

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
**«БЕЛГОРОДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**
(**Н И У « Б е л Г У »**)

ИНСТИТУТ ИНЖЕНЕРНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ И ЕСТЕСТВЕННЫХ НАУК
Кафедра биотехнологии и микробиологии

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ ГЛЮКОЗЫ НА РОСТ И РАЗВИТИЕ *CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM*

Выпускная квалификационная работа
студентки очной формы обучения
направления подготовки 19.03.01 Биотехнология
4 курса группы 07001316
Константиновой Алисы Александровны

Научный руководитель
Ассистент кафедры
биотехнологии и
микробиологии
Клюева В.В.

БЕЛГОРОД 2017

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	3
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	5
1.1. Семейство <i>Corynebacteriaceae</i>	5
1.1.1. <i>Corynebacterium glutamicum</i>	6
1.2. Получение лизина.....	9
1.2.1. Характеристика лизина.....	9
1.2.2. Получение лизина с помощью растений.....	12
1.2.3. Использование лизина в пищевых добавках, лекарственных препаратах и БАВ	15
1.3. Питательные среды.....	16
1.3.1. Углеродные компоненты питательных сред. Углеводы	18
1.3.2. Источники углеродного питания для производственных штаммов	20
1.3.3. Минеральные компоненты питательных сред. Макроэлементы.....	24
1.3.4. Биофакторы роста.....	25
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	28
2.1. Объект исследования.....	28
2.2. Методы исследования.....	30
2.2.1. Методы микроскопического исследования микроорганизмов.	33
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	35
3.1. Обработка результатов	35
3.1.1. Методы обработки результатов	35
3.2. Результаты исследования.....	37
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	40
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	41
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	45

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы на территории РФ получение аминокислот становится все более востребованным. Это в большей степени связано, прежде всего, с активным развитием животноводства. Последние исследования в области здравоохранения говорят о том, что людям недостает незаменимых аминокислот в употребляемой пище, в частности, на здоровье сказывается нехватка лизина.

Лизин – незаменимая аминокислота, которая входит в состав белков. Лизин необходим для роста и восстановления тканей, производства гормонов, антител, ферментов и альбуминов. Так же лизин оказывает противовирусное воздействие на организм (ослабляет вирус герпеса). Последние исследования на животных показали поразительные результаты: при недостатке лизина провоцируются иммунодефицитные состояния. Дефицит лизина неблагоприятно сказывается на синтезе белка, что приводит к утомляемости, слабости, плохому аппетиту, снижению массы тела, угнетению роста, пониженной концентрации внимания, анемии, потере волос и проблемам в репродуктивной системе. Кроме того, лизин в сочетании с пролином и витамином С предупреждает появление липопротеинов низкой плотности, которые вызывают закупорку сосудов, из чего следует, что лизин будет хорошей профилактикой при сердечнососудистых заболеваниях.

Сейчас все большую популярность приобретает получение аминокислот с помощью микроорганизмов. Микробиологический синтез аминокислот экономически выгоден и наиболее перспективен. Более 60% всех получаемых в настоящее время высокоочищенных препаратов аминокислот получают именно таким способом. Промышленное получение аминокислот стало возможным, когда открыли способность некоторых бактерий выделять в субстрат, значительное количество какой-либо аминокислоты. При этом было подмечено, что высокопродуктивные штаммы

посредством селекции и направленного мутагенеза можно улучшить и значительно изменить их генетическую программу. В результате можно получить штамм сверхпродуцент «полезной» аминокислоты.

Целью выпускной квалификационной работы является изучение влияния различных концентраций глюкозы на рост и развитие штамма-продуцента лизина *Corynebacterium glutamicum* В-11167.

В соответствии с поставленной целью необходимо решить следующие задачи:

1. Изучить влияние концентрации глюкозы на скорость размножения *Corynebacterium glutamicum* В-11167

2. Выявить оптимальную концентрацию глюкозы для *Corynebacterium glutamicum* В-11167

Объект исследования: штамм-продуцент лизина *Corynebacterium glutamicum* В-11167.

Предмет исследования: влияние концентрации глюкозы на рост *Corynebacterium glutamicum* В-11167

Актуальность: в связи с развитием микробного синтеза и получением ценных веществ появилась необходимость изучить все особенности штаммов продуцентов для последующих изменений, как самого штамма продуцента, так и рецептуры, чтобы добиться максимально выхода аминокислот.

Структура работы: дипломная работа состоит из введения, трех глав, заключения, списка использованной литературы и приложения.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Семейство *Corynebacteriaceae*

Семейство *Corynebacteriaceae* включает в себя род *Corynebacterium*, с более чем 80 видами, и моноспецифичный род *Turicella*. Сходство последовательностей гена 16S rRNA между некоторыми видами *Corynebacterium* ниже 92%, в то время как сходство *Turicella otitidis* с некоторыми видами *Corynebacterium* выше, чем 92%. Филогенетические расчеты, основанные на последовательности 16S rRNA [34] объединили *Turicella otitidis* с родом *Corynebacterium*. Большинство видов *Corynebacterium* содержат миколовые кислоты, однако *Corynebacterium amycolatum*, *Corynebacterium atypicum*, *Corynebacterium caspium*, *Corynebacterium ciconiae*, *Corynebacterium kroppenstedtii*, и *Turicella otitidis* испытывают недостаток в этом веществе [30]. Длина миколовых кислот, обнаруженных в штаммах, варьируется между 22 и 38 атомами углерода, но обычно только один или два вида миколовых кислот преобладают [31]. *Corynebacterium bovis* содержит большинство миколовых кислот, включающих в себя 28 атомов углерода и единственную двойную связь, хотя два представителя рода содержат большую часть миколовых кислот с 24 атомами углерода и одной двойной связью. Как и другие члены порядка *Corynebacteriales*, жирнокислотный состав представителей семейства *Corynebacteriaceae* в основном состоит из ненасыщенных и насыщенных неразветвленных кислот с C16:0 и C18:1 ω9 с преобладают, хотя некоторые виды содержат также туберкулостеариновую кислоту, в том числе *C. ammoniagenes*, *C. bovis*, *C. cystitidis*, *C. minutissimum*, и *C. pilosum*, *C. kroppenstedtii*, *C. terpenotabidum*, *C. urealyticum*, и *C. variabilis*.. Пептидогликан имеет A1 γ типа с характерной кислотой диаминопимелиновой кислоты. Члены семьи *Corynebacteriaceae* встречаются в различных средах. Некоторые виды используются в промышленности и

производстве продуктов питания, в то время как другие виды являются серьезными патогенами для людей или домашних животных. Некоторые виды *Corynebacterium*, как правило, связанные с животными, также были задокументированы как причина инфекции человека. Виды *C. diphtheriae*, *C. ulcerans* и *C. pseudotuberculosis* являются единственными видами, которые могут производить мощные экзотоксины - дифтерийный токсин и фосфолипазу D, которые оба играют значительную роль в патогенности[34].

1.1.1. *Corynebacterium glutamicum*

Описание и значение:

Corynebacterium glutamicum - небольшие, неподвижные Грам-положительные почвенные бактерии. Физически, это палочкообразная бактерия, конец которой схож с булавой. Бактерии не производят спор. Содержат каталазу и в процессе метаболизма ферментативно используют ее для разрушения углеводов[32]. Впервые бактерия была открыта в Японии в 1950-х годах, и это имело особое значение для биотехнологии [29]. Другая причина для исследователей секвенировать этот геном – бактерия является хорошей моделью для понимания других родов в том же монофилетическом таксоне[31].

Генетическая структура:

C. glutamicum имеет кольцевую хромосому и плазмиду. Геном состоит из 3,314,179 нуклеотидов. Этот геном был взят у штамма дикого типа *C. glutamicum* ATCC 13032. Она так же имеет кольцевую хромосому, pCGR1, которая имеет 49,120 нуклеотидов[27].

Клеточная структура и метаболизм:

C. glutamicum разрушает углеводы в процессе ферментации. Может использовать углерод из множества различных источников, которые имеют

несколько ароматических колец [28]. Из-за различий в доступности питательных веществ и источников углерода, *C. glutamicum* имеет 127 белков, ассоциированных с регуляторной функцией в транскрипции, которая, в свою очередь контролирует метаболизм. Из структуры *C. glutamicum* следует, что клеточная стенка бактерии является ее самой уникальной частью. Кроме слоя пептидогликана, клеточная клетка содержит короткие последовательности миколовых кислот, наряду с парой других необычных липидов (мезо-диаминопимелиновой кислоты и арабино-галактановой полимеров) [32].

Посредством своего метаболизма *C. glutamicum* синтезирует такие вещества как серин, глутамат, и лизин, каждая из этих аминокислот используется в самых разных областях, таких как фармацевтика.

Экология:

C. glutamicum делает огромный вклад в окружающую среду, так как она может быть использована в биоремедиации таких веществ как мышьяк [31]. Исследования также направлены на использование *C. glutamicum* для получения биоразлагаемого пластика.

Патология:

C. glutamicum не является патогенной бактерией, хотя родственный вид, *C. diphtheriae* является патогенным и вызывает дифтерию у людей посредством продуцирования сильного экзотоксина. Это обычно, поддается лечению с помощью антитоксинов, анатоксинов и антибиотиков.

Применение в биотехнологии:

Некоторые характеристики *C. glutamicum* могут использоваться в биотехнологии. Бактерия не патогенна, не образует спор, растет быстро, не требует специальных условий для роста, не имеет внутриклеточной секреции протеазы, и имеет относительно стабильный геном [31].

