

**МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
«ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ - ФИЛИАЛ ФГБОУ ВО
УЛЬЯНОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ**

И.И. Шигапов

Учебное пособие
По дисциплине «Биотехнология»



УДК 54
ББК 24.1

Шигапов И.И. Биотехнология: краткий курс лекций для студентов направления 19.03.03. Продукты питания животного происхождения.- Димитровград: Технологический институт – филиал ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ, 2020 . — 98 с.

Данный сборник лекций предназначен для обучающихся направления 19.03.03 Продукты питания животного происхождения. В нем даны основные термины и понятия в области биотехнологии, описаны процессы получения полезных веществ с помощью клеток микроорганизмов. Более подробно рассмотрены вопросы, касающиеся одной из наиболее перспективных и развивающихся отраслей данной науки – пищевой биотехнологии.

© Технологический институт – филиал ФГБОУ ВО УлГАУ им. П.А. Столыпина»

© Шигапов Ильяс Исхакович

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение.	5
1. Содержание теоретического курса по «Биотехнология».	6
<u>Тема 1.</u> Цель изучения дисциплины, основные понятия.	
Этапы развития и направления биотехнологии	6
1.1. Цель изучения дисциплины, ее место в образовательной программе студентов направления «Продукты питания животного происхождения»	6
1.2. Основные термины и определения биотехнологии. Требования, предъявляемые к микроорганизмам-продуцентам	7
1.3. Этапы развития биотехнологии	9
1.4. Основные направления в биотехнологии.	11
<u>Тема 2.</u> Теоретические основы биотехнологии.	14
2.1. Стадии и кинетика роста микроорганизмов	14
2.2. Продукты микробного брожения и метаболизма.	15
2.3. Сырье и состав питательных сред для биотехнологического производства.	16
2.4. Способы культивирования микроорганизмов	19
2.5. Культивирование животных и растительных клеток	24
<u>Тема 3.</u> Общая биотехнологическая схема производства продуктов микробного синтеза	27
3.1. Приготовление питательной среды	27
3.2. Получение посевного материала.	29
3.3. Ферментация (культивирование).	29
3.4. Выделение целевого продукта	30
3.5. Очистка целевого продукта.	32
<u>Тема 4.</u> Биотехнологическое производство веществ и соединений, используемых в пищевой промышленности.	33
4.1. Получение пищевых кислот с помощью микроорганизмов.	33
4.2. Получение и использование аминокислот	38
4.3. Получение липидов с помощью микроорганизмов	40
4.4. Получение витаминов и их применение	41
<u>Тема 5.</u> Получение ферментных препаратов и их применение в пищевой промышленности.	44
5.1. Понятие ферменты и ферментные препараты. Характеристика активности ферментных препаратов	44
5.2. Получение ферментных препаратов из сырья растительного происхождения	45
5.3. Получение ферментных препаратов из сырья животного происхождения.	46
5.4. Получение ферментных препаратов с помощью микроорганизмов.	

Номенклатура микробных ферментных препаратов	47
5.5. Применение ферментных препаратов в пищевой промышленности	49
<u>Тема 6.</u> Получение биомассы микроорганизмов	51
6.1. Получение биомассы микроорганизмов в качестве источника белка.	52
6.2. Производство хлебопекарных дрожжей и их экспертиза	55
<u>Тема 7.</u> Современное состояние пищевой биотехнологии	58
7.1. Современное состояние пищевой биотехнологии.	68
7.2. Применение пищевых добавок и ингредиентов, полученных биотехнологическим путем	60
7.3. Микроорганизмы, используемые в пищевой промышленности	61
7.4. Генетически модифицированные источники пищи	62
7.5. Съедобные водоросли	64
<u>Тема 8.</u> Пищевая биотехнология продуктов из сырья животного происхождения.	66
8.1. Получение молочных продуктов	66
8.2. Биотехнологические процессы в производстве мясных и рыбных продуктов	75
<u>Тема 9.</u> Пищевая биотехнология продуктов из сырья растительного происхождения.	80
9.1. Бродильные производства	80
9.2. Хлебопечение	88
9.3. Применение ферментов при выработке фруктовых соков	89
9.4. Консервированные овощи и другие продукты	90
9.5. Продукты из сои.	91
9.6. Микромицеты в производстве продуктов растительного происхождения	92
9.7. Продукты гидролиза крахмала	93
9.8. Перспективы развития пищевой биотехнологии	93
2. Требования к выполнению контрольных заданий по дисциплине «Биотехнология»	95
3. Варианты контрольных заданий для студентов по ««Биотехнология»»	95
4. Вопросы к экзамену по «Биотехнологии».	97

ВВЕДЕНИЕ

Учебное пособие к выполнению самостоятельной и контрольных работ по курсу «Биотехнология» предназначено для направления 19.03.03 Продукты питания животного происхождения всех форм обучения. Целью изучения данной дисциплины является приобретение студентами теоретических знаний и формирование навыков и умений в области современной пищевой биотехнологии.

Данная дисциплина базируется на знаниях, полученных студентами при изучении курсов «Микробиология», «Биохимия», «Анатомия пищевого сырья», и других. Объектом изучения курса являются: растительные и животные клетки, а также клетки микроорганизмов-продуцентов, чистые культуры клеток, биологически активные и химические соединения, полученные с их помощью; пищевые добавки, в частности ферментные препараты, применяемые в процессе производства продуктов питания; пищевые продукты, в производстве которых используются биотехнологические процессы.

В теоретической части пособия рассмотрены термины и определения, этапы и направления современной биотехнологии, более подробно изложены вопросы, касающиеся таких отраслей данной науки, как промышленная микробиология и пищевая биотехнология. Изложены процессы получения полезных для человека веществ и соединений с помощью растительных, животных и микробных клеток; традиционные биотехнологические процессы, используемые в различных областях пищевой промышленности, и их роль в формировании потребительских свойств продовольственных товаров; современные достижения пищевой биотехнологии и основные направления ее развития.

В результате освоения дисциплины студенты должны знать биотехнологические способы получения полезных для человека соединений; традиционные биотехнологические процессы, используемые в пищевой промышленности; приобрести навыки работы с целевыми продуктами; научиться применять полученные знания на практике.

Учебным планом по данному курсу предусмотрены лекции, практические занятия и самостоятельная работа студентов. В процессе ознакомления с теоретическим материалом студенты заочной формы обучения выполняют 1 контрольную работу. По окончании изучения дисциплины студенты сдают экзамен.

Данное учебное пособие включает теоретический материал, который могут использовать студенты всех форм обучения; контрольные вопросы по каждой теме; практическое руководство к выполнению самостоятельной и контрольной работ для студентов заочной формы обучения; задание по контрольной работе и указания по его выполнению.

1. СОДЕРЖАНИЕ ТЕОРЕТИЧЕСКОГО КУРСА ПО «ОСНОВАМ СОВРЕМЕННОЙ ПИЩЕВОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ»

В первом разделе излагается основное содержание программы курса по «Биотехнологии» для студентов направления 19.03.03 Продукты питания животного происхождения всех форм обучения. Для удобства усвоения дисциплины весь теоретический материал разделен на несколько тем, посвященных этапам и направлениям развития биотехнологии; теоретическим аспектам дисциплины; биотехнологическому производству веществ и соединений, используемых в пищевой промышленности; пищевой биотехнологии. В конце каждой темы даются вопросы для самостоятельной проверки знаний.

ТЕМА 1. ЦЕЛЬ ИЗУЧЕНИЯ ДИСЦИПЛИНЫ, ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ. ЭТАПЫ РАЗВИТИЯ И НАПРАВЛЕНИЯ БИОТЕХНОЛОГИИ

1.1. Цель изучения дисциплины, ее место в образовательной программе студентов специальности «Товароведение и экспертиза товаров»

Целью изучения данной дисциплины является приобретение студентами теоретических знаний и формирование навыков и умений в области современной пищевой биотехнологии.

Биотехнология – это наука, которая изучает методы получения полезных для человека веществ и продуктов в управляемых условиях, используя микроорганизмы, клетки животных и растений или изолированные из клеток биологические структуры.

Промышленная микробиология составляет основную часть биотехнологии. Это наука о важнейших микробиологических процессах и их практическом применении для получения промышленным способом ценных продуктов жизнедеятельности микроорганизмов, их биомассы как белкового продукта, о получении отдельных полезных веществ или препаратов, используемых в различных отраслях народного хозяйства.

Пищевая биотехнология является одним из важнейших разделов биотехнологии. В течение тысячелетий люди успешно получали сыр, уксус, спиртные напитки и другие продукты, не зная о том, что в основе лежит метод микробиологической ферментации. С помощью пищевой биотехнологии в настоящее время получают такие пищевые продукты, как пиво, вино, спирт, хлеб, уксус, кисломолочные продукты, сырокопченые и сыровяленые мясные продукты и многие другие. Кроме того, пищевая биотехнология используется для получения веществ и соединений, используемых в пищевой промышленности: это лимонная, молочная и другие органические кислоты; ферментные препараты различного действия – протеолитические, амилалитические, целлюлолитические; аминокислоты и другие пищевые и биологически активные добавки.

Важность пищевой биотехнологии для специалистов в области товарооценки и экспертизы определяется тем, что использование микроорганизмов или ферментных препаратов, биотехнологических процессов при производстве пищевых продуктов оказывает существенное влияние на потребительские свойства и показатели качества продовольственных товаров. Знание о биотехнологических процессах позволит товароведу-эксперту определить причины порчи продовольственных товаров и возникновения дефектов, приводящих к существенным количественным потерям товаров. Например, неправильное применение заквасок может привести к ухудшению качества и возникновению дефектов кисломолочной продукции. С другой стороны, использование новых штаммов микроорганизмов может придать продукту – пиву, вину и другим пищевым продуктам, – новые оригинальные оттенки вкуса и аромата. Применение ферментных препаратов и других соединений, полученных биотехнологическим способом, будет способствовать оптимизации и интенсификации технологических процессов производства пищевых продуктов, улучшению их свойств и продлению сроков хранения.

1.2. Основные термины и определения биотехнологии.

Требования, предъявляемые к микроорганизмам-продуцентам

В биотехнологии обычно используются чистые культуры микроорганизмов-продуцентов, так как это позволяет получить продукт с заранее известными свойствами. Применяются **штаммы** микроорганизмов – микроорганизмы одного вида, выращенные в определенных условиях, вследствие чего обладающие определенными свойствами, которые отличаются от других чистых культур данного вида.

Не все микроорганизмы могут быть использованы в промышленных условиях, а лишь те **микроорганизмы-продуценты**, обладающие способностью под воздействием внешних факторов (состава среды, условий культивирования, температуры, рН среды и т.д.) образовывать в больших количествах преимущественно то соединение, которое является главным (целевым) продуктом данного производства.

К микроорганизмам-продуцентам предъявляется ряд обязательных требований. Микроорганизмы должны:

- расти на дешевых и доступных питательных средах;
- максимально усваивать питательные вещества среды;
- обладать высокой скоростью роста биомассы и давать высокий выход целевого продукта;
- проявлять синтетическую активность, направленную в сторону получения желаемого продукта; образование побочных продуктов должно быть незначительным;
- быть генетически однородными, стабильными в отношении продуктивности, требований к питательному субстрату и условиям культивирования;

- быть устойчивыми к фагам и другой посторонней микрофлоре;
- быть безвредными для людей (не обладать патогенными свойствами) и для окружающей среды;
- обладать хорошей способностью выделения.

Сверхсинтез, то есть способность микроорганизма синтезировать определенный продукт в количествах, превосходящих физиологические потребности, часто встречается в природе. Микроорганизмы с такими свойствами первыми были использованы в хозяйственной деятельности человека, и таким образом был проведен стихийный отбор наиболее продуктивных форм.

В промышленности применяют три вида штаммов: природные штаммы, нередко улучшенные естественным или искусственным отбором; штаммы, измененные в результате индуцированных мутаций; штаммы культуры, полученные методами генной или клеточной инженерии.

Часто путем отбора не удается получить высокоактивные продуценты, поэтому возникает задача изменения природы организма в нужном направлении. Для этого используют методы селекции.

Селекция – это направленный отбор мутантов, то есть микроорганизмов, наследственные признаки которых претерпели изменения в нужном для человека направлении.

Природные штаммы микроорганизмов не обладают способностью выделять и накапливать в питательной среде такое количество нужного продукта, которое обеспечило бы низкую его стоимость и требуемый объем производства. Поэтому задачей селекции является не только усиление природной способности микроорганизмов продуцировать определенное вещество (ферменты, антибиотики, аминокислоты и т.д.), но во многих случаях и создание продуцента «заново» из штамма дикого типа, способного синтезировать вещество, но не способного его продуцировать. Эти задачи осуществляются получением у природных штаммов наследственных изменений – **мутаций**, влияющих на фенотип (физиологические и морфологические признаки) клетки. Спонтанные (происходящие случайным образом) мутации помогают микробным популяциям приспосабливаться к новым условиям существования. Мутации приводят к усилению природной способности микроорганизмов синтезировать и продуцировать определенное вещество, а также к появлению новой способности – синтезировать вещество в избытке (сверх своих потребностей) и продуцировать его. Для ускорения селекции используют индуцированный мутагенез, применяя **мутагенные факторы** физической, химической и биологической природы. К универсальным физическим мутагенам относятся ультрафиолетовое облучение (УФО), рентгеновские лучи и др.; химические факторы мутагенного воздействия - азотистый иприт, нитрозамины, четыреххлористый углерод и другие химикаты; биологическими мутагенами являются фаги (вирусы микроорганизмов).

Таким образом, селекционированные штаммы микроорганизмов обладают определенными ценными наследственно закрепленными свойствами.

Однако мутации образуются случайным образом, поэтому более широко

используется **генная** или **генетическая инженерия** – генетическая рекомбинация *in vitro* (в пробирке). Рекомбинация - это обмен генами между двумя хромосомами. Рекомбинантными ДНК называют молекулы ДНК, полученные вне живой клетки, в пробирке, путем соединения природных или синтетических фрагментов ДНК с молекулами, способными реплицироваться (удваиваться) в клетке. Этот подход был разработан на бактериях, в частности на кишечной палочке, в клетки которой вводили гены животных и человека и добивались их репликации. Метод рекомбинации *in vitro* заключается в выделении ДНК из разных видов, получении гибридных молекул ДНК и введении рекомбинантных молекул в живые клетки с целью проявления нового признака, например, синтеза специфического белка.

Возможности получения новых штаммов микроорганизмов, обладающих способностью к сверхсинтезу целевого продукта, рассмотрим на примере продуцента антибиотика пенициллина. Изначально штамм *Penicillium chrysogenum* (NRRL-1951) производил 60 мг/л пенициллина. После спонтанной мутации возник новый штамм (NRRL-1951·B25) с выходом пенициллина 150 мг/л. После рентгеновского облучения был отобран мутант (X-1612), дающий 300 мг/л пенициллина. После нескольких циклов мутагенеза и селекции, в которых помимо УФО применяли иприт, удалось вывести высокопродуктивный штамм (E-15·1), который производил 7 г/л пенициллина. Таким образом, 21 цикл мутагенеза и селекции в течение более двух десятков лет позволил увеличить выход пенициллина в 55 раз. В настоящее время новые штаммы микроорганизмов-продуцентов дают выход более 20 г/л пенициллина.

1.3. Этапы развития биотехнологии

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

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

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

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

1894 г. Создан первый ферментный препарат, полученный из плесневого гриба, выращенного на влажном рисе (И. Такаmine).

В 1923 г. было организовано первое микробиологическое промышленное производство лимонной кислоты, а затем молочной, глюконовой и других органических кислот. Наиболее широко используется лимонная кислота – ее

применяют при производстве безалкогольных напитков, кондитерских изделий и многих других пищевых продуктов.

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

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

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

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

В 1948 г. советским ученым Букиным с помощью микроорганизмов был получен витамин В₁₂, который не способны синтезировать ни растения, ни животные.

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

Еще в 60-х годах ряд нефтяных и химических компаний начали исследования и разработки по созданию биотехнологических процессов получения белка одноклеточных организмов, предназначенного для добавления в пищу животным и людям. Одной из причин этого был недостаток белковой пищи в мире. Наиболее конкурентоспособными оказались процессы на основе метанола и крахмала. На основе углеводородного сырья (жидких и газообразных углеводородов) в 70-х годах в СССР впервые было создано многотоннажное производство кормовых дрожжей.

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

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

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

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

1.4. Основные направления в биотехнологии

В некоторых отраслях биотехнология способна заменить традиционную технологию (например, при длительном хранении продуктов, в производстве пищевых приправ, полимеров, сырья для текстильной промышленности, метанола, этанола, биогаза и водорода, а также при извлечении некоторых металлов из бедных руд). В некоторых отраслях промышленности биотехнология играет ведущую роль (табл. 1.1). Здесь, прежде всего, имеются в виду следующие области применения: производство продуктов питания (широкомасштабное выращивание микроорганизмов для получения белков, аминокислот и органических кислот, витаминов, ферментов); повышение продуктивности сельскохозяйственных культур (клонирование и отбор разновидностей растений на основе тканевых культур *in vitro*, использование биоинсектицидов); фармацевтическая промышленность (производство вакцин, биосинтез антибиотиков, гормонов и других соединений); уменьшение загрязнения окружающей среды (очистка сточных вод, переработка отходов и побочных продуктов сельского хозяйства и промышленности) и многое другое.

