или темно-коричневые пигменты животных, растений и микроорганизмов. У высших животных и человека меланины – основная группа пигментов. У животных меланины придают окраску шерсти, у птиц – оперению, у человека ответственны за цвет глаз, волос, окраску кожи.

Меланины – аморфные высокомолекулярные вещества. Обширную группу природных конденсированных фенолов составляют меланиновые пигменты, имеющиеся у всех живых организмов. Охарактеризовать их можно как класс соединений с низкой токсичностью, обладающих разнообразным биологическим действием. Эти свойства могут найти широкое применение в профилактической и клинической медицине. Более глубоко изучены меланины млекопитающих и растений: не растворимы в воде, минеральных кислотах, органических растворителях; хорошо растворяются в щелочах, а затем выпадают в осадок при подкислении растворов, что используется для их выделения. Химическое разрушение меланинов происходит при нагревании выше 200 °С, сплавлении со щелочью, окислении концентрированными растворами KMnO_4 или H_2O_2 .

По предшественникам меланинов в организме их разделяют на эумеланины, феомеланины и алломеланины. Эумеланины (черные) и феомеланины (желтые, красные и коричневые) распространены у животных, алломеланины (черные) – в растениях, грибах, бактериях. Предшественник эумеланинов – тирозин, из которого в организме образуются пигменты, содержащие С, Н, N и О. Предшественники феомеланинов – тирозин и цистеин – в организме превращаются в серо-содержащие пигменты. Предшественники алломеланинов – дифенолы

(пирокатехин и др.), из которых образуются меланины, не содержащие азота. В организмах меланины находятся в комплексе с белками.

Многие свойства и биологические функции меланинов определяются их способностью функционировать в организме в виде системы «фенол – семихинон – хинон». Механизм образования меланинов окончательно не выяснен. Полагают, что первые стадии биосинтеза меланинов являются ферментативными и катализируются оксидоредуктазами (например, тирозиназой, полифенолоксидазой и др.), а последующие протекают спонтанно с участием свободных радикалов.

Меланины могут быть получены автоокислением 3,4-дигидрокси-фенилаланина (ДОФА), 5,6-дигидроксииндола и других дифенолов.

Меланины характеризуются наличием в их структуре неспаренных электронов и обладают свойствами стабильных свободных радикалов. Эта особенность меланинов важна для выполнения защитных функций в организме. Они не только поглощают различные излучения, но и нейтрализуют и обезвреживают опасные для клеток свободные радикалы, образующиеся при действии ионизирующего излучения и некоторых химических веществ на живые организмы.

Меланины могут существовать в нескольких окислительно-восстановительных состояниях, обладают электрон-транспортными свойствами.

У животных и человека процесс образования меланинов в организме происходит в специальных клетках – меланоцитах – и регулируется гормональной системой, главным образом с помощью гормонов гипофиза (α - и β -меланоцитстимулирующих гормонов). Некоторые физические факторы (солнечные, УФ- и рентгеновские лучи) и химические реагенты стимулируют образование меланинов в организме. Их повышенное содержание наблюдается также в некоторых злокачественных опухолях-меланоммах.

Получение меланина из грибов. Меланин из *Aspergillus niger* был получен по общепринятой методике. Культивирование продуцента проводили на минеральной среде, содержащей глюкозу, при 26 °С до появления сильной пигментации мицелия. Мицелий отделяли фильтрованием, промывали дистиллированной водой и замораживали при –16 °С; подвергали щелочному гидролизу (0,1 М NaOH) с последующим осаждением концентрированной HCl. Полученный осадок центрифугировали при 7000 g в течение 30 мин, промывали дистиллированной водой, затем снова центрифугировали и диализовали. Диализ проводили не менее 24 ч и заканчивали при достижении диализуемого раствора

pH = 4,5. Диализированный препарат грибного меланина высушивали при 40 °С.

При применении такой же методики меланиновые пигменты были получены из базидиомицетов *Inonotus obliquus* (трутовик скошенный, или чага), *Phellinus robustus* (трутовик ложного дуба) и *Phellinus igniarius*. Очищенные меланиновые пигменты могут быть использованы для создания фармакологических препаратов, обладающих разнообразными протекторными свойствами, например противовоспалительный и противоязвенный препарат бефунгин получен из чаги березовой – стерильной формы гриба *Inonotus obliquus*.

Способ микробиологического получения меланина. Изобретение относится к области микробиологического синтеза органических соединений. При реализации способа проводят культивирование штамма дрожжей *Saccharomyces neoformans* var. *nigricans* на углеродсодержащих средах при 27...35 °С и pH культуральной жидкости 4,5–5,5 в условиях аэрации и при перемешивании. Полученную биомассу отделяют от культуральной жидкости с последующим выделением целевого продукта. Способ позволяет сократить время синтеза и повысить выход меланина.

Меланины представляют собой черные, коричневые и желтые пигменты. Молекулы меланинов – это сложные комплексы, образованные полимерами производных тирозина и белков. Молекулярная масса меланина зависит от способа его получения.

Приведем примеры получения меланина.

1. Дрожжи штамма *Saccharomyces neoformans* var. *nigricans* ГСП-ТБ 17 Д выращивали в аппарате, конструкция которого обеспечивала аэрацию культуральной жидкости при перемешивании и термостатировании, объемом 5 дм³ на питательной среде, содержащей в качестве источника углерода отход спиртового производства в количестве 4 % объема культуральной жидкости, а также в качестве источников минерального питания сульфат аммония (6 г/дм³), однозамещенный фосфат калия (1,5 г/дм³), сульфат магния (0,5 г/дм³), сульфат марганца, сульфат цинка, сульфат железа (II) и сульфат меди по (0,05 г/дм³); pH культуральной среды составил 5,5 при температуре 30 °С, режим аэрации – 1 мл газа/мл культуральной среды · мин. При этом в течение 20 ч культивирования была получена суспензия, содержащая 3,9 % биомассы. Биомассу обработали 0,5 М гидроксидом натрия при давлении 0,5 атм в течение 30 мин. Клетки дрожжей осадили центрифугированием. Фугат подкислили 40 %-й соляной кислотой до pH = 3,2. В результате

вышеуказанных операций меланин выпал в осадок. Осадок центрифугировали при 5 тыс. об/мин в течение 15 мин с последующей последовательной промывкой водой и этиловым спиртом. В результате было получено 4,5 г меланина, что составило выход 2,5 % от субстрата и 3,1 % от содержания биомассы.

2. Дрожжи штамма *Saccharomyces neoformans* var. *nighcans* выращивали в аппарате, конструкция которого обеспечивала аэрацию культуральной жидкости при перемешивании и термостатировании, объемом 5 дм³ на питательной среде, содержащей в качестве источника углерода смесь мелассы с углеводородами в соотношении 10 : 1 в количестве 6 % объема культуральной жидкости, а также в качестве источников минерального питания сульфат аммония (5,8 г/дм³), однозамещенный фосфат калия (1,6 г/дм³), сульфат магния (0,6 г/дм³), сульфат марганца, сульфат цинка, сульфат железа (II) и сульфат цинка по 0,045 г/дм³; рН культуральной среды составил 5,6 при 30 °С, режим аэрации – 1,1 мл газа/мл культуральной среды · мин. При этом в течение 18 ч культивирования была получена суспензия, содержащая 3,5 % биомассы. Биомассу обработали 0,5 М гидроксидом калия при давлении 0,5 атм в течение 30 мин. Клетки дрожжей осадил центрифугированием при 5 тыс. об/мин в течение 20 мин. Фугат содержал 70 % меланина, 15 % белков и 6 % липидов. В результате выход продукта составил 13,8 % от исходной биомассы, при этом чистого меланина получено 6,9 % от содержания биомассы.

3. Дрожжи штамма *Saccharomyces neoformans* var. *nigricans* выращивали в аппарате, конструкция которого обеспечивала аэрацию культуральной жидкости при перемешивании и термостатировании, объемом 5 дм³ на питательной среде, содержащей в качестве источника углерода отход спиртового производства в количестве 4 % объема культуральной жидкости, а также в качестве источников минерального питания сульфат аммония (6 г/дм³), однозамещенный фосфат калия (1,5 г/дм³), сульфат магния (0,5 г/дм³), сульфат марганца, сульфат цинка, сульфат железа (II) и сульфат меди по 0,05 г/дм³; рН культуральной среды составил 5,5 при температуре 30 °С, режим аэрации – 1 мл газа/мл культуральной среды · мин. При этом в течение 18 ч культивирования была получена суспензия, содержащая 3,3 % биомассы. Биомассу обработали ультразвуковыми колебаниями частотой 50–100 кГц в течение 5 мин. Клетки дрожжей осадил центрифугированием. Фугат пропустили через мембранный фильтр фирмы *Millipore* с размером пор 0,45 мкм. Полученный продукт содержал 98 % меланина.

4. Для получения меланина путем микробиологического синтеза в качестве углеродсодержащего сырья использовали молочную сыворотку. Дрожжи штамма *Saccharomyces neoformans* var. *nigricans* выращивали в аппарате, конструкция которого обеспечивала аэрацию культуральной жидкости при перемешивании и термостатировании, объемом 10 дм³ на молочной сыворотке с содержанием сухих веществ 6 %. В качестве источников минерального сырья использовали сульфат аммония (4 г/дм³), однозамещенный фосфат калия (1,0 г/дм³), сульфат меди (0,1 г/дм³), сульфат железа (II) (0,01 г/дм³); рН культуральной среды составил 5,5 при 30 °С, режим аэрации – 1 мл газа/мл культуральной среды · мин. При этом в течение 20 ч культивирования была получена суспензия, содержащая 2,6 % биомассы. Для извлечения меланина биомассу обрабатывали в ультразвуковом дезинтеграторе при частоте колебаний 100 кГц в течение 30 мин, затем дезинтегрированные клетки дрожжей осаждали центрифугированием. Фугат подкислили соляной кислотой до рН = 3,0 и отделили центрифугированием осадок. Полученный продукт содержал 91 % меланина.

В результате проведенных экспериментальных работ установлено, что молекулярный вес получаемого меланина зависит от условий проведения эксперимента.

Глава 17 ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ ПРОИЗВОДСТВА АЛКАЛОИДОВ

17.1. Определение алкалоидов

Алкалоиды – гетероциклические азотсодержащие вещества щелочного характера, обладающие сильным физиологическим действием. Во второй половине XVIII в. и в начале XIX в. при изучении химического состава растений были выделены отдельно сложные производные гетероциклов, получившие впоследствии объединяющее название «алкалоиды» (лат. *alkali* – щелочи, *oides* – подобный, т. е. подобные щелочам). Данный термин введен В. Мейснером в 1819 г. Современное определение алкалоидам впервые дано в 1910 г. Э. Винтерштейном и Г. Триром. В определении сформулированы основные условия, которым должен отвечать истинный алкалоид:

- растительное происхождение;
- сложная молекулярная структура соединения;
- атом азота – часть гетероциклической системы;
- проявление высокой фармакологической активности.

В настоящее время классическое определение Винтерштейна – Трира несколько устарело, так как соединения, рассматриваемые большинством химиков и фармакологов как алкалоиды, не отвечают всем его требованиям. Это не удивительно, ведь известно свыше 5 тыс. алкалоидов, строение установлено примерно для 3 тыс.

Обратим внимание на некоторые недостатки определения Винтерштейна – Трира: многие вещества со структурой классических алкалоидов получены из материалов нерастительного происхождения (бактерии, грибы, ткани животных). Определение «сложная молекулярная структура соединения» слишком расплывчато и не дает представления

о положении в целом. Словосочетание «высокая фармакологическая активность» не слишком корректно, так как фармакологическая активность веществ во многом зависит от уровня доз и проявляется при достаточном содержании многими веществами, не имеющими отношения к алкалоидам. Учитывая все вышперечисленное, было предложено новое определение понятия «алкалоид», которое, безусловно, охватывает большее число соединений, исключая тем не менее такие классы природных азотсодержащих соединений, как аминокислоты, аминсахара, алифатические амины, белки и пептиды, нуклеотиды, нуклеиновые кислоты, витамины, птерины, порфирины. Новое определение, сформулированное У. Плетье, заключалось в том, что алкалоид – это циклическое органическое соединение, содержащее азот в отрицательной степени окисления и имеющее органическое распространение среди живых организмов. Это определение отвечало необходимым условиям и получило повсеместное признание. Достоинство состоит в том, что в нем подтверждается отнесение к алкалоидам большинства тех соединений, которые традиционно считаются алкалоидами, но не подходят под классическое определение Винтерштейна – Трира: это, например, колхицин, пиперин, β -фенилэтиламины, ригинин, генцианин, буфотоксин.

17.2. Способы выделения алкалоидов

Основной проблемой при выделении алкалоидов является отделение вещества от «балластного» материала, составляющего главную массу растительного сырья. В случае с легколетучими алкалоидами выделение производится путем отгонки с водяным паром, однако это редкость. Поскольку алкалоиды обычно находятся в растении в виде различных кислот, то необходимо сначала освободить их путем смачивания измельченного растения раствором щелочи.

Нередко для извлечения алкалоидов прибегают к экстракции при помощи подходящих растворителей. Подобные методики делятся на две группы: экстракция в виде солей и экстракция в виде свободных оснований.

Экстракция алкалоидов в виде солей. Растительное сырье обрабатывается подходящим растворителем, к которому прибавляется небольшое количество какой-либо кислоты (укусная, соляная, винная, лимонная и др.). Экстракция ведется обычно в конических экстракционных аппаратах (перколяторах), в которые загружается мелко размо-

лотое сырье и заливается растворитель. После настаивания в течение нескольких часов раствор медленно выпускают через кран, имеющийся в нижней части перколятора, а сырье снова заливают свежим растворителем и продолжают так до полного извлечения, т. е. до того момента, когда в пробе жидкости, стекающей из перколятора, при помощи подходящих качественных реакций не удастся больше открыть присутствие алкалоида. Более совершенной является непрерывная перколяция; при этом способе по мере того как из крана перколятора медленно сливается раствор, в верхнюю его часть автоматически добавляется такое же количество свежего растворителя. При наличии аппаратуры целесообразно осуществлять экстракцию в нескольких перколяторах по принципу противотока: раствор, вытекающий из первого перколятора, поступает на свежее сырье, находящееся во втором перколяторе; из второго обогащенный раствор поступает на свежее сырье в третьем перколяторе и т. д. В результате удастся получить более концентрированные растворы алкалоида и обойтись меньшим количеством растворителя. На производстве устанавливаются «экстракционные батареи», состоящие из 5–10 перколяторов.

Соли алкалоидов обычно растворимы в воде, спиртах (метиловый и этиловый) и нерастворимы в эфире и углеводородах, поэтому при извлечении алкалоидов в виде солей в качестве растворителя обычно применяется вода или спирт. Хотя экстракция алкалоидов идет в большинстве случаев легко и быстро, однако этот способ имеет недостаток: в спирте, а особенно в воде, из растений наряду с алкалоидами извлекается большое количество так называемых экстрактивных веществ (белки, смолы, дубители, слизи и др.), присутствие которых часто затрудняет обработку таких растворов.

Экстракция алкалоидов в виде свободных оснований. Необходимо предварительно выделить алкалоиды, находящиеся в растении в виде солей, что достигается обработкой щелочью. Иногда для этого слегка влажный порошок растительного сырья тщательно смешивают с сухим основанием (оксид магния или известь), а затем подвергают экстракции. В других случаях растение смачивают и тщательно растирают с раствором щелочи (аммиак, сода, гидроксид натрия) и затем подвергают экстракции в перколяторе. Поскольку свободные алкалоиды растворимы не только в воде и спирте, но и в большинстве органических растворителей, то выбор подходящего растворителя в этом случае гораздо богаче. Чаще всего применяют бензол, дихлорэтан, реже пользуются эфиром, хлороформом, четыреххлористым углеводородом, пе-

тролейным эфиром и керосином. Сама экстракция ведется путем перколяции совершенно так же, как в случае экстракции в кислой среде.

Выбор подходящей щелочи – важный момент, так как многие алкалоиды очень чувствительны к действию сильных щелочей и могут при этом подвергаться нежелательным изменениям. Иногда алкалоид представляет собой настолько сильное основание, что для его выделения из солей недостаточно слабых оснований вроде аммиака.

Предварительная экстракция. Для отделения смеси алкалоидов от балластных веществ применяется способ предварительной очистки сырья. Для этого сырье сначала обрабатывают какой-либо слабой кислотой (или солью, имеющей слабокислую реакцию) и подвергают экстракции бензолом или петролейным эфиром. Алкалоиды, связанные в виде солей, в эти растворители не переходят, а растворитель извлекает только нейтральные или кислые экстрактивные вещества. После предварительной очистки растительный материал снова обрабатывают подходящей щелочью и вторично извлекают по тому же способу. Раствор алкалоидов при этом получается более чистым, содержащим гораздо меньше посторонних веществ, и выделение из него чистых оснований значительно облегчается. Однако вследствие громоздкости и большой затраты времени этот метод применяется только в исключительных случаях там, где приходится иметь дело с сырьем, особо богатым балластными веществами, или в случае очень чувствительных и легко изменяющихся алкалоидов.

Экстракты, полученные тем или иным способом, содержат алкалоиды (и балластные вещества) или в виде солей, или в свободном виде. Сообразно с этим их дальнейшая обработка несколько отличается.

Далее проводится обработка экстрактов. При этом для выделения алкалоидов из водных, кислых растворов их солей эти растворы подщелачиваются и алкалоиды отсасываются (если они труднорастворимы в воде и прямо выпадают в твердом виде) или же извлекаются подходящим растворителем (эфир, хлороформ, бензол, амиловый спирт и др.), не смешивающимся с водой. Такую обработку часто проводят многократно.

В случае спиртовых кислых растворов необходимо сначала удалить спирт, что делается путем отгонки на водяной бане; остающаяся после этого густая масса обрабатывается водой (или разбавленной кислотой), причем часть смолистых веществ остается нерастворенной и отделяется путем фильтрации. Эти смолы часто адсорбируют значительное количество алкалоидов, так что приходится обрабатывать их несколько раз горячей водой (или разбавленной кислотой) до полного выделения из них алкалоидов.

В последнее время для выделения алкалоидов из водных или кислых диффузионных соков применяется более простой метод адсорбции.

В качестве адсорбента обычно используются угли и ионообменные адсорбенты: природные глины или искусственные смолы.

Растворы свободных алкалоидов в не смешивающемся с водой растворителе, полученные путем щелочной экстракции растения, обычно значительно чище, чем водные и спиртовые экстракции, т. е. содержат меньше балластных веществ. Для получения из них алкалоидов эти растворы сначала взбалтываются с разбавленной кислотой (1–5 %), в которую переходят все алкалоиды. Последние таким образом сразу концентрируются в сравнительно небольшом объеме жидкости. Этот кислый раствор подвергается обычной очистке, подщелачивается, и алкалоидная смесь или отсасывается, или снова извлекается органическим растворителем.

Разделение алкалоидов на основании различных температур кипения. Этот метод используется в случае, когда алкалоиды, находящиеся в смеси, сильно отличаются один от другого по своей температуре кипения. Таким образом возможно разделить их путем дробной перегонки.

Методы, основанные на различии в растворимости. Различие в растворимости алкалоидов и их солей в разных растворителях является основой наиболее часто применяемых методов их разделения и очистки. Уже при извлечении «суммы алкалоидов» из первичного кислого раствора, полученного при экстракции, путем применения различных несмешивающихся органических растворителей можно достигнуть частичного разделения смеси. Так, например, при взбалтывании подщелоченного раствором эфира в последний переходит часть алкалоидов, тогда как часть остается в водном растворе и извлекается из него только при использовании другого растворителя, например хлороформа или бензола. Такое частичное разделение алкалоидной смеси на две или более группы применялось, например, в случае алкалоидов кактуса *Anhalonium*. Это разделение, конечно, никогда не бывает полным и представляет собой только первое грубое фракционирование.

Разделение на основании различной «силы основности». Метод базируется на том, что различные алкалоиды обладают разной «силой основности». Если к смеси таких алкалоидов прибавить количество кислоты, недостаточное для нейтрализации всей массы, то в первую очередь с кислотой свяжутся наиболее сильные основания, тогда как более слабые останутся свободными. Наоборот, если к раствору смеси алкалоидов в теоретическом количестве какой-либо кислоты прибавить

количество щелочи, недостаточное для освобождения всей суммы алкалоидов, то в первую очередь разложатся соли наиболее слабых оснований, тогда как сильные останутся в связанном с кислотой виде. Разделение этим способом обычно бывает неполным, в особенности при сложных смесях, и в отдельных фракциях наблюдается обогащение одним из оснований. Для полного разделения и очистки этот метод комбинируют с другими способами, основанными на кристаллизации солей или свободных оснований.

Разделение на основании различной адсорбционной способности (хроматография). Метод хроматографии состоит в том, что через колонку, наполненную адсорбентом, пропускается испытуемый раствор, содержащий несколько алкалоидов. После того как раствор полностью проникает в слой адсорбента, колонку промывают органическим растворителем или смесью нескольких растворителей и собирают отдельные фракции вытекающей из колонки жидкости. Дальнейшая обычная обработка отдельных фракций позволяет выделять индивидуальные соединения.

Разделение путем получения производных алкалоидов. Данный метод используется в случаях, когда алкалоиды, находящиеся в смеси, различаются такими химическими особенностями, которые позволяют разделить их путем получения каких-либо подходящих производных. Этот метод разделения основывается на том, что один из алкалоидов вступает в реакцию с каким-либо реактивом, тогда как другой остается неизменным. Свойства образовавшегося таким образом производного первого алкалоида (растворимость и пр.) часто сильно отличаются от свойств исходного вещества и позволяют провести его разделение обычным методом кристаллизации. Основным условием при этом является то, что алкалоид должен легко получаться обратно из производного и не должен претерпевать при этом никаких существенных изменений.

Глава 18 ПОЛУЧЕНИЕ ПРОДУКТОВ БРОЖЕНИЯ

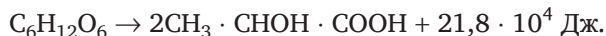
18.1. Молочнокислое брожение

При молочнокислом брожении конечный продукт – это молочная кислота. С ним люди знакомы издавна. Сквашивание молока, приготовление простокваши, кефира, квашение овощей – результаты молочнокислого сбраживания сахара молока или углеводов растений. Этот вид брожения осуществляется с помощью молочнокислых бактерий, которые делятся на две большие группы (в зависимости от характера брожения): *гомоферментативные*, образующие из сахара только молочную кислоту, и *гетероферментативные*, образующие кроме молочной кислоты спирт, уксусную кислоту, углекислый газ.

Гомоферментативное молочнокислое брожение вызывают бактерии рода *Lactobacillus* и стрептококки. Они могут сбраживать различные сахара с шестью (гексозы) или пятью (пентозы) углеродными атомами, некоторые кислоты. Однако круг сбраживаемых ими продуктов ограничен.

У молочнокислых бактерий нет ферментативного аппарата для использования кислорода воздуха. Кислород для них или безразличен, или угнетает развитие.

Молочнокислое брожение может быть описано уравнением



Гетероферментативное молочнокислое брожение – процесс более сложный, чем гомоферментативное: сбраживание углеводов приводит к образованию ряда соединений, накапливающихся в зависимости от условий процесса брожения. Одни бактерии образуют помимо молочной кислоты этиловый спирт и углекислоту, другие – уксусную кисло-

ту; некоторые гетероферментативные молочнокислые бактерии могут образовывать различные спирты, глицерин, маннит.

Гетероферментативное молочнокислое брожение вызывают бактерии родов *Lactobacterium* и *Streptococcus*. Химизм этих брожений изучен не так хорошо, как спиртового или гомоферментативного молочнокислого брожения.

Гетероферментативные бактерии образуют молочную кислоту иным путем. Последняя стадия – восстановление пировиноградной кислоты до молочной – та же самая, что и в случае гомоферментативного брожения. Но сама пировиноградная кислота образуется при ином расщеплении глюкозы – гексозомонофосфатном. Выход энергии гораздо меньше, чем при спиртовом брожении.

Гетероферментативные бактерии сбраживают ограниченное число веществ: некоторые гексозы (причем определенного строения), пентозы, сахароспирты и кислоты.

Молочнокислое брожение широко используется при выработке молочных продуктов: простокваши, ацидофилина, творога, сметаны. При производстве кефира, кумыса наряду с молочнокислым брожением, вызываемым бактериями, имеет место и спиртовое брожение, вызываемое дрожжами. Молочнокислое брожение происходит на первом этапе изготовления сыра, затем молочнокислые бактерии сменяются пропионово-кислыми.

Молочнокислые бактерии применяются при консервировании плодов и овощей, силосовании кормов. Чистое молочнокислое брожение применяется для получения молочной кислоты в промышленных масштабах.

Молочная кислота используется в производстве кожи, красильном деле, при выработке стиральных порошков, изготовлении пластмасс, в фармацевтической промышленности и во многих других отраслях, в кондитерской промышленности и для приготовления безалкогольных напитков.

Типичное и нетипичное молочнокислое брожение. Возбудителями *типичного молочнокислого брожения* являются следующие микроорганизмы: 1) *Bact. Streptococcus lactis* – небольшая бесспорная палочка, молодая культура имеет вид стрептококка; оптимальная температура для развития этой бактерии 30...35 °С; она сбраживает лактозу, глюкозу, галактозу и мальтозу; молочной кислоты накапливается в среде около 1 %; 2) *Bact. Delbrücki* представляет собой длинную бесспорную палочку, развивающуюся при температуре 45...48 °С; используется для производства молочной кислоты, количество которой достигает 2,2 %; в присутствии нейтрализующих агентов (мел) можно накопить до 10 % молочной кислоты; 3) *Bact. bulgaricum*, или болгарская палочка, – непод-

вижная беспоровая палочка длиной от 10 до 20 мкм, оптимальная температура для ее жизнедеятельности 40...48 °С. Эта бактерия накапливает наибольшее количество молочной кислоты, равное 3,2 %. Молочнокислые бактерии могут сбраживать различные сахара в зависимости от наличия в них тех или иных ферментов.

Нетипичным молочнокислым брожением называется такое, при котором наряду с молочной кислотой образуются и другие продукты, например этиловый спирт, уксусная и янтарная кислоты, углекислота и водород.

Количество получающихся продуктов колеблется. В среднем молочной кислоты образуется до 40 % от сброженного сахара, янтарной – около 20 %, уксусной кислоты и этилового спирта – по 10 %, и 20 % составляют газы. Представителями бактерий, вызывающих нетипичное молочнокислое брожение, являются *B. coif*, *B. pentoaceticum* и др. Нетипичному молочнокислому брожению подвергаются также пентозы. При брожении пентоз образуются молочная и уксусная кислоты:



Встречаются и так называемые ложные бактерии молочнокислого брожения, они размножаются при температуре 25...35 °С и образуют наряду с молочной другие кислоты.

Типичное и нетипичное молочнокислое брожение широко применяется в различных областях народного хозяйства. Первое используется для приготовления молочных продуктов (простокваша, кефир, кумыс и др.), кислого черного хлеба, получения молочной кислоты, консервирования фруктов и овощей. Брожение пентоз имеет значение при силосовании кормов, так как в сене, соломе и в некоторых растениях содержатся пентозаны, гидролизующиеся до пентоз, которые превращаются в указанные выше кислоты, придающие силосу кислый вкус и предохраняющие его от загнивания.

18.2. Получение продуктов пропионовокислого брожения (витамин В₁₂)

Витамин В₁₂, или цианкобаламин, – важное биологическое соединение, активный гематопозитический фактор млекопитающих и ростовой фактор для многих видов микроорганизмов и животных.

Начало истории витамина В₁₂ положили исследования злокачественного малокровия (пернициозной анемии) – заболевания, поражающего в основном пожилых людей, но наблюдаемого иногда и у детей.

До 1926 г. это заболевание было неизлечимым и обычно кончалось смертью. При нем в организме вырабатываются аномально большие, недоразвитые и нестойкие эритроциты, общее количество которых значительно снижалось (в полтора – два раза). Заболевание поражает также и другие быстрорастущие ткани, например слизистую оболочку желудка (в результате прекращается секреция HCl) и нервные ткани. При этом часто наблюдается демиелинизация центральной нервной системы с нарушением координации движений (атаксия) и психотическими расстройствами. Внутримышечного введения 3–6 мкг витамина В₁₂ достаточно, чтобы вызвать ремиссию у пациента, больного пернициозной анемией.

В 1926 г. Дж. Мино и У. Мёрфи обнаружили, что с пернициозной анемией можно справиться, если употреблять в пищу сырую или слегка поджаренную печень из расчета 1/4 кг в день. И только 22 годами позднее из печени крупного рогатого скота были выделены первые красные кобальтсодержащие кристаллы витамина В₁₂. Позже выяснилось, что более богатым источником витамина могут служить жидкие ферментационные среды бактерий.

Структура витамина В₁₂ была впервые определена в 1956 г. Д. Ходжкин методом дифракции рентгеновских лучей. Это была самая крупная органическая молекула, структуру которой удалось определить методами рентгено-структурного анализа. Циклическая система витамина В₁₂ подобна циклической системе порфиринов; она состоит из четырех пиррольных колец с атомом кобальта в центре.

Нормальный уровень витамина В₁₂ в крови составляет $\sim 2^{-10}$ М или немного выше, однако у вегетарианцев этот уровень может опускаться ниже половины этой величины. Недостаточность фолиевой кислоты может вызывать также мегалобластическую анемию, а большой ее избыток – в некоторой степени уменьшить анемию у пациентов, больных злокачественным малокровием.

В тканях животных концентрация витамина очень низкая (в печени быка 1 мг/кг), чтобы использовать этот источник для промышленных целей. Активированный ил сточных вод содержит 4–10 мкг/кг витамина, но при этом требуется разделение большого числа различных форм (аналогов).

Химический синтез витамина В₁₂ очень сложен. Больше 10 лет потребовалось сотрудникам двух больших лабораторий – Д. Вудворта

и О. Эшенмозера – для осуществления химического синтеза витамина В₁₂, включающего 70 стадий. Поэтому в настоящее время витамин В₁₂ в промышленности получают исключительно биосинтетическим путем. Из 10 т ежегодно выпускаемого в мире витамина В₁₂ 3,5 т приходится на цианкобаламин (собственно витамин В₁₂), 2 т – на гидроксокобаламин, 1 т – на коэнзим В₁₂ и небольшое количество – на метилкобаламин; эти формы в указанных количествах используют в медицине. Остальное количество витамина применяют в животноводстве.

Витамин В₁₂ используют при лечении злокачественной анемии, цирроза печени, нервных и психических расстройств. Он широко применяется в производстве кормов. В настоящее время большинство комбикормов для свиней и птиц обогащают витамином В₁₂, особенно благоприятное действие на животных оказывает сочетание витамина В₁₂ с малыми дозами антибиотиков, в частности биомицина. Витамин В₁₂ воздействует на кроветворную функцию и обмен белков, принимает участие в регуляции оптимального содержания в организме животного метионина, валина, треонина, лейцина, изолейцина.

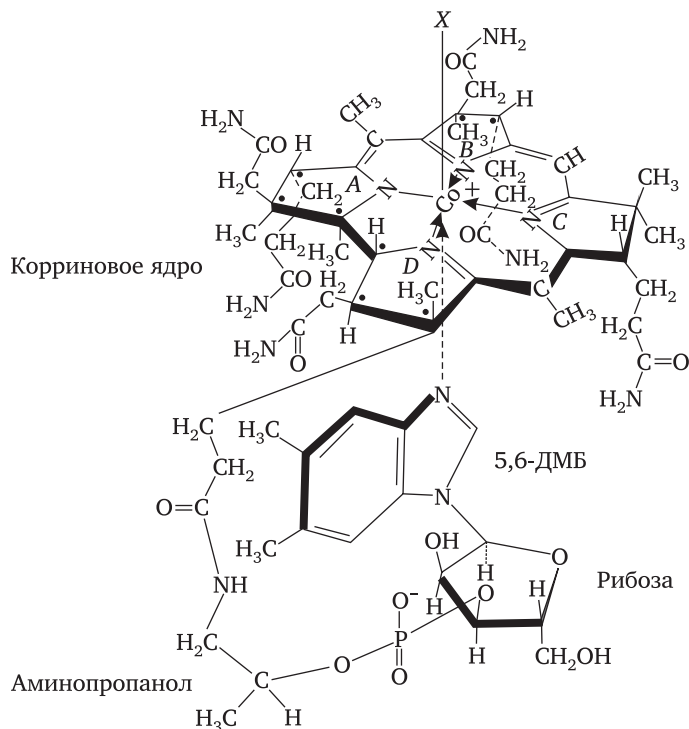
У птиц снижение содержания В₁₂ в желтке яиц приводит к резкому падению выводимости потомства. При добавлении В₁₂ в корма (10–15 мг/т) прирост поросят увеличивается на 10–15 %, цыплят – до 20 %, яйценоскость кур – со 180 до 208 яиц в год. При добавлении В₁₂ к кормам можно заменить животный белок растительным. Отечественная микробиологическая промышленность выпускает витамин В₁₂ двух марок: А – 200 мг/кг, В – не менее 500 мг/кг препарата.

Люди получают витамин В₁₂ с пищей и не могут усваивать витамин, выделяемый бактериями кишок. Животные получают витамин В₁₂ с кормом и утилизируют витамин, образуемый кишечной микрофлорой.