C. glutamicum продуцирует несколько полезных соединений и ферментов. Она была впервые обнаружена как продуцент глутамата. Сейчас бактерия используется для получения аминокислот, таких как лизин, треонин, и изолейцин, а так же витаминов как пантотенат – витамин В5[26].

Другим возможным использованием *C. glutamicum* является биоремедиация, например от мышьяка. *C. glutamicum* содержит два оперона в своем геноме: *ars1* и *ars2* опероны, которые устойчивы к мышьяку. С дальнейшими экспериментами, исследователи надеются, в конце концов, использовать бактерию для очистки окружающей среды от мышьяка [31].

Текущие исследования:

Из-за полезных характеристик *Corynebacterium*, большинство исследований направлены на модификацию бактерии, чтобы сделать ее еще более полезной.

Одним из таких путей является создание биосинтетического пути, для получения поли(3-оксибулата), полиэфира, который может быть использован для создания биоразлагаемого пластика. Плазмиды были вставлены в *C. glutamicum*, включая плазмиды экспрессии, что при определенных условиях создаст поли(3-оксибулат). Этот эксперимент был также проделан с *E. coli*. Результаты показали, что созданный поли(3-оксибулат) незначительно отличался в своих свойствах и показатель П(ЗОб) у *E. coli* был выше. Однако клетки *C. glutamicum* имели плотность в четыре раза выше, и это делает бактерию более эффективным продуцентом эфира. Дальнейшие исследования направлены на более точную настройку самого процесса и попытку изменить свойства полученного полиэфира еще больше [27].

Другое направление исследований *C. glutamicum* - как увеличить выход L-глутаминовой кислоты, который ежегодно производится в размере 1.5 миллиона тонн. Один из путей - избавиться от CO₂, что приведет к увеличению продукции L-глутаминовой кислоты. Для этого использовали

фосфокетолазу, чтобы обойти путь по которому, как правило, синтезировался CO₂. Выход L-глутаминовой кислоты был увеличен на 9%, по весу и производительности увеличился на 10%, это означает, что метод был успешным. Этот метод может развиваться дальше, также для увеличения производства других аминокислот, получаемых с помощью *C. glutamicum* [25].

В смежной области исследований, другая группа исследователей пытается получить L-серин с помощью *C. glutamicum*. Так как серин используется в фармацевтических целях и около 300 тонн производится ежегодно, существует большой интерес к исследованию его производства. Одним из внутриклеточных процессов ингибирования продукции L-серина является энзим, который называется серин гидрометилтрансфераза (СГМТ), чья активность может контролироваться 5,6,7,8-тетрагидрофолатом (ТГФ). Удаляя гены для синтеза ТГФ, *C. glutamicum* нуждается во внешнем источнике фолиевой кислоты, но использование СГМТ контролировалось. Это привело к более высокому выходу L-серина[33].

1.2.Получение лизина

1.2.1.Характеристика лизина

Лизин – аминокислота, которая относится к незаменимым аминокислотам, так как она не синтезируется в организмах человека и животных. Эта аминокислота жизненно важна для построения критических белков организма. Лизин входит в группу аминокислот, которые особенно учитываются при определении общей полноценности питания (лизин, триптофан, метионин). Аминокислота известна в виде двух оптически активных D и L-формах. Природный L-лизин хорошо растворим в воде,

кислотах, основаниях. Он выделен в 1889 г. Дрекселем из гидролизата казеина. В 1902 г. был осуществлен синтез лизина Вайгертом и Фишером. Нехватка лизина в зерновых продуктах и довольно высокая потребность организма в нем ставят проблему лизина на одно из первых мест. Экспериментально доказано, что при недостатке лизина в рационе молодых крыс - их рост прекращается. Животным и птице лизин нужен для регуляции обмена азота, углеводов, а так же для синтеза каллогена, нуклеотидов. Он способствует быстрому росту молодых особей, интенсивному использованию кормов, образованию пигмента меланина в оперении птицы, влияет на нормальное формирование эритроцитов и отложение в костях кальция, участвует в ОВР, активизирует переаминирование и дезаминирование аминокислот, способствует усвоению фосфора и кальция.

Во всех обычно применяемых в свиноводстве кормовых рационах лизин по важности опережает все другие аминокислоты. Для птицы, нуждающейся в метионине для образования перьевого протеина, лизин является второй по важности аминокислотой.

Наибольшую ценность по содержанию лизина представляют сычужные сыры и творог.

Физические и химические свойства лизина

L-лизин (Lys) является представителем диаминомонокарбоновых кислот. Его молекулярная масса равняется 146,19.

L-лизин кристаллизуется в виде бесцветных игл или гексагональных пластинок и плавится с разложением при температуре 224-225°C. Хорошо растворим в воде, в кислотах и основаниях, трудно растворим в спирте и нерастворим в эфире.

В молекуле лизина α -атом углерода асимметричен, то есть все четыре группы, с которыми он связан, различны. Поэтому молекула лизина может

существовать в форме двух конфигураций, зеркально противоположно ориентированных в пространстве, вследствие чего она обладает оптической активностью, выражающейся в способности вращать плоскость поляризованного света. Изомер, вращающий плоскость поляризованного света вправо, называется правовращающим (D-лизин), а вращающий влево - левовращающим (L-лизин). Если оба изомера присутствуют в смеси в равных количествах, правое и левое вращения взаимно уничтожаются. Такие смеси называются рацемическими. Все природные аминокислоты, в том числе и лизин, являются L-аминокислотами[6,11]

Аминокислоты проявляют свойства оснований за счет аминогрупп и свойства кислот за счет карбоксильных групп, то есть являются амфотерными соединениями. Молекулы аминокислот в растворах существуют в виде внутренних солей, которые образуются за счет переноса протона от карбоксила к аминогруппе. Электрохимические свойства лизина в растворах определяются величиной рН. Лизин можно рассматривать как трехосновную кислоту, диссоциирующую в три ступени. При рН 7 боковой радикал лизина вносит дополнительный положительный заряд в общий заряд молекулы.

Благодаря наличию карбоксильной и аминных групп, лизин может участвовать в специфических химических реакциях. Он образует соли, сложные эфиры, гидразиды, азиды, тиоэфиры, галогенатгидриды. Например, с соляной кислотой лизин образует гидрохлориды с температурой плавления 263-264 °C .

Жизненно важными для человека являются реакции образования пептидов и белков с участием лизина [7, 12, 13, 17].

1.2.2. Получение лизина с помощью растений

Запасные белки, которые служат источниками углерода и азота прорастающих семян, состоят из ограниченного повторяющегося набора аминокислот. Пищевая ценность этих белков невелика, поскольку в них отсутствуют одна или несколько незаменимых аминокислот (обычно лизин или метионин)[23]. Аминокислотный состав запасных белков семян можно немного изменить обычным скрещиванием, а недавно для этих целей были использованы генно-инженерные методы.

В одном из предварительных экспериментов в растения табака был введен ген фазеолина из фасоли, кодирующий запасной белок, который состоит из самых разных аминокислот. Ген эффективно экспрессировался, а белковый продукт доставлялся в нужный компартмент. Кроме того, специфически изменив *in vitro* нуклеотидную последовательность генов запасных белков семян, можно было синтезировать белок с нужным аминокислотным составом. Если аминокислотные замены происходят вблизи гипервариабельной области С-концевого участка молекулы, то ее структура не нарушается. Правильная укладка цепи остается и при прорастании семян.

Чтобы увеличить содержание лизина в семенах, была предпринята попытка нарушить регуляцию его биосинтеза. Аминокислоты лизин, треонин, метионин и изолейцин синтезируются из аспартата (рис.1.2.2.) в несколько этапов. Первый этап состоит в фосфорилировании аспартата аспартаткиназой (АК) с образованием β -аспартилфосфата. Далее, при биосинтезе лизина, происходит конденсация аспарагинового β -полуальдегида с пировиноградной кислотой, катализируемая синтазой дигидролипиколиновой кислоты (DNDPS). Регуляция обеих ферментативных активностей (АК и DNDPS) осуществляется с помощью лизина по принципу обратной связи, которую нужно разорвать, чтобы синтез лизина ничем не ограничивался. Для этого использовали гены DNDPS и АК, не

чувствительные к ингибированию лизином, из *Corynebacterium* и *E. coli* соответственно. К каждому из этих генов «пришивали» нуклеотидную последовательность, кодирующую лидерный пептид, транспортирующий белки в хлоропласты, снабжали каждый из генов семяспецифичным промотором и вводили их в растения канолы и сои в составе бинарного вектора на основе T1-плазмид (рис. 1.2.2.). В семенах трансгенных растений содержалось в 100 раз больше свободного лизина, чем в семенах обычных растений; при этом содержание лизина во всех белках семян канолы было в два раза больше, а в белках сои - в пять раз.

Когда кукуруза используется в качестве корма для скота, к ней добавляют соевую муку и очищенный лизин. Однако вместо того чтобы использовать дорогостоящий лизин, можно добавлять к кукурузе дешевую соевую муку, полученную из трансгенных растений сои, которые синтезируют в больших количествах лизин. Возможно, используя этот подход, успешно примененный на сое, удастся вывести сорт кукурузы, в семенах которой повышено содержание лизина. Такая кукуруза имела бы большую пищевую ценность [9].