Вопросы для самопроверки

1. Что такое биотехнология ?
2. Какие пищевые продукты получают в настоящее время с применением пищевой биотехнологии ?
3. В чем заключается важность пищевой биотехнологии для специалистов в области товароведения и экспертизы ?
4. Что такое сверхсинтез ?
5. В чем отличие селекции от мутации ?
6. Приведите примеры мутагенных факторов.
7. Что такое генетическая инженерия ?
8. Перечислите требования, предъявляемые к микроорганизмам продуцентам.
9. В каком году начато промышленное производство лимонной кислоты с помощью микроскопических грибов ?
10. Когда было начато производство пищевых дрожжей ?
11. С какого года началось развитие генетической инженерии ?
12. Перечислите основные направления биотехнологии.
13. Каковы области применения биотехнологии в пищевой промышленности ?

Таблица 1.1

Основные направления биотехнологии в различных отраслях промышленности и практической деятельности человека

Отрасль	Области применения
---------	--------------------

Сельское хозяйство	<p>Получение новых штаммов микроорганизмов-продуцентов биомассы, используемой в качестве белковых и белково-витаминных концентратов.</p> <p>Новые методы селекции растений и животных, получение генетически модифицированного сырья, клонирование.</p> <p>Использование антибиотиков (в том числе полученных биотехнологическим путем) для профилактики и лечения заболеваний сельскохозяйственных животных и птиц; получение вакцин.</p> <p>Применение гормонов и других стимуляторов роста.</p>
Производство химических веществ и соединений	<p>Производство органических кислот (лимонной, итаконовой).</p> <p>Получение витаминов, антибиотиков и других веществ.</p> <p>Использование ферментов в составе отбеливателей и моющих средств.</p>
Контроль за состоянием окружающей среды	<p>Улучшение методов тестирования и мониторинга загрязнения окружающей среды.</p> <p>Прогнозирование превращений ксенобиотиков благодаря более глубокому пониманию биохимии микроорганизмов.</p> <p>Усовершенствование методов переработки отходов, бытовых и промышленных, с использованием микроорганизмов, разлагающих пластмассу и другие соединения.</p>
Медицина	<p>Применение ферментов для усовершенствования диагностики, создание датчиков на основе ферментов.</p> <p>Использование микроорганизмов и ферментов при создании сложных лекарств (например, стероидов).</p>

Продолжение таблицы 1.1.

	<p>Синтез новых антибиотиков.</p> <p>Применение ферментов (пищеварительных ферментов: фестала, мезима, энзистала) и препаратов микроорганизмов (лактобактерий, бифидобактерий) в терапии.</p>
--	---

Энергетика	Увеличение потребления биогаза – продукта жизнедеятельности микроорганизмов. Крупномасштабное производство этанола как жидкого топлива.
Материаловедение	Выщелачивание руд. Дальнейшее изучение и контроль биоразложения.
Пищевая промышленность	Создание новых методов переработки и хранения пищевых продуктов. Применение пищевых добавок (продуцируемых микроорганизмами аминокислот, органических кислот, полимеров и др.). Использование белка, синтезируемого одноклеточными микроорганизмами. Применение ферментов при переработке пищевого сырья. Использование микроорганизмов в бродильных производствах. Применение микроорганизмов в качестве заквасок.

ТЕМА 2. ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ

2.1. Стадии и кинетика роста микроорганизмов

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

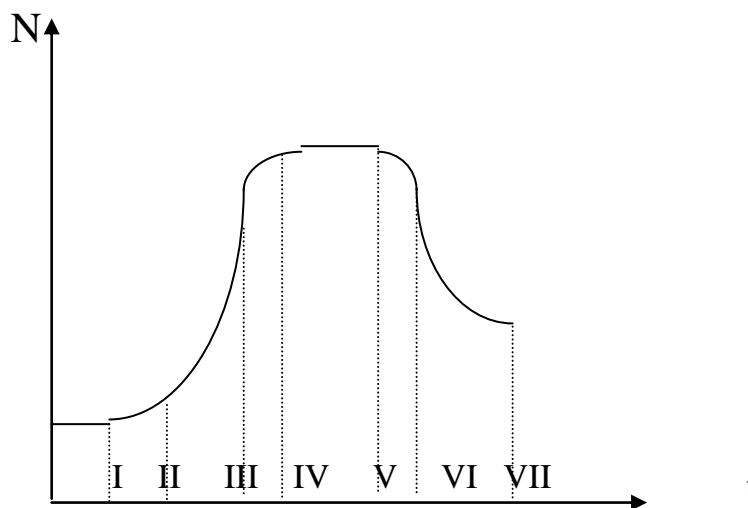


Рис. 2.1. Кривая роста микроорганизмов (зависимость количества клеток от времени культивирования); I, II, III, IV, V, VI, VII – фазы роста

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

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

Вследствие интенсивного роста и размножения культуры запас необходимых питательных веществ в среде уменьшается. Это является основной причиной снижения скорости роста культуры. Кроме того, в среде накапливаются продукты метаболизма, которые в определенной концентрации могут мешать нормальному протеканию биохимических процессов обмена веществ. Иногда в

питательной среде образуется так много клеток, что для новых поколений клеток не хватает пространства, а точнее, поверхности. Скорость роста снижается, уменьшается число делений клеток, наступает IV фаза – фаза замедления или уменьшения скорости роста.

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

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

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

Кинетика роста микроорганизмов

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

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

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

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

2.2. Продукты микробного брожения и метаболизма

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

Первичные метаболиты – это низкомолекулярные соединения

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

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

2.3. Сырье и состав питательных сред для биотехнологического производства

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

Сырье для питательных сред в биотехнологическом производстве

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

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

Мелассная барда – отход мелассно-спиртового производства. Химический состав барды зависит от состава исходной мелассы и колеблется в широких пределах. По своему химическому составу мелассная барда является полноценным сырьем для производства кормовых дрожжей, не требующим до-

бавок ростовых веществ, так как содержит достаточное количество витаминов. Содержание сухих веществ в натуральной барде – 8-12 %, в упаренной барде – 53 %.

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

Отходы пивоварения (пивная дробина и солодовые ростки), а также отходы подработки несоложенного ячменя являются подходящим, однако небольшим источником усвояемых углеводов для получения микробного белка. Для производства кормовых дрожжей это сырье соответствующим образом гидролизуют и вводят в питательную среду в соотношении 8 : 0,2 : 0,05 (дробина : ростки : отходы ячменя).

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

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

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

Состав питательных сред

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

В состав практически любой питательной среды входят такие компоненты, как вода, соединения углерода, азота, фосфора и других минеральных ве-

ществ, витамины.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2.4. Способы культивирования микроорганизмов

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

Известно множество процессов культивирования микроорганизмов. Они различаются:

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

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

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

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

1. При периодическом способе культивирования стерильная питательная среда засеивается исходной культурой продуцента, и далее в этой же емкости микроорганизмы при определенных условиях проходят через все стадии роста и развития популяции (кривые роста культуры мы рассмотрели ранее в п. 2.1.). Когда процесс культивирования заканчивается, емкость для выращивания освобождают, и цикл возобновляется, начиная от засева питательной среды исходной культурой продуцента. При таком способе культивирования (его можно назвать «закрытой» системой, когда хотя бы один из компонентов не может поступать в нее или выводиться из нее) скорость роста биомассы всегда должна стремиться к нулю либо из-за недостатка питательных веществ, либо из-за накопления в среде токсических метаболитов.



Рис. 2.2. Классификация процессов культивирования микроорганизмов по способу действия

Ранее применялось культивирование на поверхности плотных питательных сред в пробирках, колбах, матрасах, бутылках. Выращиваемая в этих условиях культура гетерогенна (разнородна) в физиологическом отношении, так как клетки на различных участках поверхности и в разных слоях находятся в различных условиях и развиваются неодинаково. Этот способ иногда применяется для наращивания биомассы.

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

Периодический способ выращивания микроорганизмов используется для получения посевного материала на некоторых этапах, а также при микробиологическом производстве аминокислот, в производстве вакцин и т.д.2 . Промежуточные способы культивирования .

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

2.2. Многоциклическими процессами культивирования называют такие, в которых цикл выращивания культуры повторяется многократно без многократной стерилизации емкости. Многоциклическое культивирование может быть различным. Его можно вести в одном ферментере, многократно повторяя полный цикл развития культуры без перерыва на стерилизацию. Способы, осуществляемые в одном ферментере, называют одностадийными. Возможны и многостадийные многоциклические процессы, основанные на принципе повторного и последовательного периодического культивирования, протекающего в нескольких ферментерах, соединенных в батарею, с целью длительного использования культуры. Один из вариантов такого способа заключается в следующем: культура выращивается в одном биореакторе и в то время, когда она проходит в своем развитии экспоненциальную фазу, из нее берется инокулят (посевной материал) для засева следующего реактора. В первом реакторе культура доращивается до необходимой фазы роста. Когда культура во

втором реакторе достигает экспоненциальной фазы, из нее также делается пересев в третий реактор и т.д. Поскольку культура все время пересеивается в экспоненциальной фазе, не происходит ее старения и вырождения. Кроме того, отмечается выигрыш во времени, так как одновременно работают несколько ферментеров.

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

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

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

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

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

Многостадийные системы состоят из ряда последовательно соединенных ферментеров – батареи. Применение многостадийных систем позволяет получать культуру при любой скорости роста – от лаг-фазы до экспоненциальной и

стационарной. Многостадийное культивирование применяется при получении молочной кислоты, этилового спирта.

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

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

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

Хотя теоретически взаимосвязь между концентрацией биомассы и скоростью разбавления подчиняется одним и тем же закономерностям в хеостате и турбидостате, методы управления процессами различны.

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

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

изводство уксуса в стружечных аппаратах.

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

Культивирование микроорганизмов, образующих пленку из биомассы, осуществляется в ферментере типа колонки с наполнителем. В качестве наполнителя может использоваться макроноситель (кокс, прутья, стружка, стеклянные шарики и т.д.) и микроноситель (амберлитовые смолы, частички сефадекса и т.д.). Клетки, культивируемые таким образом, называют **иммобилизованными**. Использование иммобилизованных клеток имеет несколько преимуществ.

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

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

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

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

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

2.5. Культивирование животных и растительных клеток

Особенности культивирования животных клеток

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

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

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

Особенности культивирования растительных клеток

Культивирование растительных клеток в крупных масштабах было освоено в 1976 г. японскими исследователями, которым удалось получить растительную биомассу в объеме 20 м³. Получение массы растительных клеток обходится намного дороже, чем равное количество бактериальных или дрожжевых клеток. Поэтому ученые стараются избежать разрушения клеток с целью извлечения из них полезных для человека соединений. В связи с этим, растительные клетки иммобилизуют внутри пористых полимеров. Доказано, что в таком состоянии клетки удается поддерживать жизнеспособными в течение нескольких сотен дней. Проблемой остается извлечение метаболитов в том случае, когда они синтезируются внутри клеток, а не выделяются в среду.

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

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

Вопросы для самопроверки

1. Назовите основные стадии роста микроорганизмов.
2. Что необходимо для выращивания любой клеточной культуры ?
3. Какие продукты микробного брожения и метаболизма Вы знаете ?
4. Какие соединения - первичными или вторичные метаболиты – необходимы для роста микроорганизмов ?
5. Перечислите отходы пищевой промышленности, широко используемые в качестве сырья для биотехнологического производства.
6. Назовите компоненты, которые обязательно должны присутствовать в питательной среде.
7. Для чего в состав питательных сред вводят источники азота и фосфора

?

8. Что такое ферментация (культивирование) ?
9. Перечислите способы культивирования микроорганизмов.
10. В чем особенности периодического способа ферментации ?
11. Где применяется данный способ ?
12. Каковы особенности промежуточных способов культивирования ?
13. В чем преимущество непрерывного способа культивирования ?
14. В чем отличие хемостата от турбидостата ?
15. Что такое иммобилизованные клетки, и каковы преимущества их применения ?
16. Расскажите об особенностях культивирования животных и растительных клеток.

ТЕМА 3. ОБЩАЯ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ СХЕМА ПРОИЗВОДСТВА ПРОДУКТОВ МИКРОБНОГО СИНТЕЗА

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

3.1. Приготовление питательной среды

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

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

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

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

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

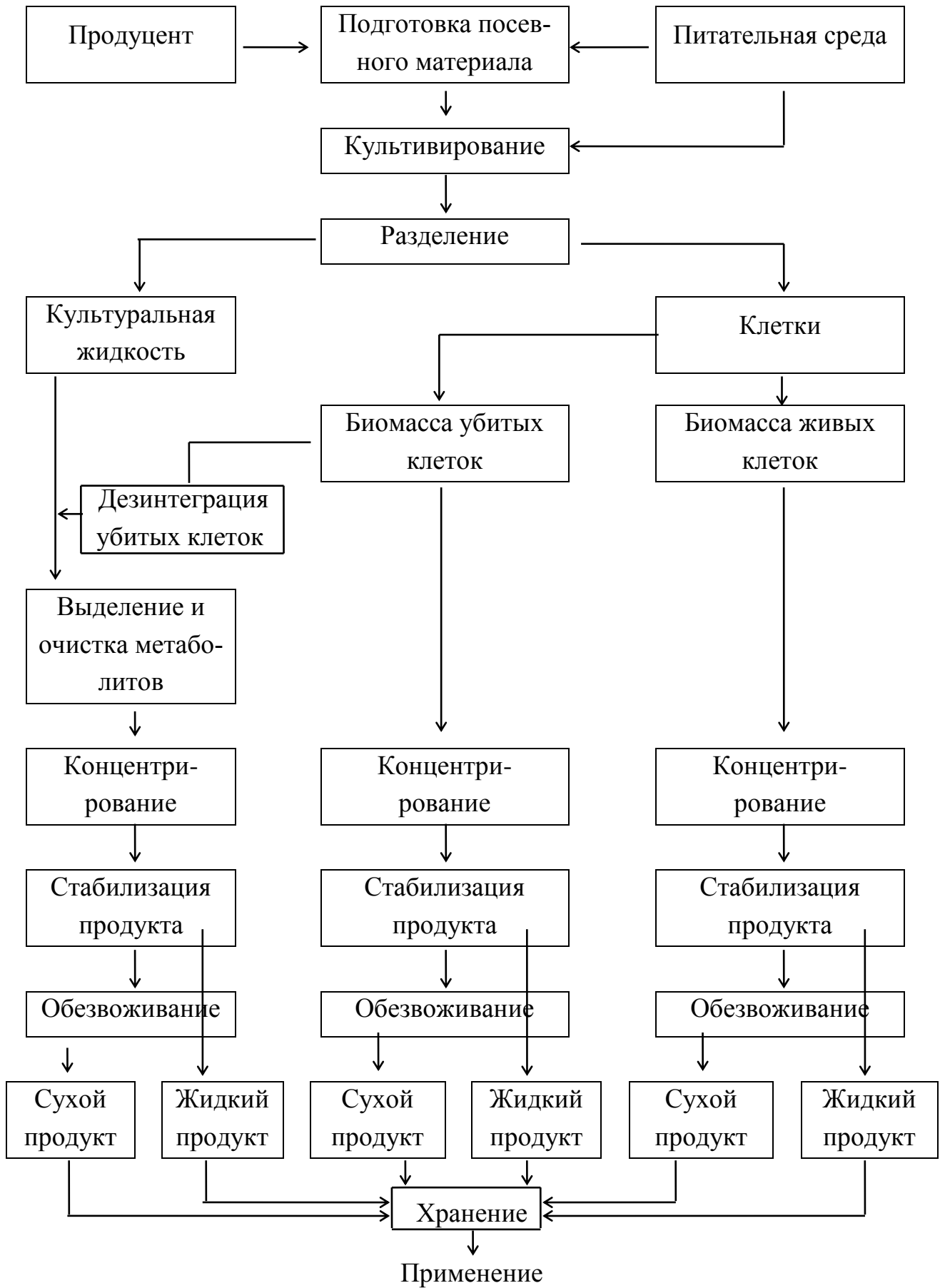


Рис. 3.1. Принципиальная биотехнологическая схема производства продуктов микробного синтеза

3.2. Получение посевного материала

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

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

1. Получение культуры микроорганизма в микробиологической лаборатории завода.
2. Выращивание микроорганизмов в малом посевном аппарате.
3. Выращивание микроорганизмов в большом посевном аппарате.
4. Накопление культуры микроорганизмов в малом ферментере.

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

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

3.3. Ферментация (культивирование)

Это самый важный и продолжительный этап биотехнологического производства. Ферментация представляет собой совокупность последовательных операций от внесения в заранее приготовленную и термостатированную пита-

тельную среду посевного материала до завершения процессов роста и биосинтеза вследствие истощения питательных веществ среды. Существует два основных типа ферментаций: получение биомассы микроорганизмов и получение ценных веществ (метаболитов), возникающих в ходе роста или на последующих стадиях развития культуры.

Как говорилось ранее (п. 2.1), для выращивания любой культуры необходимы: жизнеспособный посевной материал; источники энергии и углерода; питательные вещества для синтеза биомассы; отсутствие ингибиторов роста; соответствующие физико-химические условия.

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

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

3.4. Выделение целевого продукта

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

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

Фильтрация – простой и широко применяемый процесс разделения твердых частиц и жидкости, скорость которого зависит от пористости фильтрующего материала и давления. Фильтрование при помощи вакуумных насосов существенно ускоряет процесс.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

3.5. Очистка целевого продукта

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

Для очистки ферментов применяют избирательную **сорбцию** (связывание) каолином, трифосфатом кальция, гидроксидом алюминия и другими адсорбентами. Таким образом проводят сорбцию либо фермента, либо балластных белков, которые затем разделяют центрифугированием. Фермент из сорбента отделяют раствором фосфатного буфера.