Молекулярная структура. Витамин В₁₂ – первое органометаллическое соединение, выделенное из биологической системы. Из неполимерных органических соединений оно имеет наиболее сложное строение. Молекула состоит из двух почти планарных циклических структур и линейного участка. Металл Со⁺³ связан с макроциклом, сильно напоминающим порфириновое ядро гема. Вторая кольцевая структура – азотистое основание – 5,6-диметилбен-зимидазол (5,6-ДМБ). Он соединен с первой кольцевой системой гетерогенной боковой цепью, состоящей из N-амино-2-пропанола (изопропанола), этерифицированного фосфатом 3-мононуклеотида, соединенного с основанием 5,6-ДМБ Na-гликозидной связью.

Структура витамина В₁₂ (рис. 13) не только очень сложная, но и содержит некоторые необычные части: 1) корриновую структуру, которая

ранее не была известна в органической химии (до открытия витамина В₁₂ в 1948 г. независимо С. Риксом и Д. Смитом); 2) Na-гликозидную связь, встречающуюся в природе очень редко и обнаруженную лишь в нескольких соединениях, содержащих рибозо-3-фосфат; 3) 5,6-ДМБ, принадлежащий к уникальным соединениям и встречающийся в природе только в составе кобаламинов.



Кобаламины:

$X = \text{CN}^-$ Цианкобаламин

$X = \text{CH}_3$ Метилкобаламин

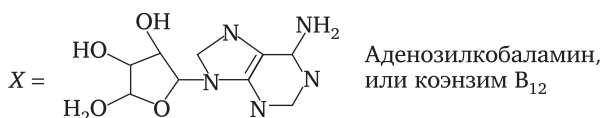


Рис. 13. Строение кобаламина

Атом кобальта имеет 6 координационных связей: 4 из них заняты пиррольными кольцами, одна – N-3-5,6-ДМБ и последняя – верхним лигандом (У), природа которого может варьировать. В коммерческом витамине В₁₂ (цианкобаламине) лиганд –CN-группа (артефакт процесса выделения).

Нижний лиганд (х)-5,6-ДМБ может быть заменен на аденин (псевдовитамин В₁₂), гуанин (фактор С), 2-метиладенин (фактор А) и др. Они могут проявлять активность для некоторых микроорганизмов, но неактивны для людей. Из всех соединений, подобных витамину В₁₂, только Со–В₁₂–I и Со–В₁₂–II (СН₃–В₁₂) активны на клеточном уровне и как кофакторы вовлекаются в катализ двух типов реакций. Аденозил В₁₂ используется в реакциях, в которых имеет место перестройка углерод-углеродных связей. Метил В₁₂ вовлекается в реакциях переноса метильных групп, например в синтезе метионина из гомоцистеина.

Биосинтез. Биосинтез витамина В₁₂ включает в себя ступени образования:

- порфиринового ядра;
- корринового ядра;
- кобаламинов.

Путь до уропорфирина III хорошо изучен в отличие от последующих ступеней от УПГ III к кобириновой кислоте.

В последние годы открыт ряд пигментированных интермедиатов – метилкорриноидов. Источником СН₃-групп служит S-аденозилметионин. Диметилкоррифирин идентичен сирогидрохлорину (сирогему микробной сульфитредуктазы), следовательно, этот интермедиат и, возможно, другие коррифирины имеют витаминнезависимую биологическую функцию.

Образование кобаламина состоит из амидирования семи карбоксильных групп корринового кольца, включения остатка изопропиламина (происходит из треонина), активации кобиамида с участием GTP и образованием GMP, нуклеотидного основания.

Включение атома кобальта в систему происходит вскоре после образования кобириновой кислоты. У бактерии *Prop. shermanii* все известные корриноиды, амидированные больше, чем кобириновая кислота, находятся в 5'-аденозильной форме. Аэробные и аэротолерантные формы синтезируют 5,6-ДМБ из рибофлавина через FMN. Для синтеза требуется кислород.

Анаэробы образуют 5,6-ДМБ другим способом, для которого необходимы глицин и метионин. 6-Аминолевулиновая кислота (6-АЛК) у аэробов образуется из глицина и сукцинил-СоА, а у анаэробов – из глутамата (как у растений).

Биосинтез витамина В₁₂ у бактерий происходит двумя независимыми путями, приводящими к образованию 5'-дезоксиаденозилкобинамидгуанозиндифосфата и α-рибазол-5'-фосфата, являющихся субстратами для конечной стадии синтеза.

Из клеток мутанта *E. coli* выделили 70S рибосомы, способные синтезировать витамин В₁₂ в реакционной системе. Основным катализатором синтеза является белок 18L. Белки 5S RNA также катализировали синтез витамина. Витамин В₁₂, синтезированный при участии изолированных рибосом, был биологически активным.

Гем оказывает ингибирующее действие на общие начальные пути синтеза корриноидов и порфиринов. Синтез витамина В₁₂ регулируется на уровне монометилкоррифина. Регуляция осуществляется с участием кобаламинов и аналогов, в которых 5,6-ДМБ замещен на аденин или метиладенин. Фактор В регулирующей активностью не обладает. На биосинтез витамина В₁₂ пропионовыми бактериями стимулирующее действие оказывает ион NH⁴⁺; в его отсутствие клетки витамин не синтезируют. Глутамин и аспарагин могут заменить ион NH⁴⁺. Стимулятором синтеза В₁₂ у микроорганизма *Ps. denitrificans* выступает бетин (триметилглицин).

Продуценты. Витамин синтезируют многие бактерии. Дрожжи и мицелиальные грибы не образуют корриноиды. В организме человека и животных витамин В₁₂ синтезируется исключительно бактериальной микрофлорой кишечника.

Таблица 10

Образование витамина В₁₂ различными штаммами

Штамм	Источник углерода	Выход, мг/л
<i>Micromonospora sp. Nocardia rugolaa</i>	Глюкоза	11,5
<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	Глюкоза-тростниковая меласса	14
<i>Propionibacterium Khermanii</i>	Глюкоза	25
<i>Propionibacterium vannielii</i>	Глюкоза	23–40
<i>Pseudomonas denitrificans</i>	Глюкоза	25
<i>Streptomyces olivaceus</i>		
<i>Bacterium FM-O2T</i>	Свеклосахарная меласса	59
<i>Methanobacillus omelianskii</i>	Глюкоза	35
<i>Protaminobacter ruber</i>	Лактоза	2,6
<i>Corynebacterium</i>	Метанол	8,8
<i>Rhodopseudomon</i>	Парафины	2,5

В табл. 10 перечислены микроорганизмы, которые в силу высокого уровня биосинтеза кобаламинов в разное время рассматривались как его потенциальные продуценты в промышленности. В настоящее время здесь используют в основном три штамма бактерий: *Pseudomonas denitrificans*, представителей рода *Propionibacterium* и метаногенные бактерии (смешанную культуру). Во всех случаях независимо от используемого штамма и условий культивирования в среду вводят ионы кобальта и часто 5,6-ДМБ. Добавление таких предшественников корриноидов, как глицин, треонин, 6-АЛК и аминопропанол, может оказывать стимулирующее действие на витаминобразование.

Получение витамина В₁₂ с помощью пропионово-кислых бактерий. В настоящее время для получения витамина В₁₂ используют следующие микроорганизмы: *Prop. freudenreichii* ATCC 6207, *Prop. shermanii* ATCC 13673, *Prop. shermanii* ВКМ-103, их варианты и мутанты. Наибольший интерес представляют штаммы, способные к самостоятельному синтезу 5,6-ДМБ. Поскольку синтез 5,6-ДМБ лучше происходит при доступе воздуха, осуществляют двустадийный процесс, в котором получают наиболее высокий выход продукта. На первой стадии культуру выращивают в анаэробных условиях до полной утилизации сахара. На второй включают аэрацию, тем самым создавая условия для синтеза 5,6-ДМБ и превращения этиокобаламина в дезоксикобаламин. Обе стадии осуществляют или в двух разных ферментерах, или в одном. Анаэробно выросшие клетки можно собрать путем центрифугирования и инкубировать густую суспензию на воздухе и, если нужно, в присутствии 5,6-ДМБ и цианида. Добавление ДМБ производят только на второй стадии ферментации (если бактерии не синтезируют его самостоятельно), поскольку в его присутствии образуются полные формы витамина, ингибирующие его синтез. Среда для ферментации обычно содержит глюкозу или инвертированную мелассу (10–100 г/л), небольшое количества солей Fe, Mn и Mg, а также Co (10–100 мг/л), источник азота. В среду добавляют кукурузный экстракт (30–70 г/л), содержащий молочную и пантотеновую кислоты, которые усиливают рост бактерий. Пантотеновую кислоту, стимулирующую также синтез витамина, рекомендуют вносить в среду дополнительно. Бактерии культивируют при 30 °С, поддерживая рН на уровне 6,5–7,0 путем введения (NH₄)ОН. Ферментацию производят в емкостях на 500 л, содержащих 340 л среды, инокулированных 7 л посевного материала. В первые 80 ч культура растет под небольшим давлением N₂ при слабом перемешивании (без аэрации), в следующие 88 ч включают аэрацию (2 м³/ч) и перемешивание. Возможны некоторые вариации в культивировании. Ви-

тамин В₁₂ сохраняется в клетках бактерий, поэтому его экстракцию проводят следующим образом:

- выделяют витамин из клеток и превращают его в цианокобаламин;
- выделяют неочищенный продукт (80 % чистоты), который можно использовать в животноводстве;
- далее очищают до уровня 91–98 % (для медицинских целей).

Для экстракции витамина из клеток последние нагревают при 80...120 °С в течение 10–30 мин при pH 6,1–8,5. Превращения в CN-баламин достигают, обрабатывая горячий раствор или клеточную суспензию цианидом или тиоцианатом, часто в присутствии NaNO₂ или хлорамина В. Корриноиды сорбируют на различных носителях: амберлите IRC-50, Al₂O₃, активированном угле – и элюируют водными спиртами или водно-фенольными смесями. Из водных растворов корриноиды экстрагируют фенолом или крезолом либо смесью этих спиртов с бензином, бутанолом, углеродистым тетрахлоридом или хлороформом.

При упаривании различных растворителей получают осадок или кристаллы витамина, которые растворяют в соответствующем растворителе до нужной концентрации.

Выход витамина В₁₂ при использовании пропионово-кислых бактерий – 25–40 мг/л. Но есть патентное сообщение (Франция) о достижении невероятно высокого выхода – 216 мг/л.

Получение витамина В₁₂ с помощью бактерии *Pseudomonas denitrificans*. Ряд штаммов рода *Pseudomonas* образует в значительных количествах *B₁₂*, но чаще всего используют мутант *Ps. denitrificans*, у которого в результате мутагенеза уровень витамина В₁₂ удалось поднять с 0,6 мг/л (дикий штамм) до 60 мг/л. Бактерии культивируют с аэрацией и при периодическом перемешивании (или проточных условиях) в среде следующего состава: свеклосахарная меласса – 100 г, дрожжевой экстракт – 2 г, MgSO₄ – 3 г, MnSO₄ – 200 мг, CoNO₃ – 188 мг, 5,6-ДМБ – 25 мг, ZnSO₄ – 20 мг, Na₂MoO₃ – 5 мг, вода водопроводная – до 1 л, pH 7,4. Меласса богата бетаином и глутаминовой кислотой, оказывающими положительный эффект на выход витамина. Бетаин стимулирует синтез б-АЛК и, возможно, изменяет проницаемость мембраны.

Культуру сохраняют в лиофилизированном состоянии, поддерживают в вышеприведенной среде. Пересев осуществляют в пробирку с плотной средой. Состав среды: свеклосахарная меласса – 60 г, пивные дрожжи – 1 г, MgSO₄ – 1 г, MnSO₄ – 200 мг, ZnSO₄ – 20 мг, MoSO₄ – 5 мг, агар – 25 г, вода водопроводная – до 1 л, pH 7,4. Инкубируют 4 дня при 28 °С. Далее клетки переносят в 150 мл жидкой среды того же состава (но без агара), помещенной в литровую колбу Эрленмейера. Инкубиру-

ют 3 дня при 28 °С на качалке. Содержимое колбы вносят в ферментер на 5 л, содержащий 3,3 л среды (см. выше), стерилизованный 75 мин при 120 °С. Инкубируют 90 ч при 29 °С с перемешиванием (420 об/мин) и аэрацией (0,2 м³/ч). Чистый витамин В₁₂ получают в результате проведения последовательных операций.

Получение витамина В₁₂ с помощью метаногенных бактерий.

В клетках метанобразующих бактерий витамин В₁₂ присутствует от 4,1 нМ/мг сухих клеток у *Methanosarcina barkeri* до 0,65 нМ/мг сухих клеток у *Metanobacterium formicum*. Биосинтез кобаламинов архебактериями (изучали на *M. barkeri*) сходен с биосинтезом корриноидов у анаэробных эубактерий. У метанотрофа *Mtb. thermoautotrophicum* большая часть клеточного кобамида локализована во фракции мембран и связана с мембранным белком. Предполагают, что содержащий кобамид интегральный мембранный белковый комплекс играет существенную роль в метаболизме этих бактерий при утилизации Н₂ + СО₂, которая, видимо, сводится к переносу электронов. Корриноиды у метанобразующих бактерий участвуют также в катаболизме ацетата и метанола. Превращение метанола в метан у *M. barkeri* происходит через образование СН₃-СоМ, в метилировании которого за счет метанола участвуют две метилтрансферазы, зависимые от кобамида. Корриноид, видимо, служит простетической группой фермента.

Во Франции из ила сточных вод выделили мезофильные метаногенные бактерии и инкубировали их в ассоциации с другими бактериями в полупроточном режиме в среде, содержащей метанол (3–12 г/л), мелассу, кукурузный экстракт, NH₄, Со, ортоксидин и 5,6-ДМБ. Ферментацию ведут при 35 °С в ферментере на 1 тыс. м³ с ежесуточной заменой 10 % бродящего субстрата свежей средой. Биомассу отделяют на сепараторах и высушивают на распылительной сушилке. Высушенный концентрат усредняют мелом до стандартной активности 1 тыс. мкг/г препарата, который используют в таком виде как добавку к кормам. Сухой концентрат до усреднения содержит 3 тыс. мкг/г витамина В₁₂, что составляет 45–50 % суммы корриноидов, фактор III – 10–15 % и другие неполные корриноиды – 40–50 %. Термофильные штаммы метанотрофных бактерий родов *Metanobacillus* и *Metanobacterium* образуют 2 мг/л кобаламина при содержании в среде 8 г/л метанола.

В России производство кормового препарата витамина В₁₂ основано на переработке барды (отхода ацетоно-бутилового или спиртового производства) биоценозом бактерий, осуществляющих термофильное метановое брожение сточных вод.

Используют сложный консорциум анаэробных микроорганизмов, включающих углеводсбраживающие, аммонифицирующие, сульфатвосстанавливающие и метанобразующие бактерии. К барде добавляют метанол – до 2 %, $\text{CoC}_{12}\text{-6H}_2\text{O}$ – 10 г/м³, мочевины – 300 г/м³ и сухие кормовые дрожжи – 230 г/м³. Дозировку обогатителей производят автоматически.

Барду подают в нижнюю часть ферментатора метантенка (4–5 тыс. м³), в котором автоматически регулируют параметры процесса, обеспечивая контроль температуры, pH (7,5–8,0) и длительности брожения. Брожение ведут непрерывно, ежесуточно заменяя 20–25 % бродящей жидкости на свежую барду. В качестве пеногасителя используют рыбий жир.

Для получения кормового препарата бражку выпаривают и сушат. Поскольку витамин В₁₂ неустойчив при тепловой обработке, особенно в щелочной среде, его стабилизируют. Для этого получаемую в процессе брожения жидкость перед выпариванием подкисляют до pH 5,0–5,3 и добавляют к ней сульфит натрия (0,1–0,25 %). Содержание витамина В₁₂ в исходной сброженной жидкости – 4,4 г/м³. Сгущение сброженной барды осуществляют на выпарных аппаратах (до 14–17 % содержания сухих веществ), а сушку – в распылительной сушилке. Концентрация витамина В₁₂ в высушенном препарате 500–600 мг/кг. Истинный витамин составляет 20–25 % от суммы корриноидов, фактор III – 35–40 %, фактор В и другие – 40–45 %. Получаемый препарат называют КМБ-12.

Мезофильные и термофильные метаногенные бактерии, в том числе *Metanobacterium thermoautotrophii*, *Mb. thermoformicuin*, *Mb. bryantii*, *Metanosarcina barkeri*, *Ms. vacuolata*, *Ms. mazei*, *Methanococcus hatopilus*, синтезируют исключительно фактор III.

Истинный витамин В₁₂ образуют неспорообразующие метилотрофы: *Eubacterium limosum*, близкий к нему *Butyribacterium methylotrophicum* и *Acetobacter woodi*. Путем создания искусственных биоценозов и подбора условий ферментации возможно целенаправленное регулирование процесса биосинтеза витамина В₁₂.

Новые разработки. Для удешевления производства витамина В₁₂ и утилизации дешевого возобновляемого сырья изучалось образование корриноидов бактериями *Prop, atidipropionici* ATCC 25562 при росте на ксилозе как главной составной части гидролизатов гемицеллюлоз. Используя ксилозу, бактерии аккумулировали 0,35 мг корриноидов в 1 л среды без внесения солей Со. Для продукции корриноидов из ксилозы больше всего подходит UFR-реактор, работающий с ультрафильтратционной рециркуляцией клеток.

Иммобилизованные клетки. В Японии сравнивали стабильность и продуктивность биокатализатора при включении клеток

Propionibacterium sp. в гели каппа-каррагенана, Na-альгината, агара и фторполимерные уретановые смолы. Оптимальной подложкой служит фторполимер PU-9, полимерная матрица которой не снижала активности включенных в нее клеток. В оптимальных условиях ферментации 5 г иммобилизованных клеток вновь синтезировали и экскретировали 900 мкг витамина за 18 дней повторной периодической ферментации, продемонстрировав возможность проведения многоступенчатого сложного синтеза (подобных примеров известно не много).

Усовершенствование штаммов-продуцентов. Изменение в лучшую сторону было достигнуто путем мутаций и селекции. Этим методом в 50 раз увеличена продуктивность по витамину у *Ps. denitrificans*. Для грамположительных бактерий *Propionibacterium*, *Bacillus*, *Streptotnyces* применимо слияние протопластов, для грамотрицательных бактерий, например *Pseudomonas*, доступны конъюгативные плазмиды, как Inc P1. Пока весомых практических результатов с помощью этих мощных методов не получено, но начало таким работам положено. Клонировали 11 генов, кодирующих ферменты биосинтеза витамина B₁₂ у бактерии *Bac. megaterium*. Полагают, что в геноме содержится всего 20–30 таких генов, поэтому DNA *Bac. megaterium* подвергли фрагментированию и крупные фрагменты встраивали в плазмиды, которыми далее трансформировали мутанты-ауксотрофы по B₁₂. Такие мутанты приобрели способность синтезировать витамин B₁₂. Метод может быть использован для получения штаммов-продуцентов в производственных масштабах.

В бактерии *E. coli* клонированы гены *Prop*, *technicum*, ответственные за синтез витамина B₁₂. Бактерия *Prop. technicum* не содержит плазмид, поэтому из данного штамма выделили, очистили и частично разрушили ДНК, получив фрагменты 15–20 килобаз. Эти фрагменты включили в расщепленную плазмиду pBR 322 и полученной гибридной плазмидой трансформировали *E. coli*. Новые трансформанты отличались от контрольного штамма в отношении морфологических и физиологических признаков.

18.3. Ацетоно-бутиловое брожение

Ацетоно-бутиловое брожение представляет собой биохимически более сложный тип масляно-кислого брожения, в котором образовавшиеся на первой стадии жирные кислоты превращаются в нейтральные конечные продукты – ацетон, бутиловый и изопропиловый спирты. Если в первой фазе брожения увеличивается кислотность, то

во второй фазе кислотность не только не возрастает, но даже уменьшается. Таким образом за счет превращения кислот в нейтральные продукты регулируется pH среды (кислотность). Ацетоно-бутиловое брожение углеводов вызывается *Clostridium acetobutylicum* и близкими к нему по физиологии видами. *Cl. butylicum* осуществляет брожение, очень сходное по типу с ацетоно-бутиловым, но отличается тем, что вместо ацетона в этом случае образуется изопропиловый спирт.

Получение ацетона и бутанола. Получение ацетона и бутанола относится к числу важных бродильных производств. Впервые в промышленном масштабе оно было осуществлено в Манчестере Д. Вейсманом в ходе Первой мировой войны. Ацетон был необходим для производства кордита и как взрывчатое вещество в тяжелой артиллерии. Ацетон низкого качества получали путем сухой перегонки древесины, но для упомянутых целей нужен был высококачественный растворитель.

Бродильный процесс (ферментация) был основан на переработке крахмала, концентрация которого составляла до 3,8 % (вес/объем), анаэробными спорообразующими бактериями *Clostridium acetobutylicum*. Превращению подвергалось до 30 % субстрата, в результате получали смесь растворителей (60 % бутанола, 30 % ацетона, 5–10 % этанола, изопропанола и мезитилоксида). Остальная часть субстрата в ходе процесса брожения превращалась в водород и углекислый газ, как представлено на схеме (рис. 14).

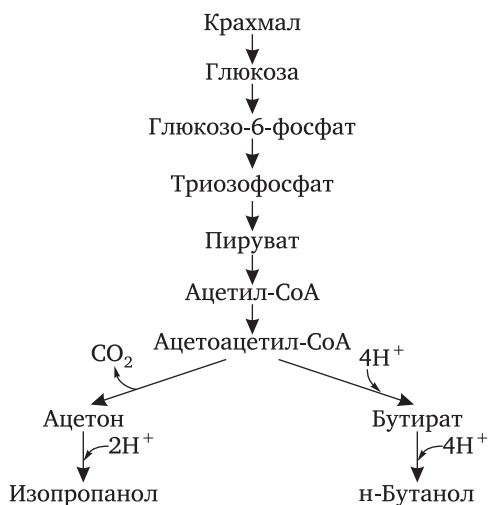


Рис. 14. Схема реакций ацетоно-бутилового брожения

Поскольку образовывались большие объемы газов, при крупномасштабном производстве перемешивания не требовалось, а главная сложность заключалась в гашении пены. В зависимости от штаммов отношение ацетон/спирт несколько варьировало. Многие микробы, разрушающие крахмал и способные образовывать растворители, могут также сбраживать мелассу при содержании сахара в среде до 6 % (вес/объем). Фактором, определяющим количество использованного субстрата, оказалась чувствительность организмов, участвующих в процессе, к н-бутанолу (верхний предел – около 1,2 % по объему) и ацетону (0,4 %). Заражения бродильных емкостей аэробными бактериями обычно не происходило, и главной проблемой было инфицирование бактериофагами. Впоследствии выяснилось, что участвующие в процессе микроорганизмы можно «иммунизировать» путем нескольких пересевов в присутствии бактериофага. Было установлено, что фаговая инфекция является штамм-специфичной.

Растворители отделяли от среды отгонкой. В конце Первой мировой войны главную роль стало играть производство бутанола: он нашел применение при получении широкого круга веществ, включая мочевиноформальдегидные пластмассы, пластификаторы и тормозные жидкости. Побочный продукт – водород – стал использоваться в производстве синтетического метанола и для гидрогенизации пищевых масел; углекислый газ либо сжижали, либо превращали в сухой лед. Твердые вещества отходов содержали большое количество рибофлавина (витамина B₂), и их можно было использовать как богатую белком добавку к кормам.

После Второй мировой войны бродильное производство этих растворителей сильно сократилось, так как относительная стоимость нефтехимических продуктов по сравнению с полимерами сахаров уменьшилась. Производство н-бутанола путем ферментации продолжалось только в ЮАР. Однако в настоящее время получение бутанола с помощью ферментации становится все более выгодным. Главный недостаток существующих штаммов – низкая устойчивость к конечным продуктам и относительно низкий выход растворителей.

В настоящее время ацетон и бутиловый спирт получают, сбраживая зерновые, меласно-зерновые заторы или мелассу. Если среду готовят из зерна, например кукурузы, то сначала получают муку грубого помола, ее смешивают с водой из расчета 6–8 кг муки на 100 л воды. Затем затор варят 2 ч под давлением 0,2 МПа и стерилизуют. Охлажденную до 37...42 °С массу сбраживают в течение 2 сут, рН среды 5–7. В процессе брожения из глюкозы образуется смесь, содержащая 6 частей бутилового спирта, 1 часть этилового спирта и 3 части ацетона. Практически из 3 кг крахмала получается 1 кг органических растворителей.

Разработаны методы получения ацетона и бутилового спирта из сульфитного щелока и гидролизатов древесины.

В ацетоно-бутиловом брожении в первый период образуются уксусная и масляная кислоты, выделяется водород и углекислый газ. Затем масляная кислота восстанавливается до бутилового спирта. Ацетон образуется из продукта конденсации уксусной кислоты – ацетонуксусной кислоты при декарбоксилировании. Во время брожения в среде накапливается много рибофлавина, причем его количество тем больше, чем интенсивнее образуется ацетон.

Получение рибофлавина. Разработаны способы получения кормового препарата рибофлавина из ацетоно-бутиловой барды после отделения органических растворителей. Для этого в качестве субстрата используют декантированную ацетоно-бутиловую барду, содержащую 2,0–2,5 % сухих веществ. Брожение проходит при 55...57 °С в нестерильной культуре в две фазы: на первой образуются жирные кислоты и метан, на второй – метан, углекислота и витамин В₂. Длительность процесса в одном аппарате составляет 2,5–3,5 сут, в двух последовательных – 2–2,5 сут. Концентрация витамина в бражке достигает 850 мкг/л. Параллельно в значительных количествах, до 20 м³/м³, образуется газ (65 % метана и 30 % углекислоты). Бражка имеет слабощелочную реакцию. Для стабилизации витамина ее подкисляют соляной или фосфорной кислотой, затем в выпарном аппарате сгущают до 20 % содержания сухих веществ и высушивают в распылительной сушилке. Содержание В₂ в сухом препарате составляет до 100 мкг/г.

Аппараты для ацетоно-бутилового брожения. Поскольку ацетоно-бутиловое брожение – это анаэробный процесс, в целях ферментации используются аппараты для анаэробных процессов, которые достаточно просты и применяются в процессах конверсии растительного сырья, в том числе растительных отходов, а также различных промышленных отходов. При метановом брожении для получения биогаза и в ряде других процессов (получение ацетона, шампанских вин) используют ферментационные аппараты (метанотенки), имеющие различную конструкцию (от простой выгребной ямы до сложных металлических конструкций или железобетонных сооружений) и объемы (от нескольких до сотен кубометров). Метановые установки оборудованы системой подачи сырья, системой теплообмена труб для стабилизации температуры, несложным перемешивающим устройством для гомогенного распределения сырья и биомассы продуцента, газовым колпаком и устройством переменного объема (газгольдер) для сбора образуемого биогаза.

Использование ацетона. Технический ацетон получается кумольным методом в процессе синтеза фенола, методом ацетоно-бутилового

брожения, а также в качестве побочного продукта в ряде производств. Ацетон применяется в лакокрасочной промышленности, при изготовлении пластмасс, синтетического каучука и химических волокон, служит сырьем для синтеза многих других органических продуктов. Он используется в производстве уксусного ангидрида, ацетонциангидрида, дифенилолпропана, для обезжиривания поверхностей, как растворитель в различных отраслях промышленности.

Перспективы применения низших спиртов (метанол, этанол), а также ацетона и других растворителей в качестве горючего для двигателей внутреннего сгорания вызвали в последние годы большой интерес в связи с возможностью их крупномасштабного получения в микробиологических процессах с использованием различного растительного сырья.

Промышленные объекты получения продуктов ацетоно-бутилового брожения. При ацетоно-бутиловом брожении из 1 т картофеля можно получить 25 м³ водорода, 340 кг бутанола и 110 кг ацетона.

Биоводород из биомассы можно получать путем бутилового или ацетоно-бутилового брожения сахарозы или крахмала. При этом из 1 т мелассы образуется 80 м³ водорода. Это означает, что с 1 га плантаций сахарной свеклы (мелассы) можно получить до 140 м³ водорода, или в пересчете на всю произведенную в 2003 г. мелассу – 88 млн м³. Дополнительно к водороду 1 т мелассы дает до 114 кг бутанола и до 36 кг ацетона, а весь годичный объем мелассы – 125 тыс. т бутанола и 40 тыс. т ацетона.

До конца 70-х гг. XX в. в эксплуатации находилось 4 ацетоно-бутиловых завода (АБЗ): в городах Грозном, Нальчике, Талице (Свердловской области) и Ефремов (Тульской области). К концу 1990-х гг. остались Грозненский и Ефремовский заводы, причем Ефремовский завод можно восстановить. Он производил до 50 т растворителей (бутанол/ацетон/этанол – 13/4/1) и до 29 тыс. м³ водорода в сутки, или 15 тыс. т растворителей и до 8,7 млн м³ водорода в год, а Грозненский завод – 74 т растворителей и 43 тыс. м³ водорода в сутки, или до 22 тыс. т растворителей и 12,9 млн м³ водорода в год. К сожалению, весь образующийся водород в то время выпускался в атмосферу (углекислый газ шел на производство жидкой и твердой углекислоты).

В 1967 г. на Ефремовском АБЗ и в 1969 г. на Грозненском АБЗ были введены в эксплуатацию два цеха по производству кормового витамина В₂ методом термофильного метанового брожения жидких отходов этих производств – барды (3 тыс. м³/сут). Кроме витамина В₂ каждый цех изготавливал в сутки до 30 тыс. м³ биогаза, который целиком направлялся на производство тепловой энергии для всего производственного цикла.

В конце 60-х гг. XX в. были созданы промышленные производства биотоплива из биомассы (биоводород, биометан, биобутанол, биоацетон и биоэтанол).

В Республике Беларусь в настоящее время производителем ацетона и бутанола является завод ОАО «Белхим», однако имеются источники мелассы и другого сырья, которое может быть использовано при микробном синтезе продуктов ацетоно-бутилового брожения.

18.4. Спиртовое брожение

Этиловый спирт (этанол) – бесцветная легко испаряющаяся жидкость. Спирт, содержащий 4–5 % воды, называют ректификатом, а содержащий только доли процента воды – абсолютным спиртом. Такой спирт получают химической обработкой в присутствии водоотнимающих средств (например, свежeproкаленного СаО).

Этиловый спирт – многотоннажный продукт химической промышленности. Получают его различными способами. Один из них – спиртовое брожение веществ, содержащих сахаристые вещества, в присутствии ферментов (например, зимазы – фермента дрожжей). Такой спирт называют пищевым или винным.

Этиловый спирт можно получать из предварительно гидролизованной целлюлозы. Образующуюся при этом глюкозу подвергают в дальнейшем спиртовому брожению. Такой спирт называют гидролизным.

Как известно, для получения этилового спирта существуют и синтетические способы – сернокислотная или прямая гидратация этилена. Себестоимость спирта, полученного таким способом, намного ниже, чем приготовленного из пищевых продуктов.

Этиловый спирт широко используют в различных областях промышленности, прежде всего в химической. Из него получают синтетический каучук, уксусную кислоту, красители, эссенции, фотопленку, порох, пластмассы. Спирт является хорошим растворителем и антисептиком, поэтому он находит применение в медицине, парфюмерии. Из этилового спирта производят ликеро-водочные изделия.

Этиловый спирт, применяемый для технических целей, специально загрязняют дурно пахнущими веществами. Такой спирт называют денатуратом (спирт подкрашивают, чтобы отличить его от чистого спирта).

Особенности технологии этилового спирта. До начала 30-х гг. XX в. этиловый спирт получали исключительно сбраживанием углеводсодержащего сырья и при обработке зерна (рожь, ячмень, кукуруза,

овес, просо). С 1930 по 1950 г. было открыто несколько способов синтеза этилового спирта из химического сырья.

В США в 1976 г. было выработано около 800 тыс. т этанола, в том числе 550 тыс. т прямой гидратацией (остальное – сбраживание пищевого сырья). В СНГ, Франции и других странах этиловый спирт получают также двухстадийной гидратацией этилена при 75...80 °С.

В ряде стран этиловый спирт получают сбраживанием продуктов гидролиза растительных материалов. Очистку технических спиртов проводят различными способами. Пищевой спирт-сырец обычно освобождают от примесей (сивушные масла и др.) ректификацией. Синтетический этиловый спирт очищают от этилового эфира, ацетальдегида и других ректификаций в присутствии щелочи и гидрированием в паровой фазе на никелевых катализаторах при 105 °С.

Спирт-ректификат представляет собой атиотропную смесь этилового спирта с водой (95,57 % спирта с температурой кипения 78,15 °С). Для многих целей требуется обезвоженный, абсолютный этиловый спирт.

Для получения этилового спирта издавна пользуются различными сахаристыми веществами, например виноградным сахаром или глюкозой. Путем брожения, вызываемого действием ферментов (энзимов), которые вырабатываются дрожжевыми грибами, глюкоза превращается в этиловый спирт.

В свободном виде она содержится, например, в виноградном соке, при брожении которого получается виноградное вино с содержанием спирта от 8 до 16 %.

Исходным продуктом для получения спирта может служить полисахарид – крахмал, содержащийся в клубнях картофеля, зернах ржи, пшеницы, кукурузы. Для превращения в сахаристые вещества (глюкозу) крахмал предварительно подвергают гидролизу. С этой целью муку или измельченный картофель заваривают горячей водой и по охлаждению добавляют солод – проросшие, а затем подсушенные и растертые с водой зерна ячменя. В солоде содержится диастаз (сложная смесь ферментов), действующий на процесс осахаривания крахмала каталитически. По окончании осахаривания к полученной жидкости прибавляют дрожжи, под действием фермента которых образуется спирт. Его отгоняют, а затем очищают повторной перегонкой.

