

ХИМИЯ, ХИМИЧЕСКИЕ И БИОТЕХНОЛОГИИ

УДК 574. 543.5

В.М. Востоков, С.В. Плохов, В.Р. Каргашов

ОСОБЕННОСТИ ЭКОАНАЛИТИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ ПРОМЫШЛЕННОЙ БИОПРОДУКЦИИ

Нижегородский государственный технический университет им. Р.Е. Алексеева

Выявлены специфические особенности экоаналитического контроля и диагностики промышленных биоматериалов, которые следует учитывать при создании комплексной системы управления качеством биопроизводства и в оценке экологического риска биопроизводства. Предложен оригинальный и доступный способ априорной оценки генетического риска кормовых дрожжей микробиологического производства.

Ключевые слова: качество биопроизводства; контроль промышленных биоматериалов; система качества; экологический риск биопроизводства.

В соответствии с международными нормами сертификации ISO 9000, современное биопроизводство следует оснастить комплексной системой менеджмента качества (СМК), обеспечивающей управление биотехнологическим процессом, по результатам экоаналитического контроля и физико-химической диагностики биоматериалов, включая входной контроль качества биосырья, промежуточный контроль технологических биосубстратов и выходной контроль качества выпускаемой биопроизводства.

Как отмечалось ранее в работах по анализу биологически активных веществ (БАВ) [1-4], в комплексной системе экоаналитического контроля биотехнологического производства востребованы лишь те методы и средства контроля и физико-химической диагностики биоматериалов, в которых отражены специфические особенности количественной оценки биологических объектов.

Важнейшей особенностью контроля качества и экологической безопасности производимой биопроизводства является необходимость одновременной оценки массовой доли контролируемого БАВ и величины биологической активности, обычно выражаемой в международных единицах (МЕ), где численное значение биологической (физиологической) активности БАВ является важнейшим показателем качества и экологической безопасности биопроизводства.

Общепринятая оценка величины биоактивности по величине массовой доли контролируемого биоингредиента не всегда достоверна, так как имеющие место факторы внешнего воздействия на равновесную биосистему могут существенно изменить величину биологической активности. Именно этим можно объяснить установленный факт [1-3], что отсутствие корреляции между двумя важнейшими показателями качества биопроизводства – массовой доли БАВ и биологической активности, всякий раз, ведет к систематической погрешности результатов контроля.

Так, за единицу А-витаминной активности принимается биоактивность некой порции БАВ, содержащей 0,3 мг ретинола [1, 2]. Однако численная оценка биоактивности витамина А в пересчете на ретинол не является достоверной, так как по указанной шкале измерений оценивается лишь антиоксидантная активность витамина. Тогда как для определения сум-

марной А-витаминной активности потребуется еще оценить степень непосредственного участия ретинола в иных биохимических процессах, например, в синтезе зрительного пигмента – родопсина или в биосинтезе липидных мембран, где биоактивность витамина А следует оценивать по совершенно иной шкале.

Можно привести множество других примеров несоответствия величины биоактивности массовой доле контролируемого биоингредиента, обусловленного влиянием разнообразных факторов внешнего воздействия на равновесную величину биологической (физиологической) активности.

Так, типичным примером синергентного воздействия одного БАВ на другое может быть биохимический синергизм фолиевой кислоты – витамина **В₉**, проявляющей биоактивность лишь в присутствии водорастворимого антиоксиданта – витамина **С**. Следовательно, общепринятая оценка **В**-витаминной активности фолиевой кислоты по ее массовой доле, без учета синергизма БАВ, недостоверна.

Из изложенного следует, что для достоверной оценки важнейшего показателя качества биопродукции – величины биологической активности – потребуется оригинальная методика выполнения измерений (МВИ), адекватная биопроцессу, в которой отражены особенности анализа БАВ [1-5].

Если для проверки качества химической продукции достаточно оценить массовую долю контролируемого БАВ, то для определения важнейшего показателя качества биопродукции – величины биологической активности – уже потребуется исследовать весь комплекс ингредиентов и факторов влияния на ожидаемый биологический эффект [2, 3].