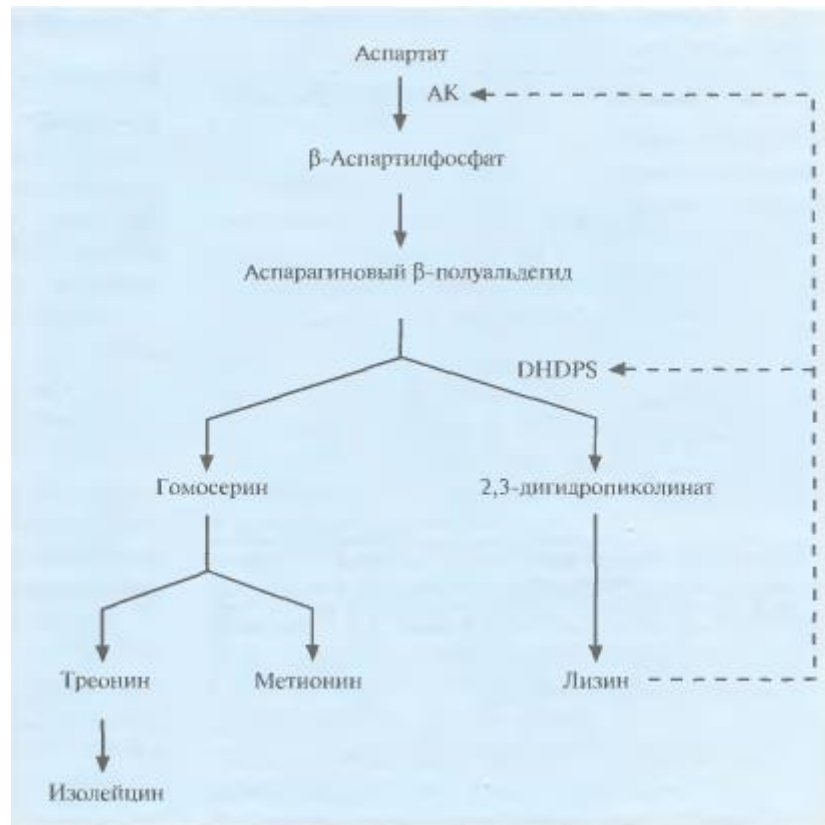


Рис.1.2.2. Схема биосинтеза аминокислот производных аспартата (здесь представлены не все реакции и промежуточные продукты). Штриховыми стрелками показано ингибирование по принципу обратной связи. DHDPS –синтаза дигидродипиколиновой кислоты. АК - аспараткиназа.

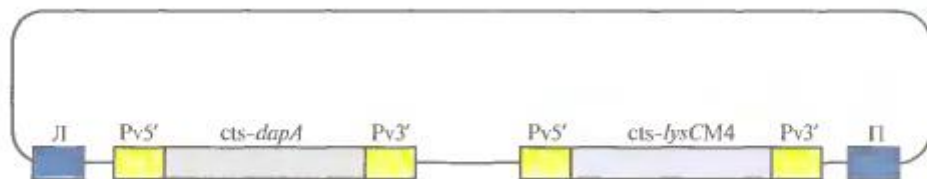


Рис. 1.2.2. Тi-плазмидный вектор, использующийся для трансформации сои и канолы с целью повышения содержания лизина в этих растениях. Pv5' - промотор гена β-фазеолина бобов, Pv3' - сигнал терминации транскрипции гена β-фазеолина бобов, cts - последовательность, кодирующая сигнальный хлоропластный пептид малой субъединицы рибулозобисфосфат-карбоксилазы, dapA - ген *Corynebacterium*, кодирующий синтазу лигидродипиколиновой кислоты, не чувствительной к лизину, lysCM4 мутантный ген lysC *E.coli* кодирующий не чувствительную к лизину аспараткиназу, Л и П - левая и правая фланкирующие последовательности Т-ДНК соответственно.

1.2.3.Использование лизина в пищевых добавках, лекарственных препаратах и БАВ.

Введение лизина в пищу человека повышает ее питательную ценность. Так, в Японии и ряде других стран, детские завтраки в системе общественного питания готовятся с добавлением лизина. Лизин используется как добавка, увеличивающая питательную ценность хлеба. Его добавляют в муку в количестве 0,2-0,3%. Хлеб с добавками L-лизина производится в Индии, США, Японии. Лизин является важнейшей незаменимой аминокислотой, потери которой в процессе метаболизма не восполняются. Кроме того, лизин, поступающий с пищевыми продуктами, частично инактивируется в процессе технологической или кулинарной обработки. Например, сухое молоко содержит на 20% меньше лизина, чем свежее. Лизин связан с метаболизмом кальция - присутствие лизина способствует всасыванию кальция из кишечника и отложению его в костях.

При достаточно высокой общей калорийности питания дополнительная добавка лизина приводит к существенному увеличению мышечной массы, особенно физически нагружаемых мышц. В присутствии достаточного количества лизина, организм вырабатывает карнитин, способствующий лучшей утилизации жировых тканей. Лизин лучше реутилизируется тканями, чем другие аминокислоты.

Форма обогащения лизином не влияет на скорость всасывания его из кишечника. Биологическая ценность пшеничной муки повышается в одинаковой степени, как от добавления свободного лизина, так и от добавления богатого лизином белка(4,5).

Также отмечен положительный опыт применения L-лизина эсцината при острых нарушениях мозгового кровообращения, черепно-мозговой и позвоночно-спинномозговой травме неврологами Украины[9,6,3].

1.3. Питательные среды

Питательные среды – это необходимые субстраты для выращивания микроорганизмов.

Они так же являются основой микробиологической работы. Результаты всего исследования в первую очередь определяет качество сред. Их особая ценность состоит в способности создания оптимальных условий для выращивания микроорганизмов.

Среды должны быть:

1) питательными, т. е. иметь в своем составе легкоусвояемые питательные элементы, чтобы максимально удовлетворить все потребности микроорганизмов. Минеральные вещества не только входят в структуру клетки и активизируют ферменты, но и определяют физико-химические свойства сред. Так же при культивировании некоторых микроорганизмов в питательные субстраты добавляют биофакторы роста — витамины, некоторые аминокислоты, которые клетка сама не синтезирует;

2) иметь оптимальную концентрацию водородных ионов — только при оптимальной реакции среды, влияющей на проницаемость оболочки, микроорганизмы могут усваивать питательные вещества.

3) быть изотоничными или иметь такое осмотическое давление в среде как и внутри клетки.;

4) быть стерильными, так как посторонние микробы препятствуют росту изучаемого микроба, определению его свойств и изменяют свойства среды

5) плотные среды должны быть достаточно влажными и иметь оптимальную консистенцию;

6) обладать определенным соотношением веществ, отдающих и принимающих электроны, выражаемым индексом RH_2 . Этот потенциал

показывает насыщение среды кислородом. Для одних микроорганизмов нужен высокий потенциал, для других — низкий.

7) быть унифицированным, т. е. содержать постоянные количества отдельных ингредиентов.

Желательно, чтобы среды были прозрачными — так удобнее следить за ростом культур, легче обнаружить загрязнение.

Классификация сред

1. Исходные компоненты. По исходным компонентам различают натуральные и синтетические среды. Натуральные среды готовят из продуктов животного и растительного происхождения. Синтетические среды готовят из определенных химически чистых органических и неорганических соединений, взятых в точно указанных концентрациях и растворенных в дважды дистиллированной воде. Важное преимущество этих сред в том, что состав их постоянен (известно, сколько и какие вещества в них входят), поэтому эти среды легко воспроизводимы.

2. Консистенция (степень плотности). Среда бывает жидкие, плотные и полужидкие. Плотные и полужидкие среды готовят из жидких веществ, к которым для получения среды нужной консистенции прибавляют обычно агар-агар или желатин. Кроме того, в качестве плотных сред применяют свернутую сыворотку крови, свернутые яйца, картофель, среды с силикагелем.

3. Состав. Среда разделяют на простые и сложные. К первым относят мясопептонный бульон (МПБ), мясопептонный агар (МПА), бульон и агар Хоттингера, питательный желатин и пептонную воду. Сложные среды готовят, прибавляя к простым средам кровь, сыворотку, углеводы и другие вещества, необходимые для размножения того или иного микроорганизма.

4. Назначение:

- а) основные (общеупотребительные) среды служат для культивирования большинства патогенных микробов;
- б) специальные среды служат для выделения и выращивания микроорганизмов, не растущих на простых средах;
- в) элективные (избирательные) среды служат для выделения определенного вида микробов, росту которых они благоприятствуют, задерживая или подавляя рост сопутствующих микроорганизмов[18].

В нашем эксперименте мы будем использовать элективную среду LB или Lysogeny broth. Среда LB стала стандартом для выращивания культур *Escherichia coli* с 1950-х годов[20,17].

1.3.1. Углеродные компоненты питательных сред. Углеводы

Полисахариды складываются из мономеров, называемых моносахаридами, а их молекулы составляют цепочки, скомпонованные из этих моносахаридных частей, которые связаны через атом кислорода[7,8].

Полисахариды могут быть из нескольких видов или одного типа моносахаридов, и в зависимости от этого полисахариды делят на гомо- и гетерополисахариды. К самым известным из них причисляют гексозы — галактоза, пентозы — арабиноза, ксилоза, а так же маннозу и глюкозу. Кетозные полисахариды появляются не так часто как альдозы. Повсеместны 6-дезоксигексозы — 2-аминосахара, фукоза и рамноза — глюкозамин, галактозамин, наравне с ними нейраминовая и уроновые кислоты. Вместе с тем, немало поликонденсированных мономеров включают в себя заместители неуглеводной природы — остатки фосфорной, серной кислот, органических кислот, чаще уксусной. Неоднородные биополимеры помимо углеводной части могут включать липидную или белковую составляющие.

Полисахариды содержат большую часть массы органического вещества на нашей планете[26,27].