В настоящее время осахариванию подвергают также другой полисахарид – целлюлозу (клетчатку), образующую главную массу древесины. Для этого целлюлозу подвергают гидролизу в присутствии кислот (например, древесные опилки при 150...170 °С обрабатывают 0,1–5 %-й

серной кислотой под давлением 0,7–1,5 МПа). Полученный таким образом продукт содержит глюкозу и сбраживается на спирт при помощи дрожжей. Из 5500 т сухих опилок (отходы лесопильного завода средней производительности за год) можно получить 790 т спирта (считая на 100 %-й). Это дает возможность сэкономить около 3 тыс. т зерна или 10 тыс. т картофеля.

В зависимости от исходного сырья и степени очистки спирт-ректификат делят на люкс, экстра, высшей очистки и первого сорта.

Питьевой спирт 95 % – это смесь спирта-ректификата высшей очистки и смягченной воды, профильтрованная и выдержанная.

Спирт-ректификат служит сырьем для производства ликеро-водочных изделий.

Водка – крепкий алкогольный напиток, содержащий 40–56 % спирта. Ее получают из спирта-ректификата, смягченной воды, фильтруют через активированный уголь, добавляют: сахар-песок, питьевую соду, уксус, лимонную кислоту, мед, соль.

Для производства этилового спирта из крахмалистого сырья на спиртзаводе используется зерно. Основными зерновыми культурами, поступающими в производство, являются рожь, пшеница, ячмень и кукуруза.

Главный показатель – условная крахмалистость, по которой ведется учет выхода спирта.

При поступлении зерна определяют показатель зерновой примеси по наличию зерна другого вида и устанавливают, что идет на переработку – чистая культура или зерносмесь.

Лаборатория завода производит отбор проб для определения качества зерна в соответствии с требованиями ГОСТ 13586-83 «Зерно. Правила приемки и методы отбора проб». При транспортировке зерна железнодорожным транспортом для проверки соответствия качества зерна нормативным требованиям анализируют среднюю пробу от поступившей партии, и выдается документ о качестве зерна. При поставке зерна автотранспортом от колхозов допускается отметка о качестве в сопроводительном документе.

С момента поступления зерна на склады завода в течение всего периода его хранения за качеством и состоянием каждой партии ведется наблюдение. К числу показателей, по которым оценивают состояние зерна при хранении, относят: температуру, влажность, а в партиях солодового зерна дополнительно проверяют энергию и способность его прорастания.

Поступившее на производство зерно взвешивается, очищается и подается в зерновой силос ($V = 48 \text{ м}^3$).

Для получения спирта-ректификата используется также спирт-сырец, который доставляется на завод спиртовозами и хранится в спиртохранилище открытого типа.

Спирт этиловый ректифицированный вырабатывают на заводе путем сбраживания крахмало- и сахаросодержащего сырья специальными штаммами дрожжей, перегонки полученной спиртовой бражки и ректификации на брагоректификационных установках, а также путем ректификации спирта-сырца на непрерывно действующей ректификационной установке.

Спирт этиловый ректифицированный из пищевых видов сырья вырабатывают в виде спиртоводной смеси, концентрация спирта в которой в зависимости от сорта составляет 96,2–96,6 % объемных. В производстве в соответствии с ГОСТ 5962-67 вырабатывают спирт этиловый ректифицированный «Люкс», «Экстра», «Высшей очистки».

Спирт «Супер-Люкс» является нововведением РУП «Кристалл» и вырабатывается по ТУ РБ 0179 7526.542-97.

В спирте этиловом ректифицированном кроме воды в очень малых количествах содержатся различные примеси (альдегиды, эфиры, высшие спирты и другие химические соединения), которые формируют у спирта свойственные ему вкус и аромат в зависимости от вида перерабатываемого сырья.

По органолептическим показателям спирт этиловый ректифицированный должен соответствовать следующим показателям (ГОСТ 5962-67):

- внешний вид – прозрачная жидкость без посторонних частиц;
- цвет – бесцветная жидкость;
- вкус и запах – характерные для каждого вида этилового спирта, выработанного из соответствующего сырья, без привкуса и запаха посторонних веществ.

Качество воды, используемой для технологических целей, оказывает большое влияние на технологические процессы и качество готовой продукции. При этом наиболее важными показателями являются жесткость, окисляемость и бактериальная чистота. Вода не должна содержать различных невооруженным взглядом водных организмов, а также посторонних вредных веществ, угнетающих дрожжи и ухудшающих качество готовой продукции.

В зависимости от места применения в производстве к воде предъявляются различные требования. Для приготовления замеса используется техническая вода с температурой не выше 50 °С, pH не менее 5,0, жесткостью не выше 12 мг/экв/л.

Для нормального ведения процесса вода, поступающая на охлаждение в теплообменные аппараты и на вакуум-охлаждение, имеет температуру не выше 12 °С.

Для питания котлов используется оборотная вода из дефлегматоров с температурой 60...65 °С. Чтобы предотвратить образование накипи, воду предварительно умягчают в целях удаления ионов кальция и магния. Эта же вода используется для рассиропки спирта-сырца при его ректификации. Контроль ведет заводская лаборатория.

Формалин (НСОН) представляет собой водно-метанальный раствор формальдегида и предназначается для использования в качестве антисептика.

Серная кислота (H_2SO_4) применяется для подкисления дрожжевого сула. Содержание моногидрата не менее 92,5 %.

Карбамид ($H_2N-CO-NH_2$, мочеви́на) используется на заводе в качестве азотосодержащего питания при выращивании дрожжей. Содержание азота в пересчете на сухое вещество составляет 46,3 %.

Хлорная известь ($CaCl_2$) применяется для обеззараживания солодового зерна, а также для дезинфекции бродильных чанов, трубопроводов, различных емкостей, полов и других загрязненных мест. Хлорная известь представляет собой белый порошок с содержанием активного хлора 32–35 %.

Побочные продукты при брагоректификации бражки – ЭАФ, сивушное масло.

Головная фракция этилового спирта ТУ РБ 00966671-494-95 (изменение введено 10.09.1999) представляет собой смесь, состоящую из метилового спирта, уксусного альдегида, кислот, сложных эфиров карбоновых кислот и других примесей. Применяется для получения технического и денатурированного спиртов и средств различного назначения.

Продукт производства, пройдя контрольный снаряд, отправляется на хранение в спиртохранилище, в специально оборудованные металлические резервуары.

Сивушное масло по ГОСТ 17071-91 – смесь амиловых, изобутилового, н-пропилового и этилового спиртов, воды и незначительных количеств других органических соединений – служит сырьем для получения технических спиртов, применяемых в пищевой, парфюмерной, фармацевтической, лакокрасочной промышленности.

В процессе перегонки бражки на спиртзаводе образуются промежуточные продукты: бражной дистиллят, эпюрат, непастеризованный спирт, сивушный спирт, промывная вода с ЭРК, барда и лютерная вода. С бардой и лютерной водой выводится нелетучая часть бражки. Лету-

чие примеси выводятся с головной фракцией этилового спирта, сивушным маслом и сивушным спиртом.

Зерно, поступающее со склада, выгружается в приемный бункер, оборудованный защитной решеткой, предназначенной для отделения крупных предметов от зерна. По спиральному шнеку зерно подается на норию и поступает в бункер-накопитель неочищенного зерна. Оттуда оно поступает на воздушно-ситовой сепаратор, где при помощи сита отделяются механические и органические примеси. Отходы поступают в специальный бункер.

С сепаратора зерно подается в бункер очищенного зерна, а затем на весы-дозатор для определения количества очищенного зерна. С весов-дозатора зерно порциями до 50 кг по нории поступает в силос.

В процессе подготовки зерна выделяется пыль, которая может образовывать взрывоопасную смесь, поэтому на всех шнеках, бункерах, нориях и воздушно-ситовом сепараторе установлена аспирация, состоящая из вентиляторов и циклонов, куда поступает пыль.

Из силосов зерно подается в накопительный бункер производства.

Разваривание крахмалистого сырья в непрерывно действующих агрегатах предусматривается в измельченном виде. Очищенное зерно из накопительного бункера самотеком идет на молотковые дробилки и измельчается в них. В измельченном зерне допускается остаток крупки (7–8 %) на сите с диаметром 1 мм.

Измельченное зерно самотеком непрерывно поступает на смесители. Туда же через ротаметры подается требующееся количество воды с температурой 40...45 °С. Для приготовления замеса на 1 кг размолотого зерна берется 2,5–3,5 л воды в зависимости от крахмальности исходного сырья. Концентрация суслу при правильной дозировке должна быть 16–18 % по сахарометру.

Зерновой замес плунжерным насосом через подогреватель типа «труба в трубе», где он нагревается вторичным паром из выдерживателя до температуры 55...65 °С, подается на контактную головку 1-й ступени, где нагревается до температуры 65...75 °С. В контактной головке 2-й ступени зерновой замес нагревается до максимально возможной температуры – 138...140 °С. При прогреве до более высокой температуры сокращается количество подаваемого пара в варочную колонну 1-й ступени.

Варочный аппарат состоит из одной колонны 1-й ступени и трех колонн 2-й ступени. Равномерность разваривания замеса достигается многосекционностью аппарата и специальной конструкцией колонны 1-й ступени. Время разваривания должно составлять 40–50 мин при температуре 138...140 °С. Для кукурузы рекомендуется режим варки

при температуре 144...150 °С в течение 60 мин. В варочные колонны 2-й ступени пар не подается. Варочный аппарат работает при одинаковом давлении в варочных колоннах 1-й и 2-й ступени и корпусе регулятора уровня, что обеспечивается соединением их уравнивательной линией. Переток массы осуществляется только за счет разницы уровней в колоннах.

Разваренная масса из последней колонны 2-й ступени через регулятор уровня выдувается в выдерживатель. В регуляторе уровня выдувной клапан расположен ниже рабочего уровня массы в сосуде не менее чем на 500–600 мм. Неконденсирующиеся газы и пары периодически, через 15 мин, в течение 15 с отводятся в паропровод через циркуляционный клапан (вентиль), расположенный в верхней части колонн, далее – в атмосферу.

В выдерживателе поддерживается постоянное избыточное давление около 0,02 МПа, что соответствует температуре замеса 105 °С. Разваренная масса находится в выдерживателе в течение 15–20 мин. Качество разваривания определяют визуально, не менее 4 раз в смену. Отбор проб производят из пробника, установленного на выдувной трубе.

Расчетное количество амилосубтилина взвешивают или отмеряют в литрах и вносят в расходную емкость, содержащую воду с температурой 20...30 °С. За 10–15 мин до подачи раствора в осаживатель добавляют расчетное количество глюкаваморина из мерника при постоянном перемешивании.

Осахаривание – это гидролиз крахмала разваренной массы до сбраживаемых сахаров под действием амилолитических ферментов, которые содержат осаживающие материалы (ферментные препараты). Одновременно под действием протеолитических ферментов протекает гидролиз белков.

При непрерывном осаживании для охлаждения массы под вакуумом используется специальная установка. Разваренную массу до поступления ее в осаживатель пропускают через испаритель, в котором температура массы снижается до 62...63 °С, так как разрежение в нем составляет 0,08–0,081 МПа.

Разрежение в испарителе поддерживается за счет резкого снижения температуры и конденсации выделившихся из разваренной массы паров. Вакуум в нем создается при помощи барометрических конденсаторов и суховоздушного вакуум-насоса. Сконденсировавшиеся пары вместе с холодной водой, подаваемой на барометрические конденсаторы, сливаются в сборник, откуда направляются в канализацию. Охлажденная масса из испарителя поступает в осаживатель, где смешивается с фер-

ментными препаратами, быстро охлаждается до температуры 57...58 °С. Если ее температура не достигла требуемой, то производится дополнительное охлаждение с помощью водяной рубашки, которой снабжен осахариватель. Продолжительность осахаривания не менее 10 мин. Солодовое молочко дозируется по объему, его расход составляет 16–18 % от объема разваренной массы. Раствор ферментного препарата дозируется в зависимости от активности и крахмалистости осахаренной массы. Осахаренная масса центробежным насосом подается через теплообменники, где охлаждается до температуры 18...20 °С, в бродильный чан.

Основная цель спиртового брожения – сбраживание сахаров суслу дрожжами в спирт. Периодический способ брожения предусматривает проведение процесса от начала до конца в одном аппарате. При заполнении стерилизованных и охлажденных бродильных чанов одновременно с суслom вводится необходимое количество дрожжей. Их расход должен составлять 6–8 % от объема сбраживаемого суслу. Заполнение бродильного чана должно продолжаться не более 8 ч. Более длительное время заполнения приводит к ухудшению отбродов. Продолжительность брожения, считая от начала залива чана до начала перегонки зрелой бражки, составляет 72 ч. Температура при трехступенчатом периодическом брожении должна быть 18...20 °С. Во время главного брожения поддерживается температура 29...30 °С, во время дображивания – 27...29 °С. Снижение температуры при дображивании исключает голодание дрожжей и способствует предотвращению нарастания кислотности бражки. Температуру регулируют подачей холодной воды на водяную рубашку бродильных чанов и измеряют ртутным термометром в защитной гильзе, при этом бражку нельзя переохладить, так как это замедлит ее дображивание. Во время брожения бродильные чаны соединяют со спиртоловушкой для конденсации спиртовых паров, уносимых выделяющимся при брожении диоксидом углерода. Промывные воды из спиртоловушки отводят в сборник, откуда отправляют напрямую в брагоректификационное отделение. Концентрация спирта в промывной воде не должна превышать 7 ‰. Содержание спирта в промывной воде определяется стеклянным спиртометром. По окончании брожения зрелую бражку из бродильных чанов направляют в брагоректификационное отделение. Бродильные чаны после освобождения от бражки моют с антисептиком и пропаривают до температуры 105 °С. Во время сгонки бродильные чаны полностью освобождают при помощи плунжерных насосов.

Нормативные показатели зрелой бражки – кислотность, количество несброженных углеводов, крепость. Нарастание кислотности в зре-

лой бражке при нормальных условиях производства не должно превышать 0,15–0,20 град. кислотности. Содержание несброженных углеводов при отличной работе – до 0,25 г/100 мл; при хорошей – от 0,25 до 0,35 г/100 мл; при удовлетворительной работе – до 0,45 г/100 мл. Крепость бражки при нормальных условиях производства должна быть 7,5–9,0 ‰.

Для оперативного контроля процесса брожения при переработке крахмалистого сырья определяют содержание сухих веществ в фильтрате бражки по сахарометру. Видимая концентрация зрелой бражки в зависимости от вида сырья должна иметь следующие значения: кукуруза – 0,4; просо – 0,2; рожь – 0,7; ячмень – 0,7; овес – 0,9 %.

Цель процесса – получение зрелых дрожжей, выращиваемых на специально приготовленном дрожжевом сусле и используемых для сбраживания сусла в бродильных чанах.

Задача процесса – такое ведение технологического процесса, которое обеспечивало бы максимальное накопление дрожжевых клеток при отсутствии развития посторонних микроорганизмов.

Для получения дрожжей готовят сусло из различных зерновых культур. Толстокожурное зерно (ячмень, овес, просо) должно перерабатываться в смеси с беспленочным зерном, чтобы покровное брожение было полностью исключено.

В спиртовом производстве процесс размножения дрожжей происходит при повышенной кислотности среды (рН 3,8–4,2), что угнетает развитие молочнокислых бактерий и создает нормальные условия для развития дрожжевых клеток. Для подкисления дрожжевого сусла используется серная кислота.

При переработке зернового сырья нормального качества, за исключением кукурузы, дрожжевое сусло готовится без дополнительного питания. При переработке дефектного сырья, а также кукурузы в дрожжевое сусло вносится дополнительное солодовое питание. Технологической инструкцией предусмотрены следующие нормы дополнительного солодового питания: 0,8 кг/дал дрожжевого сусла – при переработке кукурузы; 0,6 кг/дал дрожжевого сусла – при переработке остальных видов сырья.

Технологический процесс выращивания дрожжей состоит из двух операций: приготовления дрожжевого сусла и сбраживания этого сусла в целях накопления в нем дрожжевых клеток, используемых в качестве засевных дрожжей для сбраживания сусла в бродильных чанах.

Приготовление дрожжевого сусла. Дрожжанка для приготовления дрожжевого сусла перед началом процесса должна быть тщательно промыта, продезинфицирована раствором хлорной извести в течение

25–30 мин, затем вновь промыта теплой водой и пропарена при температуре 100 °С не менее 20 мин. В эту дрожжанку отбирают сусло из осаживателя после подачи в него всего осаживающего материала.

Концентрация сусла должна быть в пределах 17–18 %. Данный объем сусла выдерживают в течение 1 ч для полного осаживания крахмала, а затем пастеризуют при температуре 80 °С, охлаждают до температуры 50 °С и подкисляют серной кислотой из мерника при тщательном перемешивании до 0,7–0,8 град. кислотности, что соответствует рН 3,8–4,0. Для подкисления дрожжевого сусла используют серную кислоту в разбавленном виде с соблюдением всех правил техники безопасности. После охлаждения дрожжевого сусла до температуры 30 °С в него центробежным насосом вносятся зрелые засевные дрожжи, в количестве 8–12 % от объема сусла. После этого сусло охлаждают до температуры складки – 18...20 °С.

Сбраживание дрожжевого сусла. Процесс сбраживания дрожжевого сусла осуществляется в дрожжанках при строгом контроле за температурой и чистотой брожения. Повышение температуры брожения выше 30 °С не допускается, так как это свидетельствует о развитии посторонней микрофлоры. Дрожжи считаются зрелыми по достижении видимого отброда, равного 1/3 первоначальной концентрации дрожжевого сусла.

Требования к зрелым дрожжам: дрожжевые клетки должны быть хорошо упитанными; наличие мертвых клеток не должно превышать 3,0 %; не допускается присутствие посторонних микроорганизмов в поле зрения микроскопа.

Технологическая схема брагоректификационной установки с элементами под малым вакуумом типа БРУВАК-М состоит из четырех колонн: бражной, эспурационной, ректификационной и экстрактивно-ректификационной.

Бражку из бродильного отделения насосом подают в подогреватель ректификационной колонны, в котором ее нагревают до температуры 53...55 °С. Затем бражка поступает в подогреватель бражной колонны, где ее догревают до температуры 85...90 °С паром бражного дистиллята. Подогретую бражку направляют в сепаратор бражки, в котором она освобождается от диоксида углерода. Оттуда она помещается на тарелку питания бражной колонны, а диоксид углерода в смеси с другими газами и водно-спиртовыми парами попадает в конденсатор сепаратора бражки и далее на спиртоловушку бражной колонны, где они конденсируются, и конденсат подается на 36-ю питательную тарелку эспурационной колонны. Неконденсирующиеся газы из спиртоловушки бражной колонны через огнепреградитель и дыхательный клапан отводятся

в атмосферу. В бражной колонне из бражки выделяют спирт и другие летучие компоненты. Барду отводят из куба колонны через бардорегулятор в сборник барды.

Водно-спиртовой пар из верхней части бражной колонны переносится в межтрубное пространство подогревателя бражки бражной колонны. Бражной дистиллят из него и его водяной части поступает на 28-ю питательную тарелку эпорационной колонны. Часть бражного дистиллята из водяной части подогревателя бражки бражной колонны через ротаметр возвращается на верхнюю тарелку бражной колонны для ее орошения. Бражной дистиллят из конденсатора бражной колонны и ее спиртоловушки поступает на 36-ю, питательную тарелку эпорационной колонны. Бражной дистиллят из кипятильника эпорационной колонны собирают в сборник, из которого под воздействием работы инжектора подают на 23-ю питательную тарелку эпорационной колонны. При этом уровень в сборнике поддерживают постоянным.

Водно-спиртовой пар из эпорационной колонны поступает для конденсации последовательно в ее дефлегматор, конденсатор и спиртоловушку. Флегму из указанных теплообменников возвращают на верхнюю тарелку эпорационной колонны. Из конденсатора эпорационной колонны отбирают головную фракцию этилового спирта и через холодильник, фильтр, ротаметр, эпруветку и спиртоизмеряющий аппарат отводят в спиртоприемное отделение.

Эпюрат из куба эпорационной колонны направляют на тарелку питания ректификационной колонны.

Спиртовые пары из ректификационной колонны последовательно конденсируют в подогревателе бражки ректификационной колонны, ее дефлегматоре, конденсаторе и спиртоловушке. Из конденсатора ректификационной колонны отбирают непастеризованный спирт, расход которого регулируют ротаметром, и направляют на верхнюю тарелку эпорационной колонны. Избыток непастеризованного спирта возвращают на верхнюю тарелку ректификационной колонны.

Ректификованный спирт отбирают с 71–73, 75, 77 и 79-й тарелок ректификационной колонны и через холодильник спирта, эпруветку, спиртоизмеряющие аппараты направляют в спиртоприемное отделение.

Лютерную воду из ректификационной колонны отводят через гидрозатвор с паросепаратором в сборник лютерной воды, из которого насосом подают в напорный бак лютерной воды. Из данного сборника лютерная вода через ротаметр подается на верхнюю тарелку экстрактивно-ректификационной колонны и на промывку сивушного масла в насадочной колонке деконтатора.

Из 5, 7, 9, 11-й зон нижних тарелок ректификационной колонны отбираются пары сивушного масла, которые инжектором подают в куб экстрактивно-ректификационной колонны. Пары направляют в дефлегматор и конденсатор экстрактивно-ректификационной колонны. Гетерогенный дистиллят из дефлегматора направляют в разделитель, нижний слой которого возвращают на верхнюю тарелку экстрактивно-ректификационной колонны, а верхний слой, обогащенный высшими спиртами, через ротаметр подают в насадочную колонку деконтатора, где его смешивают с лютерной водой. В деконтаторе сивушная фракция поднимается в верхнюю его часть, откуда отстоявшееся сивушное масло собирается в сборник сивушного масла. Кубовой остаток из куба экстрактивно-ректификационной колонны и подсивушный слой из деконтатора направляют на 12-ю тарелку бражной колонны или на 7, 9-ю тарелки ректификационной колонны.

Из 19, 21, 23 и 24-й зон тарелок ректификационной колонны сивушные спирты с помощью инжектора подают на 36-ю тарелку эapurационной колонны, а также периодически в количестве 0,5 % сивушные спирты через пробный холодильник отводят на спиртоизмеряющий снаряд ЭАФ.

Вакуум в эapurационной и в веру ректификационной колонны создается вакуум-насосом через барометрический конденсатор, для чего спиртоловушки эapurационной и ректификационной колонн соединены по газовой линии с нижней частью барометрического конденсатора и далее с вакуум-насосом. Для улавливания спирта и других летучих веществ в барометрический конденсатор подают холодную воду, а водно-спиртовую жидкость из него направляют на 12-ю тарелку бражной колонны.

Вакуум в веру колонн регулируют подачей охлаждающей воды из коллектора холодной воды на поверхности теплообмена теплообменного оборудования колонн. Горячую воду после теплообменного оборудования колонн отводят в сборник горячей воды. Конденсат пара из кипятильника ректификационной колонны возвращается в котельную.

Для контроля потерь спирта в барде и лютерной воде установка оснащена пробными холодильниками. Для предохранения колонн от деформации вследствие избыточного давления или глубокого вакуума верх и низ бражной, низ ректификационной и экстрактивно-ректификационной колонн снабжены вакуум-прерывателями.

При переработке спирта-сырца он из спиртохранилища подается в сборник спирта-сырца, из которого насосом его подают в напорный

сборник спирта-сырца. Оттуда спирт-сырец через ротаметры и смеситель, где он смешивается с умягченной водой из напорного бака, поступает в подогреватель спирта-сырца, где он подогревается до температуры 73...75 °С. Подогретая смесь спирта-сырца с умягченной водой подается на 23 и 28-ю тарелки эспурационной колонны.

Ректификованный спирт, полученный на брагоректификационной установке, после учета спиртоизмеряющими аппаратами отводится в накопительные емкости.

Схемой спиртоприемного отделения предусмотрена возможность отводить ректификованный спирт в отдельную емкость для индивидуального учета и возможности контроля слива в любое время. Из накопительных емкостей в установленном порядке отбирают пробы для химического контроля, а также контроля качества ректификованного спирта. Все накопительные емкости в верхней их части соединены переливными устройствами для предотвращения переполнения емкостей ректификованным спиртом и его потерь от проливания.

Для передачи на хранение ректификованный спирт из накопительных емкостей самотеком поступает в мерники, где производится измерение его объема и температуры, а затем в спиртохранилище на хранение.

Глава 19 **ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА ГОРМОНАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ**

Гормоны (греч. *hormao* – приводить в движение, возбуждать) – биологически активные вещества разной химической природы, образующиеся специализированными клетками желез внутренней секреции, которые выделяются непосредственно в кровь, лимфу и регулируют обмен веществ, а также физиологические функции организма. Известно около 60 биологически активных секретов, которые продуцируются эндокринными железами и имеют гормональную активность.

По химической структуре выделяют гормоны:

- белковой природы: простые (инсулин, пролактин, гормон роста) и сложные (фолатропин, лютропин, тиротропин) белки;
- пептидной природы: глюкоген, кальцитонин, соматостатин, вазопрессин, окситоцин;
- производные аминоспиртов: адреналин, норадреналин, окситоцин;
- липоидной природы (стероидные гормоны): кортикостероиды, андрогены, эстрогены, простагландины;
- тканевые (парагормоны): гастрин, секретин, гепарин.

Получают гормоны эндокринных желез путем химического синтеза, методами генной инженерии и выделением из сырья животного происхождения. Также существует методика биотрансформации. Например, один из штаммов хлебной плесени *Rhizopus arrhizus* используется на начальном этапе синтеза производного стероида кортизона путем гидроксилрования прогестерона по 11-му положению.

Синтезированы инсулин и некоторые белковые гормоны гипофиза (кортикотропин, соматотропин) и т. д. Препараты стероидных гормонов, производных аминокислот и пептидов (окситоцин, вазопрессин)

получают путем химического синтеза. Из-за многостадийности и сложности производство полипептидных гормонов не рентабельно.

Далее будут приведены примеры получения некоторых гормонов из различных источников.

19.1. Производство инсулина.

Выделение инсулина из животного сырья

Инсулин – гормон поджелудочной железы, вырабатываемый β -клетками островков Лангерганса, играет важную роль в углеводном обмене. Молекула инсулина человека состоит из двух полипептидных цепей – *A* и *B*, соединенных двумя дисульфидными связями. *A*-цепь включает в себя 21, а *B*-цепь – 30 аминокислотных остатков.

В 1952 г. был впервые выделен инсулин в кристаллическом виде. В настоящее время существует несколько методов выделения инсулина из поджелудочных желез рогатого скота и свиней.

Получение инсулина состоит из ряда стадий:

- измельчение замороженных поджелудочных желез и экстракция кислым спиртовым раствором;
- осаждение балластных белков и освобождение от липидов;
- изоэлектрическое осаждение фракций инсулина (при $\text{pH} = 5,5$) и осаждение спиртом, ацетоном, эфиром;
- очистка инсулина: осаждение солями, фракционирование методами хроматографии, гель-фильтрации;
- осаждение инсулина в виде кристаллов;
- переосаждение цинк-инсулина.

Свежие или замороженные поджелудочные железы измельчают в мясорубке-волчанке и экстрагируют способом бисмацерации первый раз 80–85 %-м этанолом в реакторе с мешалкой. Второй раз экстрагируют 57 %-м этанолом, который подкислен ортофосфорной кислотой (хлороводородной или серной) до значения $\text{pH} = 2,8\text{--}3$. Экстракцию проводят 1,5–4 ч при постоянном перемешивании. Подкисленный спирт способствует инактивации фермента трипсина, находящегося в поджелудочной железе, благодаря чему удается сохранить инсулин в неизменном состоянии. На заводе эндокринных препаратов в г. Минске используют роторно-пульсационный аппарат для экстракции, что дает интенсивность экстрагирования и сокращает время до 1,5 ч.

Полученные вытяжки объединяют, оставляют на холоде на 48 ч для освобождения от нежелательных белков, которые выпадают в осадок.

Осадок отделяют центрифугированием и удаляют. Далее для выделения и очистки инсулина применяют ионообменную хроматографию. Осуществляют сорбцию инсулина из прозрачной жидкости на макропористом сульфокатионите КУ-33-30/100 при значении рН = 3,0–3,3 в режиме псевдооживления. Жир удаляют путем промывки катионита 65–67 %-м этанолом, а балластные белки – 0,3 М раствором ацетатного буфера.

Десорбцию инсулина проводят с помощью 0,01–0,05 М раствора аммонийного буфера (рН 10) и немедленно подкисляют хлороводородной кислотой до рН = 4,5 и добавляют ацетон. Выпавший осадок балластных веществ удаляют. Инсулин осаждают раствором ацетата цинка (рН = 6,2). Полученный цинк-инсулин очищают методом кристаллизации, после чего растворяют в воде, подкисленной до рН = 2,8 лимонной кислотой. Раствор отстаивают 1 ч. Выпавшие балластные вещества удаляют фильтрацией через кизельгур. Фильтрат смешивают с ацетоном, добавляют хлористый цинк и охлажденный до 0 °С фенол. Для медленной кристаллизации инсулина создают условия с последовательным изменением рН раствора. Раствор подщелачивают до рН = 8,5, оставляют на 2–3 мин, изменяют рН до 6,8 и перемешивают 1 ч; при значении рН = 6,5 перемешивают 2 ч; при рН, равном 6,2 и 6,0, – 2 ч и отстаивают 20 ч; при значении рН 5,8 – 2 ч и отстаивают 96 ч при температуре 5 °С. Выпавшие кристаллы инсулина отделяют центрифугированием, промывают на воронке Бюхнера последовательно холодной водой, ацетоном, эфиром. Досушивание проводят на воздухе, в вытяжном шкафу и эксикаторе.

Датская компания *Novo Industries* производит человеческий инсулин методом, в основе которого лежит замена остатка аланина в цепи В на остаток треонина. Это достигается ферментативным замещением с последующей хроматографической очисткой продукта, в результате чего получается однокомпонентный инсулин человека с 99 %-м содержанием чистого препарата.

Создание промышленного производства генно-инженерного инсулина. Первой попыткой создать такое производство в СССР можно считать пилотную установку ВНИИА, основанную на технологии, разработанной совместно с немецкой фирмой *Genbiotech GmbH* в 1987–1989 гг. Процесс был основан на продуцировании генно-инженерным штаммом *E. coli* рекомбинантного белка (молекулярная масса около 17 кДа), содержащего лидерную аминокислотную последовательность, соединенную через аминокислотный остаток метионина с проинсули-

ном человека. Исходная технологическая схема включала в себя следующие стадии:

- ферментации (выращивание штамма-продуцента в ферментере);
- отделения биомассы;
- разрушения клеток с выделением телец включения;
- очистки рекомбинантного белка последовательно ионообменной хроматографией на DEAE-сефарозе FF и гель-фильтрацией на сефадексе G-25 M;
- расщепления рекомбинантного белка бромцианом;
- окислительного сульфитолиза проинсулина;
- хроматографической очистки гексасульфоната проинсулина последовательной гель-фильтрацией на сефадексе G-50 F, ионообменной хроматографией на DEAE-сефарозе FF и гель-фильтрацией на сефадексе G-25;
- ренатурации проинсулина;
- хроматографической очистки нативного проинсулина ионообменной хроматографией на DEAE-сефарозе FF;
- ферментативного расщепления проинсулина;
- хроматографической очистки инсулина ионообменной хроматографией на S-сефарозе FF, ультрафильтрацией и гель-фильтрацией на сефадексе G-50 SG;
- лиофильной сушки Na-соли инсулина человека.

Несмотря на очевидную громоздкость приведенной схемы технологического процесса, на опытной установке ВНИИА были выпущены опытные партии субстанции генно-инженерного инсулина человека (ГИЧ) и зарегистрирована соответствующая временная фармакопейная статья (ВФС). Однако с распадом Советского Союза и сопутствующими экономическими и организационными последствиями выпуск препарата во ВНИИА прекратился.

В 1996 г. в соответствии с Указом Президента РФ «О мерах государственной поддержки лиц, больных сахарным диабетом» правительством РФ была принята Федеральная программа «Сахарный диабет». На основании этого под эгидой РАО «Биопрепарат» в Институте биорганической химии (ИБХ) РАН и Государственном научном центре (ГНЦ) прикладной микробиологии (г. Оболенск) были возобновлены широкомасштабные исследования по разработке промышленной технологии и производства препаратов генно-инженерного инсулина человека. В рамках совместных работ были созданы высокоэффективные штаммы-продуценты препроинсулина человека и разработана лабораторная технология получения субстанции инсулина. К настоящему вре-

мени в ЗАО «Национальные биотехнологии» (правопреемник РАО «Биопрепарат») в г. Оболенске открыто пилотное производство субстанции генно-инженерного инсулина человека, но возможность выпуска готовых лекарственных форм отсутствует.

Технологический процесс производства субстанции ГИЧ в ИБХ РАН осуществляется по следующей схеме:

- получение посевного материала штамма-продуцента:
 - оживление консервированной культуры;
 - выращивание маточной культуры;
 - выращивание инокулята;
- биосинтез гибридного белка:
 - выращивание продуцента в ферментере (ферментация);
 - получение биомассы (сепарирование);
 - дезинтеграция клеточной суспензии;
 - выделение и отмывка телец включения (центрифугирование);
- выделение и очистка рекомбинантного белка:
 - солюбилизация телец включения и восстановление рекомбинантного белка;
 - ренатурация рекомбинантного белка;
 - хроматографическая очистка рекомбинантного белка;
- ферментативное расщепление рекомбинантного белка:
 - хроматографическая очистка инсулина 1;
 - хроматографическая очистка инсулина 2;
 - хроматографическая очистка инсулина 3;
 - получение кристаллического инсулина.