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

Вопросы для самопроверки

1. Перечислите основные стадии биотехнологической схемы получения продуктов микробного синтеза.
2. Как определить физиологические потребности микроорганизмов в питательных веществах ?
3. Какие методы применяют для обеззараживания питательных сред в биотехнологическом производстве ?
4. Опишите последовательность получения посевного материала для промышленного производства целевого продукта.
5. Основное назначение ферментера.
6. От чего зависит проведение стадии выделения целевого продукта ?
7. Какие методы применяют для отделения биомассы клеток от культуральной жидкости ?
8. Что такое дезинтеграция, в каких случаях ее осуществляют ?
9. Расскажите об основных методах дезинтеграции клеток.
10. В чем отличие сепарирования от центрифугирования ?
11. В каких случаях выполняется стадия очистки целевого продукта ?
12. Что такое сорбция ?

ТЕМА 4. БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОЕ ПРОИЗВОДСТВО ВЕЩЕСТВ И СОЕДИНЕНИЙ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ В ПИЩЕВОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

Как говорилось ранее (п. 2.2), продуктами микробного брожения и метаболизма являются первичные метаболиты, вторичные метаболиты, ферменты и сама клеточная биомасса. Рассмотрим более подробно получение полезных для человека веществ с помощью биотехнологии.

4.1. Получение пищевых кислот с помощью микроорганизмов

Пищевыми принято называть 4 органические кислоты: лимонную, молочную, уксусную и винную. Иногда к ним причисляют яблочную и глутаминовую. Первые три пищевые кислоты получают с помощью микробного синтеза. Винную кислоту также можно получать этим способом, однако до сих пор эту органическую кислоту выгодно получать химическим путем из винного камня.

Получение органических кислот с помощью микроорганизмов началось в 20-30 гг. XX века. Пищевые кислоты до этого выделяли в ограниченном количестве из естественных источников. Лимонную кислоту – из сока лимонов, винную – из винного камня (отхода винодельческого производства).

Современное производство органических кислот, существующее в большинстве развитых стран, основано на использовании в качестве продуцентов различных штаммов плесневых грибов, чаще всего рода *Aspergillus*. С помощью микроорганизмов возможно получение более 50 различных органических кислот: лимонной, уксусной, итаконовой, глюконовой (аэробной ферментацией), молочной и пропионовой (анаэробным способом). Все органические кислоты являются промежуточными или конечными продуктами катаболизма углеводов. Основным механизмом регуляции их образования является лимитация роста продуцента факторами среды.

Получение лимонной кислоты

Лимонная кислота ($C_6H_8O_7$) - трехосновная оксикислота, широко распространена в природе, относительно много ее содержится в некоторых ягодах, фруктах, особенно в цитрусовых (в лимоне 5-10 %), 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 является крайне дорогим и небольшим по объему. Поэтому лимонная кислота была дефицитным и дорогим продуктом.

В настоящее время лимонная кислота по объему производства является одним из главных продуктов микробного синтеза, ее общий выпуск в разных странах достигает до 400 тыс. тонн в год.

В начале нашего столетия рядом исследователей было замечено, что некоторые плесневые грибы обладают способностью образовывать заметные количества органических кислот. В дальнейшем путем отбора и направленной селекции были выделены активные продуценты органических кислот.

Для получения лимонной кислоты используют микроскопические грибы родов *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Ustina* и др. В настоящее время основными продуцентами лимонной кислоты являются различные штаммы гриба *Aspergillus niger*, которые отличаются большой скоростью роста, легкостью культивирования и высоким выходом лимонной кислоты по отношению к массе окисляемого углевода. Они устойчивы к внешним воздействиям и имеют обильное конидионошение. Споры грибов для получения лимонной кислоты хранят только в сухом виде.

Образование лимонной кислоты осуществляется в цикле трикарбоновых кислот в результате конденсации оксалоацетата и ацетил КоА при участии фермента цитрат-синтетазы (рис. 4.1.).

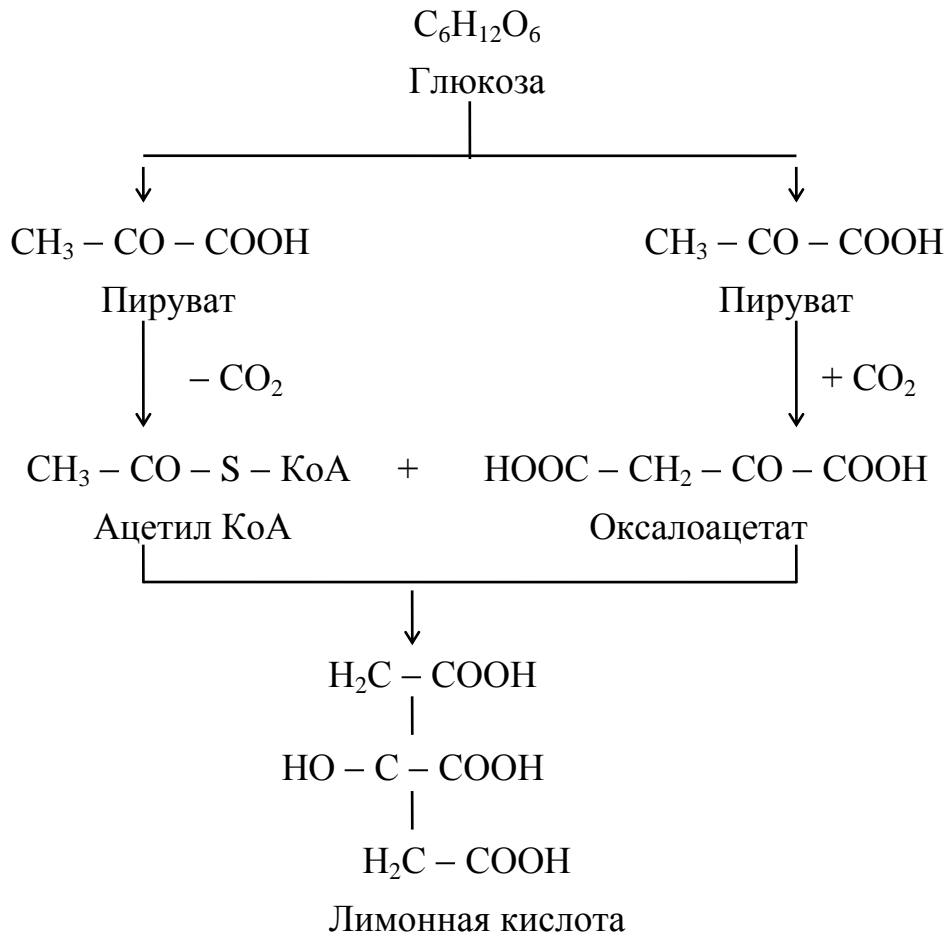


Рис. 4.1. Схема синтеза лимонной кислоты

Необходимые для реакции оксалоацетат и ацетил КоА образуются из двух молекул пирувата: одна молекула пирувата подвергается декарбоксилированию с образованием ацетил КоА, вторая - карбоксилируется, давая оксалоацетат. Пируват образуется по фруктозо-бифосфатному пути (пути гли-

колиза, Эмбдена, Майергофа-Парнаса). Все ферменты этого пути, а также пируватдегидрогеназа, пируваткарбоксилаза и цитрат-синтетаза обнаружены у *A. niger*. В результате рассмотренной реакции одна молекула сахара ($C_6H_{12}O_6$) превращается в одну молекулу лимонной кислоты ($C_6H_8O_7$).

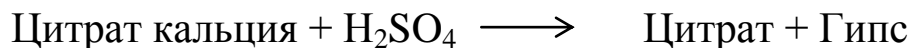
Сверхсинтез лимонной кислоты происходит при лимитировании роста грибов-продуцентов минеральными компонентами среды и одновременном избыточным содержанием источника углерода. В условиях лимитирования роста гриба недостатком железа и марганца после полного поглощения из среды дефицитного элемента он прекращает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

Общая технологическая схема производства лимонной кислоты включает следующие этапы:

1. Подготовка питательной среды. Мелассу загружают в варочный котел, разбавляют водой до определенной концентрации углеводов (16 %), добавляют источники азота, фосфора и микроэлементы. Устанавливают необходимое значение рН среды (6,8-7,2) добавлением кислоты или щелочи. Для осаждения солей тяжелых металлов (железа, магния и т.д.), находящихся в мелассе, ее раствор обрабатывают желтой кровяной солью. Затем среду стерилизуют и охлаждают до температуры ферментации.
2. В отдельном цехе выращивают посевной материал в виде спор (конидий) *Aspergillus niger*. Затем размножают его в три стадии: в пробирках, колбах и алюминиевых кюветах. Длительность каждой стадии – 2-4 сут при 32 °С. Для выращивания в пробирках используют твердую агаризованную питательную среду, а в колбах и кюветах – жидкую.
3. Ферментация может осуществляться поверхностным или глубинным способом. Заводы небольшой или средней мощности используют поверхностный способ. Глубинный способ экономически выгоден тогда, когда мощность завода превышает 2500 т лимонной кислоты в год.
 - 3.1. При поверхностном способе ферментация проводится на открытых металлических кислотоустойчивых кюветах высотой 7-20 см, в которых мицелий продуцента развивается на поверхности среды. Кюветы размещаются на многоярусных стеллажах в специальных камерах при температуре 34-36 °С. В камеры подают стерильный кондиционированный воздух. Цикл брожения заканчивается через 8-9 сут.
 - 3.2. При глубинном способе мицелий гриба погружен в питательную среду в ферментаторах, туда же подается стерильный воздух. Длительность культивирования - 5-9 суток.
4. По окончании ферментации мицелий отделяют от культуральной жидкости. При глубинной ферментации - фильтрованием на фильтрах, при поверхностной – вручную, предварительно слив жидкость с кювет.
5. Мицелий промывают, высушивают и направляют для использования в качестве добавки к животным кормам. Фильтрованная культуральная жидкость (фильтрат) представляет собой водный раствор лимонной кислоты. В 1 лит-

ре фильтрата содержится 40-50 г лимонной кислоты.

6. 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 H_2SO_4 :



Гипс удаляют фильтрованием. Раствор лимонной кислоты осветляют активным углем, упаривают, сливают в кристаллизаторы, в которых постепенно снижают температуру. Выделившиеся кристаллы центрифугируют, промывают водой, сушат, фасуют.

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

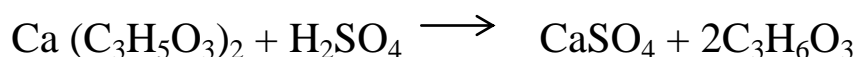
Получение молочной кислоты

Молочная кислота с 1881 г. производится промышленным способом с помощью молочнокислых бактерий. В СССР было организовано производство молочной кислоты в 1923 г. Для промышленного изготовления молочной кислоты пригодны только гомоферментативные молочнокислые бактерии, образующие до 98 % молочной кислоты. Применяемые штаммы *Lactobacillus delbrueckii* (дельбрюкки), *L. bulgaricus* не предъявляют высоких требований к питательной среде и за короткое время дают высокий выход молочной кислоты.

Молочнокислые бактерии преобразуют в молочную кислоту самые разные углеводы, поэтому для промышленного получения этой кислоты используют мелассу, молочную сыворотку, глюкозу, мальтозу, сахарозу, лактозу, осажаренный крахмал и пр. В каждом случае подбирают наиболее подходящий продуцент. Для сбраживания глюкозы или мальтозы обычно применяют штаммы *Lactobacillus delbrueckii*, *L. leichmannii* или *L. bulgaricus*. Для сбраживания осажаренного крахмала используют смесь молочнокислых бактерий *L. delbrueckii* или с *L. bulgaricus*, или со *Streptococcus lactis*. При сбраживании мальтозы выход молочной кислоты выше при использовании *L. bulgaricus* или *L. casei*.

В качестве основного сырья используют мелассу, картофельный осахаренный затор, которые разбавляют водой до определенной концентрации (12 %), вносят дополнительные источники аминного азота (свободные аминокислоты), витаминов и других биологически активных веществ в виде кукурузного или дрожжевого экстракта, или вытяжку солодовых ростков (так как на молочнокислое брожение биологически активные вещества оказывают положительное влияние).

Молочную кислоту в промышленных условиях получают методом анаэробной глубинной ферментации. Концентрация сахара в среде должна быть 5-20 %, температура 44-50 °С, рН 6,3-6,5. Во время ферментации рН среды поддерживают, добавляя мел. Через 6-7 суток культивирования в среде остается 0,5-0,1 % сахаров и 11-14 % лактата кальция. Из 100 г сахаров получают 80-90 г лактата. Осадок мела и коллоиды отделяют фильтрацией. Фильтрат упаривают до концентрации 27-30 %, затем охлаждают до 25-30 °С и выдерживают в кристаллизаторах 36-48 ч. Кристаллы лактата отделяют центрифугированием. Молочную кислоту из лактата получают при помощи серной кислоты. Реакция идет при 60-70 °С в соответствии с уравнением:



Для отделения ионов железа молочную кислоту (сырец) при температуре 65 °С обрабатывают желтой кровяной солью. Тяжелые металлы осаждают сульфатом натрия. Молочную кислоту обрабатывают активированным углем, фильтруют и фасуют. Конечный продукт - в виде жидкого концентрата молочной кислоты.

Молочную кислоту применяют для приготовления джемов, в которых она способствует хорошей консистенции. Молочная кислота как регулятор рН, улучшитель вкуса применяется в производстве многих сыров, квашении капусты, в сухом концентрате кваса. В хлебобулочном производстве молочная кислота и лактаты увеличивают объем мякиша и улучшают корку хлеба при использовании муки низкого качества. Способность лактатов удерживать влагу применяют в производстве колбас, сыров, детского питания. Молочную кислоту также используют для ускорения получения молочно-белкового сгустка при производстве творога.

Получение уксусной кислоты

Продуцентами уксусной кислоты являются уксуснокислые бактерии рода *Acetobacter*. Эти бактерии приспособлены к сахаристым и спиртовым субстратам, растут при сильно кислых условиях (рН = 4,0). К быстроокисляющим бактериям относят высокопроизводительный штамм *Acetobacter curvum* (курвум). Недостатком этого продуцента является то, что он может терять свойство образовывать уксусную кислоту, поэтому его постоянно поддерживают в среде с высокой концентрацией спирта и уксусной кислоты и низкой концентрацией питательных веществ.

В качестве сырья для получения пищевого уксуса используют виноградное вино, пивное сусло, мед, соки различных фруктов и ягод после спиртового брожения или водный раствор этилового спирта для получения белого уксуса. Кроме спирта среда содержит уксусную кислоту и минеральные соли N, P, S, Mn, K. Иногда добавляют источники витаминов в виде различных экстрактов. Уксусная кислота 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 %-ный раствор уксусной кислоты. Из 100 л безводного спирта теоретически должно быть получено 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.

В столовом уксусе содержится 5-9 % уксусной кислоты. Уксус с концентрацией кислоты 20-30 % получают путем вымораживания исходного раствора. Путем перегонки получают 70-80 %-ную уксусную кислоту, называемую уксусной эссенцией. Ледяная уксусная кислота содержит 98,0-99,8 % кислоты.

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

Уксусную кислоту или уксус широко используют в пищевой промышленности. Уксус, полученный микробиологическим путем (пищевая уксусная кислота, столовый уксус), различается по сортам в зависимости от характера сброживаемого субстрата. Известен яблочный, виноградный, грушевый и другие сорта уксуса.

Уксус также применяют для растворения органических красителей, при получении медикаментов, пластмасс и т.д.

4.2. Получение и использование аминокислот

Существует несколько способов получения аминокислот. При производстве аминокислот могут быть использованы отходы мясоперерабатывающей промышленности (отходы обработки животного сырья, кровь и т.д.), яичный белок, казеин молока, клейковина пшеницы, соевый шрот и т.д. При переработке этого сырья все 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.

Химический синтез аминокислот достаточно эффективен, однако его недостатком является то, что в процессе синтеза образуется смесь из биологически активной L-формы и D-изомера аминокислоты. D-форма является балла-

стом, 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.

В настоящее время большую часть аминокислот производят с помощью микробного синтеза, причем микроорганизмы синтезируют только L-форму. Это значительно облегчает выделение и очистку аминокислот и позволяет получать препараты с низкой себестоимостью. Микроорганизмы, образующие аминокислоты, не накапливают их в клетке, а постоянно выделяют в питательную среду. Поэтому аминокислоты выделяют из фильтрата культуральной жидкости.

Глутаминовая кислота – первая аминокислота, полученная микробным синтезом. Глутаминовая кислота относится к заменимым кислотам, обладает приятными органолептическими свойствами и находит самое широкое применение. Ее продуцентами являются бактерии, относящиеся к различным родам. В промышленном производстве используют бактерии *Corinebacterium glutamicum* и *Brevibacterium flavum* и др. Условия сверхсинтеза глутамата натрия следующие. Когда *Corinebacterium glutamicum* растет в среде с меньшей, чем оптимальная, концентрацией биотина (витамина Н), нарушается синтез мембранных фосфолипидов, в результате чего глутамат натрия проходит через мембрану и накапливается в культуральной жидкости. То же самое происходит при добавлении в питательную среду пенициллина: этот антибиотик подавляет синтез клеточной стенки и тем самым способствует выделению аминокислоты.

Лизин образуют многие микроорганизмы: бактерии, актиномицеты, сине-зеленые водоросли, некоторые виды микроскопических грибов. В нашей стране в качестве продуцентов лизина используют бактерии родов *Corinebacterium* (*C. glutamicum*), *Micrococcus*, *Brevibacterium*. Питательной средой является меласса или уксусная кислота.