Поликонденсированные моносахариды составляют основную массу сухого веса высших наземных растений и водорослей; немного меньшее, хотя и довольно ощутимое количество полисахаридов реализовывает скелетные функции, снабжая клетки и их агрегаты жесткостью. К таким полисахаридам относят целлюлозу и хитин — два наиболее изобилующих в мире органически натуральных вещества. Целлюлоза представляет собой основной структурный материал растений, хотя продуцировать ее способны некоторые бактерии и беспозвоночные. Хитин определяется как основной компонент скелета членистоногих, а также содержится в составе клеточных стенок грибов. В устройстве растительных клеточных стенок участвует и другие полисахариды: маннаны грибов, гемицеллюлозы и пектиновые вещества высших растений. Морские водоросли сильно различаются полисахаридным составом своих клеточных стенок от наземных растений что, безусловно, является следствием их специфических условий. Отличительными частями морских водорослей являются поликонденсированные моносахариды, этерифицированные серной кислотой,— агар, каррагинин, фукан, галактаны и ряд еще более сложных сульфатов гетерополисахаридов[23].

Другой ключевой функцией полисахаридов является исчерпание их живыми клетками в виде энергетических резервов, при надобности трансформируемые в моносахариды, которые являются непосредственным источником энергии. К вспомогательным питательным веществам приписывают свойства крахмалоподобных полисахаридов — амилозы и амилопектина, которые составляют крахмал высших растений, и гликогена животных, а также ряда низших растений. Несколько в меньшей степени распространены фруктаны, продуцируемые бактериями и высшими растениями.

К сожалению, биологическая роль большей части полисахаридов до настоящего времени не установлена. Внеклеточные (капсулярные) поликонденсированные моносахариды бактерий, видимо, предохраняют клетки от негативных воздействий внешней среды. Мукополисахариды животных помимо образования стенок клеток или соединения клеток друг с другом, они самым тесным образом согласованы со всеми видами движения частей тела, где они являются «смазочным материалом»[14].

1.3.2. Источники углеродного питания для производственных штаммов-продуцентов лизина

По отношению к источникам углерода микроорганизмы делят на две большие группы — автотрофы и гетеротрофы.

Автотрофы преобразовывают не содержащую никакой энергетической ценности углекислоту, где углерод пребывает в особо окисленной форме, в изобилующие энергией органические соединения собственной клетки. Для восстановления CO_2 до уровня органических компонентов клетки они расходуют различные энергетические ресурсы. В соответствии энергетических источников автотрофы делят на: литотрофы и фототрофы.

Гетеротрофы не могут извлекать необходимую энергию для ассимиляции углерода из CO_2 путем окисления минеральных веществ или солнечного света и поэтому они остро нуждаются в готовых органических соединениях, которые они используют и как источник углерода, и как источник энергии. Среди них есть такие, которые могут потреблять всего один органический субстрат и строить из него все метаболиты собственной клетки, и есть организмы, испытывающие потребность в широком наборе углеводов, готовых аминокислот и дополнительных факторов роста в виде сложных органических субстратов [17].

Ауксотрофные бактериальные штаммы производят биосинтез лизина на питательных субстратах, непременно содержащих доступный источник углерода, который требуется как для образования структуры молекулы лизина, так и конструктивного и энергетического обмена. Концентрация углеводных компонентов находится в зависимости от характеристик штамма-продуцента, от утвержденных технологических решений, от массообменных характеристик поставленной на службу техники и т.д. Хронология, в которой штамм-продуцент выделяет и использует углеродсодержащие молекулы из питательных сред, является одной из главных характеристик данного штамма-продуцента. Ферменты, которые принимают участие в концентрировании нужного вещества, продуцируются тогда, когда клетке это необходимо [2,3].

Родственность микроорганизмов - продуцентов мономеров белков к некоторым углеводам и трансформация биосинтетической активности, при участии этих соединений, хорошо исследована. При выращивании продуцента лизина на питательной среде из смеси глюкозы, рамнозы, ксилозы, галактозы и маннозы наблюдается детерминированная последовательность ассимиляции моносахаров. В первую очередь ассимилируются глюкоза. Когда ее остаток в среде приближается к концентрации 0,6% , культура начинает ассимилировать ксилозу и маннозу. Манноза расходуется полностью, ксилоза – на 60-75%. Последними ассимилируются рамноза и галактоза, причем не полностью [3,7].

Текущие крупнотоннажные производства, взявшие за основу микробиологический синтез, к которым относится и производство лизина, используют наиболее часто глюкозу, сахарозу, уксусную кислоту или мелассу.

Глюкоза, мол. м. 180,6; моносахарид сладкого вкуса, относящийся к группе альдогексоз.. Ее остаток входит в состав многих. Олигосахаридов

(сахарозы, лактозы и др.), полисахаридов (крахмала, целлюлозы и др.), гликопротеинов, гликолипидов, липополисахаридов, гликозидов и производных нуклеотидов. Глюкоза — важный показатель углеводного обмена. Большую часть энергии, которую расходуют микроорганизмы, образуется за счет окисления глюкозы. Глюкоза является основным и наиболее универсальным источником энергии для обеспечения метаболических процессов. Транспорт глюкозы из внешней среды внутрь живой клетки осуществляется путём активного трансмембранного переноса с помощью особой белковой молекулы — переносчика (транспортёра) гексоз.

Глюкоза кристаллическая ГОСТ 975-88

Глюкоза представляет собой белое кристаллическое вещество сладкого вкуса, растворимое в воде и органических растворителях.

Этот продукт должен содержать:

- воды не более 9 %,
- зольных веществ не более 0,07%, в том числе железа не более 0,004%
- редуцирующих веществ не менее 99,5%.

Одним из основных товарных форм глюкозы, используемой в промышленном производстве лизина, является глюкозный сироп, полученный из крахмалсодержащего сырья. Наиболее экономически оправданной схемой для нашего региона является получение 70 % глюкозного сиропа из пшеничного крахмала. Точная характеристика данного продукта будет определена на стадии разработки процесса глубокой переработки зерна. Качественная характеристика глюкозного сиропа определяется принятыми технологическими решениями и используемым оборудованием[12].

Уксусная кислота ГОСТ 61-75

- содержание уксусной кислоты в продукте не менее 60%

- содержание муравьиной кислоты не более 1%.

Уксусная кислота является перспективным источником углерода для промышленного биосинтеза лизина, поскольку промышленность освоила достаточно эффективный способ ее производства. Многие микроорганизмы способны использовать уксусную кислоту в качестве единственного источника углерода или дополнительного источника_ на средах содержащих другой источник. Использование микроорганизмов из рода *Brevibacterium* синтезирующих лизин показал, что уксусная кислота в концентрации до 1,5 % объема питательной среды не оказывает отрицательного воздействия на рост продуцентов. Биосинтез аминокислот начинает ингибироваться при концентрации выше 2,5 % [3]. Масштабное применение данного вида углеводного сырья ограничивается техническими требованиями к используемому оборудованию.

Меласса ГОСТ Р5230 У-2005 - представляет собой нестандартный побочный продукт сахарной промышленности.

- содержание сухих веществ- не менее 75%

- содержание редуцирующих веществ не менее 44%

В состав мелассы входят многие аминокислоты, например глутаминовая, аспарагиновая, изолейцин, тирозин, лейцин, а так же витамины группы В- биотин, тиамин, рибофлавин, инозит, никотиновая и пантотеновая кислоты, их которых особенно важное значение в микробиологическом синтезе имеет биотин[10].

Сахар ГОСТ 5833-75

Свекловичный сахар или сахароза, тростниковый сахар, в быту просто - сахар, состоящий из двух моносахаридов— α -глюкозы и β -фруктозы.

Формула $C_{12}H_{22}O_{11}$. Молекулярная масса 342,3. Растворимость (грамм на 100 грамм): в воде 179 (0°C) и 487 (100°C), в этаноле 0,9 (20°C) Плотность 1,5879 г/см³ (15°C)

Сахароза является весьма распространённым в природе дисахаридом, она встречается во многих фруктах, плодах и ягодах. Особенно велико содержание сахарозы в сахарной свекле и сахарном тростнике, которые и используются для промышленного производства сахара.

Сахароза имеет высокую растворимость. В химическом отношении сахароза довольно инертна, т.к. при перемещении из одного места в другое почти не вовлекается в метаболизм. Иногда сахароза откладывается в качестве запасного питательного вещества[6,8,9].

1.3.3. Минеральные компоненты питательных сред.

Макроэлементы

Как мы видим из химического состава микроорганизмов, представленного в таблице 1.3.3., самыми важными элементами являются: углерод, кислород, водород, азот, фосфор, сера, на их долю следует до 95% от веса сухих клеток

Таблица 1.3.3

Усредненный элементный состав микробной клетки

№ п/п	Элемент	Содержание, % от сухого вещества	№ п/п	Элемент	Содержание, % от сухого вещества
1.	Углерод	50	7.	Калий	1
2.	Кислород	20	8.	Натрий	1
3.	Азот	14	9.	Кальций	0,5

4.	Водород	8	10.	Магний	0,5
5..	Фосфор	3	11.	Хлор	0,5
6.	Сера	1	12.	Железо	0,2
			13.	Все остальные элементы	~ 0,3

Эти элементы являются важнейшими, по тем функциям, которые они совершают, из чего следует, что, в первую очередь они необходимы для микроорганизмов. Исключением является натрий. Вопреки тому, что он часто и в приличных количествах выявляется в минеральном остатке бактерий, о его физиологической роли мало что известно.