В основе процесса биосинтеза – использование штамма-продуцента *E. coli* JM 109 с рекомбинантной плазмидой pPINS 07. Рекомбинантная плазмидная ДНК содержит искусственный ген, кодирующий гибридный полипептид, состоящий из одного Ig G-связывающего домена белка А из *Staphylococcus aureus*, пептидного линкера His₆GlySerArg и проинсулина человека. Плазида (молекулярная масса 3,3 МДа, 5051 п. о.) содержит в качестве генетического маркера ген β-лактамазы, определяющий устойчивость трансформированных ею клеток бактерий к ампициллину. Экспрессия рекомбинантного белка штаммом-продуцентом индуцируется изопропил-β-D-тиогалактозидом (благодаря наличию в плазмиде *tac*-промотора) и достигает 30 % от суммарного клеточного белка.

Клетки продуцента рекомбинантного препроинсулина человека отделяют сепарированием, дезинтегрируют при высоком давлении для сбора телец включения, многократно отмывают полученные тельца включения от водорастворимых белков и иных клеточных компонен-

тов. За один цикл получают 15–25 кг влажных телец включения, содержащих более 13 % рекомбинантного белка. Полученные тельца включения солюбилизируют в буферном растворе, содержащем мочевины и дитиотреитол (ДТТ) для восстановления внутри- и межмолекулярных дисульфидных связей в рекомбинантном белке. Далее восстановленный рекомбинантный белок подвергают воздействию кислорода воздуха при сильном разбавлении, при этом белок окисляется с образованием дисульфидных связей, соответствующих нативной конформации инсулина (рефолдинг). Происходит ренатурация рекомбинантного белка.

Ренатурированный рекомбинантный белок очищают ионообменной хроматографией и подвергают ферментативному расщеплению трипсином и карбоксипептидазой Б в массовом соотношении 4000 : 2 : 1. После осаждения и предварительной обработки получают инсулин-сырец 86–88 %-й чистоты. На первой стадии очистки гидрофобной хроматографией содержание инсулина достигает 96 %, на второй стадии очистки ионообменной хроматографией проводится окончательное освобождение от иммуногенных примесей, финишная гель-фильтрация проходит в стерильных условиях и позволяет довести качество препарата до фармакопейного. В завершение процесса получают кристаллический цинк-инсулин, который высушивают до необходимой степени влажности. Выход продукта составляет не менее 100 г с 1 тыс. л культуральной жидкости штамма-производителя.

Преимущества процесса:

- одностадийная очистка ренатурированного рекомбинантного белка;
- совместное ферментативное расщепление рекомбинантного белка трипсином и карбоксипептидазой Б;
- эффективное использование хроматографии низкого давления для очистки инсулина.

Требования к качеству субстанции инсулина человека изложены в соответствующих разделах Американской фармакопеи (Ф. США) и Европейской фармакопеи (ЕФ). Инсулин должен быть охарактеризован качественно. Первый показатель определяется методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в сравнении со стандартом, сопоставлением хроматографических профилей инсулина и инсулина-стандарта, расщепленных специфическим ферментом на 4 фрагмента (метод пептидных карт), и установлением биоидентичности (*in vivo* на кроликах по сравнительному содержанию глюкозы в крови). Количественное определение проводится также методом обращенно-фазовой ВЭЖХ. Количество гормона принято оценивать в международных единицах (МЕ), при этом 1 МЕ (IU) = 0,0347 мг инсулина.

19.2. Тиреоидин – препарат щитовидной железы

Этот гормональный препарат получают из высушенных обезжиренных щитовидных желез убойного скота. Щитовидные железы извлекают немедленно после убоя от нормально развитых и здоровых животных на бойнях или мясокомбинатах. Для производства препарата их замораживают при температуре $-8...-12\text{ }^{\circ}\text{C}$ и доставляют в морозильных камерах для переработки. Перед переработкой отобранные железы размораживают, моют в воде, очищают от жира, соединительных тканей, мышц, крупных сосудов и т. д. Затем железы измельчают и полученную кашу раскладывают на плоские эмалированные противни и высушивают в вакуум-сушильном шкафу при температуре не выше $40\text{ }^{\circ}\text{C}$, после чего материал обезжиривают в аппарате Сокслета органическими растворителями с низкой температурой кипения, хорошо извлекающими жиры. Остатки органических растворителей удаляют из сырья просушиванием в вакуум-сушилках при температуре не выше $40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Сухую обезжиренную массу измельчают в фарфоровых шаровых мельницах. Препарат стандартизируют по содержанию органически связанного иода, которого должно быть $0,17-0,23\%$. При необходимости препарат разбавляют молочным сахаром. Действие данного препарата обусловлено наличием тироксина и триидотиронина. Химически тироксин отличается от триидотиронина наличием дополнительного атома иода. Тиреоидин назначают при недостаточной функции щитовидной железы.

19.3. Препараты гипофиза

Из передней доли гипофиза убойных животных для медицинского применения получают такие препараты, как кортикотропин для инъекций, суспензию цинккортикотропина, тиротропин, адипозин.

Кортикотропин. Адренкортикотропный гормон (АКТГ) образуется в базальных клетках передней доли гипофиза. Это полипептидный гормон, состоящий из 39 аминокислот. Его активность определяется биологическим путем и выражается в единицах действия. Кортикотропин является физиологическим стимулятором коры надпочечников.

Распространенный способ промышленного производства гормонов из гипофиза разработан во ВНИИ технологии кровезаменителей и гор-

мональных препаратов в 1987 г. Заключается он в комплексной переработке сырья, когда последовательно выделяют отдельные гормоны из передней доли гипофиза.

Из свежзамороженных передних долей гипофизов готовят фарш, который экстрагируют подкисленным ацетоном (1 %-й раствор HCl в 90 %-м ацетоне). Кислая водно-ацетоновая вытяжка центрифугируется. В фильтре находится АКТГ и лактогенный гормон, осаждаемые ацетоном. Концентрация ацетона в смеси достигает 92 %. Эта смесь отстаивается на холоде при температуре $-2...-5$ °С в течение 10–12 ч. Получают кислый ацетонированный осадок, который отделяют, промывают на нутч-фильтре охлажденным 98 %-м ацетоном и высушивают на воздухе. Кислый ацетонированный порошок растворяют в воде, подкисленной уксусной кислотой, и постепенно добавляют раствор аммиака до значения $pH = 5,0$. В изоэлектрической точке осаждается лактогенный гормон. Осадок отделяют центрифугированием и используют для получения препарата лактина. После отделения лактогенного гормона к остатку добавляют аммонийно-ацетатный буферный раствор ($pH = 5,0$) и пропускают через колонку, наполненную катионитом КМ-сефадекс К-25. После завершения сорбции кортикотропина на ионообменной смоле проводят его десорбцию этанольным раствором аммонийно-ацетатного буфера. Из элюента адренкортикотропный гормон осаждают этанолом. Осадок отделяют центрифугированием, промывают этанолом, ацетоном и высушивают на воздухе. Препарат стандартизуют.

Из остатков изначального сырья далее получают фолликулостимулирующий, лютеинизирующий и тиреотропный гормоны.

Разработан ряд методик подобного ступенчатого выделения лютеинизирующего, фолликулостимулирующего и тиреотропного гормонов из тканей после выделения гормона роста, но уже человеческого гипофиза.

19.4. Гормон роста

Гормон роста был открыт в 1920-е гг., а получен в кристаллическом виде из гипофиза животных в 1944 г. учеными Д. Лайем и С. Эвансом.

В 1956 г. был выделен человеческий соматотропин, а в 1958 г. эндокринолог из Новоанглийского медицинского центра в Бостоне М. Рабен

впервые ввел его ребенку, который не рос из-за того, что его организм вообще не вырабатывал этого гормона. Лечение помогло, и ребенок стал расти.

На тот момент единственным источником получения гормона роста был человеческий мозг – мозг трупов, так как гормон животного происхождения не эффективен для человека.

Большей частью трупный материал поступал из Африки. Гормон извлекался из гипофиза, и, поскольку он разрушается при нагревании, на фармацевтических заводах его пастеризовали, а не стерилизовали. В 1980-е гг. сразу у троих детей, получавших гормон роста, развилось редкое вирусное заболевание – болезнь Крейцфельда – Джейкоба (БКД). Оно характеризуется прогрессирующим слабоумием и потерей контроля над мышцами. В течение примерно 5 лет больной человек умирает.

После обнаружения болезни у детей, получавших гормон роста, распространение лекарства было остановлено. В 1991 г. БКД развилась у семерых детей в США, а по всему миру насчитывалось 50 случаев заболевания, связанных с инъекциями гормона роста. И количество больных могло возрасти, поскольку болезнь вызывается инфекционным агентом, который до появления симптомов может не давать о себе знать длительное время (до 15 лет). Поскольку от мозга трупов как источника гормона пришлось отказаться, возникла проблема – получение синтетического гормона. Гормон роста – это крупнейший белок, производимый гипофизом и состоящий из 191 аминокислоты.

В 1985 г. компания *Genentech* создала второе в истории лекарство на основе рекомбинантной ДНК – соматотропин. Генно-инженерный гормон роста отличался от своего человеческого аналога одной только аминокислотой. И хотя это небольшое несоответствие никак не отразилось на эффективности препарата при его действии на человеческий организм, оно открыло дверь для конкурентов. На следующий год базирующаяся в Индианаполисе фармацевтическая компания *Eli Lilly* создала состоящий из 191 аминокислоты новый гормон роста (препарат гуматотроп), который был на 100 % идентичен (физически, химически и биологически) тому, который вырабатывается гипофизом человека. В настоящее время из-за монополии этих компаний лечение препаратом обходится пациенту от 14 до 30 тыс. долл. в год, что создает трудности экономического порядка.

После выделения гормона железой он попадает в кровеносное русло, где немедленно связывается с альбуминами и другими специфиче-

скими переносчиками, только 5 % секретируемого гормона остается в крови в несвязанном состоянии. С кровотоком гормон доставляется ко всем органам и тканям и контактирует с ними. Однако его специфическое действие начинается после соединения с чувствительными только к этому гормону рецепторами. Известно, что рецепторы к гормонам, имеющим пептидную, белковую и аминокислотную структуры, расположены на поверхности клеток, а рецепторы к гормонам – дериватам жирных кислот и стероидам находятся внутри клетки (в цитоплазме или на мембране ядра). Специфическое избирательное восприятие гормонального сигнала объясняется высочайшим сродством и чувствительностью рецепторов и гормонов. Дефицит гормона в организме может наблюдаться по разным причинам и их всегда необходимо устанавливать. Например, недостаток инсулина может быть от того, что его мало вырабатывается в организме, он быстро расщепляется инсулиназой, вступает в новые соединения; кроме того, структура эфферентных систем с ним не взаимодействует. Каждая из перечисленных причин может быть обусловлена различными факторами. Так, слабая выработка инсулина может основываться: а) на истощении продуцирующих клеток; б) подавлении функции продуцирующих клеток аллоксаном, дегидроаскорбиновой кислотой, нингидрином и др.; в) нарушении отдельных звеньев синтеза инсулина. Из этого ясно, что гормональные препараты эффективны только в определенных условиях.

В соответствии со специфичностью фармакодинамики гормональных препаратов их наиболее часто применяют для восполнения недостающего гормона в организме (при избытке гормона обычно используют фармакологические средства, противодействующие гормону или снижающие функцию гормонопроизводящей железы); для специфической фармакотерапии и фармакостимуляции при заболеваниях, не связанных с недостатком гормона в организме.

Широко известно применение гормональных стероидных препаратов в спорте. Их обнаружение уже не является первостепенной задачей, и от контролирующих лабораторий требуют детекции малых количеств препаратов-аналогов. Активно применяются гормональные препараты-контрацептивы.

Гормональные препараты используются как в медицине, так и животноводстве. Разрабатываются методики выращивания свиней с использованием регулярных инъекций инсулина для ускорения набора веса введением фолликулостимулирующего гормона.

19.5. Получение промышленно важных стероидов

К стероидам относится большая группа биологически важных соединений, среди которых – половые гормоны, сердечные гликозиды, желчные кислоты, витамины, алкалоиды, регуляторы роста растений. В основе стероидов лежит скелет пергидроциклопентанофенантрена.

Процессами биотрансформации называют реакции превращения исходных органических соединений (предшественников) в целевой продукт с помощью клеток живых организмов или ферментов, выделенных из них. Способность клеток микроорганизмов к высокоспецифичной биотрансформации применяется в производстве стероидов. Использование абсолютной стереоспецифичности и субстратной специфичности ферментов клеток позволило создать условия для множества химических реакций в целях структурных перестроек стероидов. В результате были получены новые соединения с лучшими фармакологическими свойствами. Биотрансформация стероидов обычно заключается в селективном воздействии на одно из положений стероидного скелета.

Значимость разработанной микробной трансформации определяется тем, что процессы гидроксилирования прогестерона и его производных лежат в основе промышленного синтеза многих ценных продуктов: противовоспалительных и противоопухолевых препаратов, транквилизаторов, анестезирующих средств, половых гормонов и др.

Кроме биотрансформации стероидные гормоны можно получать с помощью культур клеток растений. Например, культура клеток корня диоскореи дельтовидной (*Dioscorea deltoidea*) продуцирует фитостерин, диогенин и его гликозидные производные (сапонины). Существенно, что способность к сверхсинтезу фураностаноловых гликозидов ряда штаммов диоскореи, например штамма ДМ-ОГ, стабильно поддерживалась в течение 27 лет. Таким образом, культивирование клеток растений *in vitro* представляет собой новое решение проблемы промышленного получения вторичных метаболитов.

В дальнейшем для производства стероидных гормонов прогнозируется применение иммобилизованных клеток, использование оптимального сочетания биологических и химических превращений, а также совершенствование технологии очистки получаемых соединений.

Глава 20 **БИОТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ ФЕРМЕНТОВ**

20.1. Источники получения ферментных препаратов

Ферменты находятся практически во всех растениях, животных и микроорганизмах. Поскольку процесс биосинтеза ферментов в организме связан с обеспечением метаболизма клеток и количество синтезируемых ферментов строго определяется жизненной потребностью организма, то такие объекты не могут служить источником получения ферментных препаратов. Для этого пригодны только микроорганизмы, некоторые растения или отдельные органы растений и животных, способные накапливать значительное количество ферментов.

Растительное сырье. Источником ферментов может быть пророщенное зерно различных злаков (солод). Оно может либо использоваться непосредственно как технический ферментный препарат, либо служить исходным материалом для получения очищенных ферментных препаратов. В тропических и субтропических странах в качестве сырья для промышленного производства протеиназ применяют латекс дынного дерева, латекс растений, относящихся к виду фикусовых, например листья, побеги инжира, сок зеленой массы ананаса и др.

Органы и ткани животных. На всех мясоперерабатывающих комбинатах собирают сырье, содержащее ферменты, консервируют его и используют для получения ферментных препаратов. Таким сырьем являются поджелудочная железа, слизистые оболочки желудков и тонких кишок свиней, сычуги крупного рогатого скота, сычужки молочных телят и ягнят, семенники половозрелых животных. Поджелудочная железа содержит большое количество разнообразных ферментов: химотрип-

син, коллагеназу, эластазу, трипсин, амилазу, липазу и др. Слизистая оболочка желудков свиней и сычугов крупного рогатого скота служит источником пепсина и липазы. Из сычужков молочных телят и ягнят получают реннин (сычужный фермент). Семенники половозрелого скота содержат фермент гиалуронидазу.

Микроорганизмы. В специально созданных условиях микроорганизмы способны синтезировать огромное количество разнообразных ферментов. Они неприхотливы к составу питательной среды, легко переключаются с синтеза одного фермента на другой и имеют сравнительно короткий цикл роста (16–100 ч). Для промышленного получения ферментных препаратов используют как природные штаммы микроорганизмов, выделенные из естественных объектов, так и мутантные штаммы. Продуцентами ферментов могут быть различные микроорганизмы: бактерии, грибы, дрожжи, актиномицеты. Микроорганизмы могут синтезировать одновременно целый комплекс ферментов, но есть и такие (особенно среди мутантных штаммов), которые являются моноферментными и образуют в больших количествах только один фермент.

Классификация и номенклатура ферментов и ферментных препаратов. Согласно современной классификации все ферменты делятся на шесть основных классов по типу катализируемой реакции: 1) оксидоредуктазы; 2) трансферазы; 3) гидролазы; 4) лиазы; 5) изомеразы; 6) лигазы (синтетазы). Большинство промышленно важных ферментов, потребность в которых определяется десятками тысяч тонн, относятся к третьему классу – гидролазам. Обычно препараты, выпускаемые фирмами разных стран, являются комплексными, содержащими помимо основного фермента еще значительное количество сопутствующих ферментов и белков. По этой причине в технологии ферментов препараты чаще классифицируют по основному компоненту в смеси ферментов, присутствующих в данном препарате: амилолитические, протеолитические, липолитические и т. д.

В нашей стране существует определенная система названия ферментных препаратов, в которой учитываются основной фермент, источник получения и степень очистки. Наименование каждого препарата включает в себя сокращенное название основного фермента, видовое название продуцента и препарата, суффикс *-ин*. Например, амилолитические препараты, получаемые из культур *Aspergillus oryzae* и *Bacillus subtilis*, называются амилоризин и амилосубтилин соответственно. Далее ставится индекс, в котором обозначены способ производства и сте-

пень очистки фермента от балластных веществ. При глубинном способе культивирования после названия ставится буква «Г», а при поверхностном – «П». Если это неочищенная культура продуцента, то далее следует буква «х». Между буквами «П», «Г» и «х» может стоять цифра, обозначающая степень чистоты препарата. Индекс 2 обозначает жидкий неочищенный концентрат исходной культуры; 3 – сухой ферментный препарат, полученный высушиванием (распылением) неочищенного раствора фермента (экстракт из поверхностной культуры или культуральной жидкости); 10 – сухие препараты, полученные осаждением ферментов органическими растворителями или методом высаливания. Индексы 15, 18, 20 обозначают препараты, частично освобожденные не только от балластных веществ, но и от сопутствующих ферментов. Номенклатура препаратов с индексом выше 20 не используется, так как в этих случаях речь идет о высокоочищенных и даже гомогенных ферментных препаратах, которые именуется согласно классической номенклатуре и классификации ферментов.

Характеристика активности ферментных препаратов. Ферменты – вещества белковой природы, поэтому в смеси с другими белками установить их количество невозможно. Наличие некоторого фермента в данном препарате может быть установлено по результатам той реакции, которую катализирует фермент, т. е. по количеству образовавшихся продуктов реакции или уменьшению исходного субстрата. В количественном выражении условно активность фермента определяется по начальной скорости ферментативной реакции. Начальная скорость зависит от многих факторов, наиболее важные из них – температура, концентрация субстрата, рН реакционной смеси и время от начала реакции. По этой причине по предложению Комиссии по ферментам Международного биохимического союза были приняты правила определения активностей препаратов и их выражения в единицах активности.

Стандартная единица активности. Эта величина для любого фермента обозначает то его количество, которое катализирует превращение 1 мкмоль субстрата в 1 мин при заданных регламентированных условиях. На русском и немецком языках эта единица обозначается буквой Е, на английском, французском, итальянском и испанском – U. Часто количество субстрата нельзя выразить числом микромолей, так как точно не известна масса молекулы, например при действии на белок, крахмал, пектин, целлюлозу. В этих случаях определяют микроэквивалент затронутых реакцией групп. Так, при гидролизе белка учитывают не число прогидролизированных молекул, а число образовавшихся сво-

бодных карбоксильных или аминных групп, т. е. расщепленных пептидных связей; при гидролизе крахмала и полисахаридов – число прогидролизированных глюкозидных связей и т. д.

Комиссия по ферментам рекомендовала придерживаться следующих условий при установлении активности фермента: концентрация субстрата, фермента и pH выбираются оптимальными для данного фермента, температура 30 °С; активность определяется по начальной скорости реакции, когда концентрация субстрата достаточна для насыщения фермента и соответствует кинетике реакции нулевого порядка.

Если количество прореагировавшего субстрата очень мало или велико, допускается выражение результатов в миллиединицах (мЕ и мU) и килоединицах (кЕ и кU).

Активность ферментных препаратов. Содержание фермента в данном препарате условно выражается в стандартных единицах активности фермента на 1 мл ферментного раствора или 1 г препарата. Активность ферментного препарата выражается в микромолях субстрата, прореагировавшего в присутствии 1 мл ферментного раствора или 1 г препарата в заданных условиях за 1 мин. Число микромолей и будет равно числу стандартных единиц. Если фермент гомогенен, то его удельная активность может быть выражена в стандартных единицах на 1 мг фермента. Если же препарат содержит балласт в виде неактивного белка, его удельная активность выражается в стандартных единицах на 1 мг белка в ферментном препарате. Молекулярная активность представляет собой число миллимолей субстрата или эквивалентов затронутой реакцией групп, прореагировавших в течение 1 мин с 1 ммолем фермента при оптимальных концентрациях субстрата, или число стандартных единиц, входящих в 1 ммоль фермента.

Если фермент содержит характерную простетическую группу или несколько каталитических центров, которые поддаются измерению, его активность можно выразить в величинах активности каталитического центра. Она будет соответствовать молекулярной активности, если молекула фермента имеет один активный центр; если же число каталитических центров n , то активность одного центра будет в n раз меньше молекулярной.

Активность условного препарата. В технологии ферментов помимо общепринятых понятий об активности ферментных препаратов принято пользоваться понятием активности условного ферментного препарата. Это необходимо для оценки работы предприятия, сравнения его с аналогичными заводами, т. е. для сопоставления показателей по всем

видам выпускаемой продукции. В целях такого пересчета предполагают, что предприятие выпускает товарную продукцию в виде стандартного препарата с точно определенной активностью, измеряемой по основному ферменту в стандартных единицах в препарате на единицу массы препарата. Активность основного фермента в таком стандартном условном препарате устанавливается нормативами и называется активностью условного препарата.

За 1 усл. т ферментного препарата принимается 1 т препарата со стандартной активностью. Для пересчета выработанной товарной продукции в условные тонны используют формулу

$$Q_{\text{усл}} = Q_{\text{тов}} A_{\text{ф}} / A_{\text{усл}}$$

где $Q_{\text{усл}}$ – количество условного препарата, т; $Q_{\text{тов}}$ – количество товарного препарата, т; $A_{\text{ф}}$ – фактическая активность товарного препарата, ед/г; $A_{\text{усл}}$ – активность условного препарата, ед/г.

20.2. Область применения и источники ферментов

Производство ферментных препаратов занимает одно из ведущих мест в современной биотехнологии. Постоянно увеличивается объем их выпуска и расширяется сфера применения. Ферменты – высокоактивные нетоксичные биокатализаторы белкового происхождения. Их преимуществом перед химическими катализаторами является действие при нормальном давлении, температуре 20...70 °С, рН от 4 до 9. Они имеют высокую субстратную специфичность, что позволяет в сложной смеси субстратов направленно воздействовать только на определенные соединения.

Согласно принятой классификации и номенклатуре идентифицировано около 2 тыс. ферментов. Промышленно выпускается около 250 наименований, причем 99 % общей суммы реализации ферментных препаратов приходится только на 18 ферментов.

Наибольший удельный вес среди выпускаемых препаратов занимают протеиназы, широко используемые в синтетических моющих средствах, и амилазы для переработки крахмала. Эти два вида препаратов составляют 60 % общего объема выпуска ферментных препаратов за рубежом.

Другими крупными отраслями – потребителями ферментов являются:

- производство вин и соков (10 %);
- производство спирта (8 %);
- сыроделие (5 %);
- хлебопечение (5 %);
- пивоварение (6 %);
- прочие отрасли (6 %).

В России, кроме того, ферменты внедряются в кормопроизводство.

Особое место в общем объеме производства ферментов занимают высокоочищенные ферментные препараты. Их доля в общем объеме очень мала, так как технология сложна, требует больших материальных затрат и времени. Эти препараты очень важны для медицины, аналитических целей и научных исследований.

Ферменты образуются у всех живых существ, однако для их выделения используют только те природные объекты, в которых содержание используемого энзима составляет не менее 1 %.

Источниками ферментов могут быть:

- проросшее зерно различных злаков (солод) – для получения амилаз, латекс фикусовых, дынного дерева – для получения протеиназ;
- отдельные ткани и органы животных (поджелудочная железа, слизистые оболочки желудков и тонких кишок, сырный сычуг крупного рогатого скота);
- микроорганизмы. В специфических условиях микроорганизмы способны синтезировать огромное количество ферментов. Они легко переключаются с синтеза одного фермента на другой, имеют короткий цикл роста (от 16 до 100 ч). Для промышленного получения ферментов используют как естественные штаммы, так и полученные с помощью мутагенеза, селекции и индукции биосинтеза.

Ферменты способны синтезировать бактерии, грибы, дрожжи, актиномицеты; микроорганизмы могут быть моно- или полиферментами.

20.3. Выбор штамма и условий культивирования

Целесообразность применения микроорганизмов для производства ферментов заключается в следующем:

- 1) генетическими манипуляциями удается в тысячу и более раз увеличить уровень катаболитных и в несколько сот раз – уровень биосинтетических ферментов;

2) энергетически оправданно выращивание микробных клеток в больших масштабах в связи с применением недорогих сред и быстрым ростом микроорганизмов;

3) огромное разнообразие реакций, к которым способны микроорганизмы, что особенно касается вторичного метаболизма;

4) микроорганизмы служат источником не только таких ферментов, которые встречаются у животных и растений, но и ряда уникальных ферментов, нигде более не обнаруженных (например, целлюлоза, танназа, гидрогеназа и др.). Среди микроорганизмов есть виды, развивающиеся при экстремально высоких температурах (87 °С), в связи с чем потенциально возможно создание термостабильных штаммов;

5) способность микроорганизмов адаптироваться к различным окружающим условиям, что позволяет переносить культуру на производство, где она растет на дешевых субстратах.

Промышленное производство и применение ферментов основано на двух важных факторах: во-первых, ферменты образуются в живых клетках; во-вторых, они могут проявлять свое специфическое действие в среде независимо от живых клеток.

При первоначальном выделении штамма исходят из того, что микроорганизмы адаптируются к утилизации субстрата, находящегося в изобилии в местах их обитания, и, следовательно, образуют ферменты, реагирующие с этим субстратом. По этой причине продуценты целлюлаз и лигнолитических ферментов выделяются из лесных почв, продуценты пектиназ – из фруктов и растений.

Ферменты близкородственных штаммов имеют сходные свойства, а у дальнеродственных могут сильно отличаться. Первая ступень производства ферментов состоит в селекции организма, образующего желаемый фермент в наибольшем количестве. При этом учитывают следующие общие требования к продуценту:

- обязательное образование внеклеточных ферментов, по причине того, что их легче выделить;
- высокий выход фермента за короткое время;
- легкая очистка фермента от культуральной жидкости;
- штаммы не должны продуцировать антибиотики, токсичные вещества и быть родственниками штаммов, образующих токсины.

Чтобы вызвать сверхсинтез ферментов, используют ряд методов, связанных с изменением условий роста и ведущих к изменению генетики организма.

20.4. Технология культивирования микроорганизмов – продуцентов ферментов и выделение ферментов

Технологический процесс можно разбить на три стадии:

- получение посевного материала;
- наработка производственной культуры методами поверхностного или глубинного культивирования;
- выделение из готовой производственной культуры технических или очищенных ферментных препаратов.

Поверхностный метод заключается в культивировании микроорганизмов на поверхности увлажненных стерилизованных отрубей, размещенных в кюветах. Инкубацию ведут в специальном термостатируемом цехе при постоянном контроле в нем температуры, влажности и подачи воздуха.

Глубинный метод более экономичен. Для его реализации применяются ферментеры из нержавеющей стали, снабженные устройствами для перемешивания и подачи в жидкую питательную среду стерильного воздуха.

Наиболее прогрессивен проточный метод, который обеспечивает непрерывную подачу в ферментер питательной среды и посевного материала и непрерывный отбор продуктов жизнедеятельности и микробимальной массы. Достоинством метода является возможность длительное время поддерживать в автоматическом режиме рост культуры микроорганизмов (до 200 сут).

Выделение и очистка фермента из культуры микроорганизмов – достаточно трудоемкая и дорогостоящая процедура, поэтому если фермент можно использовать в виде неочищенного препарата, его не очищают. В промышленности широко используют коммерческие препараты, чистота которых составляет всего 0,1 % (т. е. 99,9 % – примеси). К таким отраслям относят спиртовую, кожевенную, текстильную промышленность, сельское хозяйство, производство бытовой химии.

Неочищенные препараты получают в мягком режиме высушивания культуры микроорганизмов вместе с остатками питательной среды. Такие препараты получают или из экстракта культуры продуцента, выращенного поверхностным способом, или из фильтрата культуральной жидкости продуцента, выращенного глубинным способом.

Для большинства отраслей пищевой промышленности, научных исследований и медицины требуются очищенные ферментные препара-

ты. Источником выделения фермента может быть биомасса микроорганизмов, экстракт или фильтрат культуральной жидкости. Биомассу микроорганизмов необходимо тщательно измельчить, вплоть до разрушения субклеточных структур: лизосом, митохондрий, ядер и т. д.

Затем препараты очищают осаждением органическими растворителями, солями, после чего диализом, аффинной хроматографией, переосаждением, гель-фильтрацией, сорбцией, кристаллизацией и пр.

Поскольку ферменты имеют белковую природу, то особое значение придают соблюдению режимов, сохраняющих их активность при инактивации сопутствующих балластных белков. Очищенные ферменты хранят при низкой температуре (до $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$). Для стабилизации ферментов в их препараты добавляют коферменты и субстраты.

Ферменты широко используются в различных областях практической деятельности человека как биологические катализаторы. Их источниками могут быть животные, растения и микроорганизмы. К настоящему времени установлено наличие более двух тысяч ферментов, а несколько сотен из них получены как индивидуальные вещества.

Микроорганизмы в качестве продуцентов ферментов представляют особый интерес, поскольку их метаболизм, а следовательно и работа ферментных систем, осуществляется с очень большой интенсивностью.

Если характеризовать суммарную интенсивность ферментных реакций по поглощению молекулярного кислорода в виде коэффициента Q_{O_2} (количество миллиметров кислорода), потребленное 1 мг сухой биомассы за один час, то для клеток печени он равен 2–5; почки – 10–20, дрожжевой клетки – 50–110; у бактерий рода *Acetobacter* – 1,8 тыс., а у *Azotobacter* – 2 тыс.

Помимо высокой интенсивности метаболизма следует помнить об очень большой скорости прироста биомассы микроорганизмов. Это позволяет в течение коротких промежутков времени (иногда за 24–72 ч) получать такие количества сырья для выделения ферментов, которые не могут сравниться с тем, что дают растения и животные.

Важное свойство многих микроорганизмов – способность расти на различных дешевых субстратах, в том числе не имеющих пищевого значения (целлюлоза, углеводороды нефти, метан, метанол и др.). Некоторые субстраты, используемые микроорганизмами, токсичны для человека и животных.

Содержание отдельных ферментов в клетках микроорганизмов может быть весьма высоким. Так, количество рибулезобисфосфаткарбоксилазы у фототрофных бактерий иногда достигает 40–60 % от всех растворимых белков.

Многие микроорганизмы образуют ферменты, которые в большом количестве выделяются в культуральную среду. Эти ферменты в основном принадлежат к гидролазам, расщепляющим белки, крахмал, целлюлозу, жиры и другие нерастворимые в воде вещества.

Выделение ферментных препаратов из клеток микроорганизмов и особенно из культуральной среды после их выращивания проще и экономичнее, чем из растительных и животных тканей.

Ряд ферментов обнаружены только у микроорганизмов. К таким ферментам относятся: танназа, расщепляющая дигаллат до галловой кислоты, рацемазы многих аминокислот, кератиназы, гидролизующие серосодержащие белки – кератины, входящие в состав волос, перьев, рогов и копыт. Некоторые микроорганизмы обладают специфическими декарбоксилазами аминокислот, образуют пенициллиназу, расщепляющую пенициллин до пенициллиновой кислоты и воды.

Такой фермент, как нитрогеназа, участвующая в образовании аммиака из молекулярного азота, обнаружен лишь у бактерий, способных к фиксации N_2 .

Некоторые бактерии способны окислять неорганические субстраты: аммиак, нитриты, сульфид и другие соединения серы, а также двухвалентное железо, что связано с наличием у них особых ферментов. Ряд бактерий и водорослей синтезируют гидрогеназы, катализирующие окисление и образование молекулярного водорода.

Значительное число бактерий способны синтезировать ферменты, позволяющие им использовать метан, метанол, метилированные амины, оксид углерода и другие одноуглеродные соединения в качестве субстратов для роста.

Очистка окружающей среды от ряда загрязняющих ее веществ возможна благодаря способности ферментов, образуемых микроорганизмами, разрушать компоненты пластмасс, пестициды и другие ядовитые соединения.

Способность микроорганизмов развиваться в экстремальных условиях, т. е. при низких и высоких температурах, в отсутствие молекулярного кислорода в кислых или щелочных средах, при высоких концентрациях солей, часто определяется характером их ферментов.