Триптофан образуют микроорганизмы бактериального и грибного происхождения: *Aerobacter*, *Bacillus*, *Escherichia* (*E. coli*), *Saccharomyces* (*S. cerevisiae*), *Candida* и другие. Наиболее активные продуценты L-триптофана – представители рода *Micrococcus*, *Candida utilis*, *Bacillus subtilis*.

Основными потребителями аминокислот являются сельское хозяйство и пищевая промышленность. Аминокислоты, чаще всего лизин, используют в качестве обогатителя кормов и пищевых продуктов растительного происхождения для повышения их питательной ценности и для сбалансирования пищи по незаменимым аминокислотам. Использование 1 т лизина в комбикормовой промышленности позволяет экономить 40-50 т фуражного зерна.

Некоторые аминокислоты используют в качестве приправ, так как они обладают определенными вкусовыми свойствами и могут сообщать продукту приятные аромат и вкус. Большое распространение имеет глутаминовая кислота и ее натриевая соль (глутамат натрия), которая является эффективным усилителем вкуса мясных и овощных блюд. Данную аминокислоту добавляют во многие продукты при консервировании, замораживании и длительном хране-

нии. Растет спрос на глицин и аланин, которые также применяют в качестве приправ.

Многие аминокислоты обладают оригинальным вкусом и участвуют в образовании вкусовых особенностей пищевых продуктов. Например, аспарагиновая и глутаминовая кислоты, кислые на вкус, 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 2 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 сахара.

Многие аминокислоты: лизин, аланин, пролин, валин и другие - могут снимать неприятные запахи и используются в качестве дезодорантов пищевых продуктов.

Для улучшения органолептических показателей мясных продуктов, придания им специфического приятного вкуса и аромата используют цистин, лизин, гистидин. Цистеин и цистин с глутаматом натрия создают имитацию запаха и вкуса мяса, что используется при приготовлении приправ. Цистеин, кроме того, используется для создания пористой структуры хлеба. Добавка к порошковому молоку гистидина и триптофана снимает неприятный «окисленный» привкус.

При температуре 100-120 °С и сильнощелочной реакции некоторые аминокислоты взаимодействуют с сахарами и образуют пищевые красители, которые обладают антиокислительным действием.

Таким образом, самые различные аминокислоты находят широкое применение во многих отраслях пищевой промышленности, повышая питательную ценность пищевых продуктов, участвуя в улучшении их органолептических показателей и повышая их стабильность при длительном хранении.

4.3. Получение липидов с помощью микроорганизмов

С помощью микроорганизмов можно получать липиды. Продуцируемые микроорганизмами липиды накапливаются внутри клетки в виде запасных гранул. Требования при отборе продуцентов липидов те же, что и для продуцентов белка (раздел 6.1.), только вместо белка в клетке должны накапливаться липиды. Кроме того, ряд продуцентов в отличие от продуцентов белка (в частности, дрожжей) требуют асептических условий при выращивании.

Производство липидов с помощью микроорганизмов возможно по двум направлениям: специализированное производство, основанное на направленном биосинтезе липидов микробной клеткой, и получение отхода производства в виде микробного жира при производстве кормовых дрожжей.

В производстве, где главным, целевым продуктом являются микробные липиды, в качестве продуцентов используют дрожжи родов *Cryptococcus*,

Rhodotorula, *Lypomyces*, *Candida*. Среди этой группы дрожжей наибольшей продуктивностью обладают следующие виды: *Cryptococcus terricolus*, *Rhodotorula gracilis*, *R. glutinis*, *Lypomyces starkeyi*, *L. lipoferus* и др. Микроорганизмы выращиваются при минимальном азотистом питании. В этом случае они накапливают значительные количества (от 35 до 55 % от сухой массы клетки) липидов, состав которых зависит от используемого источника углерода. В липидную фракцию входят фосфолипиды, стерины, свободные жирные кислоты, моно-, ди- и триглицериды, стериновые эфиры и воски. Липиды извлекают экстракцией, а оставшуюся биомассу используют как белковую добавку в корма животных, однако содержание белка в ней в 1,5-2,0 раза меньше, чем в обычных кормовых дрожжах.

Источником получения липидов может быть биомасса дрожжей (в основном рода *Candida*), накапливаемая при производстве белковых веществ, но содержащая повышенное количество жиров, которые извлекают экстракцией растворителями.

При выращивании кормовых дрожжей на средах с повышенными концентрациями парафинов, на дизельном топливе в биомассе дрожжей накапливается значительное количество липидов, которые являются нежелательным компонентом в готовом продукте, так как они вызывают его прогоркание при хранении. Поэтому липиды из кормовых дрожжей экстрагируют, отработанные дрожжи высушивают, а жиры освобождают от растворителя и направляют на дальнейшую переработку.

В настоящее время значительное количество растительных и животных жиров расходуется на технические нужды. Замена пищевых жиров микробными дает заметный экономический эффект.

4.4. Получение витаминов и их применение

С помощью микробного синтеза в настоящее время получают такие витамины, как некоторые витамины группы В: B_{12} , B_2 , каротиноиды, витамин D и другие.

Витамин B_{12} (цианкобаламин). Особенность витамина B_{12} по сравнению с другими витаминами группы В определяется двумя причинами: во-первых, в природе он синтезируется только микроорганизмами, во-вторых, молекула витамина состоит из 2-х частей: кобальтосодержащей и нуклеотидной.

В тканях животных концентрация витамина очень низкая (в печени быка 1 мг/ кг) для того, чтобы использовать этот источник для промышленных целей. 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. Он представляет собой однородный порошок коричневого цвета, кисловатый на вкус, имеет характерный запах. Для обогащения кисломолочных про-

дуктов витамином В₁₂ используют пропионовокислые бактерии как в чистом виде, так и в виде концентрата, приготовленного на молочной сыворотке.

Витамин В₂ (рибофлавин) можно в небольших количествах выделять из природного сырья. В наибольшем количестве он содержится в моркови и печени трески.

Из 1 т моркови получают 1 г витамина, из 1 т печени – 6 г.

Рибофлавин впервые был выделен в кристаллическом виде в 1933 г. Продуцентами данного витамина являются дрожжи, мицелиальные грибы и бактерии. Наиболее активными продуцентами витамина В₂ являются дрожжеподобные грибы рода *Eremothecium* (эремофекиум), входящие в класс аскомицетов. Культивирование проводят глубинным способом при хорошей аэрации. Максимальное накопление витамина происходит вместе с максимумом накопления биомассы на 2-е сутки, причем синтез рибофлавина начинается лишь после фазы интенсивной ассимиляции сахара.

Витамин В₂ 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* (блакеслеа). Культивирование проводят и поверхностным, и глубинным способами на питательных средах сложного состава. Во время ферментации среду интенсивно аэрируют. Образование каротиноидов в культуре микроорганизмов не идет параллельно с образованием биомассы. Интенсивный синтез каротиноидов начинается, когда в среде использован весь азот, а рост культуры уменьшается. В качестве стимуляторов в питательные среды добавляют экстракты цитрусовых и дрожжей.

β-каротин используют при изготовлении пищевых продуктов как краситель. Его применяют при изготовлении колбас с целью замены нитрита натрия и обеспечения высокой интенсивности и устойчивости цвета. Используют при производстве леденцов, пищевых паст, кексов и других кондитерских изделий. Во многих странах β-каротин применяют для подкрашивания сливочного масла. Нагревают до 30 °С, добавляют β-каротин, который при такой температуре хорошо растворяется в масле. В Италии каротиноиды используют в производстве макаронных изделий.

β-каротин применяется для стабилизации цвета мяса охлажденного и замороженного в тушах. С этой целью раствор β-каротина наносят на поверхность мяса.

Кроме того, β-каротин обладает антиокислительными свойствами, которые используются для продления срока хранения продукта.

Таким образом, витамины, синтезированные микроорганизмами, исполь-

зуют не только для повышения пищевой ценности продуктов питания, но также в качестве антиоксидантов, красителей и стабилизаторов цвета.

Вопросы для самопроверки

1. Какие основные этапы включает схема получения лимонной кислоты ?
2. Механизм синтеза лимонной кислоты.
3. Продуценты и условия сверхсинтеза лимонной кислоты.
4. Какие микроорганизмы применяются для получения молочной и уксусной кислот ?
5. Условия культивирования микроорганизмов при производстве молочной кислоты.
6. Состав питательных сред для промышленного производства уксусной кислоты.
7. Расскажите об использовании иммобилизованных клеток в производстве уксусной кислоты.
8. Применение органических кислот в пищевой промышленности.
9. В чем преимущества получения аминокислот с помощью микроорганизмов ?
10. Какие аминокислоты получают путем микробного синтеза, и каковы их основные продуценты ?
11. Применение аминокислот в пищевой промышленности.
12. Расскажите о способах производства липидов микробного происхождения.
13. Какие витамины получают с помощью микроорганизмов ?
14. Применение витаминов в пищевой промышленности.

ТЕМА 5. ПОЛУЧЕНИЕ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В ПИЩЕВОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

5.1. Понятие ферменты и ферментные препараты. Характеристика активности ферментных препаратов

Ферменты - это высокоактивные соединения белковой природы, являющиеся специфическими катализаторами реакций.

Ферменты катализируют миллионы химических превращений в клетках животных, растений, микроорганизмов и воздействуют на соответствующие субстраты вне клетки. Достоинством применения ферментов перед химическими катализаторами является то, что они действуют при нормальном давлении, при диапазоне температур от 20 до 70 °С, рН от 4 до 9, в большинстве случаев имеют высокую субстратную специфичность, что позволяет в сложной смеси биополимеров направленно воздействовать на определенные соединения.

При помощи ферментов получают ряд пищевых продуктов. Ферменты используют в пищевой, фармакологической, биохимической промышленности и во многих областях деятельности человека.

Следует различать два понятия: ферменты и ферментные препараты. Ферменты находятся практически во всех живых объектах: растениях, животных и микроорганизмах. **Ферментные препараты** могут представлять собой смесь ферментов или фермент одного вида, иметь различную степень очистки, могут быть добавлены в сырье или продукт, или использоваться закрепленными на носителе (иммобилизованные ферменты). В качестве источника получения ферментных препаратов биотехнологическим способом используют ткани и органы растений, животных и микроорганизмы.

Производство ферментных препаратов является одним из перспективных направлений развития биотехнологии.

Характеристика активности ферментных препаратов

Ферменты являются соединениями белковой природы, поэтому в смеси с другими белками определить их количество практически невозможно. Наличие определенного фермента в данном препарате может быть установлено по результатам той реакции, которую катализирует фермент, то есть по количеству образовавшихся продуктов реакции или уменьшению исходного субстрата.

Активность ферментного препарата Е (по международной классификации) выражается в микромолях субстрата, прореагировавшего в присутствии 1 мл ферментного раствора или 1 г препарата в заданных условиях за 1 минуту. Число микромолей и будет равно числу стандартных единиц активности.

Необходимо придерживаться определенных условий при установлении активности фермента: вести определение при температуре 30 °С и определять активность по начальной скорости реакции, когда концентрация субстрата дос-

таточно для насыщения фермента.

5.2. Получение ферментных препаратов из сырья растительного происхождения

Для получения ферментных препаратов пригодны только некоторые растения или отдельные органы растений и животных, способные накапливать значительное количество ферментов. Источники некоторых ферментов приведены в табл. 5.1.

Таблица 5.1

Источники ферментов растительного происхождения

Ферменты	Источник, из которого получают
Амилазы	Ячмень
Протеазы: папаин фицин бромелаин	Дынное дерево Фиговое дерево Ананас
Кислая фосфатаза	Картофель
Пероксидаза	Хрен
Уреаза	Канавалия мечевидная

Из ферментов растительного происхождения наиболее широко в пищевой промышленности используют амилазы и папаин. Источником ферментов могут быть пророщенные зерна различных злаков. Условно ферментным препаратом можно считать и ячменный солод, в котором содержится до 1 % амилаз.

Растительная протеаза – папаин – содержится в плодах дынного дерева. Только в США ежегодно расходуют около 1 т папаина для обработки (размягчения) мяса. Папаин, а также протеазы фицин и бромелаин при контакте с мясом в течение 2 ч при комнатной температуре расщепляют белки соединительной ткани – коллаген и эластин.

Из растительного сырья получают также фосфатазы, пероксидазы, уреазы, гемицеллюлазы и другие ферменты.

5.3. Получение ферментных препаратов

из сырья животного происхождения

Органы и ткани животных (поджелудочная железа, слизистые оболочки желудков и тонких кишок свиней и т.п.), содержащие ферменты, на мясоперерабатывающих комбинатах консервируют и используют для получения ферментов. Из слизистой желудка свиней и крупного рогатого скота получают препарат пепсина. Из поджелудочной железы свиней получают панкреатин, смеси трипсина, химотрипсина, липаз и амилаз. Пепсин, трипсин и химотрипсин применяют для размягчения мяса, однако бóльший эффект получен при обработке мяса панкреатином. Из желудка (сычуга) молодых телят выделяют сычужный фермент (реннин), широко используемый в сыроделии. Сычужный фермент осуществляет процесс превращения жидкого молока в гель (сгусток), а кроме того участвует в протеолизе, происходящем в сыре при созревании. Некоторые наиболее известные ферменты животного происхождения, а также органы и ткани животных, из которых их получают, представлены в табл. 5.2.

Таблица 5.2

Источники ферментов животного происхождения

Ферменты	Источник, из которого получают
Сычужный фермент	Крупный рогатый скот – сычуг
Щелочная фосфатаза	Крупный рогатый скот - кишечник
Лактатдегидрогеназа	Крупный рогатый скот - сердце
Гиалуронидаза	Крупный рогатый скот - семенники
Каталаза	Крупный рогатый скот, свиньи - печень
Пепсин	Свинья - желудок
Трипсин, химотрипсин, карбоксинпептидаза, панкреатин, эластаза	Свинья – поджелудочная железа
Фумараза и трансаминаза	Свинья - сердце
Аминоацилаза	Свинья - почки
Ацетилхолинэстераза	Электрический угорь – мышечная ткань

5.4. Получение ферментных препаратов с помощью микроорганизмов.
Номенклатура микробных ферментных препаратов

По экономическим и технологическим соображениям получать ферменты с помощью микроорганизмов более выгодно, чем из растительных и животных источников. 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 часов). Продуцентами ферментов могут быть различные микроорганизмы: бактерии, грибы, дрожжи, актиномицеты. Для промышленного получения ферментных препаратов используют как природные штаммы микроорганизмов, так и мутантные штаммы. 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. Микробные клетки содержат или продуцируют более двух тысяч ферментов, катализирующих биохимические реакции, связанные с ростом, дыханием и образованием продуктов. Многие из этих ферментов могут быть легко выделены и проявляют свою активность независимо от того, находятся ли они внутри клетки или в культуральной жидкости.

Производство ферментных препаратов осуществляется и поверхностным, и глубинным способами. При поверхностном способе в качестве продуцентов используются грибы. Питательные среды при этом способе имеют твердую или рыхлую консистенцию. Основой почти всех сред являются увлажненные пшеничные отруби. Для придания среде рыхлой структуры и ее обогащения к пшеничным отрубям добавляются древесные опилки или солодовые ростки. Культивирование проводят в условиях аэрации.

Глубинный способ выращивания принципиальных отличий от поверхностного не имеет. Культивирование проводят в жидких средах, а продуцентами могут быть и бактерии.

При получении внеклеточных ферментов применяют питательные среды неопределенного состава. В таких средах в качестве источника органического углерода и азота, как правило, используют различные сорта крахмала (картофельный, кукурузный, рисовый), кукурузный экстракт, соевую муку, гидролизаты биомассы дрожжей. Однако такие питательные среды неприменимы при выделении внутриклеточных ферментов, так как биомасса в этом случае содержит нерастворимые компоненты, затрудняющие выделение и очистку целевого продукта.

Замена одного источника углерода на другой коренным образом меняет набор накапливаемых ферментов. Например, *Aspergillus awamori* на средах, содержащих крахмал, преимущественно образует амилазы, при замене крахмала на ксилан синтезирует ксиланазу, а если в качестве источника углерода применяют растительное масло, в культуральной жидкости накапливается липаза.

При получении ферментов высокой степени очистки целесообразно культивировать продуцент в питательной среде строго детерминированного (определенного) состава, что обеспечивает направленный биосинтез нужного фер-

мента.

Ферментные препараты представляют собой жидкости (до 50 % сухих веществ), либо порошки. Часто они содержат не один, а целый комплекс ферментов. Выделение и очистка ферментов очень трудоемкий и дорогой процесс, поэтому в некоторых случаях ферментные препараты применяют неочищенными. Но в пищевой промышленности используют препараты высокой и даже предельной степени очистки. Чем выше очистка, тем выше активность препарата. В целом ряде случаев необходимо иметь ферментные препараты, стандартизованные по активности входящих в их состав ферментов. В этом случае используют различные наполнители: муку, крахмал, соли серной и соляной кислот, бентонит и др.

Номенклатура ферментных препаратов микробного происхождения

Существует определенная система названия ферментных препаратов, в которой учитываются: основной фермент, источник получения и степень очистки. Подавляющее количество ферментных препаратов является комплексным, содержащим помимо основного фермента еще значительное количество сопутствующих ферментов и белков. Поэтому в технологии ферментов препараты чаще классифицируют по основному компоненту в смеси ферментов, присутствующих в данном препарате: амилалитические, протеолитические, липолитические и т.д.