Различное физиологическое значение имеют минеральные компоненты среды. Влияние на физико-химическое состояние коллоидов протоплазмы является наиважнейшим их свойством. Воздействие неорганических солей на поверхностный слой клетки каждую секунду претерпевает изменения. Эти изменения влияют на скорость ферментативных реакций и на обмен веществ. В осуществлении ферментативных реакций металлы играют огромную роль. Металлы (цинк, железо, магний, марганец и др.) являются активаторами действия ферментов [12,13].

1.3.4.Биофакторы роста

Отдельные микроорганизмы растут только на среде, которая содержит ряд дополнительных компонентов, чаще всего сами микроорганизмы такие компоненты не синтезируют. Эти компоненты называют ростовые факторы, а «привередливые» микроорганизмы называют ауксотрофами (от лат. *aixilit*, помощь, + греч. *trophe*, питание). Если ауксотрофия является следствием мутации, то «дикий», или основной тип, которые не требуют

определённый фактор роста, называют прототрофным. Самые важные ростовые факторы — это витамины, пурины и пиримидины. Основные и самые востребованные для бактерий водорастворимые витамины, которые принимают участие в действии огромного количества ферментов в качестве коэнзимов. Надобность микроорганизмов во вспомогательных веществах крайне мала, то есть факторы роста не эксплуатируются в качестве пластического или энергетического материала, но они гарантируют регуляцию метаболизма.

Факторы, которые инициируют рост микроорганизмов, обычно делят на 3 категории:

Вещества, которые необходимы бактериям.

Факторы, недостаток или отсутствие оных не вызывает полной остановки роста культуры. Чаще это специфические витамины, которые включены в состав простетических групп ферментов и они требуются в очень маленьких количествах.

Факторы, которые продуцируются самими бактериями и прибавление которых в среду усиливает рост, но это условие не является обязательным.

Пусковые факторы роста выделяют в специфическую категорию. Они имеют огромное значение для инициации роста микроорганизмов. Позднее клетки культуры синтезируют все необходимые для их роста продукты самостоятельно [12,14,15].

Биофакторы роста, используемые при получении лизина

Важным фактором, определяющим биосинтез лизина гомосеринзависимыми мутантами, является концентрация треонина и метионина в среде. Эти аминокислоты необходимы для роста культуры. Высокие концентрации треонина и гомосерина ингибируют биосинтез лизина, поэтому, чтобы обеспечить высокую продуктивность биосинтеза

лизина содержание их в среде должно быть оптимальным для роста. При работе с *Corynebacterium glutamicum* на полусинтетических средах с использованием глюкозы в качестве основного субстрата, показано, что на биосинтез лизина влияние оказывает соотношение концентраций треонина и метионина в среде [4]. Более высокие концентрации треонина резко снижают выход лизина.

Влияние треонина на биосинтез лизина изучено у *Brevibacterium sp.22,(5)*. Опыты, проведенные на мелассно-кукурузной среде, содержащей 85 мг % треонина и 1,2 мг % биотина были более продуктивными и дальнейшее добавление треонина в количестве 160 мкг % привело к снижению биосинтеза лизина.

Важным биохимическим регулятором у ауксотрофных мутантов является биотин. Для получения высокого выхода лизина содержание биотина в среде должно превышать 30 мкг/л [6]. Однако при высокой концентрации биотина, если в среде много также треонина и метионина, возможно образование молочной кислоты вместо лизина.

К числу биохимических регуляторов биосинтетической деятельности *Brevibacterium sp.22* необходимо отнести также тиамин. Рост культуры и синтез лизина достаточно активно идет при содержании в среде ~ 1 мкг % тиамина[17].

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объект исследования

Объектом нашего исследования является штамм-продуцент лизина *Corynebacterium glutamicum* В-11167. Паспортные данные этого штамма представлены ниже:

1. Депонирование штамма

Штамм *C. glutamicum* В-11167 депонирован во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКМП) и имеет регистрационный номер В-11167

2. Характеристика штамма

2.1 Культурально-морфологические признаки:

-клетки овальные, размером 1,0-1,5x0,6-0,8 мкм, неподвижные, грамположительные, спор не образуют

-через 3-5 сут. роста при 30°C на МПА образуется колонии диаметром 2-4 мм, желтовато – кремовые, поверхность гладкая, форма выпуклая, край ровный, структура однородная, тестообразная.

-через 3-5 сут. роста при 30°C на глюкозо-минеральной среде Гловера, содержащей лейцин биотин и тиамин, колонии 1-2 мм, край ровный, структура однородная, консистенция тестообразная, поверхность гладкая, цвет колоний светло-кремовый. Рост штриха на этой среде через 2 сут. умеренный.

2.2. Физико-биохимические свойства:

-аэроб.

-желатин не разжижает.

-хорошо растет на глюкозе, сахарозе, мальтозе, фруктозе, маннозе, этаноле, уксусной кислоте. Не растет на ксилозе, арабинозе, лактозе, раффинозе.

-усваивает азот в форме солей аммония и мочевины. Не усваивает нитратный азот.

-растет при температуре 24-40°C . Оптимальная температура 30-32°C .

-растет на средах с рН от 6 до 8,5. Оптимальное значение рН 6,8-7,2.

-при росте в минимальной среде нуждается в биотине, тиамине и L-лейцине.

-устойчив к аналогу лизина S-(2-аминоэтил)-L-цистеину (АЭЦ)

-устойчив к стрептомицину

2.3. Генетические характеристики:

В составе ключевых генов, влияющих на уровень продукции лизина – генов аспараткиназы (*lys C*), гомосерин дегидрогиназы (*hom*), пируват карбоксилазы (*pus*) выявлены следующие мутации:

-в гене *lysC* – точечная замена в позиции нуклеотидов G835A и двойная замена в триplete TCC на GTC в позициях T949G и C951T, что ведет к замене аминокислот A279T и S317A, соответственно

-в гене *hom* – точечная замена в позиции нуклеотидов G443C, что ведет к замене аминокислоты G148A

-в гене *pus* – точечная замена в позиции нуклеотидов C136G, что ведет к замене A445G

Штамм несет мутацию устойчивости к аналогу лизина S-(2-аминоэтил)-L-цистеину (АЭЦ) и мутацию устойчивости к антибиотику стрептомицину.

3. Продуктивность штамма

Штамм *Corynebacterium glutamicum* В-11167 способен продуцировать не менее 130 г лизина с 1 л рабочего объема реактора при росте на среде, содержащей в качестве источников углерода глюкозный сироп и гидролизат глютенa.

2.2. Методы исследования

Для эксперимента мы выбрали метод качалочных колб: колбы с жидкой питательной средой ставили на качалку с 600 оборотами в минуту. В колбы к питательной среде добавили различные концентрации глюкозы: 2,5%, 5%, 7,5%, 10%. Раствор глюкозы готовили следующим образом: отмерили 50 г. глюкозы, поставили емкость с 50 г. глюкозы на технические весы и по каплям дистиллированной воды довели до 100 г. Раствор был автоклавирован при 116°C и 0,5 атм. 20 минут.

За основу исследования мы брали два разведения 1/1 000 и 1/10 000. Каждое разведение каждой концентрации имело 3 повторности. К примеру, для каждой 5% концентрации глюкозы каждой пробы мы делали 3 повторности каждого разведения: 5% 1/1 000, 5% 1/1 000, 5% 1/1 000, 5% 1/10 000, 5% 1/10 000, 5% 1/10 000. Всего 6 чашек для каждой концентрации каждой повторности 1 пробы. Следовательно, 1 проба – 24 чашки Петри.

Приготовление питательной среды

Питательные среды жидкую и твердую готовили следующим образом: триптон (пептон) – 5 г., хлорид натрия – 5 г., экстракт кормовых дрожжей – 2,5 г., сухой биотин – 1 г. (из расчета 0,2 г. сухого биотина на 100 мл. среды), агар-агар – 7,5 г. (из расчета 1,5 г. агар-агара на 100 мл. среды), дистиллированная вода – 500 мл.

Затем мы приготовили 200 мл. жидкой питательной среды (из расчета 50 мл в каждую из 4 колбочек). Триптон (пептон) – 2г., хлорид натрия – 2г., экстракт кормовых дрожжей – 1г., сухой биотин – 0,40 г., дистиллированная воды – 200 мл. После того как все смешали, среды поставили на разогретую печку до закипания. Это сделали для того чтобы некоторые сухие компоненты, такие как агар-агар и биотин, лучше растворились. Затем питательные среды были автоклавированы при температуре 116°C 20 минут, 0,5 атм.

Метод скошенного агара

Для постановки этого эксперимента требовалась суточная культура *Corynebacterium glutamicum* В-11167. Для этого мы брали чашку Петри с культурой микроорганизмов или криопробирку и методом скошенного агара пересеивали культуру для получения рабочего материала(рис.2.2.).