Психрофильные дрожжи *Candida gelida* имеют оптимум роста при 15 °С, при нагревании до 35 °С они погибают: у них необратимо инактивируется только пируваткарбоксилаза. У облигатно-психрофильного штамма *Micrococcus cryophilus* кратковременное нагревание до 25 °С изменяет вторичную и третичную структуру глутамин- и пролин-тРНК-синтетаз. В результате клетки теряют способность соединять тРНК с соответствующей аминокислотой. Некоторые псевдомонады обнаружи-

вают активный рост при 3...4 °С, а их ферменты активны при –5...–10 °С. Исключительное положение среди живых существ занимают термофильные бактерии, имеющие оптимум роста при 60...80 °С и выше. Возможность развития этих бактерий при высоких температурах обуславливается термостабильностью белков. Например, экстремальный термофил *Thermtus aquaticus* обладает энлазой с оптимумом действия при 90 °С.

Гриб *Malbranchea pulchella* var. *sulfurica*, способный расти при 45 °С, выделяет в среду термостабильную протеиназу, сохраняющую активность при 73 °С.

Некоторые мезофильные микроорганизмы также образуют ферменты с высокой термостабильностью, проявляющие максимальную активность при более высокой температуре, чем необходимая для роста продуцента.

Необычна форма жизни галофильных микроорганизмов, их рост наблюдается даже в насыщенном растворе NaCl. Ферменты таких микроорганизмов требуют для проявления максимальной активности высоких концентраций солей. Отношения микробных ферментов к кислотности и щелочности среды во многих случаях также уникальны.

Амилолитическая активность *Aspergillus niger* обеспечивается двумя амилазами, из которых одна стабильна при очень низких значениях pH.

Некоторые амилазы, напротив, требуют для проявления активности резко щелочных условий. Например, амилаза *Bacillus* sp. проявляла максимум активности при pH 10,5. Известны бактерии, развивающиеся в щелочной среде (pH 9,0 и выше) и образующие ферменты с высоким оптимумом pH.

Большой интерес как продуценты ферментов представляют анаэробные микроорганизмы, многие из которых превращают аминокислоты, пурины, пиримидины и другие субстраты путями, отличающимися от известных для аэробных микроорганизмов, животных и растений.

В последние годы установлено, что среди строгих анаэробов имеются бактерии, способные расти в хемолитоавтотрофных условиях. При этом у них действуют системы ассимиляции углекислоты, не свойственные другим организмам, что обусловлено наличием особых ферментов. К числу таких автотрофов принадлежат некоторые метанобразующие, ацетатобразующие и сульфатредуцирующие бактерии.

Внимание, проявляемое к анаэробам, объясняется возможностью получения в результате их деятельности этанола, бутанола, метана, ацетата и других полезных продуктов при переработке растительных остатков и другого дешевого сырья. Культивирование анаэробов исключает необходимость аэрирования и перемешивания питательной среды;

снижается возможность инфицирования, вызываемого недостаточной стерильностью воздуха. Кроме того, использование анаэробных микроорганизмов позволяет проводить процесс в больших емкостях с высоким слоем среды.

Свойство многих ферментов микробного происхождения – их индуцибельность. Так, синтез β -галактозидазы у *Escherichia coli* индуцируется лактозой и начинается менее чем через 3 мин после ее внесения, а при удалении индуктора синтез так же быстро прекращается. По этой причине путем изменения условий культивирования можно добиться образования микроорганизмами больших количеств многих практически важных ферментов.

Известно, что ферменты, катализирующие одну и ту же реакцию, но полученные из разных организмов, могут существенно различаться по свойствам. Примером этого может служить глутаминаза, осуществляющая дезамидирование глутамина с образованием глутаминовой кислоты. У глутаминаз, полученных из клеток *Azotobacter agilis*, оптимум pH = 6,0–7,0; из *Clostridium welchii* – 5,0; из *Mycobacterium tuberculosis* – 8,3. Хлориды ингибируют глутаминазу *Pseudomonas* sp., но не влияют на ее активность у *E. coli* и активируют глутаминазу *Cl. welchii*. Аспарагиназы *E. coli* и *Alcaligenes euirophus* различны по субстратной специфичности.

В итоге следует подчеркнуть, что микроорганизмы обладают очень высокой активностью ферментативных реакций и способны осуществлять многие процессы, отсутствующие у макроорганизмов, благодаря наличию специфических ферментов.

Ферменты сходной функции у микро- и макроорганизмов могут быть различны по свойствам, а у микроорганизмов для проявления своей активности они иногда нуждаются в особых условиях, поэтому изучение ферментов разных микроорганизмов – задача весьма важная.

Получение активных продуцентов. Мутанты в большинстве случаев ауксотрофны по ряду соединений, так как в них произошли определенные нарушения обмена веществ, вызвавшие гипертрофию некоторых функций клетки. Обычно активные штаммы, выявленные из естественных источников, подвергают действию мутагенов несколько раз, т. е. осуществляют ступенчатую селекцию. В результате получают высокопродуктивные штаммы. Часто эффективно комбинированное воздействие мутагенов химической и физической природы. Так, применение этиленimina и ультрафиолетового излучения в сочетании со ступенчатым отбором позволило получить очень активные штаммы *Asp. awamori*, используемые как продуценты амилолитического, протеолитического

и других ферментных комплексов. Селекция производственно ценных штаммов ведется и на самих предприятиях.

Непременным условием правильно поставленного промышленного процесса являются такие мероприятия по сохранению микроорганизмов-продуцентов. Существует ряд методов хранения производственно ценных штаммов, обеспечивающих их высокую биохимическую активность. В музеях живых культур при заводских лабораториях культуры периодически пересеваются. Однако пересевы через короткие промежутки времени могут снизить активность микроорганизмов, поэтому после развития культуры на плотной среде ее заливают стерильным вазелиновым маслом. Во многих случаях лучшим способом хранения является лиофилизация культур.

Питательные среды для культивирования микроорганизмов. Питательные среды по своему назначению делятся на три основные группы: для поддержания штаммов-продуцентов в лаборатории и в музее; для получения посевного материала; употребляемые в больших объемах в основном процессе производства. Если первая группа сред подбирается исходя из физиологических потребностей микроорганизмов, то две последние должны удовлетворять и требованиям производства, т. е. должны быть достаточно дешевыми. Состав сред, обеспечивающих накопление того или иного фермента, может значительно отличаться от состава сред, применяемых для выделения и поддержания культуры продуцентов.

Как уже было отмечено выше, некоторые ферменты микроорганизмов индуцибельны и требуют для своего синтеза присутствия в среде индуктора, причем индуктором не всегда может быть субстрат, на который фермент действует. Так, например, если для синтеза липазы *Aps. niger* благоприятно присутствие в среде растительного масла, а для синтеза рибонуклеазы – нуклеиновых кислот, то для повышенного синтеза α -амилазы *Vac. rotuxa* недостаточно присутствия в среде растворимого крахмала, необходимо добавление гидролизата казеина. При замене органических соединений азота неорганическими фермент не синтезировался. В целях снижения себестоимости производства ферментов подбирают наиболее дешевые источники сырья, пригодные для культивирования микроорганизмов-продуцентов.

При промышленном получении гидролаз обычно используют различные отходы, содержащие специфические субстраты. Так, в производстве пектолитических ферментов применяют пектинсодержащее сырье, например свекловичный жом, для целлюлолитических – солому, отруби и другие целлюлозосодержащие субстраты. Но использова-

ние в промышленности сред с такими нерастворимыми субстратами не всегда оказывается технологичным, а также затрудняет направленное ведение ферментации при глубинном культивировании продуцентов.

Применение сред с растворимым соединением углерода дает возможность устранить эти недостатки, сократить сроки ферментации и вести процесс на современном уровне. Перспективным сырьем для получения некоторых микробных экзоферментов (пектиназа, целлюлаза и др.) признана молочная сыворотка – дешевый побочный продукт производства сыра, творога, казеина. Использование молочной сыворотки в качестве питательной среды позволяет также осуществить непрерывный способ получения ряда экзоферментов.

Для получения целлюлазы при помощи термотолерантного штамма *Asp. terreus* подобрана дешевая питательная среда с пшеничной соломой в виде сечки и муки.

При приготовлении сред для промышленного выращивания продуцентов ферментов может быть использована биомасса других микроорганизмов, подвергнутая гидролизу или экстракции.

Разработан способ экстрагирования биомассы грибов-продуцентов пектиназы и последующего введения экстрактов в питательную среду, позволяющий полностью утилизировать всю получаемую биомассу, сократив на 9 % количество экстракта свекловичного жома и интенсифицировав биосинтез пектолитических ферментов в 2,4 раза.

Разработана также замкнутая технологическая схема получения пектолитических ферментов, позволяющая полностью утилизировать отходы микробиологического производства путем возврата их в технологический процесс.

Поиски новых питательных сред, удовлетворяющих требованиям современного производства ферментов, способных заменить исходное сырье (кормовые и пищевые продукты), – актуальная проблема биотехнологии.

20.5. Выделение и стабилизация ферментов

Методы выделения и очистки ферментов микроорганизмов различны и определяются в зависимости от локализации фермента (в клетках или культуральной среде) и целей применения. Неочищенные ферментные препараты получают сушкой и размельчением мицелия гриба вместе с твердым субстратом (отруби, жом и др.)

или высушиванием продуцента вместе с культуральной жидкостью на распылительной сушилке. Высушенные препараты размалываются в порошок для дальнейшего использования. Удельная ферментная активность таких препаратов невелика, но они дешевле и достаточно устойчивы при хранении. Этим способом получают амилазы, протеазы, целлюлазы для сельского хозяйства и некоторых отраслей промышленности.

Сиропы получают при сгущении отделенной от биомассы микроорганизма культуральной жидкости, содержащей фермент.

В лабораторной практике и промышленности существуют различные способы концентрирования, однако лишь некоторые из них могут быть применены для сгущения ферментных растворов.

При промышленном производстве ферментов наряду с активностью важными показателями являются их термоустойчивость, рН и стабильность. Следует также учитывать, что увеличение концентрации неочищенных растворов ферментов может сопровождаться повышением содержания ингибирующих примесей до критического с одновременным разложением и удалением стабилизирующих продуктов. Но обычно уменьшение содержания воды при сгущении приводит к снижению скорости химических и биохимических процессов.

Известно несколько способов концентрирования: 1) без изменения фаз (мембранные); 2) с изменением фаз (вымораживание, выпаривание). Концентрирование с помощью мембран основано на том, что состав жидкости может быть изменен при пропускании ее через мембрану с селективной проницаемостью. Идеальная мембрана должна быстро пропускать необходимое вещество из раствора, однако служить барьером для всех других компонентов.

Возможен и другой вариант мембраны, при котором необходимое вещество остается, а все другие компоненты пропускаются. На практике применяют мембраны обоих типов.

Для сгущения термочувствительных жидкостей используется прием, основанный на избирательной кристаллизации воды в растворе при охлаждении ниже 0 °С. Сущность этого метода концентрирования заключается в том, что вода сгущаемого раствора превращается в кристаллы льда, увеличивая тем самым концентрацию растворимых веществ. Кристаллы льда удаляются центрифугированием или прессованием. Операция повторяется многократно до получения необходимой концентрации фермента. При таких условиях полностью исключаются потери термостабильных компонентов раствора (отсутствует термическое разрушение).

Разработка новых способов концентрирования биологических жидкостей не уменьшает значения такого общеизвестного приема, как вакуум-выпаривание. Обилие конструкций выпарных установок и уровень современного развития исследований в этой области открывают большие возможности использования процесса выпаривания.

Физический смысл выпаривания растворов – разделение их на две части: воду, удаляемую в виде пара, и обогащенный растворимыми веществами концентрат. В ферментном производстве широко распространен процесс концентрирования водных растворов под вакуумом. Так осуществляют, например, сгущение водного экстракта из мицелия *Asp. oryzae* для получения препарата протеоризина. Большое количество ферментных препаратов производят с использованием способа вакуум-концентрирования.

Высушивание ферментных препаратов выполняется в вакууме при распылении или из замороженного состояния. После высушивания препарат в случае нестойкости необходимо смешать со стабилизатором или с наполнителем (крахмал, декстрины, неорганические нейтральные соединения, тальк и др.). В некоторых случаях фермент стабилизируется добавлением в культуральную жидкость хелатирующих агентов. Так, щелочную протеазу *Vac. subtilis* удалось стабилизировать добавлением в среду триполифосфата натрия, нитрилотриацетата натрия и этилендиаминтетраацетата.

Применяются ферменты и в виде гомогенных белков. Получение ферментов в чистом виде осуществляется различными способами в зависимости от их свойств и области применения. Обычная схема получения экзоферментов может быть следующей:

I. Культуральная жидкость	II. Ферментный препарат
↓ <i>центрифугирование</i>	Обессоленный раствор
Надосадочная жидкость	↓ <i>осаждение ацетоном</i>
↓ <i>диализ</i>	Фильтрат
Диализат	↓ <i>фракционирование ацетоном</i>
↓ <i>выпаривание в вакууме</i>	Осадок
Концентрат	↓
↓ <i>осаждение солями аммония</i>	Водный раствор
Осадок	↓ <i>гель-фильтрация</i>
↓ <i>диализ</i>	Раствор фермента
Водный раствор	↓ <i>высушивание в вакууме</i>
↓ <i>гель-фильтрация</i>	III. Чистый фермент
Обессоленный раствор	
↓ <i>выпаривание</i>	

В промышленности высокая степень очистки ферментов не всегда нужна. Очистка должна быть очень высокой в случае использования ферментов как терапевтических препаратов.

Очистку и разделение ферментов, образующих комплексы, проводят, применяя ионообменные смолы. Ионообменный метод, например, позволяет разделить ферменты пектолитического комплекса грибов, очистить и выделить пектинэстеразы, полигалактуроназы и пектин-трасселиминазы.

Для использования фермента как терапевтического препарата иногда применяется микрокапсулирование. Фермент, заключенный в специальные капсулы, достигает органа или ткани, где он должен проявить свою активность, там капсула растворяется, и фермент попадает в тканевую жидкость.

В настоящее время все шире применяются так называемые иммобилизованные ферменты, т. е. ферменты, прочно связанные с различными носителями. Помимо иммобилизации высокоочищенных ферментов весьма перспективен способ иммобилизации целых клеток микроорганизмов, обладающих той или иной ферментной активностью. В этом случае фермент более стабилен.

Процесс очистки фермента от балластных веществ сводится к освобождению его от нерастворимых веществ, сопутствующих растворимых веществ и других ферментов. Процессы получения очищенных препаратов из поверхностных и глубинных культур несколько различаются. Из поверхностных культур труднее получить высокоочищенные препараты из-за большого количества балластных веществ. Из глубинных культур получить очищенные препараты немного легче, но при этом приходится вести выделение из разбавленных растворов. Оно осложняется, если фермент внутриклеточный, и тогда необходимо разрушать клетки микроорганизмов.

Из табл. 11 очевидно, что экстракт из поверхностной культуры или фильтрат культуральной жидкости является исходным материалом для получения ферментов различной степени очистки. На первом этапе выделения отходы процесса – нерастворимая часть культуры биосрот, содержащий нерастворимые включения среды и биомассу продуцента.

Далее в зависимости от свойств выделяемого фермента и сопутствующего ему балласта схема очистки и получения ферментного препарата может включать в себя различные приемы и методы, такие как концентрирование, диализ, осаждение органическими растворителями, солями, гель-фильтрация, афинная хроматография, иммобилизация, суш-

Принципиальная схема получения очищенных ферментных препаратов из культур микроорганизмов

Стадия очистки	Объем, мл	Общее количество белка, мг	Глюкозамилазная активность				Амилолитическая активность		Транслюкциданная активность*
			общая, ед.	удельная, ед/мг белка	выход, %	степень очистки	общая, ед.	выход, %	
Исходная культуральная жидкость	1200	13 600	28 500	2,1	100,0	1,0	9500	100	Глюкоза, изомальтоза, паноза
Отделение биомассы, концентрирование, отделение балласта	560	11 100	25 600	2,3	90,0	1,1	8500	89,00	—»—
Осаждение ацетоном, растворение в воде	350	2040	19 800	9,7	69,5	4,6	1050	11,30	—»—
Ультрафильтрация	55	1610	18 200	11,3	64,0	5,4	860	9,10	—»—
Хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе	555	298	15 000	50,4	52,5	245	30,0	0,35	Нет
Ультрафильтрация	16	250	13 450	54,0	47,2	25,7	27,5	0,29	—»—
Гель-фильтрация через акрилекс П-100	100	140	11 400	76,5	40,5	36,5	22,8	0,24	—»—
Обессоливание, лиофилизация	0,1**	92	7150	77,0	25,0	37,0	14,3	0,15	—»—

* Характеризуется хроматографически по наличию изосахаров.

** Выражено в граммах.

ка термолабильных материалов и т. д. Исходя из этого, первоначально рассмотрим получение технических ферментных препаратов, а затем без особого акцента на поверхностном или глубинном способе культивирования – более сложные способы очистки и выделения ферментов.

20.6. Получение неочищенных ферментных препаратов

Неочищенные ферментные препараты представляют собой культуру микроорганизма вместе с остатками питательной среды, высушенную при мягком режиме до влажности не более 8–12 %.

Неочищенный ферментный препарат может быть получен на основе поверхностной или глубинной культуры. Глубинная культура может быть перед сушкой очищена от нерастворимой части (твердая взвесь среды и биомассы продуцента) или высушена вместе с ней.

Получение сухой поверхностной культуры. Поверхностная культура микроорганизма имеет влажность от 35 до 58 %. Это низкостабильный продукт, который следует либо немедленно использовать в производстве, либо высушивать до равновесной влажности (10–12 %). Перед высушиванием культура, выгруженная из растительной камеры, измельчается до определенной величины частиц и далее поступает на высушивание.

Для сушки культуры микроорганизма могут быть применены ленточные, тоннельные, шахтные, барабанные, шкафные и вибрационные сушилки. Обычно используют барабанные сушилки прямоточного типа. Влажная культура поступает в сушилку одновременно с теплоносителем, имеющим температуру 80...85°C. Такую высокую температуру допустимо применять потому, что высушиваемый материал содержит большое количество влаги, а при ее испарении частицы культуры почти не нагреваются и активность ферментов сохраняется практически полностью. У большинства барабанных сушилок на внутренней поверхности есть насадка в виде лопаток или крестовины. Барабан вращается медленно, с частотой от 3 до 8 мин⁻¹. Высушиваемый материал с помощью лопаток поднимается, пересыпается и передвигается вдоль барабана. Происходит некоторая дифференциация частиц культуры по размерам – более крупные частицы падают почти вертикально вниз и вновь подхватываются лопатками, а мелкие подхватываются теплоносителем, траектория их падения несколько смещается, и они быстрее перемеща-

ются по барабану. Таким образом, высушенный в этой сушилке продукт имеет равномерную влажность по всей массе. Длительность пребывания высушиваемой частицы в сушилке 3–7 мин, скорость движения подаваемого теплоносителя 2–3 м/с, температура воздуха на входе 80...85 °С, на выходе 60...65 °С, температура высушенного материала 40 °С. Потери активности в процессе сушки составляют 3–10 %.

Другой вид сушилок – это паровые конвейерные сушилки, представляющие собой герметизированный ленточный конвейер. При сушке в таких установках потери активности больше, но они очень компактные и имеют большую производительность. Но все же необходимо отметить, что потери могут доходить до 10–20 %. Это связано с тем, что дифференцирование частиц культуры по размерам отсутствует, мелкие и крупные частицы находятся в сушилке одинаковое время, мелкие частицы сильно пересыхают, ферменты инактивируются быстрее, крупные частицы немного недосушиваются, в них потери активности ниже. Но они могут возрастать из-за повышенной влажности при хранении.

Для высушивания поверхностной культуры можно использовать самые различные конструкции сушилок, в которых длительность пребывания культуры сокращена до 5–8 мин при температуре продукта на выходе не выше 40...42 °С, что позволяет свести до минимума потери активности.

Готовую сухую культуру обычно упаковывают на специальной фасовочной машине по 25–40 кг, водонепроницаемые мешки зашивают на зашивочной машине и отправляют на склад готовой продукции.

Очистка культуральной жидкости от твердых взвесей. Большинство продуцентов накапливает основную часть синтезируемых ими ферментов в питательной среде. При получении очищенных ферментных препаратов нерастворимую часть среды вместе с биомассой продуцента отделяют на фильтрах, центрифугах или сепараторах.

В микробиологической промышленности наиболее широко используют ячеиковый барабанный вакуум-фильтр непрерывного действия с наружной поверхностью фильтрования. Эти фильтры имеют высокую степень механизации и позволяют осуществлять фильтрование различных суспензий с постоянной скоростью. Барабанные вакуум-фильтры представляют собой барабан, погруженный в емкость, в которую непрерывно подается культуральная жидкость. Поверхность барабана перфорирована и обтянута фильтрующей тканью (батист или синтетическая ткань аналогичного типа).

Иногда при наличии в культуральной жидкости трудно отделяемых осадков с высокими удельными сопротивлениями в качестве фильтру-

ющей поверхности применяют намывной слой. Съем осадка на этих фильтрах производится специальным ножом. При каждом обороте барабана вместе с осадком удаляется часть намывного слоя и фильтрующая поверхность обновляется. Барабан вращается медленно, с частотой 0,13–0,26 об/мин⁻¹ и проходит последовательно зоны фильтрования, подсушивания, промывания осадка, подсушивания и отдувки. Барабан разделен на секции с помощью неподвижной распределительной головки, состоящей из нескольких камер, которые соединены с вакуум-приемниками фильтрата и промывных вод соответственно, а также с линией сжатого воздуха.

Барабанные фильтры удобны для отделения не только биомассы продуцента, но и нерастворимых взвесей, которых сравнительно много в среде (выжимки, отруби, жмых, ростки и т. д.). К недостаткам фильтров этого типа можно отнести их сравнительно низкую производительность, громоздкость (отношение удельной поверхности фильтрования к объему фильтрата небольшое) и невозможность обеспечения асептических условий.

В ферментной промышленности реже используют рамные фильтр-прессы периодического действия с ручной выгрузкой осадка. С их помощью можно получать прозрачные фильтраты, но работают эти фильтры периодически без регенерации фильтрующей поверхности. Поскольку шламовое пространство ограничено, а слой осадка к концу фильтрования достигает значительной толщины, то скорость фильтрования падает, несмотря на повышение рабочего давления. При заполнении шламового пространства осадком фильтр-пресс отключают, разбирают и промывают или меняют фильтрующее полотно. Производительность фильтр-пресса много меньше, чем барабанного вакуум-фильтра. Она лимитируется содержанием осадка в фильтруемой жидкости и объемом рамного пространства фильтр-пресса. Процесс фильтрования в рамном фильтре ведется под давлением 0,6–0,4 МПа. Культуральная жидкость через отверстия в стенке рамы поступает во внутреннюю полость фильтрующего элемента, взвесь задерживается на фильтрующих поверхностях, а фильтрат проходит через фильтрующую салфетку и стекает по канавкам в плитах в трубопровод. Обычно первые порции фильтрата бывают мутные и их повторно фильтруют.

Недостатки фильтр-пресса в значительной степени устранены в конструкции с горизонтальными камерами. Этот фильтр-пресс состоит из ряда расположенных одна над другой горизонтальных фильтровальных плит, между которыми натянута фильтровальная ткань. Фильтровальные плиты размещены между верхней и нижней поддерживающими плитами, а фильтровальная ткань натянута на направляющие ролики.

Цикл работы фильтр-пресса складывается из сжатия плит, фильтрования, промывания и обезвоживания осадка, раздвигания плит и разгрузки осадка одновременно с перемещением ткани и ее промыванием. Работа фильтр-пресса ФПАКМ полностью автоматизирована. Эти фильтры имеют развитую фильтрующую поверхность (на 8 м^2 площади, занимаемой установкой, приходится до 25 м^2 фильтрующей поверхности). Осадок отжимается под давлением $0,8\text{--}1,5 \text{ МПа}$ и имеет влажность не более $60\text{--}70 \%$; наблюдаются сравнительно небольшие энергозатраты ($0,8\text{--}1 \text{ кВт}\cdot\text{ч}$ на 1 м^2 фильтрующей поверхности). Удельная производительность его в $6\text{--}8$ раз выше, чем у других фильтр-прессов (при концентрации твердой фазы в суспензии $4\text{--}7 \text{ г/л}$ до $1 \text{ тыс. л}/(\text{м}^2 \cdot \text{ч})$, потери активности не превышают $4\text{--}5 \%$). Установки ФПАКМ выпускаются с площадью фильтрующей поверхности от $2,5$ до 50 м^2 . Их применение для очистки ферментных растворов очень перспективно. Этот тип фильтров особенно рекомендуется для фильтрования взвеси культуральной жидкости бактерий.

К фильтрам, работающим под давлением, относятся различные конструкции листовых фильтров. Общим для них является наличие плоских фильтровальных элементов с жестким каркасом. Осадок с фильтрующей поверхности может удаляться различными способами: сжатым воздухом, паром, вибрацией, под действием центробежной силы.

Некоторые бактериальные культуры даже при использовании вспомогательных фильтрующих материалов фильтруются со скоростью ниже $30 \text{ л}/(\text{м}^2 \cdot \text{ч})$. В этих случаях для отделения биомассы и удаления взвеси широко применяются сепарирующие центробежные машины. В ферментном производстве используются сепараторы-кларификаторы типа ВСМ, представляющие собой емкость, внутри которой располагается барабан. Внутри него находятся концентрические цилиндры-вставки. Очищаемый раствор по патрубку поступает в цилиндр с наименьшим радиусом, затем проходит вдоль установленных цилиндров, каждый раз меняя направление. Осветленная жидкость удаляется из барабана с помощью напорного диска под давлением, а осадок под действием центробежной силы отбрасывается к внутренней стенке цилиндрических вставок. Производительность сепараторов этого вида может достигать $2\text{--}5 \text{ тыс. л/ч}$.

При производстве ферментных препаратов используются различные типы и конструкции саморазгружающихся сепараторов. В нашей стране применяют сепараторы типов АСЭ-3, АСИ, АСЭ-Б с центробежной пульсирующей выгрузкой осадка, имеющие производительность $500, 1500$ и 2000 л/ч соответственно при диаметре барабана 600 мм и межтаре-

лочном зазоре 0,5 мм. На научных предприятиях используются так называемые сопловые сепараторы фирмы *Alfa Laval* (Швеция) типов QX и FEUX производительностью от 80 до 200 м³/ч.

Фирма *Alfa Laval* выпускает фактически обеспоживающие сопловые высокоскоростные сепараторы – так называемые бактофуги типа D3187M (производительность 6 м³/ч) и АХ-213 (производительность до 36 м³/ч). Фактор разделения, например, на бактофуге АХ-213 равен 142 тыс., что позволяет получать фугат, почти полностью очищенный от микроорганизмов и тончайшей взвеси, что очень важно.

Бактофуга закреплена на станине. На ней расположен вал с фрикционной муфтой и тормозом, червячная передача, вертикальный полый шпиндель ротора с питающим насосом. На полый вал насажен барабан с набором конических тарелок. Верхняя часть станины вместе с колпаком и устройством для отвода удаляемой жидкости заключена в охлаждающую рубашку, что обеспечивает низкие температуры при сепарировании – это чрезвычайно важно, так как повышение температуры при отделении осадка может привести к инактивации ферментов. Исходная суспензия попадает в ротор снизу через полый вал и под действием центробежной силы распределяется по тарелкам. Твердые частицы направляются к стенкам ротора и непрерывно выгружаются через сопла с небольшим количеством жидкости. Основная часть жидкости удаляется из бактофуги под давлением через верхний параксиальный выпуск. Удаление чистого фильтрата происходит непрерывно.

Микробные клетки и другие взвешенные частицы с небольшим количеством жидкости собираются под крышкой над ротором и поступают вниз вдоль сборной крышки по впускной трубе в циклон, где деаэрируются. Загрязненный воздух направляется в верхнюю часть крышки ротора, где вновь смешивается с микробными клетками, выходящими через сопла, – образуется замкнутый цикл. Концентрат микробных клеток, отделенный от воздуха, удаляется через нижний патрубок циклона.

Этот вид сепаратора обладает большими преимуществами: герметичностью процесса, непрерывностью загрузки суспензии и отбора фильтрата, очисткой воздуха от продуцента или фермента, возможностью ведения процесса при низких температурах и т. д. Можно смело утверждать, что этот тип сепараторов будет успешно применяться в ферментной промышленности в XXI в. Однако следует отметить, что эффективность отделения биомассы во многом зависит не только от типов используемых аппаратов, но и от состава среды, размеров отделяемых частиц, количества нерастворимой фракции, физико-химических характеристик фильтрующих материалов, температурных режимов.

В целях улучшения процесса фильтрации проводят предварительную химическую обработку культуральной жидкости. Для этого культуральную жидкость подщелачивают до pH 8–8,5 и вводят 0,1 %-й раствор хлористого кальция, в результате образуется гель фосфата кальция, который способствует наиболее полному отделению осадка при наименьших потерях. Но предварительная химическая обработка не всегда дает хорошие результаты, поэтому для повышения эффективности процесса часто используют различные кизельгуры, например диатомит и радиолит (Япония), микрозил (Франция), диатомит (Бельгия), кларгель (Великобритания) и т. д. Применение этих наполнителей может резко повысить скорость фильтрации, но вместе с этим увеличиваются потери активности на этой технологической стадии.

Полученную биомассу продуцента вместе с нерастворимыми частицами среды (бишрот) при необходимости стерилизуют, высушивают и используют в качестве корма для животных. Фильтрат культуральной жидкости нестабилен, он не может храниться и должен немедленно направляться на дальнейшую обработку для получения очищенных ферментных препаратов.

20.7. Экстрагирование ферментов из поверхностных культур

Все ферменты – водорастворимые белки, поэтому наилучший экстрагент для них – вода. Для извлечения ферментов из дрожжей или бактерий необходимо подвергнуть механическому или автолитическому разрушению их клеточные стенки, обладающие высоким диффузионным сопротивлением. Оболочки мицелиальных нитей имеют меньшее диффузионное сопротивление, чем оболочки бактериальных и дрожжевых клеток, поэтому дезинтеграции культуры грибов не требуется.

Извлечение ферментов проводят как из влажных, так и из сухих поверхностных культур грибов. Сухая культура может храниться длительное время без потери активности ферментов, и из нее получают более концентрированные экстракты. Технологически это выгоднее, но при подсушивании культуры имеют место потери активности, и потому экстрагирование целесообразно вести из влажной культуры. При экстрагировании различные водорастворимые вещества извлекаются из культуры с неодинаковой скоростью, происходит их частичное фракционирование,

удельная активность ферментов в экстракте повышается в 3,5–4 раза по сравнению с исходной культурой в результате отделения большей части веществ (до 75 %) с нерастворимым остатком – биошротом.

На полноту экстрагирования ферментов из культур оказывают влияние многие факторы: температура, pH, длительность процесса, конструктивные особенности экстракционных аппаратов, природа извлекаемого фермента, количество отобранного экстракта с единицы массы загруженной в аппарат культуры и т. д.

Одновременно с ферментами экстрагируются многие другие соединения, и часто скорость извлечения балластных веществ больше скорости экстрагирования из культуры целевого фермента.

Таким образом, рациональнее пойти на некоторые потери фермента и закончить экстрагирование на оптимальном значении отношения активности фермента в экстракте к сумме извлекаемых веществ. Этот вопрос решается экспериментально для каждого вида продуцента.

Влиять на процесс экстрагирования с помощью температуры практически невозможно, так как ферменты очень термолабильны и инактивируются даже при 35...40 °С. Кроме этого, такое повышение температуры влечет за собой увеличение содержания сухого вещества в экстракте и уменьшение удельной ферментативной активности на 1 г сухого вещества, повышение опасности инфицирования экстрактов. Исходя из этого, при проведении экстракции в заводских условиях стремятся подавить развитие микрофлоры путем максимального снижения температуры воды до 22...25 °С и применения антисептиков (формалин, бензол, толуол, хлороформ и др.). В большинстве случаев ферменты наиболее полно извлекаются при pH = 5–7.

В целях получения концентрированных экстрактов при небольших потерях ферментов с биошротом необходимо применять специальные экстракционные установки. До недавнего времени для этого широко использовались диффузионные батареи. В них можно получить экстракт с содержанием сухого вещества от 7 до 14 % в зависимости от вида культуры, среды и величины отбора экстракта.

Диффузор представляет собой цилиндрико-коническую емкость, снабженную рубашкой. В центральную цилиндрическую часть аппарата помещают сухую или влажную поверхностную культуру и фиксируют ее двумя сетками снизу и сверху. Экстрагент подают в диффузор снизу, обычно это вода с температурой 22...28 °С, и заполняют диффузор полностью до уровня сливной трубы. Подача воды прекращается на определенное время (в зависимости от вида фермента это может быть от 30 до 60 мин), затем ее вновь включают и с помощью свежей воды вы-

тесняют экстрагент из диффузора в диффузор до его полного заполнения, и вновь вся система останавливается на определенное время. Таким образом все повторяется до тех пор, пока в последнем, восьмом диффузоре экстрагент простоит еще τ_8 , т. е. если $\tau = 30$ мин, то $\tau_{\text{общ}} = 4 \text{ ч} (0,5 \text{ ч} \cdot 8)$.

После этого отбирают готовый экстракт. Непрерывность работы батареи обеспечивается наличием в системе 10 диффузоров. После прохождения первого цикла экстракции через 8 диффузоров в диффузоре № 1 уже прошла 8-кратная экстракция, там в культуре практически нет ферментов, поэтому этот (№ 1) диффузор отключается для разгрузки, вода подается на диффузор № 2, а в конце процесса диффузор № 9 заполняется свежей культурой, и съём экстракта через 30 мин настаивания производят с диффузора № 9. К этому времени № 1 разгружен и вымыт, № 10 загружен свежей культурой, № 2 отключен на разгрузку, вода подается на № 3 и т. д. Фактически диффузионная батарея работает в непрерывном режиме: каждый диффузор периодически находится в головном, промежуточном и хвостовом состоянии.