Наименование каждого препарата включает сокращенное название основного фермента, затем добавляется видовое название продуцента, заканчивается название препарата суффиксом "ин". Например, амилалитические препараты, получаемые из культур *Aspergillus oryzae* и *Bacillus subtilis*, называются соответственно амил-ориз-ин (амилоризин) и амил-о-субтил-ин (амилосубтилин). Мальтаваморин П2х (продуцент *A. awamori* содержит в основном мальтазу). Целловиридин Г3х (продуцент *Trichoderma viride* содержит в основном целлюлолитические ферменты).

Далее ставится индекс, в котором обозначены способ производства и степень очистки фермента от балластных веществ. При глубинном способе культивирования после названия ставится буква Г, а при поверхностном - П. После букв Г или П может стоять цифра, обозначающая степень чистоты препарата. Индекс 2х обозначает жидкий неочищенный концентрат исходной культуры; 3х - сухой ферментный препарат, полученный высушиванием распылением неочищенного раствора фермента (экстракта из поверхностной культуры или культуральной жидкости). Технические ферментные препараты с индексами 2х и 3х чаще используются в легкой промышленности и сельском хозяйстве. Для пищевой промышленности, медицины и научных исследований требуются очищенные и высокоочищенные ферментные препараты. Индекс 10х означает сухие препараты, полученные осаждением ферментов органическими растворителями или методом высаливания; цифрами 15х, 18х, 20х обозначают препараты, частично освобожденные не только от балластных веществ, но и от сопутствующих ферментов; выше 20х - высокоочищенные и да-

же гомогенные ферментные препараты.

В нашей стране выпускаются следующие ферментные препараты: амило-субтилин и протосубтилин (продуцент - *Bacillus subtilis*), пектофоетидин (*Aspergillus foetidus*), мальтаваморин (*Aspergillus awamori*), амилоризин (*Aspergillus oryzae*), глюконигрин (*Aspergillus niger*) и другие.

5.5. Применение ферментных препаратов в пищевой промышленности

Протеолитические ферменты продуцируются грибами рода *Aspergillus*, *Penicillium*, бактериями рода *Bacillus*, дрожжами рода *Saccharomyces*. Эти ферменты используют при переработке животного сырья в мясной, молочной и рыбной промышленности. Они применяются как размягчители мяса, ускорители созревания мяса и рыбы. При проведении слабого протеолиза с использованием набора специфических ферментов происходит незначительное изменение структуры мяса, но оно становится качественно лучше, значительно мягче. Особенно важным является действие ферментов на белки соединительной ткани. В этом случае оказывается возможным значительно полнее использовать все части туши.

Ввиду нехватки сырья для получения сычужного фермента в последние годы ведутся интенсивные работы по поиску его заменителей ферментами микробного происхождения для сыродельной промышленности. Однако все они уступают ему по свертывающей способности. Хорошими сгустителями являются протеазы, полученные из штаммов микроскопических грибов рода *Mucor* и бактерий родов *Bacillus*, *Pseudomonas* и др. В настоящее время в сыроделии применяется около 10 % реннина микробного происхождения.

В пивоваренном производстве протеолитические ферменты применяют для устранения белковых помутнений, а в хлебопечении - для сокращения времени замеса теста из пшеничной муки с высоким содержанием клейковины. Протеолитические ферменты используют как добавки к моющим средствам, что дает высокий эффект при устранении белковых загрязнений.

Амилолитические ферменты продуцируют грибы рода *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor* и бактерии рода *Bacillus*. Самыми большими потребителями являются спиртовая и пивоваренная промышленности. Амилазы микробного происхождения добавляют при подготовке пивного сусла, при спиртовом брожении, чтобы перевести крахмал в форму, усваиваемую дрожжами. Тем самым можно ускорить или полностью заменить солодование зерна в пивоварении. Кроме того, амилолитические ферменты применяют в хлебобулочном производстве, способствуя улучшению структуры мякиша хлеба.

Целлюлолитические ферменты, участвующие в гидролизе целлюлозы, представляют собой комплекс, состоящий из нескольких ферментов с различной специфичностью действия: эндоглюканазы, экзоглюкозидазы, β -глюкозидазы и др. Целлюлазы и гемицеллюлазы могут быть получены только с помощью микроорганизмов. Целлюлазы, продуцируемые грибами родов *Fusarium*, *Trichoderma*, *Penicillium*, применяют в спиртовой, пищевых концентрат-

ной промышленности, где сырьем являются растительные материалы или отходы переработки растений, например, в производстве растворимого кофе.

Пектолитические ферменты продуцируют грибы родов *Aspergillus* (*Aspergillus niger*), *Penicillium*, бактерии *Erwinia caratovora*, *Clostridium* sp. Пектиназы представляют комплекс ферментов, состоящий из полигалактуроназы, пектинметилэстеразы и др. Эти ферменты используют при производстве осветленных соков из плодов и ягод, для осветления вин. Применение пектиназ в производстве соков обусловлено тем, что они катализируют гидролиз пектиновых веществ растительных клеток, тем самым освобождая сок из клеточных структур. Применение пектиназ в виноделии увеличивает скорость фильтрации сусла, способствует его осветлению и стабилизации. При этом возрастает содержание экстрактивных веществ, витамина С, флавоноидов, обладающих Р-витаминной активностью.

В производстве кисло-молочных продуктов используется реннин - ферментный препарат, осуществляющий свертывание молока. Получают его с помощью микроорганизмов *Endothia parasitica* и *Mucor* sp.

Наибольшее распространение получили препараты, в которых ферменты в активной форме прикреплены к нерастворимой основе. Такие ферментные препараты называют иммобилизованными. Преимуществом их применения является возможность многократного использования. В этом случае обрабатываемый раствор пропускают через основу с иммобилизованным ферментом.

Вопросы для самопроверки

1. В чем отличие ферментов от ферментных препаратов ?
2. Что такое активность ферментного препарата ?
3. Перечислите основные источники получения ферментов растительного и животного происхождения.
4. Перечислите, какие микроорганизмы применяют для промышленного производства ферментных препаратов.
5. Какие способы культивирования микроорганизмов используют при производстве ферментных препаратов ?
6. Расскажите, по какому принципу составляется название ферментного препарата микробного происхождения.
7. Ферментные препараты какого действия наиболее широко используются в пищевой промышленности ?
8. Области применения амилалитических ферментов.
9. В каких отраслях пищевой промышленности используются пектолитические ферменты ?
10. Назовите продуцентов и область применения целлюлаз.
11. Что такое иммобилизованные ферменты, в чем их преимущество ?

ТЕМА 6. ПОЛУЧЕНИЕ БИОМАССЫ МИКРООРГАНИЗМОВ

6.1. Получение биомассы микроорганизмов в качестве источника белка

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

Этот белковый источник имеет ряд преимуществ:

- большая скорость роста микроорганизмов (микроорганизмы растут в 500 раз быстрее, чем сельскохозяйственные культуры и в 1000-5000 раз быстрее, чем самые быстрорастущие породы животных);
- высокое содержание белка в биомассе: дрожжи способны накапливать до 40-50 % белка от своей массы, а некоторые бактерии до 60-70 % белка;
- удовлетворительная биологическая ценность белков: по содержанию большинства незаменимых аминокислот (лизина, триптофана и др.) белок многих дрожжей и бактерий соответствует эталону (яичному белку);
- независимость производства от погодных и сезонных условий: биомассу микроорганизмов можно получать круглогодично;
- возможность выращивания биомассы на различных непищевых субстратах и на отходах ряда производств;
- возможность организации производства микробного белка промышленными методами с применением автоматизации.

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

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

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

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

Преимуществом дрожжей перед другими микроорганизмами является их технологичность: устойчивость к инфекциям, легкость отделения от среды благодаря крупным размерам клеток по сравнению с бактериями, способность усваивать различные источники углерода, азота и способность расти на простых средах, высокие питательные свойства и приятный запах биомассы. Дрожжевая биомасса представляет собой полноценный белковый продукт с

высоким содержанием витаминов, который может найти применение как для кормовых, так и для пищевых целей.

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

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

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

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

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

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

Промышленное производство микробного белка

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

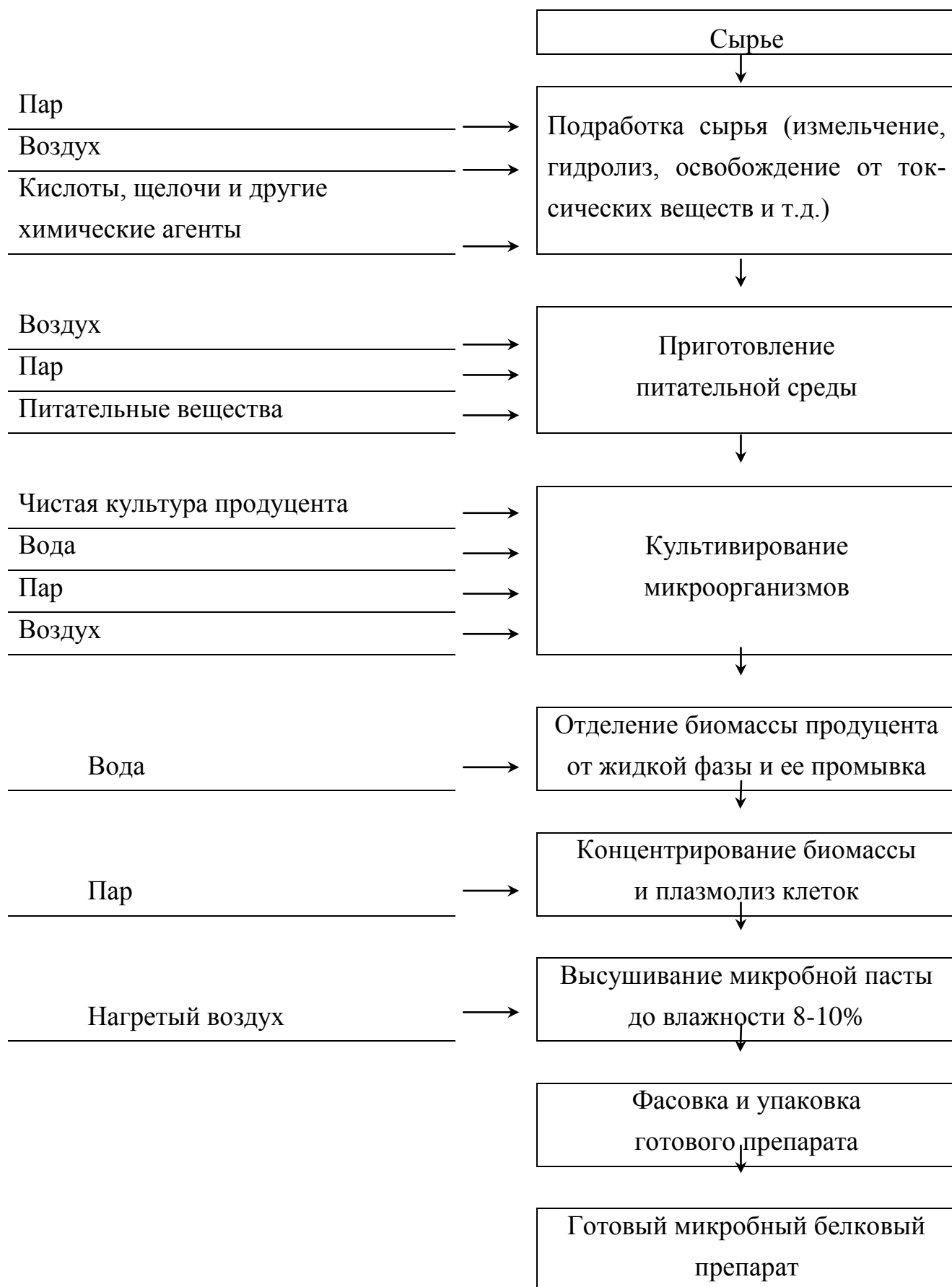


Рис. 6.1. Основные стадии процесса производства микробных белковых препаратов

биомассы; фасовка и упаковка готового препарата.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ВОЗ сделала заключение, что белок микроорганизмов может использо-

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

6.2. Производство хлебопекарных дрожжей и их экспертиза

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

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

Наши представления о питательной ценности дрожжей постепенно меняются. Человек хорошо овладел искусством выращивания дрожжей в промышленных условиях, биотехнологи освоили технологию выращивания богатой белками биомассы хлебопекарных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* на простых синтетических средах (например, на этиловом спирте микробного или химического происхождения), а химики разработали способы выделения из дрожжевой биомассы очищенных белковых концентратов. Хлебопекарные дрожжи могут метаболизировать этиловый спирт благодаря наличию в клетках алкогольдегидрогеназы, но рост дрожжей на этаноле имеет множество особенностей. Стимулирующее действие на этанольные дрожжи в синтетической среде оказывают минимальные добавки аминокислот.

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

Промышленное производство хлебопекарных дрожжей

Обычно для промышленного производства дрожжей используют питательную среду, основным компонентом которой является меласса – отход сахарного производства (свекловичная или из сахарного тростника). Дрожжи выращивают в биореакторах (ферментерах) периодического действия аэробным глубинным способом при pH 4,4-4,5 по так называемому проточному методу. В чистый аппарат вводят 70-80 % теплой воды от необходимого конечного разведения мелассы (1 : 17 – 1 : 30, в зависимости от первоначальной кон-

центрации сахаров), добавляют 10 % мелассы и растворы солей, устанавливают оптимальные рН среды и температуру и начинают умеренную аэрацию (1 об/ (об · мин)). В такую среду вносят посевной материал. В течение 1-го часа среду не добавляют, а в последующие 10 ч ее вводят непрерывным потоком в количествах 5; 6; 7,2; 8,2; 9,2; 10,2; 12,8; 11,0 и 9 % в час от общего количества питательной среды. Аэрация в течение всего процесса ферментации также меняется. В первый и последний час культивирования она меньше (1 : 1), а в период интенсивного размножения дрожжей достигает 1,5 – 2,0 об / (об · мин). В таких условиях дрожжи проходят все стадии развития. В стационарной фазе роста культуру выдерживают до полного прекращения интенсивного почкования.

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

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

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

Экспертиза хлебопекарных дрожжей

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

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

Вопросы для самопроверки

1. Каковы преимущества микробного белка перед другими источниками?

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

ТЕМА 7. СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ПИЩЕВОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ

7.1. Современное состояние пищевой биотехнологии

В современной пищевой биотехнологии можно выделить два направления: применение веществ и соединений, полученных биотехнологическим способом (например, органических кислот, аминокислот, витаминов), и интенсификация биотехнологических процессов в производстве пищевых продуктов.

В настоящее время в пищевой промышленности широко используется продукция, полученная биотехнологическим способом. Расширяется область применения пищевых добавок, в том числе полученных с помощью микробных клеток: органических кислот, ферментных препаратов, подсластителей, ароматизаторов, загустителей и т.д. (табл. 7.1). На продовольственном рынке растет ассортимент функциональных пищевых продуктов. Для их производства применяют витамины, аминокислоты и другие соединения, полученные биотехнологическим способом.

Таблица 7.1

Использование продукции биотехнологии в пищевой промышленности

Продукция биотехнологии	Использование в пищевой промышленности
Аминокислоты: Цистеин, метионин, лизин Глутаминовая кислота (глутамат натрия) Глицин, аспарат	Повышение пищевой (биологической) ценности белоксодержащих продуктов Усиление аромата мясных, рыбных и других изделий Придание кондитерским изделиям, безалкогольным напиткам кисло-сладкого вкуса
Олигопептиды: Аспартам, тауматин, монеллин	Производство низкокалорийных сладких продуктов
Ферменты: α -Амилаза Глюкоамилаза	Производство спирта, вин, пива, хлеба, кондитерских изделий и продуктов детского питания Получение глюкозы, удаление декстринов из

Продолжение таблицы 7.1

<p>Инвертаза Пуллуланаза</p> <p>β-Галактозидаза</p> <p>Целлюлазы</p> <p>Пектиназа</p> <p>Микробная протеиназа</p> <p>Реннин Пепсин, папаин Фицин, трипсин, бромелаин Липазы</p> <p>Глюкозооксидаза, каталаза</p>	<p>пива Производство кондитерских изделий Выработка мальтазных (в сочетании с β-амилазой) или глюконовых (с глюкоамилазой) фруктовых сиропов из крахмала Освобождение молочной сыворотки от лактозы, приготовление мороженого и др. Приготовление растворимого кофе, морковного джема, улучшение консистенции грибов и овощей, обработка плодов цитрусовых Осветление вин и фруктовых соков, обработка цитрусовых плодов Сыроварение, ускорение созревания теста, производство крекеров, улучшение качества мяса Свертывание молока Осветление пива Ускорение процесса маринования рыбы, отделение мяса от костей Придание специфического аромата сыру, шоколаду, молочным продуктам, улучшение качества взбитых яичных белков Удаление кислорода из сухого молока, кофе, пива, майонезов, фруктовых соков для их улучшения и продления сроков хранения</p>
<p>Витамины: А, В₁, В₂, В₆, В₁₂, С, D, Е, β-каротин С, Е В₂, β-каротин</p>	<p>Повышение пищевой ценности продуктов</p> <p>Антиоксиданты</p> <p>Красители, усилители цвета</p>
<p>Органические кислоты: Уксусная, лимонная, бензойная, молочная, глюконовая, яблочная</p>	<p>Консерванты, ароматизаторы, подкислители</p>
<p>Терпены и родственные соединения: Гераниол, нерол</p>	<p>Ароматизаторы</p>
<p>Полисахариды: Ксантаны</p>	<p>Загустители и стабилизаторы кремов, джемов</p>

Более подробно применение биотехнологической продукции в пищевой промышленности рассмотрено в разделах 4-6, посвященных получению полезных для человека веществ и соединений (пищевых кислот, аминокислот, витаминов, ферментных препаратов) с помощью микробных клеток.