Следовательно, научно-техническая разработка МВИ, приемлемой для экоаналитического контроля биопроизводства, как и прямой перенос в ЗЛ биопроизводства некой МВИ, успешно апробированной в химической промышленности, будет корректным техническим решением лишь в том случае, если в данной методике физико-химической диагностики биоматериалов отражены указанные специфические особенности количественной оценки биологических объектов.

О необходимости учета специфических особенностей анализа многофакторных и многопараметровых биологических систем было уже неоднократно указано в ранее выполненных и опубликованных работах [1-5]. В данной работе акцентировано внимание на особенности сертификации биопродукции и на проблемы стандартизации методов и средств измерений, используемых в экоаналитическом контроле и в априорной оценке экологического риска биопроизводства, где также необходимо учитывать специфические особенности анализа многофакторных биологических систем.

Как показано в работе [4], лишь применение статистических методов управления качеством биопродукции, по результатам выборочного контроля на всех критических этапах биопроизводства, с учетом его специфики, позволяет решить острую и актуальную проблему внешнего управления биотехнологическим процессом, с учетом самопроизвольного генетического управления биопроцессом, по уникальной программе, заложенной в геном.

В отсутствии эталонов и стандартных образцов биопродукции, лишь применение статистических методов исследований и оценок позволяет управлять биотехнологическим процессом, по результатам выходного контроля качества биопродукции и априорной оценки экологического риска биопроизводства. А это позволяет сертифицировать данное предприятие биотехнологического профиля по международным нормам ISO 9000.

Вопросы сертификации биопроизводств становятся весьма актуальными в связи с коренной перестройкой национальной системы обязательной сертификации и переходом на международные нормы добровольной сертификации, приемлемые в условиях рыночных отношений.

В условиях цивилизованного рынка “качество” становится важнейшей экономической категорией. Поэтому, сегодня востребованы эффективно действующие СМК биопроизводства, отвечающие международным нормам стандартизации, сертификации и менеджмента

качества, созданные на основе оригинальных МВИ, адекватных биопроцессу, при разработке которых учитываются специфические особенности количественной оценки биологических объектов [1-3], как и особенности численной оценки экологического риска того или иного биопроизводства [5]. По нормам ISO 9000, следует еще учитывать требования заказчика по качеству продукции.

Например, в оценке качества кормовых дрожжей, обогащенных витамином *D*, необходимо учитывать то обстоятельство, что в технологиях кормления с/х животных и птицы может быть востребована лишь одна из двух активных форм витамина *D*, либо эргокальциферол (*D*₂) либо холекальциферол (*D*₃). Так как корма для птицы обогащают витамином *D*₃, а корма для крупного рогатого скота должны содержать лишь витамин *D*₂, поскольку сычужные животные не усваивают холекальциферол (*D*₃).

Однако на отечественных предприятиях реализованы лишь стандартные методики хроматографического определения витамина *D* (ГОСТ Р 50929-96), где эргокальциферол (*D*₂) и холекальциферол (*D*₃) идентифицируются одним пиком. Следовательно, в контроле качества кормовых дрожжей, обогащенных витамином *D*, потребуется не только определить массовую долю витамина *D*, но также, выявить активную форму витамина и ожидаемый биологический эффект.

Но это не предусмотрено в нормах пока еще действующей “Системы стандартизации и сертификации ГОСТ Р”, где продукцию сертифицируют на соответствие жестким и незыблемым нормам обязательной сертификации (в данном случае, ГОСТ Р 50929-96), отклонение от которых ранее, до отмены в 2004 г. законодательного действия ГОСТ, считается нарушением закона.

На самом деле, нормы качества биопродукции не могут долго оставаться неизменными. В условиях рынка они непрерывно растут. Они также могут измениться в зависимости от условий реализации биопродукции и от требований заказчика, мнение которого должно быть решающим, если это не ведет к повышению экологического риска биопроизводства.

Практика показала, что сертификация биопродукции по еще действующим, но устаревшим нормам и требованиям “Системы стандартизации и сертификации ГОСТ Р” становится сдерживающим фактором развития методов и средств экоаналитического контроля современных нанобиотехнологий.

В данной ситуации, ближе подходят международные нормы добровольной сертификации, имеющие рекомендательный характер. В то время как нормы ГОСТ ранее обладали законодательным действием, что препятствовало внедрению в производственный контроль последних достижений науки и техники. Это стало возможным, лишь в 2004 г., после отмены законодательного действия ГОСТ Р.