Но эти установки для экстрагирования ферментов из поверхностной культуры имеют низкую производительность, требуют больших затрат ручного труда, и в них наблюдаются существенные потери активности.

Таким образом, исследования и поиск наиболее совершенной конструкции по экстракции ферментов из поверхностных культур микроорганизмов в непрерывном режиме и с минимальной затратой ручного труда ведутся постоянно. На ферментных предприятиях нашей страны успешно испытывался и определенное время работал с хорошими показателями диффузионный аппарат конструкции С. М. Гребенюка. Его экстрактор состоит из горизонтального корпуса со шнеком и вертикального корпуса со шнеком. Загрузка свежей культуры осуществляется через дозатор; экстрагент подается через течку и поступает сначала в вертикальный корпус, затем переходит в горизонтальный корпус вплоть до ситового пояса, из которого и происходит отбор экстракта из грибной поверхностной культуры, т. е. поток экстрагента находится в состоянии противотока с культурой микроорганизма.

В ферментном производстве используются экстракторы роторного типа фирмы *Rouns Daun*, состоящие из неподвижного корпуса, внутри которого находится ротор, разделенный на 16–20 отсеков, вращающийся вокруг вертикальной оси. Каждый отсек имеет ситчатое дно, на которое подается измельченная культура гриба. Ротор медленно вращает-

ся и последовательно проходит четыре участка, на каждом из которых культура смачивается водой или экстрагентом из предыдущих отсеков, вытяжка отсасывается вакуум-насосом и подается в следующий отсек для увлажнения свежей культуры, где вновь отбирается и передается в третий отсек и т. д. При завершении одного оборота ротора биошрот разгружается, и отсеки вновь загружаются свежей культурой.

В настоящее время наблюдается тенденция к более широкому использованию пресс-диффузии, которая заключается в том, что культура после настаивания с водой отпрессовывается, затем снова настаивается при меньшей концентрации ферментов в получаемом экстрагенте, вновь прессуется и т. д. Вероятно, после удачного аппаратурного решения данного принципа он найдет широкое применение в промышленности.

20.8. Концентрирование ферментных растворов

Экстракты из поверхностных культур микроорганизмов и фильтраты глубинной культуры нестабильны при хранении. Для получения готовых форм технических препаратов (П2х и Г2х) их необходимо сконцентрировать. Чаще всего в этих целях технология ферментных препаратов использует методы вакуум-выпаривания. Вакуум-выпаривание применяется в качестве одного из этапов получения сухих технических или очищенных ферментных препаратов. Ферменты очень чувствительны к температуре выпаривания, поэтому основным условием концентрирования ферментных растворов является кратковременное ведение процесса при низких температурах кипения, чтобы выпариваемая жидкость не нагревалась выше определенной, критической для данного фермента температуры, т. е. чтобы не наблюдалось инактивации фермента. Следует также учитывать, что чем чище раствор, чем меньше он содержит сопутствующих веществ, тем более чувствительны ферменты к воздействию высоких температур. В концентрированных экстрактах из поверхностных культур инактивация ферментов значительно меньше, так как в экстракте содержится очень большое количество защитных соединений, которые препятствуют инактивации ферментов. Зависимость стабильности ферментов экстракта от температуры после концентрирования вакуум-выпариванием близка к тому, как ведут себя ферментные растворы со стабилизатором при различных температурах кипения.

При концентрировании фильтратов культуральной жидкости наблюдаются несколько большие потери, поэтому ферменты культуральной жидкости стабилизируют различными соединениями. В процессе концентрирования ферментных растворов происходит изменение растворимости многих соединений и выпадение их осадков, а суммарное содержание сухого вещества в концентрате снижается на 11–20 %, изменяется рН концентрата. В осадок выпадают минеральные соли, некоторые органические вещества и продукты их распада, наблюдается потеря азота в результате уноса аммиака.

При концентрировании культуральной жидкости различных микроорганизмов значительно изменяется минеральный состав получаемого концентрата: например, при концентрировании культуральной жидкости *B. mesentericus* это четко видно.

Наиболее резко снижается содержание кальция, меди и магния, заметно уменьшается содержание цинка и марганца. Такое изменение минерального состава культуральной жидкости сказывается на стабильности ферментов в процессе концентрирования. При сгущении культуральной жидкости до 10 % содержания сухого вещества количество кальция снижается всего на 5 %, а меди – на 75 %. Известно, например, что медь оказывает на ферменты ингибирующее действие, а кальций – стабилизирующее. По этой причине на первых стадиях концентрирования наблюдается повышение активности ферментов, особенно протеиназ. При более глубоком концентрировании с резким снижением содержания кальция снижается и активность ферментов.

Большинство ферментов очень чувствительно к термической обработке и нуждается в мягких режимах концентрирования. При последующих исследованиях было установлено, что не только температура кипения концентрируемого раствора имеет большое значение, но и температура греющего пара (теплоносителя). Так, даже при очень низкой температуре кипения (25...30 °С) происходит заметная инактивация ферментов (до 12 %), если температура греющего пара равна 120 °С. При температуре теплоносителя 90...100 °С и температуре кипения 35...40 °С потери активности не превышают 10 %. Следует отметить также, что чем выше температура теплоносителя, тем больше сухих веществ концентрируемой жидкости выпадает в осадок, особенно при высоких температурах кипения.

В зависимости от вида продуцента культуральная жидкость имеет различный химический состав и содержит различный комплекс ферментов, поэтому тепловые режимы вакуум-выпаривания уточняются экспериментальным путем в каждом конкретном случае.

Суммарные потери активности при вакуум-выпаривании в значительной степени зависят не только от режима концентрирования, но и от конструкции аппарата. Аппараты для стадии вакуум-выпаривания в последние годы значительно усовершенствованы, в десятки раз сокращена длительность процесса, что привело к заметному уменьшению потерь активности ферментов, а также позволило несколько ужесточить температурные режимы концентрирования ферментных растворов. Помимо трубчатых вакуум-выпарных установок с различным расположением трубок (горизонтальное, вертикальное и наклонное), со встроенной и выносной поверхностью нагрева, с использованием принудительной циркуляции созданы новые конструкции пленочных выпарных аппаратов, ультрацентрибежных вакуум-выпарных установок и пластинчатых испарителей. Особый интерес представляют ротационные пленочные выпарные аппараты, где упариваемая жидкость в виде пленки движется по внутренней стенке аппарата. Лопатки, смонтированные на вращающемся роторе, непрерывно направляют ее движение сверху вниз. Время прохождения жидкости через аппарат составляет несколько секунд. В настоящее время фирма *Alfa Laval* изготавливает вакуум-выпарные центробежные аппараты. Они очень компактны, время контакта ферментного раствора с обогревающей поверхностью предельно сокращено (не более 1 с), потери не превышают 10 %, производительность этих установок от 800 до 4800 л/ч.

Создана центробежная вакуум-выпарная установка пленочного типа производительностью 800 л/ч по испаренной влаге. Время контакта культуральной жидкости с теплоносителем не более 1 с, температура греющего пара 60...80 °С. Для увеличения производительности можно монтировать установку из трех модулей, каждый из которых работает либо автономно, либо последовательно, либо первые два модуля работают параллельно и соединены с третьим последовательно. Для ферментного производства представляет интерес центробежная пленочного типа вакуум-выпарная установка производительностью до 200 л/ч и с температурой упаривания 30...40 °С. Хорошие технологические показатели имеют роторные выпарные аппараты производительностью по испаренной влаге от 50 до 200 л/(м² · ч). Французская фирма *APV* изготавливает пластинчатые вакуум-выпарные установки производительностью до 20 тыс. л/ч.

Несмотря на наличие высокопроизводительных вакуум-выпарных аппаратов, полностью устранить недостатки метода вакуум-выпаривания не удастся (потери активности, выпадение осадков и т. д.), поэтому он все чаще заменяется методом ультрафильтрации.

20.9. Мембранные методы очистки и концентрирования ферментов

В зависимости от движущей силы процесса мембранные методы классифицируются на диффузионные – диализ (движущая сила – разность концентраций по обе стороны мембраны), электромембранные – электродиализ (разность электрических потенциалов), баромембранные – обратный осмос, ультрафильтрация, микрофильтрация (разность давлений). Все эти процессы применяются для переработки ферментных растворов, выбор их определяется целью переработки: для очистки от низкомолекулярных примесей при небольших производительностях – диализ, для обессоливания в интенсивных условиях – электродиализ, для глубокой очистки от примесей с одновременным концентрированием – ультрафильтрация и т. д. Рассмотрим подробнее сущность и технические решения каждой группы процессов, что дает возможность в дальнейшем выбрать оптимальный вариант для любой конкретной задачи.

Диализ – это первый изученный и промышленно развитый мембранный процесс, поскольку для его осуществления не нужна сложная аппаратура и специальные мембраны. Диализ заключается в том, что если два раствора с различной концентрацией какого-либо компонента разделить мембраной, то начнется естественный процесс диффузии, достигающий равновесия при выравнивании концентраций этого компонента с обеих сторон мембраны. Интенсивность переноса вещества Q_B через мембрану определяется коэффициентом диффузии этого вещества в материале мембраны D_B и пропорциональна разности концентраций ΔC . Эту зависимость можно записать в виде сравнения: $Q_B = D_B \cdot S \cdot \Delta C$, где S – площадь мембраны.

Соответственно, чем больше различие в величинах коэффициентов диффузии двух компонентов, находящихся в растворе, тем лучше они разделяются мембраной. Понятно, что белковые молекулы (высокомолекулярные вещества), органические и неорганические низкомолекулярные молекулы и ионы сопутствующих компонентов (сахара, аминокислоты, минеральные соли и т. п.) в силу огромных различий в коэффициентах диффузии практически полностью разделяются мембраной.

В качестве диализных мембран обычно используют пленки из целлюлозы (целлофан, купрофан) и других синтетических полимеров. Процесс проводят либо по проточной схеме, когда исходный раствор ферментов постоянно прокачивают с одной стороны мембраны, а диализующую жидкость (обычно воду) – с другой, либо по полупроточ-

ной схеме, когда раствор ферментов помещают на определенное время в мешочки из диализной мембраны, которые постоянно омываются водой. Таким образом можно удалить основную массу сопутствующих низкомолекулярных примесей и повысить активность ферментных растворов в пересчете на сухое вещество в несколько раз.

Процесс диализа применительно к очистке растворов ферментов имеет ряд существенных недостатков. Во-первых, при диализе возможна «потеря» фермента в результате вымывания ионов металлов, входящих в состав молекулы фермента или стабилизирующих фермент соединений, либо фрагментов самого фермента, например его простетической группы. Во-вторых, при диализе против обычной водопроводной воды может происходить потеря активности фермента в результате попадания из воды в раствор фермента ионов металлов – ингибиторов фермента. Следует также отметить, что в процессе диализа одновременно с очисткой происходит сильное разбавление ферментного раствора из-за проникновения воды под действием сил прямого осмоса в диализуемый раствор. Объем продиализованного раствора увеличивается примерно на 20–25 %, а если учесть, что происходит активное удаление балластных веществ, то в результате диализа получают очень разбавленные ферментные растворы. Таким образом, этот метод очистки ферментных растворов от балластных веществ в современном ферментном производстве почти не используется. Иногда его применяют в лабораторных исследованиях и при получении высокоочищенных ферментных препаратов.

Электродиализ. Если в процессе очистки ферментов стоит задача удалить из раствора электролитные примеси, т. е. органические и минеральные ионы, иногда пользуются электродиализом. Сущность этого мембранного метода заключается в том, что перенос ионов через мембрану интенсифицируют с помощью постоянного электрического поля, а мембраны изготавливают из специальных ионообменных материалов на основе синтетических полимеров.

Электрический потенциал к аппарату подводится через два электрода, размещенных в соответствующих электродных камерах. Обе камеры отделены от рабочей обессоливающей камеры, куда подается исходный раствор, ионообменными мембранами, со стороны катода – анионообменной, со стороны анода – катионообменной. При работе аппарата катионы под действием постоянного электрического поля смещаются к аноду, встречают на пути катионообменную мембрану, проходят через нее в электродную камеру и в виде слабого раствора щелочи выводятся из аппарата. Соответственно ведут себя и анионы, выходя из аппарата в виде слабого раствора кислоты. Обессоленный раствор ферментов (диализованный) выводится из рабочей камеры.

Электродиализный метод всегда осуществляется в непрерывном режиме и более энергоемок, чем диализ. Применительно к обработке ферментных растворов он имеет те же недостатки. Кроме того, электродиализ нельзя применять при выделении ферментов, имеющих, например, четвертичную структуру, которая формируется с участием ионов металлов, а также при выделении металлоферментов, как правило, теряющих активность при электродиализе (α -амилазы, β -галактозидазы и др.).

Баромембранные методы. Эти методы разделения жидких смесей часто относят к процессу обычной фильтрации, но сходство лишь внешнее – вследствие того что движущей силой является разность давлений. В действительности с помощью полупроницаемых мембран разделяются истинные растворы, т. е. гомогенные системы, в то время как фильтрованием можно разделить лишь суспензии, т. е. твердую фазу отделить от жидкой.

Вместе с тем, считая мембранные методы фильтрованием на молекулярном уровне, можно построить условный спектр фильтрации, разместив мембранные методы – обратный осмос, нанофильтрацию, ультрафильтрацию и микрофильтрацию – в виде некоторого ряда и дополнив его обычной механической фильтрацией по порядку увеличения размера и молекулярной массы задерживаемых частиц.

Сегодня баромембранные методы получили широкое распространение в пищевой, фармацевтической, химической промышленности. В частности, ни одно современное производство ферментов уже не может обойтись без ультрафильтрационной очистки и концентрирования продукта.

Растворение вещества в растворителе возможно только тогда, когда они имеют сродство друг к другу, т. е. когда на уровне межмолекулярного взаимодействия происходит сольватация молекулами растворителя молекул или ионов растворяемого вещества. Когда речь идет о водных растворах, процесс называется гидратацией. Поскольку молекула воды представляет собой крохотный диполь, ее энергия связи с частицей растворимого вещества тем больше, чем больше заряд, который несет эта частица. Понятно, что чем больше заряд иона, тем больше молекул воды окажутся связанными с ионом в виде многослойной гидратной оболочки.

Именно образованием гидратных оболочек объясняется явление, которое называется «прямой осмос». Если раствор любого вещества отделить полупроницаемой мембраной от объема чистого растворите-

ля, то будет наблюдаться односторонний перенос молекул растворителя (в данном случае воды) в раствор, где они достраивают гидратные оболочки. Чем выше концентрация растворенного вещества слева, тем больше молекул воды должно пройти через мембрану в раствор. Количественно этот перенос выражается величиной осмотического давления (P_o):

$$P_o = CRT,$$

где C – массовая концентрация растворенного вещества; R – газовая постоянная; T – абсолютная температура.

Если осмотическое давление (P_o) больше гидравлического (P_r), то происходит прямой осмос, если $P_o = P_r$, то диффузия через мембрану прекращается.

Если же теперь к раствору приложить рабочее давление, превышающее осмотическое, $P_r > P_o$, то начнется перенос молекул воды слева направо, т. е. будет происходить дегидратация раствора, концентрирование растворенного вещества и получение чистой воды в правой половине сосуда. Этот механизм называется обратным осмосом.

Обратный осмос по механизму близок к ультрафильтрации. Ультрафильтрация год от года все шире используется в технологии ферментных препаратов. Весьма убедительны данные о преимуществах очистки и концентрирования методом ультрафильтрации (табл. 12).

Таблица 12

Этапы очистки ферментов препаратов

Метод разделения	Концентрация сухого вещества, %		Затраты на удаление 1 м ³ воды, долл.
	Исходная	В концентрате	
Центрифугирование	1–2	10–15	0,15–0,9
Гель-фильтрация	3–5	Разбавленная	6–30
Сушка барабанная	30	100	7,5
распылительная	10–20	100	15
лиофильная	10	100	60–90
Осаждение этиловым спиртом или солями	1–2	Различная	1500
Ультрафильтрация	1–10	10–50	0,15–0,30

Действительно, из табл. 12 следует, что ультрафильтрация обладает способностью не инактивировать ферменты и требует минимальных энергозатрат.

Скорость ультрафильтрации будет тем выше, чем больше разница между рабочим гидравлическим (P_r) и осмотическим давлением.

Однако между процессами обратного осмоса и ультрафильтрации все же есть различия. Так, при обратном осмосе разделение низкомолекулярных веществ происходит при рабочем давлении до 0,7–14 МПа, так как осмотическое давление P_o в этих растворах велико. При обратном осмосе используются мембраны с очень маленькими порами (от $1 \cdot 10^{-4}$ до $2 \cdot 10^{-3}$ мкм). При ультрафильтрации происходит разделение высоко- и низкомолекулярных соединений, и целью этого процесса является получение концентрата высокомолекулярных соединений (например, ферментов). Рабочее давление в этом случае низкое (от 0,07 до 0,7 МПа), так как P_o небольшое. Величина пор мембран значительно больше – от $3 \cdot 10^{-3}$ до $150 \cdot 10^{-3}$ мкм.

Однако эти различия достаточно условны. Механизм процессов обратного осмоса и ультрафильтрации пока остается не до конца ясным.

Для математического описания процесса мембранного разделения служит модель движения вязкого потока через поры (уравнение Пуазейля) и модель диффузионного массопереноса (закон Фика). Принято считать, что если размер пор мембраны меньше $3 \cdot 10^{-3}$ мкм (обратный осмос), то процесс подчиняется закону Фика, если же размер пор больше $3 \cdot 10^{-3}$ мкм (ультрафильтрация), то процесс подчиняется уравнению Пуазейля.

В этом и заключается принцип любого баромембранного процесса. Отличия между ними лишь в размерах пор используемой мембраны и в величинах приложенного к раствору давления.

Поскольку осмотическое давление белковых растворов мало, для осуществления процесса достаточно 0,3–0,6 МПа, а размер пор мембраны должен составлять 10–50 нм.

20.10. Применение ферментов микроорганизмов

Использование ферментов микроорганизмов в различных областях народного хозяйства весьма перспективно. В настоящее время ферментные препараты, полученные из микроорганизмов, при-

меняются в различных областях промышленности, сельского хозяйства и медицины.

В пивоварении и виноделии для замены солода используют препараты грибных амилаз. Это удешевляет производство и сокращает расход зерна. Амилазы используются также для получения растворимого крахмала, декстрина и патоки. Продукты из овощей и фруктов, полученные с применением амилаз, содержат больше сахара и лучше усваиваются, особенно детьми. Амилазы ускоряют процесс созревания теста и улучшают качество хлеба.

В кондитерской промышленности используется инвертаза (сахараза) дрожжей, превращающая сахарозу в глюкозу и фруктозу. Она предупреждает кристаллизацию сахарозы при высоких концентрациях.

Комплекс ферментов (цитаз) грибов, расщепляющих вещества стенки растительных клеток, применяют для улучшения экстракции их содержимого (сок, эфирные масла, жиры, крахмал).

Пектиназы грибов используют для осветления фруктовых и ягодных соков, повышения выхода виноградного сока в виноделии, при производстве кофе. Применение пектиназ особенно эффективно при изготовлении сока из плодов и ягод, содержащих много пектина (черная смородина, крыжовник, слива).

Грибная глюкоамилаза применяется в пивоваренной промышленности для удаления остатков декстринов из пива. Глюкозоизомеразы используются для получения глюкозо-фруктозных сиропов, заменяющих сахарозу, что важно для улучшения рациона питания, поскольку использование в большом количестве сахарозы вредно для человека.

Лактаза применяется для получения молока без лактозы. После такой обработки оно приобретает вкусовые качества более высокого уровня. Кроме того, некоторая часть населения не может употреблять молоко из-за наличия в нем лактозы, которая вызывает аллергическую реакцию. С помощью лактазы получают также сахара (глюкоза, галактоза) из молочной сыворотки, содержащей большое количество лактозы.

Важную роль играет глюкозооксидаза грибов, так как она позволяет пищевым продуктам освободиться от остатков глюкозы и молекулярного кислорода и этим повышает сроки их хранения. Глюкозооксидазу добавляют к яичному порошку, майонезу, пиву при его длительном хранении. С помощью этого фермента замедляется окисление аскорбиновой кислоты при обработке им овощей и фруктов. Применение ферментов облегчает получение глюконовой кислоты.

Каталазу *Asp. niger* используют в пищевой промышленности для удаления остатков пероксида водорода – стерилизующего агента при получении пищевых концентратов, стерильного молока, меланжа.

Препараты целлюлазы используют для осахаривания картофельной мезги, выделения крахмала из картофеля и зерна, увеличения выхода агар-агара из водорослей, для приготовления овощной пасты, удаления кожуры у цитрусовых, а также для получения редуцирующих сахаров из растительных материалов. Такой способ производства сахаров может быть дешевле, чем при использовании крахмала в качестве исходного субстрата.

Протеолитические ферменты микробного происхождения заменяют ренин в сыроделии для получения сгустка. Их применяют для размягчения (тендеризации) мяса, ускорения созревания рыбы при посоле, в виноделии и пивоварении.

Липазы используются в производстве цельного сухого молока, в сыроделии для ускорения созревания сыров и придания им специфического вкуса и аромата.

Применение ферментов в текстильной промышленности. В текстильной промышленности пектолитические ферменты микроорганизмов долгое время активно применяются для переработки льносолемы и получения из нее волокна. Сегодня используется тепловая мочка льна на льнозаводах. Основными микроорганизмами, участвующими в процессе мочки, признаны анаэробы рода *Clostridium*. Процессы, протекающие во время мочки, приводят к разрушению пектиновых веществ льносолемы и высвобождению льноволокна.

Для ускорения процесса (обычно идущего 2,5–3 сут) и повышения качества волокна был получен ферментный препарат пектоклостридин ГЗх – отфильтрованная и высушенная культуральная жидкость *Clostridium* sp. Препарат позволяет ускорить процесс мочки в 2–2,5 раза и получить волокно с высокой механической прочностью. Амилолитические препараты используются для удаления клея из тканей (расшлитовка). Некоторые протеиназы, в частности протосубтилин, применяются для обесклеивания шелка (удаления серицина) и высвобождения шелковых волокон, состоящих из фиброина. Для освобождения шелкового волокна от жира используются препараты липаз.

Другие области промышленного применения ферментов. В кожевенной промышленности микробные протеиназы используют для обезволашивания шкур и мягчения кожи. Применение комплексного ферментного препарата, состоящего из протеазы и липазы, ускоряет процесс и позволяет получить высококачественную шерсть.

Все большее распространение приобретает использование микробных ферментов при производстве моющих средств. Обычно в них добавляют ферменты *Bac. subtilis*, обладающие протеолитической, амилолитической

и липолитической активностью; препараты применяются в комбинации с поверхностно-активными веществами. Моющие средства, содержащие ферменты, сокращают продолжительность стирки, повышают сохранность тканей, так как обработка ведется при 40...60 °С (не выше).

Применение ферментов в сельском хозяйстве. В данной области ферменты используются в рационе животных и при обработке кормов для повышения их усвояемости.

При поверхностном способе культивирования *Asp. oryzae* у нас в стране получают препарат амилоризин – высушенную культуру гриба, содержащую α -амилазу, декстриназу, мальтазу, глюкоамилазу и протеиназу. Препарат глюкоаморин – высушенная культура *Asp. awamory*, выращенная на отрубях, содержит α -амилазу, декстриназу, мальтазу, глюкоамилазу, кислую протеиназу и гемицеллюлазу. Препарат амило-субтилин содержит α -амилазу протеазы, β -глюконазу и литические ферменты, которые входят и в состав протосублитина ГЗх и ксилаваморина ГЗх, содержащих также гемицеллюлазу и пектиназу.

Применение ферментов в медицине. Микробные ферменты используются в различных областях медицины как терапевтические средства, а также при проведении клинических анализов. При лечении воспалительных процессов и ожогов применяются препараты протеиназ, разрушающие некротизированные ткани и клетки, способствующие быстрому заживлению ран.

При терапии злокачественных новообразований используют бактериальную *L*-аспарагиназу, превращающую *L*-аспарагин, необходимым лейкозным клеткам, в *L*-аспарагиновую кислоту, в результате чего рост опухоли значительно замедляется. Тромболитическими свойствами обладают протеиназы террилитин и стрептокиназа, имеющие микробное происхождение.

В заместительной терапии, т. е. при нарушении синтеза некоторых ферментов в организме человека, применяют отдельные ферменты и комплексные ферментные препараты. Например, при нарушении функции поджелудочной железы употребляют комплексный препарат, содержащий протеиназу, амилазу и липазу. При потере способности к синтезу лактазы и глюкоамилазы также используют эти ферменты, полученные из микроорганизмов.

При нарушении процессов пищеварения в некоторых случаях употребляют комплекс ферментов (α -амилаза, целлюлаза, липаза и протеиназа).

Применение микробных ферментов в медицине весьма перспективно и, несомненно, будет расширяться, несмотря на то что ферментные пре-

параты для медицинских целей требуют дополнительных затрат на их очистку от пирогенных веществ, токсинов, а также на проверку на антигенное действие и аллергическую реакцию организма.

Использование ферментов при проведении химических анализов. Применение ферментов в качестве химических реактивов составляет особую область аналитической и препаративной биохимии.

В качестве примеров можно привести определение кокарбоксиллазы в крови при помощи протеиназы *Asp. niger*, расщепляющей ее с выделением тиаминина. По количеству свободного тиаминина рассчитывают количество фермента.

Определение галактозы производят, используя галактозооксидазу гриба *Polysporus ciracinatus*. Фермент окисляет галактозу, переводя ее в соответствующий лактон с одновременным образованием пероксида водорода. При добавлении пероксидазы и *ortho*-дианизидаина появляется синяя окраска колориметрируемого раствора.

Определение оротовой кислоты можно проводить с соответствующей дегидрогеназой оротовой кислоты из *Clostridium oroticum*. Фермент катализирует восстановление оротовой кислоты НАДН₂ с образованием дигидрооротата и НАД.

Бактериальная гиалуронидаза расщепляет гиалуроновую кислоту количественно с образованием ненасыщенного дисахарида. При этом образуются *N*-ацетилглюкозаминовые группы, дающие при нагревании в щелочи с *para*-диметиламинобензальдегидом красную окраску (важно для колориметрирования).

Бактериальные и грибные протеиназы используются для расщепления белков, причем расщепление может быть фрагментарным. Например, субтилизин при коротком воздействии на рибонуклеазу расщепляет только одну пептидную связь этого белка. Карбоксидопептидаза дрожжей постепенно расщепляет белки, отделяя одну за другой аминокислоты с карбоксильного или аминного конца.

Определение *L*-аминокислот (*L*-лизин, *L*-аргинин, *L*-орнитин, *L*-тирозин и др.) можно проводить с помощью специфических декарбоксилаз аминокислот. Ферменты синтезируются некоторыми бактериями (например, *Cl. welchii*, *Cl. septica*) и эффективны при низком значении рН. Образовавшаяся при реакции углекислота может быть измерена количественно.

Определение глутаминина и аспарагина проводится путем их дезаминирования специфическими дезаминадами *Pseudomonas* sp. Освобождающийся аммиак определяют по цветной реакции с фенолятом в присутствии нитропруссидна.

Весьма перспективны такие ферменты микроорганизмов, как холестериноксидаза, для определения холестерина в крови, алкогольоксидаза – для обнаружения спирта и др. Ферменты используют также для изучения первичной структуры высокомолекулярных соединений: нуклеиновых кислот, белков, полисахаридов.

Использование ферментов в органическом синтезе. Перспективная область применения ферментов микроорганизмов – использование их для синтеза различных практически важных соединений.

Выше отмечалось, что с помощью пенициллинамидазы, образующей некоторыми бактериями, можно получить 6-аминопенициллановую кислоту – субстрат для синтеза полусинтетических пенициллинов.

L-Аспарагиновую кислоту получают с помощью аспартазы *E. coli*. При этом используют как препараты фермента, так и клетки с увеличенной проницаемостью в иммобилизованном состоянии.

Аналогичным образом могут быть синтезированы и некоторые другие практически важные *L*-аминокислоты, в частности тирозин, 3,4-диоксифенилаланин.

Использование ацилаз аминокислот позволяет разделить их *L*- и *D*-изомеры. В Японии создано производство *L*-яблочной кислоты из фумаровой на основе использования бактериальной фумаразы. Эта кислота применяется как заменитель лимонной кислоты в пищевой и фармацевтической промышленности.

Ряд реакций трансформации, ведущих к получению стероидных препаратов, основан на ферментативной активности растущих клеток микроорганизмов.

С помощью ферментов микроорганизмов возможно и проведение многостадийных процессов. Например, иммобилизованные клетки дрожжей способны синтезировать глутатион из глюкозы и фосфата, что требует последовательного действия нескольких ферментов.

Как уже отмечалось, особая область применения ферментов микроорганизмов – генетическая инженерия. Даже эти немногочисленные примеры позволяют представить, что возможности использования ферментов микроорганизмов для получения важных соединений, а также для других целей весьма разнообразны. Очевидно, что в недалеком будущем объем и количество видов ферментов микробного происхождения, выпускаемых промышленностью, будут существенно расширены.

Производство ферментных препаратов занимает одно из ведущих мест в современной биотехнологии и относится к отраслям, объем продукции которых постоянно растет, а сфера применения неуклонно расширяется. Такое быстрое развитие связано с тем, что ферменты явля-

ются высокоактивными, нетоксичными биокатализаторами белкового происхождения, которые широко распространены в природе, без них невозможно осуществление многих биохимических процессов.

Ферменты послужили основой в становлении и развитии технологии ферментных препаратов как науки, а также для создания промышленного производства наиболее широко используемых ферментных препаратов. Их применение помогло существенно изменить, интенсифицировать и усовершенствовать многие существующие технологии и создать принципиально новые высокоэффективные. Использование ферментных препаратов различной степени очистки позволило не только улучшить показатели и продуктивность различных биотехнологических процессов, но и усовершенствовать кормопроизводство, сделать более целенаправленным и эффективным действие синтетических моющих средств, повысить качество косметических препаратов, создать целый арсенал специфических, чувствительных и точных аналитических методов, наладить производство лекарственных и профилактических средств для медицинской промышленности и т. д.

Важным и неоспоримым преимуществом ферментов перед химическими катализаторами является то, что они действуют при нормальном давлении, при температуре 20...70 °С, рН в диапазоне от 4 до 9 и в большинстве случаев имеют исключительно высокую субстратную специфичность, что позволяет в сложной смеси биополимеров направленно воздействовать только на определенные соединения. Все это свидетельствует о том, что производство ферментных препаратов – одно из перспективных направлений в биотехнологии, которое будет и далее интенсивно развиваться и расширяться.

Глава **21** **БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОЕ ПОЛУЧЕНИЕ ПИЩЕВЫХ ДОБАВОК**

21.1. Общая характеристика пищевых добавок

Пищевые добавки – вещества, добавляемые в продукты питания для придания им желаемых свойств, например определенного аромата (ароматизаторы), цвета (красители), длительности хранения (консерванты), вкуса, консистенции.

подавляющее количество продукции, потребляемой горожанами, содержит в себе пищевые добавки, которые обозначаются кодом с буквой «Е». Практически любой продукт, предлагаемый нам в супермаркетах, – сухарики, мороженое, сок, полуфабрикаты, обычная буханка хлеба – на упаковке почти всегда имеет букву «Е». Можно ли питаться такой пищей – решать только покупателю, который, естественно, не проинформирован о возможной вредности определенной пищевой добавки, содержащейся в данном продукте. Таким образом, перед тем как купить что-либо в супермаркете, нужно владеть специальной информацией.

Пищевые добавки – неотъемлемая часть практически всех продуктов быстрого приготовления и многих других видов нескоропортящихся и долго хранящихся продуктов. Благодаря пищевым добавкам можно намного улучшить вкус продукта, а также продлить его срок годности. Но помимо всех положительных качеств пищевых добавок они в основном вредны для нашего здоровья. В среднем в течение одного года человек употребляет вместе с пищей около 5 кг различных пищевых добавок. Во многих странах некоторые из них вовсе запрещены.

В Беларуси запрещены: E103, E106, E111, E121, E123, E126, E130, E181, E216, E217, E240, E924, E924a.

Существует мнение, будто пищевые добавки приносят только вред человеческому организму. Но не стоит забывать, что благодаря многим из них продукты остаются свежими и полезными для употребления. Иногда пищевые добавки просто незаменимы. По некоторым расчетам, они выполняют около пятидесяти различных функций. Можно выделить 11 групп наиболее известных добавок. К ним относятся: питательные добавки, или природные компоненты пищи; добавки, сохраняющие свежесть продукта; добавки, с помощью которых облегчается переработка или изготовление продуктов питания, а также консерванты: приправы, красители, уплотнители или текстуранты, подсластители, наполнители; добавки, благодаря которым можно снизить калорийность пищи, и др. В результате применения пищевых добавок в некоторых странах удалось полностью ликвидировать болезни, вызванные недостатком каких-либо веществ в пище. Например, зоб развивается вследствие недостатка иода в организме, цинга – из-за недостатка витамина С, рахит – в связи с нехваткой витамина D, кальция, фосфора. В развитых странах в пищевые продукты для улучшения их питательной ценности добавляют такие микроэлементы пищи, как жиры, углеводы, белки, а также клетчатку. Это делается для того, чтобы улучшить питательную ценность употребляемой пищи.