Второе направление пищевой биотехнологии - интенсификация биотехнологических процессов в производстве пищевых продуктов – будет подробно рассмотрено в следующих темах.

7.2. Применение пищевых добавок и ингредиентов, полученных биотехнологическим путем

Подкислители

Подкислители применяют в основном как вкусовые добавки для придания продуктам «острого» вкуса. Самый популярный подкислитель – лимонная кислота, которую получают при участии *Aspergillus niger*, сброживая мелассу и содержащие глюкозу гидролизаты. Ее широко используют в производстве безалкогольных напитков и кондитерских изделий. При консервировании помидоров широко используют яблочную кислоту, ее образует *A. flavus*. К числу других кислот, широко применяемых в пищевой промышленности, относятся уксусная, молочная, итаконовая (продуцент – *A. terreus*), глюконовая, используемая в форме глюконолактона (продуцент - *A. niger*), и фумаровая (микроскопический гриб рода *Rhizopus*).

Усилители вкуса

Вещества, усиливающие оттенки вкуса, содержатся в природных пищевых продуктах. Главным усилителем вкуса считается натриевая соль глутаминовой кислоты (глутамат натрия): ее можно получать при помощи *Micrococcus glutamicus*.

Расщепляя с помощью фермента нуклеазы микроскопического гриба *Penicillium citrinum* нуклеиновые кислоты, в промышленном масштабе получают 5'-нуклеотиды (содержащие главным образом инозин и гуанин), которые находят применение как усилители вкуса.

Красители

Основные потребности в этих соединениях удовлетворяются за счет природных источников и продуктов химического синтеза, но два из них традиционно получают методами биотехнологии. В качестве красителей и усилителей цвета используются некоторые витамины, такие как В₂ (рибофлавин), β-каротин, окрашивающие пищевые продукты в оранжево-желтые цвета. β-каротин применяют при изготовлении колбас с целью замены нитрита натрия, кондитерских изделий, сливочного масла, макаронных изделий.

Некоторые аминокислоты при температуре 100-120 °С и сильнощелочной реакции взаимодействуют с сахарами с образованием красителей.

Загустители

Ксантан был первым микробным полисахаридом, который начали производить в промышленном масштабе (1967 г.). Синтезируется микроорганизмами *Xanthomonas campestris* при выращивании на глюкозе, сахарозе, крахмале, кукурузной декстрозе, барде, творожной сыворотке. Это вещество обладает высокой вязкостью в широком диапазоне рН, не зависящей от температуры и присутствия солей. Ксантаны безопасны для человека, вследствие чего с 1969 г. используются в пищевой промышленности для производства консервированных и замороженных пищевых продуктов, приправ, соусов, продуктов быстрого приготовления, заправок, кремов и фруктовых напитков. В сочетании с растительным полисахаридом из семян лжеакалии водные растворы ксантана образуют стабильные гели, что используется в производстве кормов, например, консервированных кормов для домашних животных.

Широко используется в кондитерской промышленности и при производстве мороженого в качестве стабилизатора полисахарид декстран (α -D-глюкан) из *Leuconostoc mesenteroides*, выращиваемого на сахарозе.

Альгинаты из растительных источников широко используются в пищевой промышленности в качестве загустителей или гелеобразующих агентов. Их применяют для стабилизации йогурта, для предотвращения образования кристаллов льда при получении мороженого и т.д. Источником альгинатов служат морские водоросли (например, *Laminaria* spp.), однако по своей природе этот источник непостоянен. В промышленном масштабе получают альгинаты, выращивая бактерии *Azotobacter* в условиях избытка углерода. Причем тип получаемого альгината можно изменять, варьируя различные параметры культивирования (содержание фосфора, кальция).

7.3. Микроорганизмы, используемые в пищевой промышленности

Микроорганизмов, синтезирующих продукты или осуществляющих полезные для человека реакции, насчитывается несколько сотен видов. Микроорганизмы, широко используемые в производстве пищевых продуктов, относятся к четырем группам: бактерии, актиномицеты (грамположительные бактерии, не образующие спор), дрожжи и плесени.

Из 500 известных видов дрожжей первыми люди научились использовать *Saccharomyces cerevisiae*, этот вид наиболее интенсивно культивируется, и нашел самое широкое применение. Многочисленные штаммы *S. cerevisiae* находят применение в пивоварении, виноделии, производстве японской рисовой водки (сакэ) и других алкогольных напитков, а также в хлебопечении. К дрожжам, сбраживающим лактозу, относится вид *Kluveromyces fragilis*, который используют для получения спирта из молочной сыворотки. *Saccharomyces lipolytica* деградирует углеводороды и употребляется для получения микробной биомассы. Все три вида принадлежат к классу аскомицетов. Другие полезные виды относятся к классу дейтеромицетов (несовершенных грибов), так как они размножаются не половым путем, а почкованием. *Phaffia rhodozyma* синтезирует атаксантин – каротиноид, который придает мякоти форели и лосося, вы-

рациваемых на фермах, характерный оранжевый или розовый цвет.

Плесени (микроскопические грибы) вызывают многочисленные превращения в твердых средах, которые происходят перед брожением, их наличием объясняется гидролиз рисового крахмала при производстве сакэ и гидролиз соевых бобов, риса и солода при получении пищевых продуктов, употребляемых в азиатских странах (мисо, темпе и др.). Плесени также продуцируют ферменты, используемые в пищевой промышленности (амилазы, протеазы, пектиназы, целлюлазы), пищевые кислоты (лимонную, молочную, уксусную) и другие вещества. Микроскопические грибы рода *Penicillium* применяют в производстве сыров (например, Рокфора и Камамбера).

Полезные бактерии относятся к эубактериям. Уксуснокислые бактерии, представленные родами *Glucanobacter* и *Acetobacter*, - это грамотрицательные бактерии, превращающие этанол в уксусную кислоту, а уксусную кислоту – в углекислый газ и воду. Род *Bacillus* относится к грамположительным бактериям, которые способны образовывать эндоспоры и имеют жгутики. *B. subtilis* – строгий аэроб, а *B. thuringiensis* может жить и в анаэробных условиях.

Анаэробные, образующие споры бактерии, представлены родом *Clostridium*. *C. acetobutylicum* сбраживает сахара в ацетон, этанол, изопропанол и *n*-бутанол (ацетонобутаноловое брожение), другие виды могут сбраживать крахмал, пектин и различные азотсодержащие соединения. К молочнокислым бактериям относятся представители родов *Lactobacillus*, *Leuconostoc* и *Streptococcus*, которые не образуют спор, грамположительны и не чувствительны к кислороду. Гетероферментативные молочнокислые бактерии рода *Leuconostoc* превращают углеводы в молочную кислоту, этанол и углекислый газ; гомоферментативные молочнокислые бактерии рода *Streptococcus* продуцируют только молочную кислоту, а брожение, осуществляемое представителями рода *Lactobacillus*, позволяет получить наряду с молочной кислотой ряд разнообразных продуктов.

7.4. Генетически модифицированные источники пищи

Возможности генетической инженерии позволяют создавать генетически модифицированные источники пищи.

Растения, животные, микроорганизмы, полученные с помощью генно-инженерной биотехнологии, называются генетически измененными, а продукты их переработки – **трансгенными пищевыми продуктами**, или **генетически модифицированными источниками** (ГМИ).

Создание генетически модифицированных источников растительного происхождения, являющихся сырьем для производства пищевых продуктов, связано с возможностью придать сельскохозяйственным растениям новые полезные свойства: повысить пищевую ценность, устойчивость растений к неблагоприятным погодным условиям, патогенам и вредителям и т.д. Техника рекомбинантных ДНК (генная инженерия) и ее применение к растениям способ-

ствует преодолению барьеров, препятствующих межвидовому скрещиванию. Она позволяет также увеличить генетическое разнообразие культивируемых растений.

Первый ГМИ – устойчивый при хранении томат марки Flavr Savr («Calgene Inc.», США) – появился на продовольственном рынке США в 1994 г. после 10 лет предварительных испытаний. В последующие годы ГМИ, разрешенных для использования в США, Канаде, Японии и странах Европейского союза, стало значительно больше: это кукуруза, картофель, соя, тыква, сахарная свекла, папайя. В 1999 г. в России была зарегистрирована первая генетически модифицированная соя линии 40-3-2 («Monsanto Co», США). На настоящий момент созданы и разрешены для использования в питании человека сотни ГМИ, число которых продолжает увеличиваться.

В результате трансгенной модификации растения становятся устойчивыми к гербицидам, инсектицидам, вирусам, приобретают новые потребительские свойства. При этом уменьшается количество применяемых пестицидов, снижается их остаточное содержание в продукции, сокращается время технологических операций при переработке, уменьшаются потери, повышается качество продукции, экономятся средства и материальные ресурсы.

В США производится более 150 наименований ГМИ. Наиболее распространенной является соя, которая используется при производстве более 3000 пищевых продуктов: супов, детских каш, картофельных чипсов, маргаринов, салатных соусов, рыбных консервов и др. Из ГМИ-хлопка, рапса изготавливают хлопковое и рапсовое масла, из ГМИ-картофеля – картофель фри, из помидоров медленного созревания – кетчуп и др.

Трансгенные продукты, не имеющие отличий в составе и свойствах от традиционных продуктов-аналогов и не содержащие ДНК и белок, разрешено использовать без проведения исследований их безопасности как ГМИ-источников. Их относят к первому классу безопасности и считают безвредными для здоровья потребителей. К таким продуктам относятся: пищевые и ароматические добавки, рафинированные масла, модифицированные крахмалы, мальтодекстрин, сиропы глюкозы, декстрозы и другие.

Важное значение приобретают новые технологии получения трансгенных сельскохозяйственных животных и птицы, направленные на повышение продуктивности и оптимизацию отдельных частей и тканей туши (тушек), что оказывает положительное влияние на качество и физико-химические показатели мяса, его технологичность и промышленную пригодность, особенно в условиях дефицита отечественного мясного сырья.

Возможности генной инженерии позволяют менять структуру и цвет мышечной ткани, ее рН, жесткость, влагоудерживающую способность, степень и характер жирности (мраморность), а также консистенцию, вкусовые и ароматические свойства мяса после технологической переработки. Кроме того, с помощью генной инженерии можно повысить приспособляемость животных и птицы к вредным факторам окружающей среды, получить устойчивость к заболеваниям, направленно изменить наследственные признаки.

В нашей стране исследования в области создания трансгенных животных проводятся во Всероссийском институте жиров и во Всероссийском НИИ мясной промышленности.

В области генной инженерии микроорганизмов большая часть исследований направлена на отбор продуцентов ферментов, витаминов, антибиотиков, органических кислот и других полезных веществ.

Известны полученные с помощью генетически измененных бактерий ферменты, которые применяют при выпечке хлеба (мука при этом осветляется, а хлеб становится более пышным). В Германии получены трансгенные пектиназы для производства соков, причем показано, что в готовых соках и винах эти пектиназы отсутствуют.

Во многих странах, например, странах Европейского союза, Австралии, Новой Зеландии и других регистрация продуктов, полученных с помощью таких «нетрадиционных» ферментов, является обязательной.

7.5. Съедобные водоросли

Морские и океанские водоросли с давних пор употребляют в пищу народы Тихоокеанского побережья, островных государств. Этот продукт отличается высокой пищевой ценностью. Жители Гавайских островов из 115 видов водорослей, обитающих в местных океанских пространствах, используют в питании 60 видов. В Китае также высоко ценят съедобные водоросли. Особенно ценятся сине-зеленые водоросли *Nostoc pruniforme*, по внешнему виду напоминающие сливу и по вкусовым качествам причисленные к китайским лакомствам. В кулинарных справочниках Японии встречается более 300 рецептов блюд, в состав которых входят водоросли. На Дальнем Востоке весьма интенсивно используют водоросли в пищевых целях, и плантации не успевают восстанавливаться естественным путем. В связи с этим все чаще водоросли культивируют искусственно, в подводных садах. Выращивание аквакультур – процветающая отрасль биотехнологии. Широко применяется ламинария, содержащая в большом количестве дефицитный микроэлемент йод. Водоросли также используют в качестве сырья для промышленности.

Одним из перспективных представителей является сине-зеленая водоросль спирулина (*Spirulina platensis* и *Spirulina maxima*), растущая в Африке (оз. Чад) и Мексике (оз. Тескоко). Для местных жителей спирулина является одним из основных продуктов питания, так как содержит много белка, витамины А, С, D и особенно много витаминов группы В. Биомасса спирулины приравнивается к лучшим стандартам пищевого белка, установленным ФАО (продовольственной и сельскохозяйственной организацией ООН). Спирулину успешно культивируют в открытых прудах или в замкнутых системах из полиэтиленовых труб, получая высокие урожаи (примерно 20 г биомассы в пересчете на сухое вещество с 1 м³ в сутки).

1. Расскажите об основных направлениях развития пищевой биотехнологии.
2. Какая биотехнологическая продукция используется в пищевой промышленности ?
3. Расскажите о применении пищевых добавок и ингредиентов, полученных биотехнологическим путем.
4. Какие микроорганизмы широко используются в пищевой промышленности ?
5. Что такое трансгенные продукты ?
6. С какой целью создают генетически модифицированные растения ?
7. Какие генетически модифицированные продукты растительного происхождения разрешены к использованию в нашей стране и за рубежом?
8. Расскажите, какие трансгенные продукты считают безвредными для здоровья потребителей.
9. В чем преимущества использования трансгенных сельскохозяйственных животных и птицы ?
10. Почему водоросли получили широкое применение в питании жителей некоторых государств ?

ТЕМА 8. ПИЩЕВАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ ПРОДУКТОВ ИЗ СЫРЬЯ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

8.1. Получение молочных продуктов

Применение заквасок в производстве кисломолочных продуктов

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

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

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

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

Основные правила приготовления заквасок

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

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

Пороки заквасок

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

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

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

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

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

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

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

Классификация кисломолочных продуктов в зависимости от используемой закваски

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

- ◆ Вырабатываемые с использованием многокомпонентных заквасок (кефир, кумыс). Микрофлора этой группы продуктов состоит из молочнокислых бактерий (одного или нескольких видов), дрожжей и нередко уксуснокислых бактерий. Дрожжи и уксуснокислые бактерии придают продуктам специфические вкус и аромат. При производстве кефира применяют естественную симбиотическую закваску – кефирные грибки, состоящие из молочнокислых бактерий *Lactobacillus*, дрожжей *Saccharomyces kefir* и некоторых видов стрептококков. Кумыс получают из кобыльего молока с помощью молочнокислых бактерий (*Lactobacillus casei* и др.), стрептококков и дрожжей, сбраживающих лактозу. Скваживание молока при использовании таких заквасок проводят при 20-22 °С в течение 10-12 часов.
- ◆ Вырабатываемые с использованием мезофильных молочнокислых стрептококков (творог, сметана, простокваша обыкновенная). Основными представителями микрофлоры таких продуктов являются молочнокислые стрептококки: *Streptococcus lactis*, *Streptococcus acetoinicus*, *Streptococcus cremoris*, *Streptococcus diacetylactis*. Скваживание молока происходит через 6-8 часов при 30 °С.
- ◆ Изготавливаемые с применением термофильных молочнокислых бактерий (ряженка, варенец, йогурт, простокваша Южная, Мечниковская). Для приготовления этих кисломолочных продуктов используют смесь молочнокислых бактерий (10:1) *Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus bulgaricus* (болгарская палочка). Заквашивание молока этими бактериями проводят при 40-42 °С в течение трех часов.
- ◆ Вырабатываемые с применением термофильных и мезофильных молочнокислых бактерий (любительская сметана, сметана с пониженным содержанием жира, напитки «Любительский» «Юбилейный», «Русский»). Основными представителями микрофлоры таких продуктов являются мезофильные и термофильные молочнокислые стрептококки. Температура сквашивания молока при использовании смешанных заквасок - 33-38 °С.
- ◆ Приготавливаемые с использованием ацидофильных бактерий и бифидобактерий: ацидофильное молоко, ацидофилин, бифидопродукты – продукты лечебно-профилактического питания. В состав микрофлоры этих продуктов входят: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus* с добавлением кефирной закваски; *Bifidobacterium bifidum* и др.

Процессы, протекающие при ферментации молока

Технологический процесс изготовления кисломолочных продуктов сво-

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

Рассмотрим более подробно процессы ферментации (сбраживания) молока. В пищевой промышленности ферментацию применяют для получения большого ассортимента кисломолочных продуктов. Главным процессом является молочнокислое брожение, вызываемое стрептококками и молочнокислыми бактериями, при котором лактоза (молочный сахар) превращается в молочную кислоту. Путем использования иных реакций, которые сопутствуют главному процессу или идут при последующей обработке, получают такие продукты переработки молока, как пахта, сметана, йогурт и сыр. Свойства конечного продукта зависят при этом от характера и интенсивности реакции ферментации. Те реакции, которые сопутствуют основному процессу образования молочной кислоты, обычно и определяют особые свойства продуктов. Так, именно вторичные реакции ферментации, идущие при созревании сыров, определяют вкус отдельных их сортов. В некоторых таких реакциях принимают участие пептиды, аминокислоты и жирные кислоты, присутствующие в продуктах.