В последние годы идет коренная перестройка ГСС, с целью перехода на нормы добровольной сертификации производств и статистического управления качеством промышленной продукции [5]. Так, в 2007 г., с целью обеспечения качества и безопасности выпускаемой продукции, была создана промежуточная модель системы сертификации смешанного типа, названная “Системой сертификации ГОСТ Р – ИСО 14000”, где реализованы важнейшие элементы круга качества Исикава Каору, способствующие организации на каждом предприятии комплексной системы менеджмента качества и априорной оценки экологического риска биопроизводства, в рамках современной методологии *Prevention Pollution*.

Следует отметить, что отсутствие СМК, отвечающей международным нормам сертификации и экологической безопасности биопроизводства, уже является сдерживающим фактором развития микробиологической промышленности России. Так, в 70–80-е годы прошлого столетия, по соображениям экологической безопасности, крупнейшие заводы белково-витаминных концентратов (БВК) и гидролизно-дрожжевые заводы (ГДЗ), не оснащенные комплексной СМК, были остановлены и законсервированы на неопределенный срок, что отбросило Россию, ранее выпускавшую более 5% мирового объема биопродукции, на 70-е место в мире (0,25%) [6, 7].

Актуальная необходимость реабилитации заводов БВК, ранее остановленных без серьезного технико-экономического обоснования, востребует скорейшего решения указанных проблем менеджмента качества биопродукции и превентивной оценки экологического риска биопроизводства.

В связи с тем, что неуправляемое биопроизводство неминуемо становится источником экологического загрязнения окружающей природной среды (ОПС), потребовалось оснастить все предприятия биотехнологического профиля комплексной СМК, обеспечивающей выпуск доброкачественной и генетически безопасной биопродукции.

Так, на малых предприятиях биотехнологического профиля получила распространение и стала популярной английская система менеджмента качества *GMP*, где вмешательство человека в биопроцесс, управляемого по программе генома, сводится к обеспечению мягких и стерильных условий пониженной обсемененности чужеродными микроорганизмами поступающего сырья, аппаратуры и производственных помещений.

Но система *GMP* оказалась непригодной для управления качеством крупнотоннажных микробиологических производств, в частности, - гидролизно-дрожжевых заводов, обеспечивающих кормовым белком крупнейшие предприятия Агропромышленного комплекса. Оказалось, что на крупнотоннажном биопроизводстве невозможно создать достаточно благоприятные и стерильные условия микробиологического синтеза, например, кормового белка. А в жестких и нестерильных условиях повышенной обсемененности биотехнологический процесс идет в ином направлении, чем это указано в техническом регламенте. Безусловно, это снижает качество биопродукции и увеличивает экологический риск биопроизводства [3, 6].

Но если под влиянием факторов внешнего воздействия нарушен генетический код, то биопроцесс уже не может саморегулироваться по программе, заложенной в геном. Поэтому, потребуются активное вмешательство человека в управление биотехнологическим процессом, где необходимо помнить о том, что генетическое управление биотехнологическим процессом остается главенствующим, а вмешательство человека в биопроцесс должно быть осторожным и разумным, основанным на знаниях биохимии, молекулярной биологии и генной инженерии.

Соответствующая стратегия и тактика управления качеством биопродукции нужна для разработки оригинальной методики физико-химической диагностики биоматериалов и при оценке экологического риска биопроизводства. Так, для достоверной оценки генетического риска промышленного микробиологического синтеза кормового белка (производства кормовых дрожжей) потребуются достоверные сведения о возможных последствиях экологического загрязнения биосферы генетически модифицированной биопродукцией (ГМБ).

Известно, что нарушение механизмов наследственности в жестких и не стерильных условиях крупнотоннажного микробиологического производства провоцирует мутации живых организмов. Тем не менее, генетическое воздействие ГМБ на объекты ОПС, как и последствия возникшего мутагенеза, оценить очень сложно. Острый мутагенез способен уничтожить вид или даже всю популяцию, что уже является экологической катастрофой. Однако незначительные, фоновые мутации не опасны. Более того, они могут быть полезными живому организму, помогая ему приспособиться к изменениям среды обитания, так как фоновые мутации являются составной частью естественного эволюционного процесса.