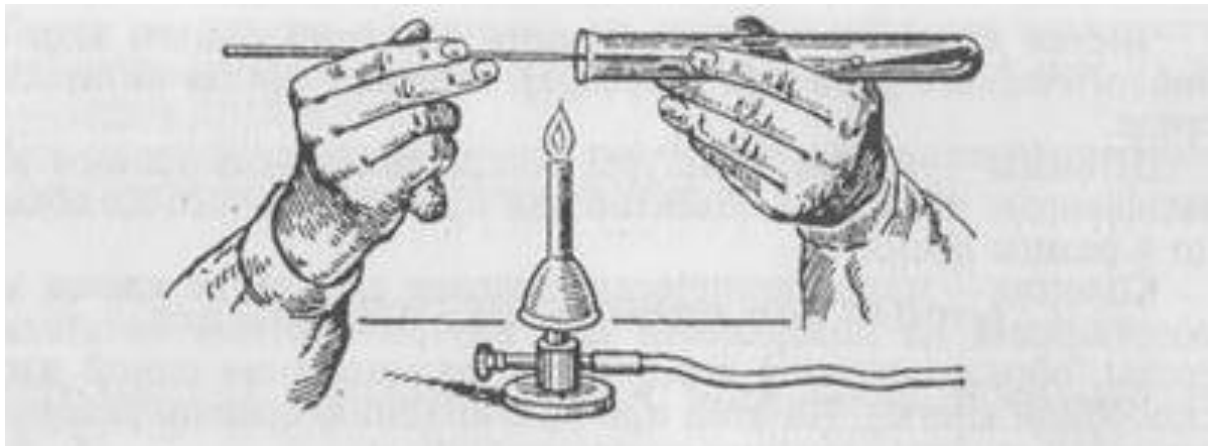


Рис.2.2. Посев микроорганизмов штрихом на скошенный агар

Метод серийных разведений с последующим высевом

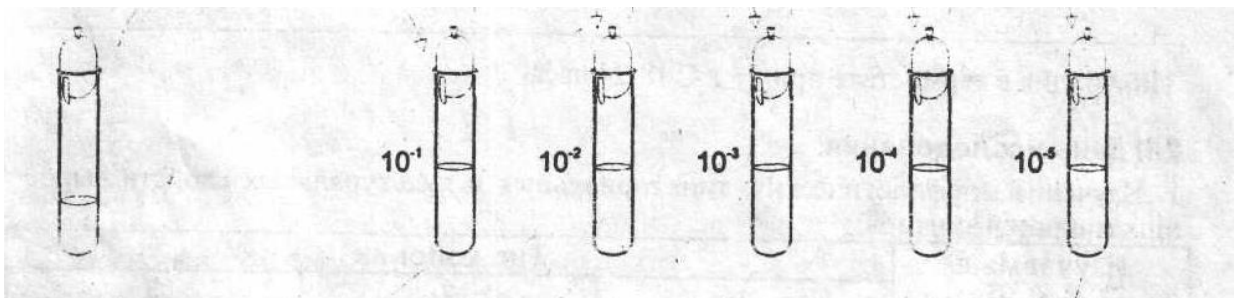
Для микробиологического анализа микрофлоры мы использовали, согласно ГОСТ Р 53430-2009 два разбавления – 1:1000 и 1:10 000.

Водопроводную воду разливали в шестьдесят сухих пробирок и перед дальнейшим использованием автоклавировали.

Затем мы отбирали пробу (1 час, 3 часа, 6 часов) разбавляли 1 мл пробы в 9 мл стерильной воды, хорошо взбалтывая и перемешивая (разбавление 1:10). После чего 1 мл исследуемой жидкую взвесью стерильным наконечником одноканального дозатора переменного объема переносили в первую пробирку с 9 мл стерильной воды, получали первое разбавление (1/100). Затем перемешивали отобранную пробу в пробирке, вбирая нужный объем дозатором и выпуская из него полученную суспензию. В таком порядке мы работали, чтобы получить финальное необходимое нам разбавление – 1/1000.

Затем из каждого разбавления, тщательно взболтав его на вортексе, мы брали по 0,1 мл взвеси и высевали на чашки Петри уже с застывшей стерильной средой, распределяя бактериальную суспензию равномерно по поверхности чашки стерильным стеклянным шпателем, обжигая его каждый раз над пламенем спиртовки.

Для приготовления каждого разбавления мы использовали новый стерильный носик во избежание получения ошибочного результата.



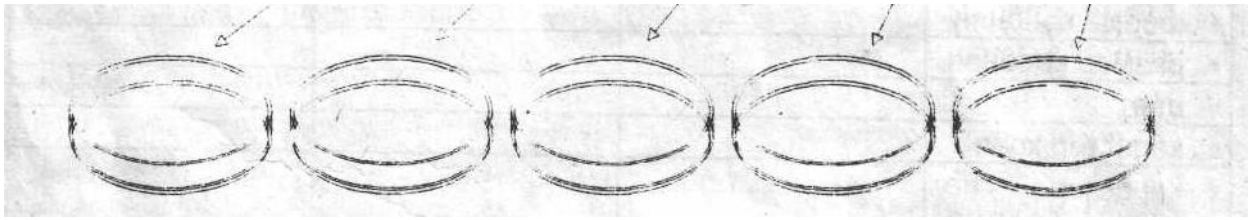


Рис.2.2: а- метод серийных разведений; б – чашки Петри

2.2.1. Методы микроскопического исследования микроорганизмов.

Фиксированный препарат

Для более детального изучения клеток микроорганизмов применяют фиксированный препарат.

Для того чтобы его приготовить, мы следовали инструкции:

1. Приготовить мазок бактерий. Взяли мазок с колонии *S. glutamicum*
2. Высушить.
3. Фиксировать.
4. Окрашивать.
5. Промывать.
6. Снова высушивать.
7. Нанести иммерсионное масло.

В качестве результата ниже представлена микроскопическая фотография: Рис. 2.2.1.

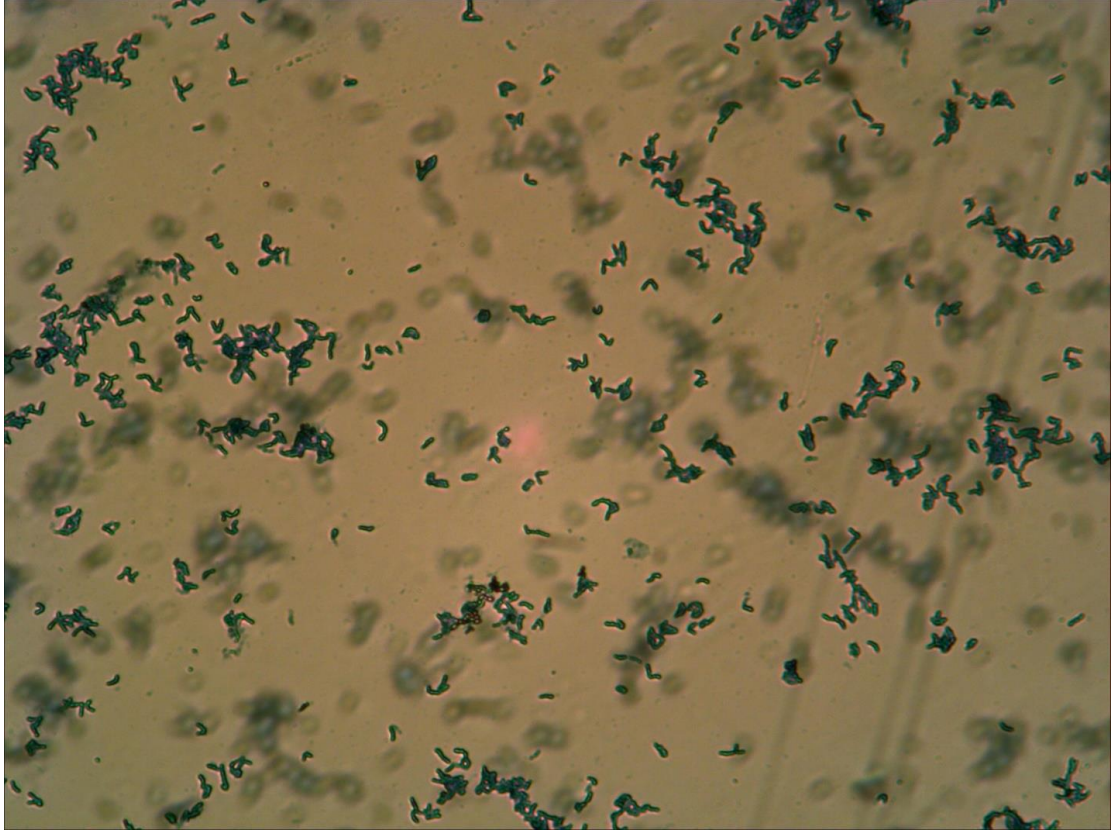


Рис. 2.2.1. *Corynebacterium glutamicum* под иммерсионным маслом, увеличение 1000, окраска метиленовым синим

ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1.Обработка результатов

Весь ход статистического изучения заключается в следующем: постановка эксперимента, наблюдение, группировка материала, вычисление обобщающих показателей и их анализ. Два последних этапа и есть задачи математической статистики. Оценка точности производимых измерений имеет большое экономическое и прикладное значение. Поэтому знание практических методов оценки погрешностей результатов измерений просто необходимо. Рассмотрим полученные данные и методы, которыми мы их обрабатывали

3.1.1.Методы обработки результатов

Для малых выборок (3-6 повторностей) вычисляют такие статистические характеристики: средние арифметические, дисперсии, стандартные отклонения, коэффициенты вариации, ошибки выборочных средних, относительные ошибки и др.

Средняя арифметическая простая.

Для вычислений мы использовали данные учета числа колоний *S.glutamicum* (в пересчете на КоЕ). Варьирующий показатель - число колоний - обозначим буквой X количество повторений - n . Среднюю арифметическую простую вычисляют по формуле:

(3.1)

$$x = X/n$$

Основной статистической характеристикой вариационного ряда является средняя арифметическая, все остальные лишь объясняют ее.

Дисперсия.

Дисперсию вычисляют по формуле:

(3.2)

$$s^2 = \frac{\sum(X - x)^2}{(n - 1)}$$

Дисперсии характеризуют специфику варьирования, а не только величину изменения вариационных рядов.

Стандартное отклонение.