E100–E182 – красители;

E200–E299 – консерванты;

E300–E399 – антиокислители (антиоксиданты);

E400–E449 – стабилизаторы консистенции;

E450–E499 – эмульгаторы;

E500–E599 – регуляторы кислотности, разрыхлители;

E600–E699 – усилители вкуса и аромата;

E700–E800 – запасные индексы для другой возможной информации;

E900 и далее – антифламинги, улучшители качества хлеба и т. д.

Добавки делятся на натуральные и синтетические. Натуральные производятся только из естественного сырья – трав, специй, фруктов, овощей, мяса, дрожжей, древесной коры, грибков и даже из насекомых-вредителей. Однако различие между натуральными и синтетическими добавками довольно условно, так как касается не столько состава, сколько способа их производства. Натуральные добавки не обязательно безопаснее искусственных. Часто они содержат больше химических примесей.

Способ получения пищевых добавок из растительного сырья, содержащих витамины, минеральные соли и растительные волокна, может найти широкое применение в пищевой и медицинской промышленности. Он заключается в следующем: подготовленное растительное сырье предварительно измельчают, сушат в определенных условиях до влажности не более 10 %, после чего полученную массу охлаждают хладагентом до достижения температуры во всей массе $-80...-165$ °С с последующим ее измельчением до размеров частиц 50–600 мкм, затем готовый продукт упаковывают. Перед упаковкой он может быть таблетирован. Это позволяет получить биологически активную добавку из традиционно используемого пищевого сырья, обладающую высокой биологической активностью за счет наиболее полного сохранения биологически активных веществ и повышенной их усвояемости организмом. Товарная экспертиза пищевых добавок проводится на стадии изготовления и на всех этапах их движения, один из которых – создание и анализ технологии подбора и внесения пищевых добавок или их комплекса в продукт с учетом особенностей химического состава, функциональных свойств пищевых добавок и сырья, характера действия, вида продукта, технологии, в отдельных случаях – упаковки и хранения.

21.2. Натуральные пищевые красители

Относительно дешевые синтетические красители нашли очень широкое применение в пищевой промышленности. Однако среди них практически нет абсолютно безвредных. Более того, многие импортные красители потенциально опасны как канцерогены и аллергены. К тому же они не всегда удачно имитируют цвет натурального продукта. Именно поэтому в последнее время все больше внимания уделяется природным окрашивающим веществам. Натуральные (природные) пищевые красители – это красящие вещества, выделенные физическими способами из растительных и животных источников. Иногда их подвергают химической модификации для улучшения технологических и потребительских свойств. Ряд красителей получают не только их выделением из природного сырья, но и синтетически. Сырьем для натуральных пищевых красителей могут быть ягоды, цветы, листья, корнеплоды и т. д., в том числе в виде отходов переработки растительного сырья на консервных и винодельческих заводах. Технология производства натуральных красителей постоянно совершенствуется, что позво-

ляет увеличивать их стойкость и оптимизировать цену. Натуральные красители обычно выделяют из природных источников в виде смесей различных по своей природе соединений, состав которых зависит от сырья и технологии получения, поэтому обеспечение постоянства их качества – очень сложная задача. Оттенки и стойкость одних и тех же натуральных пигментов в красителях разных производителей могут варьировать. Свойства натуральных пигментов можно откорректировать и улучшить при помощи натуральных антиоксидантов и технологий суспендирования, эмульгирования и микрокапсулирования, применение которых позволяет значительно расширить сферу использования натуральных красителей. Их производство – одна из сложнейших областей пищевой промышленности, в которой достичь высокого уровня качества может лишь производитель, обладающий глубокой научной и высокоразвитой производственной базой.

Содержание красящих веществ в растительном сырье зависит от климатических условий произрастания и времени сбора, но в любом случае оно относительно невелико (обычно несколько процентов или доли процента). Количество других химических соединений – сахаристых, пектиновых, белковых веществ, органических кислот, минеральных солей и т. д. – может превышать содержание красящих в несколько раз. Эти вещества не представляют опасности для здоровья, а часто даже полезны для него, но своим присутствием они снижают интенсивность окрашивания готового продукта. При производстве препаратов натуральных пищевых красителей от побочных веществ избавляются.

Современные технологии позволяют получать препараты натуральных пищевых красителей с заданными свойствами и стандартным содержанием основного красящего вещества. Потребители интуитивно связывают внешний вид и качество продукта в единое целое. Именно поэтому пищевые красители стали важнейшими ингредиентами, от которых зависит «товарный вид».

Натуральные красители могут быть водо- и жирорастворимыми, что расширяет сферу их применения. Более того, многие природные красящие вещества являются диетологическими средствами. Существует большое количество природных красителей, таких как, например, красный сандал, кверцитрон, кармин, сепия, кампешевое дерево и т. д. Кампешевое дерево растет в Южной Америке, сандал – в Южной Азии, сепию добывают из каракатиц, кармин – из кошенили (крошечных насекомых).

Растения применяются главным образом в высушенном виде. Сушка производится не на солнце и не в печи, а в тени на открытом воздухе,

на растянутых веревках или полотне. Красящие вещества, содержащиеся в растениях, очень редко находятся в чистом виде, и для получения их пользуются следующими приемами и способами: прежде всего происходит измельчение сырых материалов, состоящее в их резке, крошке или толчении; его степень зависит от свойств и качеств самого материала, но в любом случае измельчать нужно равномерно. После этого материал подвергается выщелачиванию, состоящему в кипячении в дождевой, речной или перегнанной воде, причем для более полного извлечения красок к воде необходимо прибавить немного поташа или соды. По мере выкипания воды прибавляют свежей и так поступают до полного выщелачивания материала, т. е. пока вода больше уже не будет окрашиваться. После этого отвар кипятят для выпаривания, т. е. для получения более густой краски. Дают отстояться и фильтруют через сито, на которое положен кусочек полотна.

Если отварить в воде сухую кожуру репчатого лука, то получается *коричневый краситель* разных оттенков – от почти желтого до темно-коричневого. Другой его источник – сухая кора жостера.

Краситель карамельный колер (E150 a–d) добывают путем термической обработки различных видов сахаристых веществ. Он имеет коричневую окраску, хорошо растворим в водной фазе, не чувствителен к воздействию света, температуры.

За последние годы развитие рынка мороженого, йогуртов, творожных и кисломолочных продуктов привело к появлению множества новых оригинальных видов продукции. Варьировать оттенки конечной продукции можно также изменением дозировки красителя либо применением двух или нескольких красителей одновременно. Например, для получения лаймового цвета рекомендуется одновременно использовать меднохлорофиллиновый краситель и куркумин.

Жирорастворимые натуральные красители в первую очередь применяются производителями шоколадных глазурей, шоколада. Они имеют в своем составе жировую составляющую, поэтому их внесение в продукцию на жировой основе гораздо технологичнее, нежели порошков синтетических лаков (не требуются высокоскоростные миксеры и т. п.). Применение натуральных жирорастворимых красителей дает возможность производителю, используя натуральное сырье, получать широкий спектр оттенков готовой продукции.

Итак, современное производство немислимо без красителей. Но в соответствии с тенденциями развития рынка сейчас необходимы именно природные компоненты. Это подтверждают и маркетинговые исследования. Правда, объемы производства синтетических красителей

пока в 3,5 раза выше, чем натуральных. Но зато темпы роста производства натуральных красителей выше, чем синтетических.

Красный краситель можно получить из стебля зверобоя (отвар надо подкислить), корня подмаренника, отвара ольховой коры, помещенной в воду на несколько дней. Красный краситель можно извлечь из корней конского щавеля, но в этом случае не забудьте прибавить к готовому отвару немного алюминиевых квасцов, иначе цвет будет тусклым. Красные оттенки представлены различными антоцианинами E163, карминами E120, а также свекольным соком. Оттенки антоцианинов могут варьироваться от красных до красно-фиолетовых. Источниками их получения могут служить кожица винограда, черная морковь, ягоды бузины и т. д. Красители водорастворимы, свето- и термоустойчивы, оттенок зависит от pH. Красные красители флавоноидного типа (в частности, антоциановые), получают элюированием 50 %-й уксусной кислотой или экстрагированием соляной кислотой и этилацетатом. Кармин получают экстракцией из кошенили – высушенных и растертых женских особей насекомых вида *Coccus Sactic*, обитающих на кактусах в Южной Америке, Африке. Пигмент кармин обладает хорошей устойчивостью к воздействию света и высокой температуры. Кармины могут быть представлены и водорастворимыми, и жиродисперсными формами с оттенками от красного до красно-фиолетового.

Источник красителя свекольного сока (E162) – свекла *Beta vulgaris*. Основные пигменты, содержащиеся в соке, – бетанин и валгаксантин. Свекольный сок придает продуктам окраску от розовой до красно-синей. Главный недостаток свекольного сока – слабая термоустойчивость. Однако для молочной промышленности это не является ключевым моментом. Краситель может быть представлен либо в форме водорастворимой жидкости, либо порошка.

Синий краситель добывают из корней девясила. Для этого корни надо сначала поддержать в нашатырном спирте – водном растворе аммиака. Синий краситель можно добыть также из цветов живокости и корней птичьей гречишки.

Зеленый краситель (хлорофилл E140) является натуральным красителем, изготавливаемым из зеленой массы растений (крапива, шпинат) и придающим продукту оливковые оттенки. Медные комплексы хлорофиллов, хлорофиллинов (E141) применяют для придания продуктам ярко-зеленых оттенков. Краситель зеленого цвета извлекают из листьев трилистника (лекарственная трава). Не такой яркий, но тем не менее красивый серо-зеленый краситель можно получить из листьев и стеблей манжетки; перед приготовлением отвара их необходимо тщательно измельчить.

Желтый краситель дают многие растения: дрок красильный, орешник (кора), ольховидная крушина (кора, листья, ягоды), подмаренник (цветы). Из плодов барбариса получается желтый краситель с лимонным оттенком.

Ягоды черники и ежевики, как нетрудно догадаться, содержат *фиолетовый краситель*. Он не очень стоек, но вполне может пригодиться для акварельных красок.

Из стеблей и листьев чистотела удастся извлечь *оранжевый краситель*. Каротиноиды получают путем добавления к овощам эфирно-ацетоновой смеси и уксусной кислоты, а затем диэтилового эфира.

Черный краситель можно добыть из отвара ягод и корней воронца. Но есть и другой, более простой способ: добавить железный купорос к одному из полученных ранее отваров. Почти все эти отвары содержат дубильные вещества типа танина, и в присутствии солей двухвалентного железа они становятся черными.

Естественный неброский цвет вареного мяса, к сожалению, не особо привлекает большинство потребителей, поэтому в мясной промышленности широко применяются ингредиенты для коррекции цвета мясных продуктов. Мясная отрасль потребляет 13 % производимых во всем мире натуральных красителей. Идеальный пищевой краситель для данной отрасли должен быть устойчивым, безвредным при рекомендуемых дозировках и условиях применения, не оказывать неблагоприятного влияния на свойства пищевого продукта, не реагировать с основными и сопутствующими компонентами окрашиваемого изделия, обладать высокой красящей способностью, быть простым в применении, а также иметь приемлемую цену.

В мясной промышленности очень широко используется натуральный желто-оранжевый краситель *аннатто* (E160b), относящийся к группе каротиноидов. Аннатто получают из семян орлеанового дерева *Bixa orellana*. Его родиной является тропическая Америка. Это дерево издавна культивируют в тропических странах для получения натурального красителя оранжевого цвета. Аннатто имеет в своем составе смесь каротиноидов, главным из которых является биксин. Биксин жирорастворим, а его производное норбиксин – водорастворимый пигмент. Аннатто обладает хорошей термо- и светоустойчивостью. Для использования в продуктах с кислым pH разработаны специальные кислотоустойчивые формы красителя. Водорастворимая форма аннатто (пигмент норбиксин) обладает способностью образовывать прочные комплексы с белками. Благодаря этой способности аннатто хорошо подходит для окраски оболочек и поверхностей копченых продуктов. Для получения рыжего

или яркого красно-коричневого оттенка следует внести 50–100 г красителя на 10 л воды (дозировка указана для красителя с концентрацией пигмента около 1 %). Оболочку необходимо погрузить в приготовленный раствор на 2–3 ч и более в зависимости от желаемой интенсивности окраски. При окрашивании мясные изделия погружают в растворенный в холодной мягкой воде краситель на 2–5 мин до получения необходимой окраски. Для окрашивания копченостей этот краситель иногда комбинируют с натуральным коричневым красителем карамель, причем из четырех ее видов в мясной промышленности используют только E150c и E150d. Наиболее подходящим для сочетания с аннатто и по оттенку, и с технологической точки зрения является E150c. Если необходимо придать копченостям несколько более яркий оранжевый оттенок, к аннатто прибавляют немного кармина.

Для получения золотисто-желтого оттенка аннатто иногда смешивают с натуральным красителем *куркумином* (турмериком) (E100). Натуральный пигмент куркумин позволяет окрашивать пищевые продукты в желтый цвет. Куркумин (турмерик) (E100) получают из корневища пряного растения куркумы *Curcuma longa L.* семейства имбирных, произрастающего в Индии. Куркумин жирорастворим по своей природе и диспергируется в воде при добавлении эмульгаторов. Он также применяется для коррекции оттенков смесей специй, приправ, для имитации желтизны куриного жира. Куркумин является сильным антиоксидантом, улучшает пищеварение, способствует нормализации кишечной микрофлоры, связывает свободные радикалы, помогает в борьбе с возрастными болезнями, предотвращает рак, является антибактериальным агентом, способствует детоксикации печени, предотвращает формирование катаракты и желчных камней, стимулирует работу желчного пузыря.

Одним из наиболее широко применяемых в пищевой промышленности натуральных красителей является экстракт *паприки* (E160c). Паприка – краситель, полученный экстракцией из красного сладкого перца *Capsicum annuum*, произрастающего в Европе и Северной Америке. Паприка содержит каротиноидные пигменты капсантин, β-каротин и капсорубин. В зависимости от содержания пигмента краситель может иметь цвет от красного до оранжевого. Он улучшает пищеварение, обладает антисептическими свойствами. Пигменты паприки жирорастворимы по своей природе, но на их основе получают также диспергируемые в воде красители. В зависимости от условий производства и состава вододисперсной паприки этот краситель может по-разному вести себя при смешивании с водой. Наиболее дешевые формы вододисперс-

ной паприки диспергируются в воде при тщательном перемешивании; красители, легко смешиваемые с водой, имеют несколько более высокую цену. Наиболее востребован этот краситель в мясной отрасли и широко применяется при производстве смесей специй, приправ. Паприка используется практически во всех сферах пищевой промышленности. Хорошо очищенный краситель при соблюдении рекомендуемой дозировки не придает продуктам никаких ощутимых посторонних привкусов и запахов. Олеорезины паприки не проявляют заметной чувствительности к рН среды, однако без специальной защиты пигменты паприки не очень устойчивы к воздействию света и высокотемпературной обработки. Для увеличения свето- и термостойкости паприки применяются натуральные антиоксиданты (токоферолы, экстракт розмарина и др.). В мясных полуфабрикатах водо- и жирорастворимые формы красителя (с содержанием 1,5 % красящего пигмента) обычно применяются в количестве от 0,05 до 0,1 %.

Во всем мире для придания мясным изделиям естественного красного цвета наиболее часто применяется натуральный краситель животного происхождения *кармин* (E120), представляющий собой комплексное соединение карминовой кислоты с кальцием и алюминием. На основе этого пигмента могут производиться водо- и жирорастворимые красители, кроме того, он используется в виде лака – не растворимого в воде и жирах комплексного соединения с кальцием и алюминием. Карминовый лак имеет более светлый оттенок красного и легко смешивается с продуктами на водной и жировой основе. Такая форма этого красителя обладает низкой миграционной способностью. Кармин зарекомендовал себя как один из самых устойчивых пищевых красителей: придавая колбасным и деликатесным изделиям естественный сочный оттенок, он не проявляет заметной чувствительности к свету, окислению и температурной обработке. Кармин используется как при производстве сырокопченых и сыровяленых продуктов, так и при изготовлении колбасных изделий, подвергаемых термической обработке. Кармин в водорастворимой форме – единственный натуральный краситель, применяемый при инъектировании вареной ветчины и для окраски оболочек в разные оттенки красного цвета (часто в сочетании с аннатто). Этот краситель позволяет получать стабильный цвет при производстве мясопродуктов, регулировать степень их окрашивания в соответствии с типом и пожеланиями потребителя, а также улучшать их товарный вид.

Лютеин (E161) получают экстрагированием из лепестков бархатцев *Aztec Marigolds*, которые произрастают в Южной Америке. Краси-

тель представляет собой вододисперсный экстракт, растворимый в жирах и масле. Он придает продукту различные оттенки желтого цвета от лимонного до золотистого. Лютеин менее чувствителен к окислению, чем другие красители каротиноидного типа, стабилен к нагреванию, светоустойчив.

21.3. Консерванты, антиоксиданты, пищевые стабилизаторы, эмульгаторы, усилители вкуса, текстуранты, подсластители, наполнители

Консерванты. Наиболее используемыми консервантами являются: *поваренная соль, этиловый спирт, уксусная, сернистая, сорбиновая, бензойная кислоты и некоторые их соли*. Консерванты можно условно разделить на собственно консерванты и вещества, обладающие консервирующим действием. Первые влияют непосредственно на клетки микроорганизмов, вторые отрицательно воздействуют на микробы, в основном за счет снижения рН среды, активности воды или концентрации кислорода. Каждый консервант имеет свой спектр действия.

Накопление консерванта в продукте может происходить не только при его внесении извне, но и в связи с химическими изменениями, происходящими в сырье в результате деятельности микроорганизмов. Квашение капусты, соленье огурцов и других овощей основано на молочнокислом брожении сахара, в результате которого в продукте накапливается молочная кислота, являющаяся природным консервантом.

По мере роста населения консерванты приобретают все большее значение, поскольку обеспечить 10 %-й прирост запасов пищевых продуктов с их помощью гораздо легче, нежели путем расширения сельскохозяйственного производства.

Низин (E234) – антибиотик естественного происхождения, продукт жизнедеятельности молочнокислых бактерий. Он активно подавляет рост термоустойчивых грамположительных спорообразующих бактерий, предотвращает образование ботулиновых токсинов. Применяется в производстве сыров и других молочных продуктов, овощных, мясных и рыбных консервов, а также в виноделии, пивоварении и хлебопечении.

Молочная кислота (E270) образуется в процессе молочнокислого брожения и широко используется в качестве консерванта при изготов-

лении сыра и целого ряда других молочных продуктов. Муравьиная кислота и ее производные (Е236–238) используются в основном при консервировании овощей и производстве безалкогольных напитков.

Антиоксиданты. Добавки, сохраняющие свежесть, включают в первую очередь антиоксиданты. Их вводят в состав масел и материалов для упаковки, чтобы предотвратить прогоркание. Используют также хелатирующие агенты и секвестранты. Они предотвращают взаимодействие между металлами и компонентами пищи, что сводит к минимуму обесцвечивание, а также утрату вкуса и аромата. Ряд веществ используется для того, чтобы не допустить потемнения фруктов на поверхности разреза.

Как и консервирующие вещества, антиоксиданты применяются для продления сроков хранения пищевых, главным образом жироемких, продуктов. В основе их действия лежит ингибирование реакций окисления пищевых компонентов. Окисление происходит под влиянием кислорода воздуха, света, температуры, технологических факторов производства. В первую очередь окисляются липиды и их соединения, витамины и другие биологически важные нутриенты, что снижает пищевую ценность продукта. Конечные продукты окисления отрицательно влияют на органолептические свойства и могут быть токсичны для организма человека. Например, окисление липидных компонентов приводит к образованию гидропероксидов, которые, также окисляясь, образуют такие токсичные соединения, как альдегиды, кетоны, отдельные жирные кислоты и многочисленные продукты их полимеризации.

К *натуральным антиокислителям* относят токоферолы (витамин Е), аскорбиновую кислоту (витамин С), флавоны (кверцетин), эфиры галловой кислоты и т. д.

Пищевые стабилизаторы. Это особая группа добавок, применяемых в разных отраслях пищевой промышленности, главное назначение которых – формирование и сохранение консистенции, текстуры, формы и потребительских качеств продуктов молочного, мясоперерабатывающего, хлебопекарного и кондитерского производства.

Обычно выделяют три главные группы пищевых стабилизаторов: пектины, каррагинаны и камеди. Все они производные натуральных веществ, хотя в последнее время объемы мирового производства продуктов питания потребовали и промышленного синтеза некоторых видов пищевых стабилизаторов. Пищевые стабилизаторы не представляют опасности для здоровья и являются очень важным подспорьем в наращивании мирового производства продуктов питания. Сырьем для них служат яблоки, плоды цитрусовых, пшеница, кукуруза, морские водорос-

ли, смолы различных наземных растений и т. п. Отдельные виды стабилизаторов – продукты микробиологической промышленности.

Пектин (E440) – это натуральное желеобразующее вещество, содержащееся во фруктах и многих видах овощей. Пектин обычно получают в результате экстракции из цитрусовых или яблок. Его особенность как студнеобразователя – способность формировать гели в водных растворах только в присутствии определенного количества сахара и кислоты или ионов кальция. Применяются пектины в кондитерском, молочно-перерабатывающем, мясoperерабатывающем производстве.

К другой группе относятся камеди трех видов: *гуаровая* (E412), *ксантана* (E415) и *камедь рожкового дерева* (E410). Камеди служат загустителями, стабилизаторами, гелеобразователями, средством для капсулирования. Широко используются в производстве плавленых сыров, мороженого и молочных продуктов, фруктовых и овощных консервов, сырокопченых колбас, соусов, кетчупов, майонезов, хлебобулочных изделий, рыбных консервов, низкожирных маргаринов и спредов. Камеди применяются также в связке с другими загустителями и гелеобразователями для регулировки процесса. Так, например, гуаровая камедь используется для производства сыра в сочетании с каррагинаном.

Каррагинан (E407) – природный загуститель, получаемый при переработке красных морских водорослей класса *Rhodophyceae*, которые произрастают практически по всей акватории Мирового океана, на подводных скалах на глубине до трех метров. Каррагинаны также широко применяются в вышеперечисленных отраслях пищевой промышленности.

Эмульгаторы. Вещества, способные образовывать и стабилизировать эмульсию, обеспечивают возможность создания и сохранения дисперсии двух или более несмешивающихся веществ. Впервые в качестве эмульгаторов стали использовать камеди, сапонины, лецитин и другие натуральные вещества. В настоящее время список эмульгаторов расширился главным образом за счет синтезированных препаратов. Эмульгирующая способность рассматриваемой группы веществ связана с их поверхностно-активными свойствами, поэтому термин «эмульгатор» можно рассматривать как синоним терминов «эмульгирующий агент» и «поверхностно-активное вещество». Основная область применения эмульгаторов и стабилизаторов – масложировая промышленность. Так, для приготовления жиров, используемых в хлебопечении и кондитерском производстве, разрешены эмульгаторы: Т-1 – моно- и диглицериды жирных кислот; Т-2 – продукт этерификации полиглицерина насыщенными жирными кислотами (С16 и С18). Их добавляют в количестве не более 2 г/кг на 1 кг продукта. Для этих соединений допустимая су-

точная доза (ДСД) составляет 125 мг на 1 кг массы тела человека. Наряду с основной функцией эмульгаторы используют для равномерного распределения в воде жирорастворимых веществ и соединений: ароматизаторов, эфирных масел, экстрактов пряностей и т. д.

Усилители вкуса. Свежие овощи, мясо, рыба и другие продукты имеют яркий вкус и аромат за счет содержания в них нуклеотидов. В процессе хранения и промышленной переработки количество нуклеотидов уменьшается, что сопровождается потерей вкуса и аромата продукта.

Глутамат натрия (Е621, или натриевая соль глутаминовой аминокислоты) – пищевая добавка, предназначенная для усиления вкусовых ощущений за счет увеличения чувствительности рецепторов языка. Глутамат натрия не содержит питательных веществ. При употреблении пищи он «обманывает» наш мозг, в результате чего мы думаем, что еда очень вкусная.

Текстуранты. Так называют различные добавки, предназначенные для улучшения текстуры пищевых продуктов. Соединения кальция делают консервированные томаты более плотными и крепкими. Фосфаты улучшают вкус консервированных груш, делая их более нежными. Пирофосфаты улучшают текстуру пудингов быстрого приготовления и молочных продуктов. Эмульгаторы придают стабильность водным и масляным эмульсиям в заправках для салата. Разнообразное применение находят вещества типа крахмала, придающие продуктам большую плотность. Разрыхлители обеспечивают соответствующую текстуру выпекаемых хлебулочных и кондитерских изделий.

Подсластители. Природные подсластители, такие как сахар, известны людям на протяжении тысячелетий. Они всегда производились в больших количествах. Однако забота о снижении калорийности пищи вынудила обратиться к непещевым подсластителям. В США в настоящее время разрешены к применению пять таких веществ: сахарин, аспартам, ацесульфам, тауматин и глициризин. Рассматривается и возможность использования ряда веществ, разрешенных в других странах. Аспартам и ацесульфам приблизительно в 200 раз слаще сахарозы. Ведутся работы по созданию новых, более эффективных искусственных подсластителей.

Наполнители. Тенденция к применению непещевых подсластителей заставила искать вещества, которые могли бы выполнять роль сахаров в напитках, джемах, желе и копченостях. Желатинированный крахмал люди употребляют на протяжении веков, теперь же получен ряд производных крахмала и целлюлозы. Используется полидекстроза – также одно из производных сахара.

Глава 22 ПОЛУЧЕНИЕ ЛИГНИНА

Обычно присутствие лигнина в растительном мире связывается с наличием опорных и проводящих тканей (например, ксилемы). Лигнин – важный компонент клеточных стенок этих тканей. Он обнаружен в таких растениях, как плауны, папоротники, голосеменные и покрытосеменные, но его нет в несосудистых растениях – грибах и водорослях. Мхи составляют исключение в том отношении, что, не имея клеток, подобных ксилеме, они тем не менее содержат лигниноподобные соединения; правда, имеются некоторые сомнения в том, что это настоящие лигнины.

Лигнин содержится в клеточных стенках не только проводящих тканей, но и сердцевины, корней, плодов, почек, коры и пробки. Лигнификация клеточной стенки происходит после отложения полисахаридных компонентов стенки и к концу ростового периода клетки. Распределение лигнина в стенке происходит неравномерно; обычно те слои, которые откладывались первыми, бывают наиболее богаты лигнином. Следовательно, срединная пластинка и первичная стенка подвергаются наибольшей лигнификации, а вторичная – наименьшей.

Лигнификация имеет двоякое значение. Она укрепляет клеточную стенку, образуя разветвленную сеть по всему матриксу, закрепляя таким образом более прочно микрофибриллы целлюлозы. Кроме того, лигнин предохраняет микрофибриллы стенки от химических, физических, биологических воздействий.

Важное свойство лигнина – устойчивость по отношению к микроорганизмам. Лишь немногие из них, и то сравнительно медленно, разрушают лигнин.

Лигнин – это группа близкородственных высокомолекулярных полимеров, главным, если не единственным, строительным блоком кото-

рых является фенилпропановый остаток. Структурных вариантов фенилпропанового остатка известно мало, но существует много путей, по которым остатки соединяются вместе. Порядок в структуре полимера отсутствует. Процесс полимеризации происходит путем хаотичной конденсации свободных радикалов. По этой причине структура каждой молекулы лигнина может быть уникальной, и, следовательно, записать ее невозможно. Однако можно нарисовать гипотетическую частичную структуру, отражающую различные типы фенилпропановых строительных блоков и различные пути их связывания.

Лигнины однодольных и двудольных покрытосеменных и голосеменных растений структурно различаются между собой. В основе этого различия лежит неодинаковая структура фенилпропановых строительных блоков. Об этом свидетельствуют различные ароматические альдегиды, получающиеся при мягком окислении нитробензолом в щелочной среде лигнинов из указанных источников. Лигнин голосеменных растений дает преимущественно ванилин и немного *n*-гидроксибензальдегида. Лигнин двудольных растений дает главным образом ванилин и сиреневый альдегид, а также немного *n*-гидроксибензальдегида; лигнин однодольных растений дает все три альдегида.

Накапливается все больше данных в пользу того, что лигнин ковалентно связан с полисахаридами матрикса клеточной стенки, однако природа этой связи пока не установлена.

Лигнин исключительно трудно экстрагировать из клеточной стенки. До сравнительно недавнего времени все методы экстрагирования включали использование очень агрессивных химических реагентов при повышенных температурах, например 40 %-й HCl, смеси 3 : 1 36 % HCl и 80 %-й H₂SO₄, 2 %-й H₃PO₄, а затем аммиачного CuO. Эти методики приводили к значительной модификации экстрагируемого лигнина. Более того, природа модификации зависела от реагента, применяемого для экстракции. Дополнительное осложнение вносила самоконденсация молекул лигнина, происходившая при повышенных температурах. Такие модифицированные лигнины обычно называли по использованному экстрагирующему реагенту, например солянокислый лигнин, купроксамовый лигнин.

Указанные трудности были в значительной мере преодолены, когда Браунс показал, что около 5 % общего количества лигнина древесины можно экстрагировать, обрабатывая свежие опилки 95 %-м этанолом в течение нескольких дней при комнатной температуре. Такое сочетание нейтрального, относительно инертного растворителя и низкой температуры не вызывало заметных структурных изменений и поэто-

му позволяло получать немодифицированный лигнин. Экстрагированный таким образом лигнин называют лигнином Браунса или нативным лигнином. Выход нативного лигнина можно увеличить, если для экстрагирования по методу Браунса брать древесину, пораженную бурой гнилью, которую вызывает, например, гриб *Poria vaillantii*. Подобные грибы выделяют смесь ферментов, расщепляющих целлюлозу и другие полисахариды стенки, но не атакующих лигнин, который в результате становится более доступным экстрагирующему растворителю. Бурой гнилью эти грибы называются потому, что пораженная область древесины имеет бурый цвет. Это отличает их от грибов, вызывающих белую гниль, которые расщепляют все компоненты древесины, включая лигнин, и оставляют белые изгнившие области.

Утилизация лигноцеллюлозной биомассы основана на процессе ее конверсии в сбрасываемые субстраты, которые в свою очередь служат сырьем для многих отраслей промышленности, производящих химические вещества, горючее и продукты питания. При этом необходимо эффективно использовать все компоненты биомассы: целлюлозу, гемицеллюлозу и лигнин. Лигнин защищает полиглюкан от действия ферментов, так что для успешного использования полимерной целлюлозы необходимо прежде всего удалить гемицеллюлозы, далее разрушить комплекс лигнина с целлюлозой, а затем – и кристаллическую структуру самой целлюлозы. Эти задачи могут быть решены применением разнообразных химических, физических и микробиологических методов.

Гемицеллюлозы легко удаляются путем растворения в слабой кислоте в ходе первичной обработки биомассы. При производстве глюкозы из древесины довольно успешно применяется гидролиз слабым раствором кислоты при высоких давлении и температуре. Этот способ используется в ряде стран. Гораздо эффективнее гидролиз концентрированной кислотой, но для осуществления такого процесса требуются большие капиталовложения. Особенно успешно применяется плавиковая кислота, причем безводную кислоту можно регенерировать. Лигноцеллюлозу можно также размалывать и затем подвергать радиационному облучению в больших дозах. Получаемый такими способами лигнин различается по своим свойствам. Очищенные лигнины используются при выработке клеев, смол, адгезивов, типографской краски, для диспергирования красителей; в качестве адсорбентов, изоляторов, при добыче нефти, нанесении полимеров в асфальтовых смесях. После удаления лигнина экстракцией растворителями получают кристаллическую целлюлозу, которая идет на нужды бумажной промышленности. Рентабельность этого процесса определяется главным образом стоимо-

стью регенерации растворителя. Примером одностадийного процесса, протекающего в мягких условиях, является экстракция фенолом при 100 °С, когда лигнин и гемицеллюлозы растворяются в феноле, а высвободившуюся после фильтрования целлюлозу используют для выделки бумажной массы. По мере остывания фенольного экстракта гемицеллюлоза концентрируется главным образом в водной фазе, отделяясь от масел и лигнина, которые можно использовать для производства новых порций фенола методом гидрокрекинга. Таким образом, в отношении фенола и энергетических потребностей это самообеспечивающийся процесс. При «паровом взрыве» лигноцеллюлоза претерпевает превращения, в результате которых она становится более чувствительной к ферментативному гидролизу. При этом увеличивается и выход реакционно-способных лигнинов, высвобождаемых под действием слабой щелочи. При разрушении замораживанием используется жидкий аммиак. При обработке умеренно твердой древесины методом автогидролиза на основе «парового взрыва» получают отходы, пригодные для дальнейшей переработки микробами (древесина хвойных и тропических пород, более богатая лигнином, плохо поддается такой обработке).

Гидролизный лигнин – неоднородный продукт кислотной переработки древесины, который состоит из собственно лигнина (до 80 %), остатков поли- и моносахаридов, органических кислот, смол, воска, азотистых веществ, солевых элементов и не отмытых при гидролизе древесины минеральных кислот.