Из изложенного следует, что для достоверной оценки уровня генетического риска, всякий раз, потребуются установить тот минимум генетической модифицированности, который становится уже опасным для контролируемого биологического объекта. Если установлен предельный уровень генетической модифицированности, то данную величину следует стандартизовать, как некую норму ПДК, с целью применения ее в качестве эталона (шаблона) при проведении сличительных испытаний качества биопродукции, с использованием различных, как оригинальных, так и стандартных МВИ, адекватных биотехнологическому процессу.

В работах [9, 10] впервые указано на то, что мониторинг качества кормового белка

различными способами определения массовой доли протеинов в кормовых дрожжах позволяет, не только установить качество выпускаемой биопродукции непосредственно в ЗЛ предприятия биотехнологического профиля, но и априорно оценить экологический риск биопроизводства, в рамках современной методологии *Prevention Pollution* [3, 6].

В качестве примера численной критериальной оценки экологического риска микробиологического производства, включая оценку генетического риска, рассмотрим предложенную нами схему мониторинга качества кормовых дрожжей, производимых на трех ведущих предприятиях отрасли: Астраханский ГДЗ, Волжский ГДЗ и Кировский БХЗ. Все три предприятия построены по типовому технологическому проекту, где применяется единый штамм, а сырьем для питательной среды является растительная клетчатка из плавневого тростника; древесной щепы, опилок и иных отходов и компонентов древесины.

Таблица 1

Статистическая обработка (по Стьюденту) результатов анализа образцов кормовых дрожжей Астраханского ГДЗ, на содержание белка, неселективными методами Кьельдаля, Барнштейна и селективным фотометрическим методом, по Лоури

№ п/п	Массовая доля протеина, x_i	Средний результат, x_m	Стандартное отклонение, S_x	Абсолютная погрешность, ε	Относит. станд. отклонение, S_r
Массовая доля протеина, %					
	По Кьельдалю				
1	55,39	54,185	0,2814	0,636	0,012
2	55,10				
3	54,44				
4	54,12				
5	53,77				
6	53,67				
7	53,41				
8	55,27				
9	54,09				
10	52,58				
	По Барнштейну				
1	53,09	52,539	0,4096	0,926	0,018
2	54,40				
3	50,63				
4	52,08				
5	53,78				
6	53,34				
7	53,44				
8	52,08				
9	50,54				
10	52,01				
	По Лоури:				
1	48,90	48,939	0,2519	0,569	0,011
2	48,56				
3	48,21				
4	48,77				
5	48,50				
6	47,95				
7	48,48				
8	50,23				
9	50,15				
10	49,64				

В качестве критерия качества кормовых дрожжей – целевой продукции указанных заводов – было принято численное значение массовой доли кормового белка, определяемое стандартными методами Кьельдаля и Барнштейна (ГОСТ Р 51417-99), а также селективным способом фотометрического определения белка по специфической на протеины, фотометрической реакции Лоури [9, 10].

В качестве критерия численной оценки генетического риска кормового белка была принята массовая доля нуклеотидов – метаболитов нуклеиновых кислот $m_{\text{нукл}}$ [11], которую вычисляют по разности значения массовой доли белка, найденного методом Барнштейна $m_{\text{барн}}$, и массовой доли протеинов, найденной фотометрическим методом, по реакции Лоури – $m_{\text{фот}}$:

$$m_{\text{нукл}} = m_{\text{барн}} - m_{\text{фот}} \quad (1)$$

В табл. 1 представлены результаты контрольных испытаний кормовых дрожжей – целевой продукции Астраханского ГДЗ, проведенных в ИЛ НГТУ, по заказу ВНИИ Гидролиз, с целью сравнительной оценки результатов определения массовой доли кормового белка тремя указанными ранее методами: методом Кьельдаля, методом Барнштейна и оригинальным фотометрическим методом, где белок определяется по специфической на протеины реакции Лоури [10].

Аналогичные сличительные испытания, с целью объективной оценки качества кормового белка, выпускаемого на разных гидролизно-дрожжевых заводах, а также, с целью сопоставления результатов определения белка указанными методами анализа, были проведены с белковой продукцией Волжского ГДЗ и Кировского БХЗ.