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

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

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

Различные процессы ферментации молока проводят сегодня в контролируемых условиях. В течение тысячелетий они осуществлялись при участии бактерий, изначально присутствующих в молоке. В наше время для этого ис-

пользуют разнообразные закваски, позволяющие получать молочные продукты нужного качества и типа. Цеховые и заводские микробиологические лаборатории, а также отраслевые научно-исследовательские институты постоянно следят за чистотой и качеством заквасок.

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

Применяющиеся в производстве кисломолочных продуктов культуры живых бактерий могут являться одним штаммом определенного вида (культуры моноштаммов), либо несколькими штаммами и/или видами (смешанные культуры). Коммерческие культуры-закваски состоят из бактерий, образующих молочную кислоту и пахучие вещества (то есть условно делятся на 2 категории – кислотообразующую и ароматообразующую). В табл. 8.1. перечислены некоторые виды бактерий, используемых при производстве молочных продуктов методом ферментации, указана их роль в этих процессах, а также получаемые продукты. Выбор и состав используемых комбинаций из этих штаммов и видов бактерий определяются желаемыми свойствами и условиями получения продуктов, например, скоростью образования молочной кислоты.

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

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

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

аромата и рисунка в сырах. аромата и рисунка в сырах.

Таблица 8.1

Функциональная роль некоторых бактерий,

используемых при переработке молока

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

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

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

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

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

Lactobacillus fermentum - гетероферментативная молочнокислая палоч-

ка. Практически не свертывает молоко. Оптимальная температура + 30-35 °С, не растет при 15 °С, растет при 45 °С.

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

Йогурт

Это один из древнейших продуктов, получаемых путем ферментации. После термообработки молоко заквашивают добавлением 2-3 % закваски йогурта. Температура при брожении поддерживается около 40 °С. Главную роль здесь играют бактерии *Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus bulgaricus*. Для получения желаемой консистенции продукта, вкуса и запаха эти организмы должны содержаться в культуре приблизительно в равных количествах. Кислоту в начале заквашивания образует в основном *Streptococcus thermophilus*. Смешанные закваски нужно часто обновлять, поскольку повторные пересевы неблагоприятно сказываются на соотношении видов и штаммов бактерий: в них начинает доминировать *Lactobacillus bulgaricus*.

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

Сброженная пахта

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

Сметана

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

кислоты не достигнет 0,6 %.

Бифидопродукты

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

Ассортимент бифидопродуктов:

- б и ф и д о к е ф и р – вырабатывается на цельном или обезжиренном молоке с использованием кефирного грибка и закваски бифидобактерий или бактериального концентрата бифидобактерий;

- б и ф и д о й о г у р т или б и о й о г у р т – вырабатывается на цельном молоке с использованием заквасок на ацидофильной или болгарской палочках, термофильном стрептококке и обогащением закваской бифидобактерий или бактериальным концентратом бифидобактерий;

- б и ф и д о с м е т а н а или б и о с м е т а н а – вырабатывается на сливках с использованием заквасок на молочнокислых бактериях и обогащением закваской или бактериальным концентратом бифидобактерий;

- б и ф и л и н – вырабатывается из натурального коровьего молока путем сквашивания чистой культурой бифидобактерий, способных подавлять условно-патогенную микрофлору кишечника.

Диетические свойства кисломолочных продуктов

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

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

Приготовление сыра

Сыр готовят из творога, полученного в результате свертывания казеина цельного или обезжиренного молока. Свертывание казеина происходит под влиянием микробных ферментов и молочной кислоты или с помощью сычуж-

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

Созревание сыра длится от нескольких недель до нескольких месяцев (для сыра Чеддер – 8 мес.). В первые недели созревания число микроорганизмов в массе сыра увеличивается и достигает нескольких сотен миллионов на 1 г сыра, потом число живых бактерий и дрожжей снижается. Сыр должен созревать при пониженной температуре (для сыра Рокфор – не выше 9 °С).

Коровье масло

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

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

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

Новые продукты

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

8.2. Биотехнологические процессы в производстве мясных и рыбных продуктов

Использование микроорганизмов при производстве мясопродуктов

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

Применение ферментных препаратов

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

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

Каждый из этих способов имеет свои преимущества и недостатки.

1. Введение раствора ферментного препарата через кровеносную систему путем инъекций в организм животного при жизни. Прижизненное введение препарата обеспечивает его равномерное распределение и хороший размягчающий эффект, сокращает время созревания, увеличивает количество мяса, пригодного для жарения. Вместе с тем, следует отметить, что при введении достаточно высоких доз препарата возникает анафилактический шок и нарушение нормальных функций организма.
2. Обработка поверхности мяса путем разбрызгивания раствора фермента или нанесения порошкообразных препаратов на поверхность мяса. Способ имеет ограниченное применение ввиду неравномерного преобразования белко-

вых структур: мясо на поверхности размягчается слишком сильно, а внутри – недостаточно.

3. Внутримышечное шприцевание мясной туши. Наибольший эффект получен при введении препаратов ферментов в мышечную ткань многократными уколами. При этом эффективность способа значительно повышается при введении ферментов под давлением вместе со стерильным вакуумом или азотом. Газы, разрыхляя структуру мышечной ткани, способствуют лучшему распределению фермента между клетками. Используется еще один способ – безыгольный - введение препаратов в мясо под сверхвысоким давлением ($200 \cdot 10^5$ Па).
4. Погружение мяса в раствор ферментов после механического рыхления. Простое погружение мяса в ферментный раствор малоэффективно, поскольку в данном случае наибольшим изменениям подвергается лишь поверхность мяса (наступает полный лизис структур мышечной ткани), в то время как в глубоких слоях изменения минимальны. Сочетание предварительного механического рыхления с последующим погружением мяса в раствор ферментов, а также «массирование» мяса в ферментном растворе дают хорошее качество мяса и малые потери влаги при его обработке.
5. Хорошие результаты дает восстановление дегидратированного (обезвоженного) сублимацией мяса в водном растворе размягчающего препарата. При этом создаются условия для контакта фермента не только с поверхностью мяса, но и с внутренними структурами путем проникновения раствора в хорошо развитую систему пор и капилляров. В процессе регидратации мяса обеспечивается равномерный по всему объему контакт фермента с основными белковыми структурами. В результате этого достигается максимальное размягчение мяса при минимальном расходе фермента. Положительное действие на мягчение мяса оказывает поваренная соль.

Используемые протеолитические ферментные препараты должны отвечать определенным требованиям:

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

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

Среди группы ферментов растительного происхождения для обработки

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

Протеиназы микробного происхождения имеют ряд преимуществ по сравнению с другими источниками: неограниченность сырьевой базы, относительно простая технология получения, невысокая стоимость и др. Кроме того, микробные протеиназы, как правило, способны к более глубокой деструкции белков, в том числе многих фибриллярных, а также обладают широким спектром действия на различные субстраты. Продуценты ферментов протеолитического действия рассматривались в п. 5.5.

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

Источники белка различного происхождения

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

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

Растительные белковые препараты в настоящее время используют не только в качестве добавок, способствующих повышению выхода традиционных мясных продуктов, но и качестве основного компонента комбинированных мясных изделий. Особое место отводится соевым белковым препаратам. Основными исходными продуктами являются: обезжиренная соевая мука, содержащая 50 % белка; соевые концентраты с содержанием белка 70 %; соевые изоляты с 90 %-ным содержанием белка. Помимо сои белковые препараты из-

готовавливают из гороха, подсолнечника, кукурузы, хлопчатника и других культур. Подобно сое, на их основе получают муку, концентраты, изоляты с высоким содержанием белка.

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

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

Большое внимание уделяется перспективам использования продуктов микробного синтеза, особенно белкам биомассы дрожжей и одноклеточных организмов, выращенных на нефтяных субстратах. Белки пивных дрожжей повышают биологическую ценность мясopодуKтов, так как увеличивают общее содержание белков, минеральных веществ, витаминов группы В. Благодаря частичному автолизу клеток, они придают продуктам приятный специфический вкус и запах за счет содержащихся в них свободных аминокислот и других веществ. Их использование целесообразно не только с целью экономии основного сырья, но и для «маскировки» вкуса и запаха немясных компонентов в продукте, например, сои, других растительных и овощных белковых добавок.

Использование вторичных продуктов переработки животного сырья

При переработке сельскохозяйственных животных образуется перечень вторичных продуктов, богатых ценным белком: кровь и ее производные, кость, хрящ, сухожилия, шкуры, мездра, рога, копыта и т.д. Из перечисленных отходов на пищевые цели находит применение кровь (как источник белка). Осталь-

ные продукты применяются недостаточно для пищевых и кормовых целей, хотя имеют высокую биологическую ценность. Несмотря на высокое содержание незаменимых аминокислот, в исходном виде это сырье представляет лишь потенциальный источник белка ввиду слабой доступности к гидролизу со стороны пищеварительных ферментов (низкая перевариваемость и усвоение), а также невыраженных функциональных свойств (плохая растворимость и эмульгирующая способность, жесткость и т.д.). Наиболее эффективным средством решения данной проблемы является биотехнология, а именно использование ферментов. Особенно здесь полезны ферменты микроорганизмов, способные расщеплять труднодоступные белки животных, главным образом кератин, коллаген, эластин. Ферментация сырья позволяет улучшить пищевые свойства, функциональность и биологическую ценность продуктов.

Вопросы для самопроверки

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

ТЕМА 9. ПИЩЕВАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ ПРОДУКТОВ ИЗ СЫРЬЯ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

9.1. Бродильные производства

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

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

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

Пивоварение

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

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

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

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

Полученное сусло отделяют от нерастворимых остатков. Добавив хмель, его кипятят в медных котлах. В процессе кипячения прекращается ферментативная активность, осаждаются белки из сусла и экстрагируются вкусовые компоненты хмеля. Для производства пива с определенным содержанием алкоголя сусло после кипячения доводят до нужной плотности. Удельная плотность сусла определяется содержанием экстрагированных сахаров, подлежащих сбраживанию. Затем в сусло засевают штамм пивных дрожжей, которые сбраживают сахара в спирт и углекислый газ (в процессе брожения дрожжевая биомасса увеличивается в пять раз). Ряд других соединений, придающих пиву его особенный вкус, образуются в незначительных количествах. Среди них амиловый, изоамиловый и фенилэтиловый спирты, концентрация которых составляет около нескольких миллиграммов на 1 л, уксусная и масляная кислоты, а также эфиры. По истечении определенного времени брожение заканчивается, дрожжи отделяют от пива и выдерживают его некоторое время для созревания. После фильтрации и других необходимых процедур (пастеризации) пиво готово.

Перспективы развития пивоварения

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

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

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

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

Пивоварение является весьма консервативной отраслью пищевой промышленности. Тем не менее, в данной отрасли постоянно внедряются новые технологические приемы, позволяющие интенсифицировать производственные процессы. Среди них наибольший интерес представляют непрерывные процессы, например, непрерывное солодование, непрерывное брожение пивного сусла в специальных бродильных колоннах с рециркуляцией пивных дрожжей при использовании флокулирующихся штаммов.

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

Виноделие

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

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

Виноделие, в отличие от пивоварения, до самого последнего времени было основано на использовании местных дрожжей дикого типа. Единственная обработка, которой подвергали виноград до отжима, – окуривание сернистым газом, чтобы сок не темнел. Кроме того, сернистый газ подавляет деятельность не винных дрожжей; это позволяет винным дрожжам, которые менее чувствительны к нему, осуществлять брожение без помех. В прошлом именно с помощью этих диких дрожжей и осуществляли спиртовое брожение. В тех районах, где виноделием начали заниматься недавно, широко применяются дрожжевые закваски. Связано это с тем, что желаемая микрофлора может и отсутствовать, а инокуляция стандартной культурой дрожжей позволяет получать вина с нужными свойствами. Кроме того, количество используемого сернистого газа ограничено законодательно, и это побуждает применять дрожжевые культуры-закваски. Используются дрожжи-сахаромицеты: *Saccharomyces cerevisiae*, *S. oviformis*, *S. ellipsoideus*. Виноделы не очень-то полагаются на дрожжи дикого типа, если нет уверенности, что конкуренция со стороны не-винных дрожжей не подавлена. Использование заквасок дает ряд преимуществ: сокращается лаг-период размножения дрожжей, образуется продукт с известными свойствами, уменьшается вероятность появления нежелательного вкуса, поскольку в брожении не участвуют дикие не-винные дрожжи. Хересные винные дрожжи (*Saccharomyces oviformis*), способные переокислять спирт в продукты, придающие вину хересный букет, чувствительны к концентрациям спирта выше 15 %. Культивируя исходный штамм дрожжей при постепенном повышении концентрации спирта до 18 %, удалось выделить штамм, способный к образованию хереса в этих условиях.

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

После завершения спиртового брожения молодое вино хранят в особых условиях, чтобы оно не испортилось. Если вино не предполагается подвергать

яблочно-молочнокислому дображиванию, из него удаляют дрожжи, чтобы прекратить брожение. Затем его обрабатывают сернистым газом, чтобы подавить окислительные процессы, вызывающие его потемнение.

Первосортные вина подвергают выдержке разного рода в зависимости от типа вина, а более дешевые разливают, как правило, в тот же год, когда они были получены. Трудности при выработке дешевых вин обычно связаны с их склонностью к вторичному, яблочно-молочнокислому брожению, которое развивается ко времени розлива. Если вино склонно к такому брожению, его искусственно вызывают до розлива или подавляют. При производстве первосортных красных вин такое брожение даже желательно. Оно составляет естественную часть процесса и происходит при хранении. Этот тип брожения осуществляется молочнокислыми бактериями, в частности *Leuconostoc*, *Lactobacillus* и *Pediococcus*. Оно не идет при низких значениях pH; создав такие условия, его можно подавить. В белых винах яблочно-молочнокислое брожение происходит реже, так как pH в них ниже. Для инициации брожения иногда вместо бактерий используют иммобилизованные ферменты.

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

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

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

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

Получение сидра

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

Когда делают сидр, яблоки прежде всего измельчают в кашицу и отжимают сок. Способы подготовки сока перед брожением весьма разнообразны: он может использоваться как без обработки, так и после подавления в нем естест-

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

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

Спиртопродукты

Микроорганизмы, используемые при получении этанола

Производство этилового спирта при помощи дрожжей основано на давно устоявшейся технологии. В спиртовом производстве используют пригодные для этих целей штаммы рода *Saccharomyces*. Основную массу вырабатываемого в настоящее время спирта получают при помощи дрожжей рода *S. cerevisiae*, иногда *S. uvarum* (*carlsbergensis*), *S. diastaticus*. Самое главное здесь – подобрать дрожжи, подходящие для переработки определенного субстрата. Дрожжи *S. cerevisiae* могут расти на глюкозе, фруктозе, мальтозе и мальтотриозе, то есть на простых сахарах. *S. diastaticus* может также использовать декстрины, а виды дрожжей *Kluveromyces fragilis* и *K. lactis* - лактозу. Крупные спиртовые заводы всегда поддерживают свою собственную культуру дрожжей в специальных средах. Выбор штамма дрожжей при производстве спирта определяется его продуктивностью в особых условиях бродящего сусла. Брожение должно идти активно с образованием спирта в количестве, близком к теоретическому пределу.

Одним из лимитирующих факторов в ферментационном производстве этанола является неспособность микроорганизмов переносить высокие концентрации спирта и вызываемая этим остановка процесса брожения по достижении относительно высокой концентрации спирта. Штаммы дрожжей, используемые в спиртовой промышленности, должны сохранять жизнеспособность вплоть до концентрации этанола 12-15 % (по объему). Кроме того, если в качестве сырья используется зерно, дрожжи должны обладать способностью гидро-

лизовать полисахариды до глюкозы. Это необходимо для полного превращения крахмала в этиловый спирт и углекислый газ.

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

Получение этилового спирта

Схема процесса производства этанола приведена на рис. 9.1. Некоторые сорта спирта обычно производят из вполне определенных типов сырья. Так, коньяк, получаемый при перегонке вина, делают из винограда, а шотландский виски – из ячменного солода. Другие напитки – американский виски, джин и водку, которые обычно делают из зерна (например, кукурузы), можно производить и на основе другого подходящего сырья. Ром обычно получают из мелассы сахарного тростника или свеклы. Когда сырьем служит зерно (например, пшеница или кукуруза), до сбраживания необходимо гидролизовать крахмал до сахаров. Так, виски – это продукт перегонки пива без хмеля. Первые стадии процесса производства виски такие же, что и при приготовлении сусла в пивоварении. Однако, если применяют кукурузу или другие зерновые, то до приготовления сусла непосредственно в бродильных чанах проводят обработку крахмала в зерне ферментами солода.