Научно-исследовательские работы по изысканию рациональных путей использования гидролизного лигнина проводятся с начала гидролизного производства, но реализация многих предложений из-за сложности и неоднородности состава лигнина, недостаточной технологической отработанности отдельных стадий и аппаратурного оформления так и не была осуществлена. Например, разработаны технологии использования гидролизного лигнина в качестве компонента фенолформальдегидных смол и резин, сорбента для очистки сточных вод, реализуется технология получения лечебного препарата полифепан и др. И все же переработке подвергается лишь около 2,7 % образующегося гидролизного лигнина. Существуют рекомендации по применению гидролизного лигнина в качестве энергетического топлива, так как невысокая теплотворная способность гидролизного лигнина может быть эффективной мерой по его утилизации, но не причиной использования его потенциальных возможностей как природного органического сырья. Вернуть гидролизный лигнин в круговорот углерода в природе можно с помощью микробиологического компостирования.

Имеется также достаточное количество рекомендаций для использования гидролизного лигнина и его смеси со щелочными добавками, например навозом, в качестве удобрения. Наряду с этим есть сведения об ухудшении структуры и механического состава почвы из-за цементирующей способности гидролизного лигнина. Очевидно, для получения полноценного удобрения простого смешивания гидролизного лигнина с органическими добавками недостаточно.

Одно из направлений переработки технических лигнинов в органико-минеральные удобрения связано с применением микроорганизмов и их ферментов в качестве делигнифицирующих агентов, так как разрушение лигнина – один из основных этапов компостирования. В силу сложного химического строения лигнин чрезвычайно медленно разлагается. Разрушение лигнина осуществляют в основном базидиальные грибы, в первую очередь грибы белой гнили. Биодegradация лигнина этими грибами – многоступенчатый процесс с участием ферментов лигнолитического комплекса.

Проблема загрязнения окружающей среды выбросами целлюлозно-бумажной и лесохимической промышленности особенно актуальна в областях, где расположены гидролизные предприятия, с которых ежегодно на свалку вывозится огромное количество гидролизного лигнина. Такие крупнотоннажные отходы занимают значительные земельные участки и загрязняют прилегающие к предприятиям территории. Следовательно, основная задача биотехнологии не получение, а утилизация лигнина как отхода целлюлозно-бумажного производства.

Глава 23 ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПРОДУКТОВ БИОТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ ЗАЩИТЫ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Экобиотехнология решает проблемы по охране окружающей среды, такие как переработка отходов, очистка воды, устранение загрязнений.

В процессе круговорота загрязняющих веществ в экосистемах огромную роль играют микроорганизмы. Однако многие из созданных человеком низкомолекулярных соединений (ядохимикаты, детергенты) и высокомолекулярных полимеров оказались устойчивыми и не разлагаются микроорганизмами, кроме того, они проявляют мутагенное, канцерогенное, тератогенное влияние, поэтому для их утилизации требуется разработка более совершенных технологий очистки.

Обычно для утилизации отходов применяют комплексы микроорганизмов и специальные приборные устройства.

Чужеродные вещества (ксенобиотики), попадая в организм человека и животных, претерпевают различную биотрансформацию: окисление, восстановление, гидролиз и другие превращения с участием ферментных систем. В воде и почве биотрансформация ксенобиотиков протекает под воздействием ферментов и микроорганизмов. Изучение реакций в почвах затруднено гетерогенностью среды и адсорбцией ксенобиотиков, микроорганизмов и ферментов на частицах и коллоидах почв. Многие ксенобиотики в биосфере достаточно устойчивы: например, дихлордифенилтрихлорэтан (ДДТ) не исчезает из почвы 30 лет, альдрин и хлордан – 15 лет, диэльдрин – 25 лет, гептахлор – 14 лет. Некоторые вещества при распаде образуют еще более устойчивые и токсичные соединения.

Одним из направлений экобиотехнологии является получение экологически чистой энергии. Таковой считается энергия, получаемая путем преобразования солнечной энергии в электрическую с помощью солнечных коллекторов, а также энергия биогаза и микробного этанола.

23.1. Получение биогаза

Биогаз – это смесь, состоящая из 65 % метана, 30 % углекислого газа, 1 % сероводорода и незначительных примесей азота, кислорода, водорода и угарного газа. Энергия, заключенная в 1 м³ биогаза, эквивалентна энергии 0,6 м³ природного газа, или 0,74 л нефти, или 0,66 л дизельного топлива. В основе получения биогаза лежит процесс метанового брожения, или биометаногенез, – превращение биомассы в энергию.

Биометаногенез – сложный микробиологический процесс, в котором органическое вещество разлагается в анаэробных условиях до метана и диоксида углерода. Микробиологическому разложению поддаются практически все соединения природного происхождения, а также значительная часть ксенобиотиков органической природы.

Для получения биогаза можно использовать отходы животноводства, сельского хозяйства, испорченные продукты, стоки крахмалоперерабатывающих предприятий, жидкие отходы сахарных заводов, бытовые отходы, сточные воды городов (рис. 15).

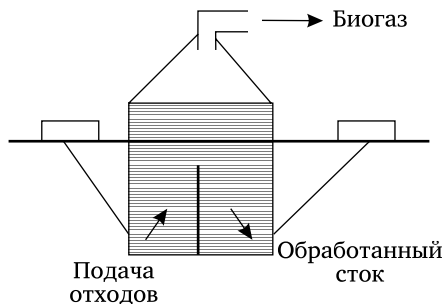


Рис. 15. Схема устройства реактора для обработки сельскохозяйственных отходов

Процесс ведут при температуре 30...60 °С и значениях pH от 6 до 8. Чаще всего используют вторичные отходы (т. е. отходы животноводства и сточные воды городов).

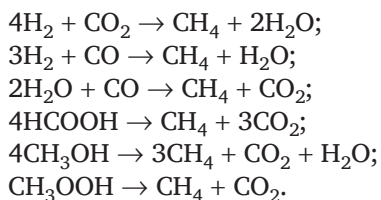
Подачу навоза, остатков растениеводства (субстрата) и отбор обработанных (стоков) осуществляют в нижней части реактора. Режим его работы может быть как периодическим, так и полунепрерывным. Реактор обычно имеет две (или более) секции для разделения стадий про-

цесса. Биогаз сгорает с образованием углекислого газа и воды, а в реакторе остается естественное удобрение – сапропель. Он содержит азот, фосфор, соли калия, необходимые для роста растений. Использование сапропеля более целесообразно, чем навоза, поскольку последний перегружает почву.

В анаэробном процессе биометаногенеза выделяют три последовательные стадии, в которых участвуют свыше 190 различных микроорганизмов. На первой стадии ферментативному гидролизу подвергаются сложные многоуглеродные соединения: белки, липиды, полисахариды. На второй идет образование ацетата, которое может протекать двумя путями:

- *ацетогенные* микроорганизмы усваивают водород, углекислый газ и некоторые одноуглеродные соединения с образованием ацетата;
- *гомоацетатные* микроорганизмы усваивают водород, углекислый газ и некоторые одноуглеродные соединения с образованием ацетата.

На третьей стадии образуется метан. Он может синтезироваться через стадию восстановления углекислого газа с молекулярным водородом, а также из метильной группы ацетата. Некоторые метановые бактерии в качестве субстрата используют формиаат, углекислый газ, метанол, метиламин и ароматические соединения:



В зависимости от температуры протекания процесса метановые бактерии разделяют на мезо- и термофильные. Оптимальная температура для мезофильных бактерий – 30...40 °С, для термофильных – 50...60 °С. В целом термофильный процесс метаногенеза идет интенсивнее мезофильного, причем субстрат обеззараживается от патогенной микрофлоры и гельминтов.

Микрофлора для метаногенеза формируется в основном микрофлорой желудочно-кишечного тракта животных: *Lactobacillus acidophilus*, *Eubacterium aerofaciens*, *Methanobacterium mobile*, *Methanosarcina* sp., *Methanobrevibacterium ruminantium*.

Метанообразующие бактерии от 90 до 95 % используемого углерода превращают в метан и лишь от 5 до 10 % – в биомассу.

Анаэробная биоконверсия органических отходов в метан – наиболее конкурентоспособная область биоэнергетики. Она позволяет получать из местного сырья биогаз как локальный источник энергии. Экологически чистые источники энергии не влияют отрицательно на окружающую среду. Современные источники энергии – ГЭС, ТЭС, АЭС – вызывают серьезные нарушения во внешней среде. ГЭС служат причиной затопления территорий, изменения ландшафта, гибели биоценозов. ТЭС загрязняют атмосферу, вызывают отчуждение земель. АЭС создают угрозу радиационного загрязнения. Сжигание нефти и газа вызывает повышение концентрации углекислого газа, образование смога и, кроме того, уменьшение ресурсов нефти и газа.

Биогаз широко применяют в Индии, Китае, Японии. Основное преимущество биогаза состоит в том, что он является возобновляемым источником энергии. В природе в результате деятельности бактерий образуется ежегодно около 800 млн т метана, примерно столько же добывается людьми.

23.2. Производство биоэтанола

С 1975 г. производство пищевого этилового спирта остается постоянным, а топливного этанола увеличилось в 10 раз.

Этанол может применяться как топливо самостоятельно или в смеси с бензином в количестве от 10 до 26 % (такую смесь в США называют «газохол»), или в смеси с дизельным топливом в количестве 3 %. Эти смеси могут быть использованы без изменений в конструкции двигателей внутреннего сгорания.

В качестве источника энергии спирт применяется в Бразилии, США, странах ЕС, т. е. в энергодефицитных зонах. Кроме того, он широко используется в химической промышленности в качестве растворителя, экстрагента, антифриза.

Этанол получают преимущественно путем сбраживания сахаров, содержащихся в растениях.

По мировым масштабам первое место занимает производство спирта из сахарного тростника (Бразилия, США). При переработке сахарного тростника его тщательно давят, сок концентрируют и подвергают брожению. На втором месте находится получение спирта из маниока (касавы) – крахмалистого растения, способного расти на скудных почвах.

Считается, что бразильский вариант биотехнологического решения топливной проблемы самый подходящий, однако вышло так, что луч-

шие пахотные земли засеивались сахарным тростником, при этом для одного автомобиля требовалось примерно 13 тыс. м², в то время как для одного человека 0,8 тыс. м² в год, т. е. один автомобиль отбирал пищу у 18 жителей. Известно, что в Бразилии миллионы людей страдают от недоедания. Кроме того, стоки со спиртовых заводов загрязняют водоемы и нарушают экологическое равновесие.

Кроме сахарного тростника и маниока для производства спирта используют кукурузу, топинамбур, ананас, сахарную свеклу, сорго.

При переработке крахмалосодержащего сырья необходимо его предварительное разваривание и обработка ферментами для превращения крахмала и других полисахаридов в усваиваемые микроорганизмами сахара.

Для производства спирта можно также использовать мелассу – остаток от производства сахара из сахарной свеклы – и сыворотку, остающуюся после производства сыров.

Производство спирта из сахарного тростника экономически неоправданно (Бразилия), из кукурузы (США) – субсидируется государством, чтобы цена на этанол была ниже, чем на нефтепродукты. В других регионах себестоимость биоэтанола еще выше, поскольку выше себестоимость сырья. Снижение себестоимости этанола может быть достигнуто заменой сырья или кардинальным изменением технологии ферментации.

При замене сырья вместо зерна злаков для превращения в этанол используется биомасса целых растений, как травянистых, так и деревьев, а также твердые коммунальные отходы, т. е. мусор.

Лигноцеллюлоза (древесина) состоит из трех полимеров: целлюлозы, гемицеллюлозы и лигнина. Путем химического или ферментативного гидролиза эти полимеры расщепляются до мономеров с последующей ферментацией сахаров до этанола. Несмотря на неполный гидролиз (из-за сложности химического строения молекул полимеров), процесс экономически выгоден.

Кроме того, найдены виды дрожжей, способных сбраживать в спирт не только гексозу (глюкозу), но и ксилозу. Применение таких дрожжей приводит к более полному использованию сахаров, а следовательно, повышается выход спирта и снижается его себестоимость.

Из гидролизатов древесины и сульфитных щелоков (отход в целлюлозно-бумажном производстве) в России получают технические спирты.

23.3. Очистка сточных вод

Важнейшая проблема экологической биотехнологии – очистка сточных вод. Потребность в воде в связи с ростом городов, бурным развитием промышленности, интенсификацией сельского хозяйства огромна. Ежегодный расход воды на земном шаре по всем видам водоснабжения составляет от 3300 до 3500 км³, при этом в сельском хозяйстве – 70 % всего водопотребления. Для производств химической, целлюлозно-бумажной, энергетической промышленности, черной и цветной металлургии и бытовых нужд населения требуется также значительное количество воды. Большая часть этой воды после ее использования возвращается в реки и озера в виде сточных вод.

На современном этапе выделяются следующие направления рационального расхода водных ресурсов: более полное использование и расширение воспроизводства ресурсов пресных вод; разработка новых биотехнологических процессов, позволяющих предотвратить загрязнение водоемов и свести к минимуму потребление свежей воды.

Загрязнение поверхностных и подземных вод можно разделить на несколько типов: механическое, сопровождающееся повышением содержания механических примесей и относящееся в основном к поверхностным видам загрязнений; химическое, обусловленное присутствием в воде органических и неорганических веществ токсического и нетоксического действия; биологическое, связанное с наличием в воде разнообразных патогенных микроорганизмов, грибов и мелких водорослей; радиоактивное; тепловое. Основные источники загрязнения и засорения водоемов – недостаточно очищенные сточные воды промышленных и коммунальных предприятий, крупных животноводческих комплексов, отходы производства при разработке рудных ископаемых (воды шахт, рудников); сбросы водного и железнодорожного транспорта; пестициды и т. д. Загрязняющие вещества, попадая в природные водоемы, качественно изменяют их состав.

Сточные воды содовых, сульфатных, азотно-туковых заводов, обогатительных фабрик свинцовых, цинковых, никелевых руд, содержащие кислоты, щелочи, ионы тяжелых металлов, меняют физические свойства воды (появление неприятных запахов, привкусов и т. д.). Сточные воды нефтеперерабатывающих, нефтехимических заводов, предприятий органического синтеза содержат различные нефтепродукты, аммиак, альдегиды, смолы, фенолы и другие вредные вещества. Вследствие окислительных процессов уменьшается содержание в воде кислорода, ухудшаются ее органические показатели.

Нефть и нефтепродукты – основные загрязнители внутренних водоемов, вод и морей Мирового океана – создают разные формы загрязнения: плавающую на воде нефтяную пленку, осевшие на дно водоемов тяжелые фракции. Вода приобретает токсические свойства и представляет собой угрозу для всего живого: 12 г нефти делают непригодной для употребления одну тонну воды. Вредным загрязнителем промышленных вод является фенол, содержащийся в сточных водах многих нефтехимических предприятий. На жизнь обитателей водоемов пагубно влияют сточные воды целлюлозно-бумажной промышленности. Окисление древесной массы сопровождается поглощением значительного количества кислорода, что приводит к гибели икры, мальков и взрослых рыб. Сточные воды, имеющие повышенную радиоактивность (100 кюри на 1 л и более), подлежат захоронению в подземные бессточные бассейны и специальные резервуары.

В значительной степени загрязняют водоемы моющие синтетические средства, широко используемые в быту, промышленности и сельском хозяйстве. Они парализуют жизнедеятельность бактерий. Пестициды, попадая в водоемы, накапливаются в планктоне, бентосе, рыбе и по цепочке питания попадают в организм человека, действуя отрицательно как на отдельные органы, так и на организм в целом. Сточные воды, содержащие отходы кожевенной и целлюлозно-бумажной промышленности, сахарных и пивоваренных заводов, предприятий мясомолочной, консервной и кондитерской отраслей, служат причиной органических загрязнений водоемов. Нагретые сточные воды тепловых электростанций вызывают тепловое загрязнение, которое резко изменяет термический режим, отрицательно влияет на флору и фауну водоемов. Возникают благоприятные условия для массового развития в водохранилищах синезеленых водорослей (так называемое цветение воды).

Применение того или иного метода очистки воды – механического, химического, физико-химического и биологического – в каждом конкретном случае определяется характером и степенью вредности примесей.

Сущность этих методов состоит в том, что из сточных вод путем отстаивания и фильтрации удаляют механические примеси. Грубодисперсные частицы в зависимости от размеров улавливаются решетками, ситами, песколовками, навозоуловителями, нефтеловушками и т. д. Механическая очистка позволяет выделять из бытовых сточных вод до 60–75 % нерастворимых примесей, а из промышленных – до 95 %, многие из которых как ценные используются в производстве.

Химические методы связаны с тем, что в сточные воды добавляют различные химические реагенты, которые вступают в реакцию с за-

грязнителями и осаждают их в виде нерастворимых осадков. Химическая очистка уменьшает количество нерастворимых примесей до 95 %, а растворимых – до 25 %.

Физические методы используют для удаления тонкодисперсных и растворенных неорганических примесей, а также для разрушения органических и плохо окисляемых веществ. В их арсенал входят электролиз, окисление, сорбция, экстракция, ионообменная хроматография, ультразвук, высокое давление и др.

Биологические методы основаны на использовании закономерностей биохимического и физиологического самоочищения рек и других водоемов. Для очистки сточных вод применяют биофильтры, биологические пруды и аэротенки.

В биофильтрах сточные воды пропускают через слой крупнозернистого материала, покрытого тонкой бактериальной пленкой, благодаря которой интенсивно протекают процессы биологического окисления. В биологических прудах в очистке сточных вод принимают участие все организмы, населяющие водоем.

Аэротенки – огромные резервуары из железобетона, в которых очистка происходит с помощью активного ила из бактерий и микроскопических животных, бурно развивающихся в этих сооружениях, чему способствуют органические вещества сточных вод и избыток кислорода, поступающего с потоком подаваемого воздуха. Бактерии, склеивающиеся в хлопья, выделяют в среду ферменты, разрушающие органические загрязнения. Ил с хлопьями оседает, отделяясь от очищенной воды. Инфузории, жгутиковые, амёбы, коловратки и другие мельчайшие животные, пожирая бактерии, не слипшиеся в хлопья, тем самым омолаживают бактериальную массу ила. Сточные воды сначала подвергают механической, а после химической очистке для удаления болезнетворных бактерий путем хлорирования жидким хлором или хлорной известью. Для дезинфекции используют также ультразвук, озонирование, электролиз и другие методы.

Биологический метод дает существенные результаты при очистке коммунально-бытовых стоков, а также отходов предприятий нефтеперерабатывающей, целлюлозно-бумажной промышленности и производства искусственного волокна.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Антибиотики / П. Н. Кашкин [и др.]. Л., 1970.
- Артамонов, В. И. Занимательная физиология растений / В. И. Артамонов. М., 1991.
- Безбородов, А. М. Биохимические основы микробиологического синтеза / А. М. Безбородов. М., 1984.
- Безбородов, А. М. Ферменты микроорганизмов и их применение / А. М. Безбородов // Биотехнология / под ред. А. А. Бабаева. М., 1984.
- Бекер, М. Е. Биотехнология / М. Е. Бекер, Г. К. Лиепинен, Е. П. Райпулис. М., 1990.
- Биотехнология / под ред. А. А. Бабаева. М., 1984.
- Биотехнология растений: культура клеток / А. Д. Головлева [и др.]. М., 1989.
- Биотехнология – сельскому хозяйству / А. Г. Лобанок [и др.]. Минск, 1988.
- Биотехнология сельскохозяйственных растений / Е. В. Левашов [и др.]. М., 1987.
- Булдаков, А. Пищевые добавки : справочник / А. Булдаков. СПб., 1996.
- Варфоломеев, С. Д. Биотехнология преобразования солнечной энергии. Современное состояние, проблемы, перспективы / С. Д. Варфоломеев, Е. С. Панцхава // Биотехнология / под ред. А. А. Бабаева. М., 1984.
- Варфоломеев, С. Д. Биотехнология / С. Д. Варфоломеев, С. В. Калужный. М., 1990.
- Виестур, У. Э. Биотехнология: Биологические агенты, технология, аппаратура / У. Э. Виестур, И. А. Шмите, А. В. Жилевич. Рига, 1987.
- Вудворт, М. Методы культивирования клеток / М. Вудворт. Л., 1988.
- Гемипеллюлазы / М. С. Дудкин [и др.]. Рига, 1991.
- Глик, Б. Молекулярная технология. Принципы и применение / Б. Глик, Дж. Пастернак. М., 2002.
- Голубовская, Э. К. Биологические основы очистки воды / Э. К. Голубовская. М., 1978.
- Грачева, И. М. Технология микробных белковых препаратов, аминокислот и биоэнергия / И. М. Грачева, Л. А. Иванова, В. М. Кантере. М., 1992.

- Грачева, И. М. Технология микробных белковых препаратов, аминокислот и жиров / И. М. Грачева, Н. М. Гаврилова, Л. А. Иванова. М., 1980.
- Грачева, И. М. Технология ферментных препаратов / И. М. Грачева, А. Ю. Кривова. 3-е изд. М., 2000.
- Егоров, Н. С. Основы учения об антибиотиках / Н. С. Егоров. М., 1986.
- Елинов, Н. П. Основы биотехнологии / Н. П. Елинов. СПб., 1995.
- Елинов, Н. П. Химическая микробиология / Н. П. Елинов. М., 1989.
- Иммобилизованные клетки и ферменты. Методы / под ред. Дж. Вудворта. М., 1988.
- Иммобилизованные ферменты / И. В. Березин [и др.]. М., 1987.
- Инженерная энзимология / И. В. Березин [и др.]. М., 1987.
- Казанская, Н. Ф. Ферменты и белковые препараты в медицине / Н. Ф. Казанская, Н. И. Ларионова, В. П. Торчилин // Биотехнология / под ред. А. А. Бабаева. М., 1984.
- Каравайко, Г. И. Биоготехнология металлов / Г. И. Каравайко // Биотехнология / под ред. А. А. Бабаева. М., 1984.
- Квеситадзе, Г. И. Введение в биотехнологию / Г. И. Квеситадзе, А. М. Безбородов. М., 2002.
- Квеситадзе, Г. И. Грибные и бактериальные амилазы / Г. И. Квеситадзе. Тбилиси, 1984.
- Кефели, В. И. Биотехнология : курс лекций / В. И. Кефели, Г. А. Дмитриева. Пуццино, 1989.
- Клесов, А. А. Применение иммобилизованных ферментов в пищевой промышленности / А. А. Клесов // Биотехнология / под ред. А. А. Бабаева. М., 1984.
- Мартинек, К. Иммобилизованные ферменты / К. Мартинек // Биотехнология / под ред. А. А. Бабаева. М., 1984.
- Микробиологическое производство биологически активных веществ и препаратов / под ред. Н. С. Егорова, В. Д. Самуилова. М., 1987.
- Молекулярная биология клетки : в 3 т. / Б. Альбертс [и др.]. М., 1994. Т. 1.
- Нечаев, А. П. Пищевые добавки / А. П. Нечаев, А. А. Кочеткова, А. Н. Зайцев. М., 2002.
- Печуркин, Н. С. Популяционные аспекты биотехнологии / Н. С. Печуркин, А. В. Брильков, Т. В. Марченкова. Новосибирск, 1990.
- Пирузян, Л. А. Сапротрофная микрофлора в качестве продуцента биологически активных веществ для целей микробной сапротрофной фармакотерапии / Л. А. Пирузян, Е. М. Михайловский // Изв. РАН. Сер. биол. 1992. № 6. С. 860–866.
- Производство белковых веществ / В. А. Быков [и др.]. М., 1987.
- Промышленная микробиология / под ред. Н. С. Егорова. М., 1989.
- Реннеберг, Р. От пекарни до биофабрики / Р. Реннеберг, И. Реннеберг. М., 1991.
- Рычков, Р. С. Биотехнология: перспективы развития / Р. С. Рычков, В. Г. Попов // Биотехнология / под ред. А. А. Бабаева. М., 1984.
- Савицкая, Е. И. Биология наших дней / Е. И. Савицкая. М., 1987. Вып. 2.

- Самарцев, М. А.* Применение иммобилизованных ферментов в промышленных процессах / М. А. Самарцев, Н. В. Беляков, А. И. Кестнер. М., 1984.
- Сассон, А.* Биотехнология: свершения и надежды / А. Сассон. М., 1987.
- Скоупс, Р.* Методы очистки белков / Р. Скоупс. М., 1985.
- Скрябин, Г. К.* Иммобилизованные клетки микроорганизмов / Г. К. Скрябин, К. А. Кощеенко // Биотехнология / под ред. А. А. Бабаева. М., 1984.
- Технология переработки жиров / под ред. Н. С. Арутюняна. М., 1985.
- Технология продуктов из гидробионтов / под ред. Т. М. Сафроновой, В. И. Шендерюка. М., 2001.
- Технология спирта / под ред. В. Л. Яровенко. М., 2002.
- Тривен, М.* Иммобилизованные ферменты / М. Тривен. М., 1983.
- Тютюнников, Б. Н.* Химия жиров / Б. Н. Тютюнников. М., 1966.
- Ферментные препараты в кормлении животных / Л. Г. Боярский [и др.]. М., 1985.
- Хиггинс, И.* Биотехнология. Принципы и применение / И. Хиггинс, Д. Бест, Дж. Джонс. М., 1988.
- Хотянович, А. В.* Методы культивирования азотфиксирующих бактерий, способы получения и применение препаратов на их основе (методические рекомендации) / А. В. Хотянович. Л., 1991.
- Шлегель, Г.* Общая микробиология / Г. Шлегель. М., 1987.

Рекомендуемые веб-сайты для самостоятельного изучения материала

www.antibiotic.ru
www.biengi.ac.ru
www.bio.1september.ru
www.bioinform.ru
www.bioline.net.ru
www.bioscience.ru
www.chem.ac.ru
www.chemistry.narod.ru
www.chshb.ru
www.edu.ru
www.informnauka.ru

www.markovsky.virtualate.net
www.medline.ru
www.medlinks.ru
www.mednovosti.ru
www.membrana.ru
www.molbio.ru
www.nature.ru
www.rusbiotech.ru
www.scientific.ru
www.sciteclibrary.com
www.washingtonprifile.com

ОГЛАВЛЕНИЕ

ПРЕДИСЛОВИЕ.....	3
Глава 1. РАЗВИТИЕ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ В МИРЕ В XX в.	5
Глава 2. РАЗВИТИЕ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ.....	23
Глава 3. ПРЕДМЕТ И ЗАДАЧИ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ	27
3.1. Источники получения лекарственных веществ	28
3.2. Основные пути поиска новых лекарственных средств, их клинические испытания.....	29
Глава 4. НОРМАТИВНОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОИЗВОДСТВ	35
4.1. Технические условия на лекарственные средства	35
4.2. Технологические регламенты производства	36
4.3. Фармакопейная статья	44
Глава 5. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ	48
5.1. Классификация продуктов фармацевтического производства ..	52
5.2. Общая биотехнологическая схема фармацевтического производства.....	53
5.3. Сепарация.....	55
5.4. Разрушение клеточных оболочек (дезинтеграция биомассы)....	56
5.5. Отделение и очистка продуктов.....	56
5.6. Методы тонкой очистки фармацевтических препаратов.....	58

Глава 6. ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ ПОЛУЧЕНИЯ БЕЛКОВ В ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ	59
6.1. Использование микроорганизмов для производства белка	59
6.2. Использование дрожжей для производства белка	61
6.3. Использование бактерий.....	63
6.4. Использование водорослей.....	63
6.5. Использование грибов.....	64
6.6. Методы очистки белков	64
6.6.1. Приготовление экстракта	64
6.6.2. Разрушение клеток и экстракция.....	68
6.6.3. Оптимизация и осветление экстракта	75
6.6.4. Методы очистки белков и ферментов, ассоциированных с частицами.....	80
6.7. Биотехнология производства интерферона.....	83
6.8. Биотехнология производства интерлейкинов.....	87
Глава 7. ПРОИЗВОДСТВО АМИНОКИСЛОТ.....	89
7.1. Биотехнология синтеза аминокислот и их очистка.....	92
7.2. Получение аминокислот с помощью иммобилизованных клеток и ферментов.....	95
7.3. Получение оптических изомеров аминокислот путем применения ацилаз микроорганизмов	96
Глава 8. ПРОИЗВОДСТВО ИММУННЫХ АНТИСЫВОРОТКОВ	98
8.1. Способы иммунизации	101
8.2. Получение антисывороток морских свинок к инсулину свиньи.....	102
8.3. Хранение антисывороток	103
8.4. Выделение и очистка антител	105
Глава 9. BIOTEХНОЛОГИЯ ПРОИЗВОДСТВА ВАКЦИН	112
9.1. Живые вакцины.....	113
9.2. Инактивированные корпускулярные вакцины	117
9.3. Химические вакцины.....	119
9.4. Анатоксины и ассоциированные вакцины	121
9.5. Новые принципы конструирования вакцин.....	123
9.6. Субъединичные вирусные вакцины.....	126
9.7. Генно-инженерные вакцины	128
9.8. Контроль вакцин.....	129

Глава 10. ПРОИЗВОДСТВО ВИТАМИНОВ	132
10.1. Общая характеристика витаминов	132
10.2. Получение водорастворимых витаминов	135
10.3. Получение жирорастворимых витаминов	141
Глава 11. ПРОИЗВОДСТВО ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ	146
11.1. Получение лимонной кислоты	151
11.2. Получение молочной кислоты.....	154
11.3. Получение уксусной кислоты.....	156
11.4. Получение пропионовой кислоты	158
11.5. Получение итаконовой кислоты.....	158
11.6. Получение глюконовой кислоты	159
11.7. Получение фумаровой кислоты	160
Глава 12. ИСТОЧНИКИ ПОЛУЧЕНИЯ ЛИПИДОВ И ОСНОВНЫЕ СПОСОБЫ ИХ ВЫДЕЛЕНИЯ.....	161
12.1. Промышленное получение липидов	162
12.2. Практическое применение липидов.....	164
Глава 13. ПОЛУЧЕНИЕ НУКЛЕОТИДОВ И НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ	166
Глава 14. ПОЛУЧЕНИЕ САХАРОВ И ПОЛИСАХАРИДОВ.....	170
14.1. Полисахариды цитоплазмы и мембранных структур	171
14.2. Полисахариды клеточных стенок.....	173
14.3. Внеклеточные полисахариды.....	175
14.4. Использование полисахаридов	180
14.5. Промышленное получение полисахаридов микроорганизмов.....	184
Глава 15. ПОЛУЧЕНИЕ АНТИБИОТИКОВ	189
15.1. Принципы получения антибиотиков.....	191
15.2. Экстракционные процессы	197
15.3. Сорбционные процессы	200
15.4. Кристаллизация	205
15.5. Сушка антибиотиков	210
15.6. Применение антибиотиков	215
Глава 16. ПРОИЗВОДСТВО МЕЛАНИНОВ.....	218

Глава 17. ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ ПРОИЗВОДСТВА АЛКАЛОИДОВ.....	223
17.1. Определение алкалоидов.....	223
17.2. Способы выделения алкалоидов	224
Глава 18. ПОЛУЧЕНИЕ ПРОДУКТОВ БРОЖЕНИЯ.....	229
18.1. Молочнокислое брожение.....	229
18.2. Получение продуктов пропионовокислого брожения (витамин В ₁₂)	231
18.3. Ацетано-бутиловое брожение.....	241
18.4. Спиртовое брожение.....	246
Глава 19. ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА ГОРМОНАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ	259
19.1. Производство инсулина. Выделение инсулина из животного сырья.....	260
19.2. Тиреоидин – препарат щитовидной железы.....	265
19.3. Препараты гипофиза	265
19.4. Гормон роста.....	266
19.5. Получение промышленно важных стероидов.....	269
Глава 20. BIOTEХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ ФЕРМЕНТОВ.....	270
20.1. Источники получения ферментных препаратов.....	270
20.2. Область применения и источники ферментов	274
20.3. Выбор штамма и условий культивирования	275
20.4. Технология культивирования микроорганизмов – продуцентов ферментов и выделение ферментов	277
20.5. Выделение и стабилизация ферментов.....	283
20.6. Получение неочищенных ферментных препаратов	288
20.7. Экстрагирование ферментов из поверхностных культур	293
20.8. Концентрирование ферментных растворов.....	296
20.9. Мембранные методы очистки и концентрирования ферментов	299
20.10. Применение ферментов микроорганизмов	303
Глава 21. BIOTEХНОЛОГИЧЕСКОЕ ПОЛУЧЕНИЕ ПИЩЕВЫХ ДОБАВОК.....	310
21.1. Общая характеристика пищевых добавок.....	310
21.2. Натуральные пищевые красители	312

21.3. Консерванты, антиоксиданты, пищевые стабилизаторы, эмульгаторы, усилители вкуса, текстуранты, подсластители, наполнители	319
Глава 22. ПОЛУЧЕНИЕ ЛИГНИНА.....	323
Глава 23. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПРОДУКТОВ БИОТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ ЗАЩИТЫ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ.....	328
23.1. Получение биогаза	329
23.2. Производство биоэтанола.....	331
23.3. Очистка сточных вод	333
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	336

Учебное издание

Новиков Дмитрий Алексеевич

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ

Пособие

Ответственный за выпуск *Т. С. Петроченко*

Художник обложки *Т. Ю. Таран*

Технический редактор *Л. В. Жаборовская*

Компьютерная верстка *С. Н. Егоровой*

Корректор *Е. А. Бондаренко*

Подписано в печать 30.07.2018. Формат 60×84/16. Бумага офсетная.
Ризография. Усл. печ. л. 19,99. Уч.-изд. л. 22,02. Тираж 300 экз. Заказ 434.

Белорусский государственный университет.
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,
распространителя печатных изданий № 1/270 от 03.04.2014.

Пр. Независимости, 4, 220030, Минск.

Республиканское унитарное предприятие
«Издательский центр Белорусского государственного университета».
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,
распространителя печатных изданий № 2/63 от 19.03.2014.

Ул. Красноармейская, 6, 220030, Минск.