Они приведены здесь не полностью, а сведены в табл. 2, в виде конечных результатов статистических исследований и оценок, подтверждающих ранее полученные выводы [3, 6, 9] о целесообразности оценки качества кормовых дрожжей не по массовой доле “сырого протеина” (по Кьельдалю) и не по массовой доле “истинного белка” (по Барнштейну), а по массовой доле хорошо усвояемых протеинов, установленной селективным на белок, фотометрическим методом.

В то время как численная оценка качества кормового белка, по результатам определений стандартными методами Кьельдаля и Барнштейна (ГОСТ Р 51417-99), указывает на систематическое завышение результатов выборочного контроля (табл. 2), что позволяет фальсифицировать белок путем добавления мочевины или иных соединений, содержащих азот.

Обсуждая статистические данные, представленные в табл. 2, можно сделать вывод, что в Астраханских дрожжах меньше небелковых соединений, включая азотсодержащие вещества, чем в продукции двух других заводов. Но еще важнее то, что в дрожжах Астраханского ГДЗ содержится меньшее количество нуклеотидов, что косвенно свидетельствует о не высоком уровне генетической модифицированности выпускаемого кормового белка.

Таблица 2

Мониторинг качества биопродукции микробиологических производств

Оценка массовой доли белка в кормовых дрожжах методами Кьельдаля, Барнштейна и фотометрическим методом по реакции Лоури			
Гидролизно-дрожжевые заводы	Интервальное значение ($n=10$) массовой доли белка, определенное:		
	по Кьельдалю, %	по Барнштейну, %	фотометрическим методом
Астраханский ГДЗ	$54,18 \pm 0,64$	$52,54 \pm 0,92$	$48,94 \pm 0,57$
Волжский ГДЗ	$56,93 \pm 0,97$	$33,36 \pm 1,84$	$30,02 \pm 1,01$
Кировский БХЗ	$46,82 \pm 0,92$	$40,40 \pm 1,34$	$35,94 \pm 0,90$

Таблица 3

Определение массовой доли нуклеотидов в кормовых дрожжах и в истинном белке

Контролируемые заводы	Массовая доля “истинного” белка и протеинов, %		Массовая доля нуклеотидов в дрожжах, %	Массовая доля нуклеотидов в белке, %	Примечания
Астраханский ГДЗ	52,54	48,94	3,60	6, 8	Генетический риск отсутствует
Волжский ГДЗ	33,36	30,02	3,34	10,2	Повышенная экологическая нагрузка
Кировский БХЗ	40,40	35,94	4,46	11,0	

Если сопоставлять результаты оценки генетического риска указанных заводов по критерию $m_{\text{нукл}}$, то генетический риск Астраханского ГДЗ не превышает допустимых пределов (табл. 3), что подтверждается многолетним опытом реализации указанной белковой продукции в России и странах ближнего зарубежья. Но если взять в качестве верхнего предела генетической модифицированности кормовых дрожжей значение массовой доли нуклеотидов в истинном белке, равное 6,8% (табл. 3), то в кормовом белке Волжского и Кировского заводов обнаруживается повышенное содержание нуклеотидов, что косвенно указывает на повышенный генетический риск данных микробиологических производств.

Несмотря на то, что предложенный нами способ численной оценки генетического риска микробиологических производств запатентован [11], авторы не гарантируют полную достоверность результатов косвенной оценки генетического риска по массовой доле нуклеотидов в белке, так как пока не установлена четкая связь между содержанием нуклеотидов в белке и возможными нарушениями нуклеотидного обмена на субклеточном уровне. Это еще не доказано и останется гипотезой до тех пор, пока на основе теоретических и экспериментальных работ, в сфере молекулярной биологии и геномной инженерии, не будут получены убедительные доказательства данной гипотезы о косвенной связи генетического риска с массовой долей нуклеотидов в кормовом белке.

Тем не менее, острые проблемы превентивной оценки генетического риска нанобиотехнологий, непосредственно на производстве, требуют своего незамедлительного решения. В первую очередь, это касается нанотехнологий с применением генетически модифицированных микроорганизмов [7, 8] (ГМО).