Этот показатель представляет собой корень квадратный из дисперсии и вычисляется по формуле:

(3.3)

$$s = \sqrt{s^2}$$

Стандартное отклонение выражается в тех же единицах что и характеризуемый им признак. Чем сильнее варьирует показатель, тем больше числовое значение стандартного отклонения. При расчетах оно является более удобной характеристикой, чем дисперсия.

Ошибка выборочной средней:

Средние арифметические имеют ошибки, которые возникают в результате неполной представительности выборки. Эти ошибки свойственны только выборочному методу исследования, их числовое значение зависит как от степени изменчивости изучаемого признака, так и от объема выборки. Ошибку выборочной средней вычисляют по формуле:

(3.4)

$$s_x = \sqrt{\frac{\sum(X - x)^2}{n(n - 1)}}$$

Ошибка стандартного отклонения.

Рассчитывают по формуле:

(3.5)

$$s_s = \frac{s}{\sqrt{2n}}$$

Результаты обработки представлены в Табл.1 Приложении 1.

3.2.Результаты исследований

Полученные данные в результате исследования представлены в таблице ниже:

Данные роста <i>Corynebacterium glutamicum</i> (в пересчете на КоЕ 10 ⁻⁵)									
10% 10 ⁻⁴	1 проба (1 час)			2 проба (3 часа)			3 проба(6 часов)		
	8	4	15	11	5	19	4	3	6
Среднее значение	9			11			4		
7,5% 10 ⁻⁴	1 проба (1 час)			2 проба (3 часа)			3 проба(6 часов)		
	2	4	6	19	19	21	48	4	14
Среднее значение	4			19			22		
5% 10 ⁻⁴	1 проба (1 час)			2 проба (3 часа)			3 проба(6 часов)		
	8	12		25	7		64	17	64
Среднее значение	10			17			48		
2,5% 10 ⁻⁴	1 проба (1 час)			2 проба (3 часа)			3 проба(6 часов)		
	6	11	10	14	11	8	15	1	
Среднее значение	8			9			11		

По результатам обработки данных методом критерия Стьюдента, мы можем сделать вывод, что полученные данные являются достоверными (Табл. 3.2).

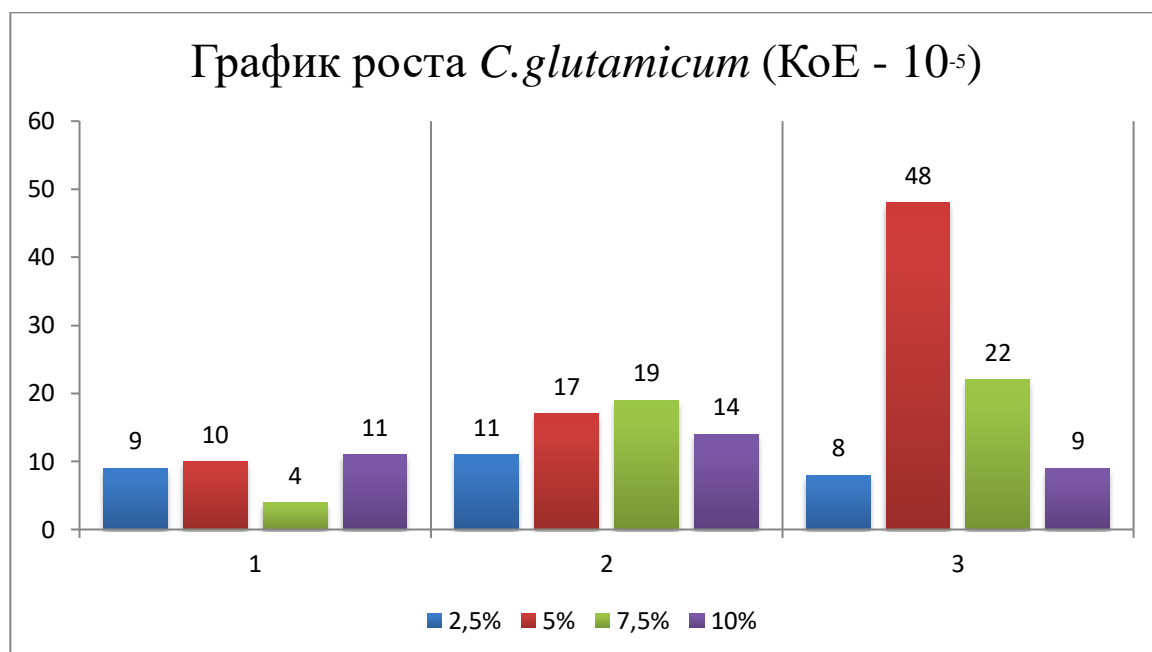
Таблица 3.2

Результаты обработки данных с помощью критерия Стьюдента

Концентрации	Коэффициент достоверности расчетный	P=0,1	P=0,5
10% и 7,5% 10^{-3}	5,393	3,707	2,446*
10% и 7,5% 10^{-4}	5,234	3,355	2,306*
10% и 5% 10^{-3}	3,695	3,25	2,262*
10% и 5% 10^{-4}	4,05	3,169	2,228*
10% и 2,5% 10^{-3}	2,966	3,105*	2,201
10% и 2,5% 10^{-4}	2,459	3,085*	2,179
7,5% и 5% 10^{-3}	1,487	3,112	2,16
7,5% и 5% 10^{-4}	1,907	4,032	2,57
7,5% и 2,5% 10^{-3}	3,195	4,032*	2,57
7,5% и 2,5% 10^{-4}	4,268	4,268	2,57*
5% и 2,5% 10^{-3}	3,325	3,5*	2,365
5% и 2,5% 10^{-4}	2,96	4,604*	2,776

* - данные достоверны

По результатам полученных данных построим график:



Исходя из данных полученных в результате нашего исследования, мы можем сделать вывод, что интенсивный рост бактерии наблюдается при концентрации глюкозы 5% т.е., именно эта концентрация является оптимальной. Четко прослеживается кривая роста микроорганизмов. Так же можно отметить, что концентрация 7,5% глюкозы является подходящей для этой культуры: рост умеренный, кривая роста прослеживается. Концентрации 2,5% и 10% в данном исследовании являются лимитирующими факторами: при низкой концентрации глюкозы и высокой концентрации рост культуры ингибируется.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведенного исследования мы изучили влияние концентрации глюкозы в питательной среде на скорость размножения *Corynebacterium glutamicum* В-11167

По результатам анализа и обработки полученных результатов представляется возможным сделать следующие выводы:

1. Концентрация глюкозы в питательной среде существенно влияет на рост культуры

2. Наиболее интенсивный рост бактерии *Corynebacterium glutamicum* В-11167 наблюдается при концентрации глюкозы 5%. Концентрации 2,5% и 10% не являются оптимальными, поскольку угнетают рост культуры: при 2,5% рост культуры не значительный т.к. культуре недостаточно источника углерода для интенсивного роста; при 10% нарушается осмотическое давление в клетках, что способствует замедлению роста и развития культуры. Концентрация 7,5% не является лимитирующей, но рост так же угнетается.

3. Самой оптимальной концентрацией для роста и размножения *Corynebacterium glutamicum* В-11167 является концентрация 5%. При этой концентрации наблюдается наиболее интенсивный рост бактерий. Так же мы отметили, что при концентрации 5% скорость размножения микроорганизмов увеличивается. Остальные концентрации не дают такого результата: рост микроорганизмов умеренный при концентрации 7,5%, при концентрациях 2,5% и 10% рост культуры наблюдался неинтенсивный.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аузан С.И. Получение и применение аминокислот / С.И. Аузан // Рига. – 1970. – 63 с.
2. Бекер М.Е. Биотехнология микробного синтеза / М.Е. Бекер // Рига. – 1980. – 350 с.
3. Бекер В.Ф. Лизин микробного синтеза / В.Ф. Бекер , М.Е. Бекер // Рига. – 1974. – 124 с.
4. Бирюков В.В., Штоффер Л.Д. Влияние перемешивания на распределение питательных веществ и метаболитов в суспензии микроорганизмов при их культивировании / В.В. Бирюков, Л.Д. Штоффер // Прикладная биохимия и микробиология Наука . – 1971. – №.1. - С.12-19.
5. Бобрешова О.В., Кулинцов П.И., Аристов И.В. и др. Механизмы химических превращений и особенности транспорта аминокислот в электромембранных системах / О.В. Бобрешова., П.И. Кулинцов., И.В. Артистов и др. // Мембраны. – 2000 . – №7. – С. 3-12.
6. Бобрешова О.В. Разработка малоотходных мембранно-сорбционных технологий очистки и концентрирования L-аминокислот для пищевой промышленности и медицины / О.В. Бобрешова // Отчет о НИР НТП Министерства Образования. – 2002. – 104 с.
7. Букин В.Н. Избранные проблемы микробиологии, энзимологии и биохимии / В.Н. Букин // София. – 1969. – 236 с.
8. Виестур У.Э. Селга С.Э. Микробиологические препараты / У.Э. Виестур , С.Э. Селга // Рига. – 1976. – 84 с.
9. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Дж. Пастернак // М. – 2002. – 589 с.
10. Гершанович В.Н., Транспорт аминокислот, полипептидов и органических кислот у бактерий / В.Н. Гершанович // М. – 1977. – 181 с.
11. Доманова Е.Г., Варшавская Н.З., Вальнягина А.И. и др. Диффузия и электромиграция нейтральных аминокислот через ионообменные мембраны /

Е.Г. Доманова, Н.З., А.И.Вальнягина // Журн. прикл. химии. – 1974. – Т. 47. – №6. – С. 1258–1261.