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

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

Большую роль в увеличении выхода продукта играет отбор штаммов дрожжей, более устойчивым к повышенным концентрациям как субстрата, так и спирта. Для большинства видов дрожжей оптимальная для их жизнедеятель-

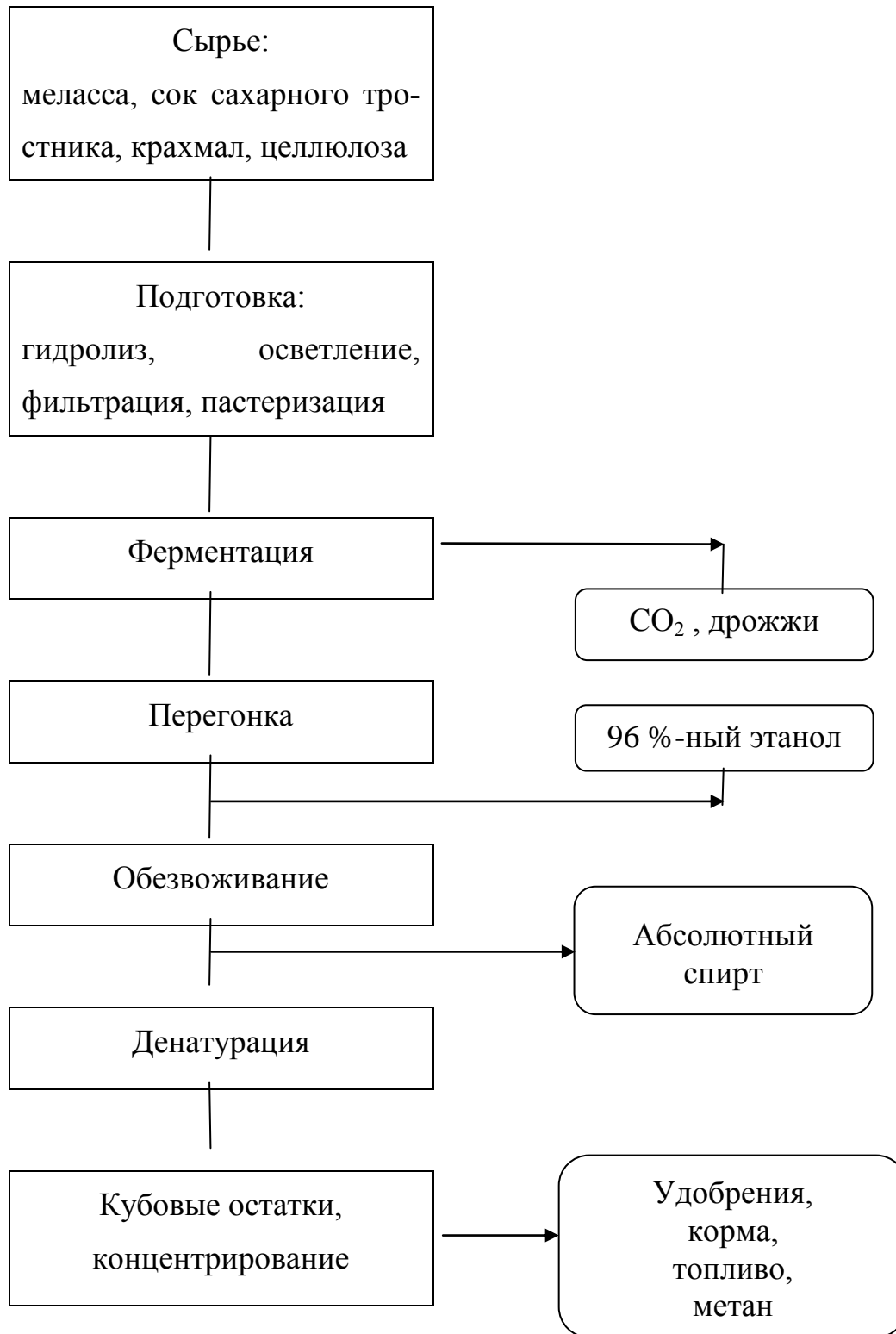
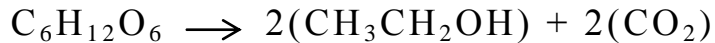


Рис. 9.1. Схема процесса производства этанола

ности температура лежит в пределах от 25 до 33 °С. Проведение процесса при рН 4-5 снижает опасность микробного обсеменения посторонними микроорганизмами.

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



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

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

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

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

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

Для получения 96 %-ного спирта нужна перегонка. Применяют два способа: кубовый и непрерывной перегонки (патент Коффи, 1830 г.). После этого продукт или отправляют на созревание (например, виски), или проводят завершающие операции и разливают по бутылкам (джин, водка). Для продажи спиртопродукты обычно разводят до стандартной концентрации в них спирта

(40 % по объему). При производстве алкогольных напитков (водки, ликероводочных изделий и др.) применяют этиловый спирт высокой степени очистки (**ректификат**). Технический спирт применяют главным образом как горючее для двигателей внутреннего сгорания. Этанол используют как растворитель, экстрагент и антифриз.

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

Особенности производства различных видов спиртопродуктов

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

Производство сакэ, или рисовой водки (Япония), похоже скорее на пивоварение, чем на виноделие, поскольку сбраживаемым углеводом является крахмал. Последний превращается в сбраживаемые сахара под действием *Aspergillus oryzae*, споры которого смешивают с размолотым и сваренным на пару рисом и инкубируют пять-шесть дней при 35° С. Полученный продукт смешивают с распаренным рисом и засевают штаммом *Saccharomyces cerevisiae* (мото). Брожение продолжается не менее трех недель. Приготовление сакэ – сложный и труднорегулируемый процесс, требующий освоения различных способов брожения (в полутвердом и затопленном состоянии) и последовательного регулирования микробных популяций: сначала плесневых грибов (*Aspergillus oryzae*), затем бактерий (*Lactobacillus* и *Leuconostoc* spp.) и наконец дрожжей (*S. cerevisiae*). К концу брожения сакэ содержит не менее 20 % спирта по объему. Концентрация спирта перед выходом в торговую сеть доводится обычно до 16 % по объему.

9.2. Хлебопечение

В различных странах мира используются самые разнообразные технологии хлебопечения.

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

Для производства хлеба в основном применяют дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*. Обычно их выращивают в ферментерах периодического действия на мелассе – отходе сахарного производства. Реже используют дрожжи вида *Candida milleri*. Дозировка прессованных дрожжей при производстве хлебобулоч-

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

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

9.3. Применение ферментов при выработке фруктовых соков

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

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

Ферменты используются на следующих основных стадиях переработки фруктов:

1. Обработка мезги: разрушение мякоти при выработке фруктовой кашицы или нектаров; увеличение выхода сока; лучшее отделение веществ, ответственных за цвет и вкус.
2. Обработка сока: уменьшение вязкости; облегчение изготовления концентратов; упрощение процедур осветления, фильтрования и стабилизации со-

ка.

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

9.4. Консервированные овощи и другие продукты

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

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

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

Кислую капусту готовят из свежей измельченной капусты. После добавления соли на первых стадиях брожения доминируют бактерии *Leuconostoc mesenteroides*, которые в анаэробных условиях превращают сахара в молочную и уксусную кислоты, этиловый спирт, маннитол, эфиры и CO_2 . В дальнейшем образование молочной кислоты из сахаров и маннитола осуществляется при участии *Lactobacillus plantarum*. Разложение маннитола – важный этап, так как он придает продукту горький вкус. Хотя при получении кислой капусты условия сбраживания в какой-то степени контролируются, применять закваски нет необходимости, так как никаких преимуществ они не дают.

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

Оливки перерабатывают путем засолки и обработки щелоком. Когда кон-

сервируют зеленые плоды, молочнокислое брожение осуществляется *Leucostoc mesenteroides*, а затем *Lactobacillus plantarum* и продолжается от шести до десяти месяцев. Спелые оливы либо не сбраживают вовсе, либо сбраживают недолго. И в том, и в другом случае большое значение имеет обработка щелоком, так как при этом удаляется олеуропеин (гликозид, имеющий горький вкус).

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

9.5. Продукты из сои

Соя принадлежит к числу главных пищевых культур в странах Азии, особенно в Китае и Японии. В восточной кухне она служит главным поставщиком белка и масла. На основе соевых бобов на Востоке вырабатывают множество традиционных пищевых продуктов (смотри п. 9.6.).

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

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

Соевые бобы могут стать тем сырьем, из которого на основе традиций восточной кухни можно будет получать новые продукты способом ферментации. В этих случаях перерабатываются целые бобы, однако с помощью биотехнологии получены новые продукты из белков сои. Их вырабатывают путем контролируемого гидролиза белков сои ферментами микроорганизмов. Например, растворимый гидролизат белков сои в качестве заменителя мяса лучше,

чем блюда из соевых бобов. В странах, где население получает с пищей недостаточно белка, им обогащают безалкогольные напитки.

9.6. Микромицеты в производстве продуктов растительного происхождения

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

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

Производство темпе занимает 2-3 дня. Сначала соевые бобы на 12 ч погружают в воду и лущат. Затем их кипятят в течение получаса, чтобы разрушить ингибиторы трипсина (протеолитического фермента) желудочного сока и гормона роста (эти два ингибитора делают сырые соевые бобы несъедобными для человека). После этого бобы несколько раз промывают и высушивают. Затем производят посев спорами плесневого гриба *Rhizopus oligosporus*. Традиционно посев производят остатками от предыдущей порции темпе. Брожение продолжается 36-38 ч при температуре 31 °С. В процессе брожения в продукте возрастает содержание белка и свободных аминокислот, рН возрастает с 5,0 до 7,6. Продукт естественным образом обогащается витаминами: рибофлавином (В₂), цианкобаламином (В₁₂), никотиновой кислотой (РР). В итоге получается светло-коричневая лепешка, состоящая из бобового пюре и мицелия микроскопического гриба. Данный продукт, в отличие от исходного сырья (соевых бобов), является высокопитательным и легкоусваиваемым. Темпе употребляют в пищу непосредственно после изготовления или после обжарки в кокосовом масле.

Японская кухня славится продуктом под названием нате или мисо. Его получают из обросших плесневым грибом *Aspergillus oryzae* соевых бобов. Продукт имеет характерный острый вкус. В Китае аналогичным способом изготавливают сырообразный деликатес суфу (красный творог), используя для этого соевые бобы и некоторые виды плесневых грибов рода *Mucor*. Еще один китайский продукт – ангкак, при приготовлении которого рис засеивается плес-

невым грибом *Monascus purpureus* с целью улучшения вкуса продукта, а также для того, чтобы придать ему красный цвет.

9.7. Продукты гидролиза крахмала

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

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

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

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

9.8. Перспективы развития пищевой биотехнологии

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

- ✓ Создание новых штаммов микроорганизмов, используемых в качестве заквасок в молочной промышленности, в виноделии, пивоварении.
- ✓ Разработка новых штаммов - продуцентов веществ и соединений, применяемых в пищевой промышленности (органических кислот, пищевых добавок, компонентов биологически активных добавок и др.).

- ✓ Получение с помощью микроорганизмов ферментов для разных отраслей пищевой промышленности – молочной (сыры), пивоваренной, безалкогольной, мясной (сыровяленые и сырокопченые колбасы, мясные изделия), пищевых концентратов и т.д.
- ✓ Использование отходов пищевой промышленности (молочной, сахарной и др.), а также других отраслей промышленности (химической, целлюлозно-бумажной) в качестве основных компонентов питательных сред для культивирования микроорганизмов.

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

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

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

Вопросы для самопроверки

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

2. ТРЕБОВАНИЯ К ВЫПОЛНЕНИЮ КОНТРОЛЬНЫХ ЗАДАНИЙ ПО ДИСЦИПЛИНЕ «БИОТЕХНОЛОГИЯ»

Выполнение контрольной работы следует начинать с изучения теоретического материала. Затем нужно продумать поставленный вопрос и изложить его письменно. Работу следует писать разборчиво и аккуратно, оставляя поля для замечаний преподавателя. Обязательно указывается номер варианта, полностью записывается вопрос. Номер варианта определяется по последней цифре зачетки. Каждый вариант содержит два вопроса.

Ответы на вопросы, не проработанные студентом, а механически переписанные целиком с учебника засчитываться не будут. Ответы должны соответствовать поставленным вопросам. Оценивается не обширность ответа, а его суть, полнота и конкретность. В конце работы следует привести перечень учебников, учебных пособий, журналов, использованных при выполнении контрольной, количеством не менее трех.

3. ВАРИАНТЫ КОНТРОЛЬНЫХ ЗАДАНИЙ ДЛЯ СТУДЕНТОВ ПО ДИСЦИПЛИНЕ «ОСНОВЫ СОВРЕМЕННОЙ ПИЩЕВОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ»

Вариант 1

1. Получение лимонной кислоты и ее применение в пищевой промышленности.
2. Консервированные овощи и другие продукты.

Вариант 2

1. Направленный синтез микроорганизмами молочной и уксусной кислот.
2. Продукты из сои, микромицеты в производстве пищевых продуктов из сырья растительного происхождения.

Вариант 3

1. Направленный синтез микроорганизмами витаминов и аминокислот. Их применение в пищевой промышленности.
2. Биотехнологические процессы в пивоварении. Перспективы развития пивоварения.

Вариант 4

1. Получение биомассы микроорганизмов как источника белка. Преимущества и недостатки различных групп микроорганизмов.
2. Биотехнологические процессы в виноделии.

Вариант 5

1. Направленный синтез микроорганизмами ферментов. Номенклатура ферментных препаратов микробного происхождения.
2. Получение спиртопродуктов.

Вариант 6

1. Способы культивирования микроорганизмов.
2. Получение хлебопекарных дрожжей, биотехнологические процессы в хлебопечении.

Вариант 7

1. Сырье и состав питательных сред для биотехнологического производства.
2. Биотехнологические процессы в получении мясных продуктов. Требования к применяемым ферментным препаратам.

Вариант 8

1. Стадии получения посевного материала в биотехнологическом производстве. Микроорганизмы, используемые в биотехнологии.
2. Применение ферментов в пищевой промышленности.

Вариант 9

1. Требования, предъявляемые к микроорганизмам – продуцентам. Способы создания высокоэффективных штаммов-продуцентов.
2. Получение кисломолочных продуктов (йогурта, сметаны, сброженной пахты, коровьего масла, сыра).

Вариант 10

1. Особенности стадии выделения и очистки в зависимости от целевого продукта. Продукты микробного брожения и метаболизма.
2. Применение заквасок в производстве кисломолочных продуктов, пороки заквасок.

4. ВОПРОСЫ К ЭКЗАМЕНУ ПО «ОСНОВАМ СОВРЕМЕННОЙ ПИЩЕВОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ»

Студенты должны знать термины и определения в области пищевой биотехнологии: биотехнология, промышленная микробиология, пищевая биотехнология, штамм, селекция, мутация, генная инженерия, направленный синтез, сверхсинтез, продуценты, целевой продукт, первичные и вторичные метаболи-

ты, инокулят, ферментация, периодическое и непрерывное культивирование, иммобилизованные клетки, ферментер, фильтрация, флотирование, сепарирование, отстаивание, дезинтеграция, автолиз, центрифугирование, экстракция, кристаллизация, ультрафильтрация, сорбция, меласса, ферменты и ферментные препараты, активность ферментного препарата, протеазы, амилазы, целлюлазы, пектиназы, липазы, трансгенные пищевые продукты, генетически модифицированные источники, закваски, флокуляция, ректификат и др.

1. Предмет «Биотехнология», его значение для специалистов в области товароведения и экспертизы продовольственных товаров.
2. Этапы развития биотехнологии.
3. Основные направления в биотехнологии.
4. Требования, предъявляемые к микроорганизмам – продуцентам. Способы создания высокоэффективных штаммов-продуцентов.
5. Стадии и кинетика роста микроорганизмов.
6. Сырье и состав питательных сред для биотехнологического производства.
7. Способы культивирования микроорганизмов.
8. Культивирование животных и растительных клеток.
9. Общая биотехнологическая схема производства продуктов микробного синтеза.
10. Получение посевного материала. Микроорганизмы, используемые в биотехнологии.
11. Сырье для питательных сред. Принципы составления питательных сред.
12. Состав питательной среды для биотехнологического производства (источники углерода и других питательных веществ).
13. Приготовление питательной среды, инокуляция и культивирование.
14. Способы ферментации: аэробная и анаэробная, глубинная и поверхностная, периодическая и непрерывная, с иммобилизованным продуцентом.
15. Особенности стадии выделения и очистки в зависимости от целевого продукта. Продукты микробного брожения и метаболизма.
16. Направленный синтез лимонной кислоты.
17. Получение молочной кислоты биотехнологическим способом.
18. Получение уксусной кислоты биотехнологическим способом.
19. Получение и использование аминокислот.
20. Получение липидов с помощью микроорганизмов.
21. Производство и применение витаминов.
22. Получение ферментных препаратов из сырья растительного и животного происхождения, их использование в пищевой промышленности.
23. Получение ферментных препаратов с помощью микроорганизмов. Номенклатура микробных ферментных препаратов.

24. Применение ферментных препаратов в пищевой промышленности.
25. Получение биомассы микроорганизмов в качестве источника белка.
26. Производство хлебопекарных дрожжей и их экспертиза.
27. Современное состояние и перспективы развития пищевой биотехнологии.
28. Применение пищевых добавок и ингредиентов, полученных биотехнологическим путем.
29. Микроорганизмы, используемые в пищевой промышленности.
30. Генетически модифицированные источники пищи.
31. Съедобные водоросли.
32. Применение заквасок в производстве молочных продуктов. Пороки заквасок
33. Классификация кисломолочных продуктов в зависимости от используемой закваски. Микроорганизмы, входящие в состав заквасок.
34. Получение молочных продуктов (йогурт, сметана, коровье масло).
35. Биотехнологические процессы в сыроделии.
36. Диетические свойства кисломолочных продуктов. Классификация бифидопродуктов.
37. Биотехнологические процессы в производстве мясных и рыбных продуктов.
38. Биотехнологические процессы в пивоварении.
39. Биотехнологические процессы в виноделии.
40. Получение спиртопродуктов.
41. Биотехнологические процессы в хлебопечении.
42. Применение ферментов при выработке фруктовых соков.
43. Консервированные овощи и другие продукты.
44. Продукты из сои. Микромицеты в питании человека.
45. Продукты гидролиза крахмала.