Их применение очень выгодно, так как это позволяет многократно ускорить процесс микробиологического синтеза, например, биотоплива – биодизеля, биогаза и пр. Поэтому, несмотря на сдерживающий фактор генетического риска, нанобиотехнологии, на основе ГМО, бурно развиваются в целом ряде стран мира. Так, доля биотоплива уже превышает 10% от всех энергетических ресурсов США, где давно ведутся работы по изучению воздействия ГМО на объекты ОПС. Ведутся бесконечные споры о целесообразности использования ГМО, которые вероятно закончатся, когда человек научится объективно оценивать степень воздействия генетически модифицированной биопродукции на объекты биосферы и будут созданы достоверные способы физико-химической диагностики биоматериалов, в которых отражены специфические особенности количественной оценки биологических объектов.

Библиографический список

1. **Востоков, В.М.** Хроматографический контроль биохимической активности жирорастворимых витаминов (A,D,E) в пищевой и кормовой продукции / В.М. Востоков, В.Р. Карташов // Изв. вузов. Сер. Химия и хим. технологии 2006. Т. 49. №4. С. 115–118.
2. **Востоков, В.М.** Научные принципы выбора физико-химических методов анализа и их реализация при разработке систем контроля биотехнологических производств. /В.М. Востоков, С.А. Плохов // Н. Новгород, Деп. в ВИНТИ 29.12.2006. № 1640-В 2006. – 6 с.
3. **Востоков, В.М.** Особенности инструментального экоаналитического контроля биотехнологи-

- ческих производств / В.М. Востоков, А.Н. Давыдов, Е.Г. Ивашкин // Экоаналитика-2009: материалы VII Всероссийской конференции по анализу объектов окружающей среды / Йошкар-Ола, 2009. С. 79-80.
4. **Востоков, В.М.** Особенности метрологической оценки результатов аналитического контроля биотехнологий / В.М. Востоков, А.П. Арбатский // Изв. вузов. Поволжск. рег. 2005. № 6. С. 231-240.
 5. **Востоков, В.М.** Статистическое управление биопроизводством / В.М. Востоков, Е.Г. Ивашкин // Стандарты и качество. 2006. № 5. С. 42-44.
 6. **Востоков, В.М.** Оценка экологического риска биопроизводства / В.М. Востоков, В.М. Смирнова, Г.Л. Дегтяренко // Тр. НГТУ им. Р.Е. Алексеева. 2011. № 1(86). С. 243-251.
 7. **Василов, Р.Г.** Биоэкономика как следующий шаг развития – шанс для России // Вестник биотехнологии и физико-химич. биологии им. Ю.А. Овчинникова. 2010. № 4. С. 28–32.
 8. **Тарасов, М.Ю.** Генетически модифицированные организмы: “за” и “против”. Существует ли угроза безопасности России? / М.Ю. Тарасов [и др.] // Химическая и биологическая безопасность. 2004. №3-4. С. 3-7.
 9. Востоков, В.М. Аналитический контроль содержания протеинов в продукции предприятий микробиологического синтеза кормового белка / В.М. Востоков, Е.Г. Ивашкин, В.Р. Карташов // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. 2007. Т. 73. №3. С.21-24.
 10. Бейер, Е.М. Некоторые данные о применимости метода Лоури в зависимости от условий определения белка. / Е.М. Бейер // Лабораторное дело. 1976. № 10. С. 590 –595.
 11. Пат. №2413941 от 10.04.11. Способ определения генно-модифицированных нуклеотидов в кормовых дрожжах / Востоков В.М., Смирнова В.М., Дегтяренко Г.Л.; заявка от 21.08.2009.

*Дата поступления
в редакцию 03.07.2012*

V.M. Vostokov, S. Plochov, V.R. Cartashov

INDUSTRIAL CONTROL FEATURES ECOANALYTICAL BIO

Nizhny Novgorod state technical university n.a. R.E. Alexeev

Specific features of ekoanalytical control and diagnostics of industrial biomaterials which should be considered at creation of a complex control system by quality of bioproduction and in an assessment of ecological risk of bioproduction are revealed. The original and available way of an aprioristic assessment of genetic risk of fodder yeast of microbiological production is offered.

Key words: quality of bioproduction; control of industrial biomaterials; system of quality; ecological risk of bioindustrie.