12. Заболоцкий В.И., Гнусин Н.П., Ельникова Л.Ф. и др. Исследование процесса глубокой очистки аминокислот от минеральных примесей электродиализом с ионообменными мембранами / В.И. Заболоцкий, Н.П. Гнусин, Л.Ф. Ельникова // Журн. прикл. химии. – 1986. – Т. 59. – №1. – С. 140–145.

13. Кулинцов П.И., Бобрешова О.В., Аристов И.В. и др. Механизмы электротранспорта в системах ионообменная мембрана–раствор аминокислоты / П.И.Кулинцов, О.В.Бобрешова, И.В. Аристов и др. // Электрохимия. – 2000. – Т. 36. – №3 – С. 365–368.

14. Кочетков Н.К., Бочков А.Ф., Дмитриев Б.А., Чижов О.С., Шибяев В.Н. Химия углеводов / Н. К. Кочетков, А. Ф. Бочков, Б. А. Дмитриев, О. С. Чижов, В. Н. Шибяев // М. – 1967. – 672 с.

15. Ленинджер А. Биохимия / А. Ленинджер // М. – 1975. – 977 с.

16. Межиня Г.Р. Управление микробным синтезом / Г.Р. Межиня // Рига. – 1977. – 172 с.

17. Пащенко Л.П., Любарь А.В., Булгакова Н.Н., Бобрешова О.В., Аристов К.В., Кулинцов П.И. Повышение биологической ценности изделий из муки тритикале / Л.П. Пащенко, А.В. Любарь, Н.Н. Булгакова, О.В. Бобрешова, К.В. Аристов // Известия вузов. Пищевая технология. – 2002. – №2-3. – С.26-28.

18. Прозоркина Н.В., Рубашкина Л.А. Основы микробиологии, вирусологии и иммунологии: Учебное пособие для средних специальных медицинских учебных заведений / Н.В. Прозоркина, Л.А. Рубашкина // — Ростов на Дону. – 2002. – 416 с.

19. Сиротин А.А., Оспищева Н.В., Бондаренко В.В., Резун А.П. Влияние БАВ и витамина В2 на рост бактерий штамма *Corynebacterium glutamicum* В-11167 в жидкой питательной среде/ А.А.Сиротин,

Н.В.Оспищева, В.В.Бондаренко, А.П. Резун // Научное обозрение. Биологические науки. – 2014. – № 1. – 114 с.

20.Трусле Э.Б. Закономерности роста и синтеза лизина культурой *Brevibacterium 22L* на синтетических средах, включающих некоторые моносахариды / Э.Б Трусле., А.К. Саксе, Г.К. Лиепиньш // Рига. – 1976. – 342 с.

21. Фаустов А.С. Лизин - одна из важнейших незаменимых аминокислот в обеспечении полноценного питания. / А.С. Фаустов, М.И. Чубирко, О.В. Бобрешова и др./ Воронежский государственный университет. – 2003. – 88 с.

22. Федосеев К.Г. Физические основы и аппараты микробного синтеза биологически активных соединений / К.Г Федосеев. – М.: Медицина ,1977, - 304с.

23. Хмель И.А., Коршунов И.С. Влияние аэрации на жизнедеятельность микроорганизмов / И.А. Хмель , И.С. Коршунов // Прикладная биохимия и микробиология. – 1966. – №2. – с. 713-742.

24. Хуанг Х. Биосинтез аминокислот микроорганизмами / Х. Хуанг // Микробиологический синтез. – 1966. – № 3. – С.3-5

25. Chinen, Akito, Yuri I. Kozlov, Yoshihiko Hara, Hiroshi Izui and Hisashi Yasueda Innovative Metabolic Pathway Design for Efficient L-Glutamate Production by Suppressing CO₂ Emission / Chinen, Akito, Yuri I. Kozlov, Yoshihiko Hara, Hiroshi Izui and Hisashi Yasueda // Journal of Bioscience and Bioengineering. – 2007. – Vol. 103. – P. 262-269

26. Daoust D. R., Stodt T.H. Devs ind. Microbiolog / D.R. Daoust, T.H. Stodt. – 1966. – 122 p.

27. Genomic Sequence of *Corynebacterium glutamicum*. NCBI Database.

28. Jo, Sung-Jin, Michihisa Maeda, Toshihiko Ooi and Seiichi Taguchi. Production System for Biodegradable Polyester Polyhydroxybutyrate by *Corynebacterium glutamicum* / Jo, Sung-Jin, Michihisa Maeda, Toshihiko Ooi

and Seiichi Taguchi // Journal of Bioscience and Bioengineering. – 2006. –Vol. 102. – P. 233-236

29. Kalinowski, Jörn, Dr. Fermentative Production of Amino Acids and Vitamins by Corynebacteria / Kalinowski, Jörn, Dr // Universität Bielefeld. – Genetik.

30. Nakayama., Tanaka H., Hagino H., Kinoshita S. Agris Biol.Chem / Nakayama., H Tanaka, H Hagino, S Kinoshita // – 1972. – 611 p.

31. Mateos, Luis M., Efren Ordonez, Michal Letek, and Jose A. Gil. Corynebacterium glutamicum as a model bacterium for the bioremediation of arsenic / Mateos, Luis M., Efren Ordonez, Michal Letek, and Jose A. Gil // International Microbiology. – 2006. – P. 207-215

32. Rollins, David M. Pathogenic Microbiology / M David, Rollins // – 2000.

33. Stolz, Michael, Petra Peters-Wendisch, Helga Etterich, Tanja Gerharz, Robert Faurie, Hermann Sahm, Holger Fersterra, and Lothar Eggeling. Reduced Folate Supply as a Key to Enhanced L-Serine Production by Corynebacterium glutamicum. / Stolz, Michael, Petra Peters-Wendisch, Helga Etterich, Tanja Gerharz, Robert Faurie, Hermann Sahm, Holger Fersterra, and Lothar Eggeling // Applied and Environmental Microbiology. – 2007. – Vol. 73. – №3. – P. 750-755.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Табл.1 Обработка данных стандартными статистическими методами.

10⁻³														
10% I ПРОБА 27.03.17			10% II ПРОБА 27.03.17			10% III ПРОБА 27.03.17			10% I ПРОБА 24.05.17			10% II ПРОБА 24.05.17		
131	72	41	нет данных			26	16	28	11	7	20	2	13	10
Средняя арифметическая простая														
81,3333						23,3333			12,6666			8,33333		
3						3			7			3		
Дисперсия														
2090,33						41,3333			44,3333			32,3333		
3						3			3			3		
Стандартное отклонение														
45,7201						6,42910			6,65832			5,68624		
6						1			8			1		
Ошибка выборочной средней														
18,6651						2,62466			2,71825			2,32139		
8						9			1			8		
10⁻⁴														
10% I ПРОБА 27.03.17			10% II ПРОБА 27.03.17			10% III ПРОБА 27.03.17			10% I ПРОБА 24.05.17			10% II ПРОБА 24.05.17		
30	26	41	37	10	3	8	4	15	11	5	19	4	3	6
Средняя арифметическая простая														
32,3333			16,6666			9			11,6666			14,8		
3			7						7					
Дисперсия														
60,3333			322,333			31			49,3333			2,33333		
3			3						3			3		
Стандартное отклонение														
7,76745			17,9536			5,56776			7,02376			1,52752		

3			4			4			9			5		
Ошибка выборочной средней														
3,17105			7,32954			2,27303			2,86744			0,62361		
			4						2					
10^{-3}														
7,5% I ПРОБА 27.03.17			7,5% II ПРОБА 27.03.17			7,5% III ПРОБА 27.03.17			7,5% I ПРОБА 24.05.17			7,5% II ПРОБА 24.05.17		
25	40	32	40	14		83	44	53	22	16	24	55	5	10
Средняя арифметическая простая														
32,3333			27			60			20,6666			23,3333		
3									7			3		
Дисперсия														
56,3333			338			417			17,3333			758,333		
3									3			3		
Стандартное отклонение														
7,50555			18,3847			20,4205			4,16333			27,5378		
3			8			8			2			5		
Ошибка выборочной средней														
3,06412			9,19238			8,33666			1,69967			11,2422		
9			8			6			3			8		
10^{-4}														
7,5% I ПРОБА 27.03.17			7,5% II ПРОБА 27.03.17			7,5% III ПРОБА 27.03.17			7,5% I ПРОБА 24.05.17			7,5% II ПРОБА 24.05.17		
18	31	40	33	15	6	48	4	14	2	4	6	19	19	21
Средняя арифметическая простая														
29,6666			18			22			4			19,6666		
7												7		
Дисперсия														
122,333			189			532			4			1,33333		
3												3		
Стандартное отклонение														

11,0604 4			13,7477 3			23,0651 3			2			1,15470 1		
Ошибка выборочной средней														
4,51540 6			5,61248 6			9,41629 8			0,81649 7			0,47140 5		
10^{-3}														
5% I ПРОБА 27.03.17			5% II ПРОБА 27.03.17			5% III ПРОБА 27.03.17			5% I ПРОБА 24.05.17			5% II ПРОБА 24.05.17		
35	63	80	6	18		26	80	125	3	24		29	11	3
Средняя арифметическая простая														
59,3333 3			12			77			13,5			14,3333 3		
Дисперсия														
516,333 3			72			2457			220,5			177,333 3		
Стандартное отклонение														
22,7229 7			8,48528 1			49,5681 3			14,8492 4			13,3166 6		
Ошибка выборочной средней														
9,27661 3			4,24264 1			20,2361 1			7,42462 1			5,43650 2		
10^{-4}														
5% I ПРОБА 27.03.17			5% II ПРОБА 27.03.17			5% III ПРОБА 27.03.17			5% I ПРОБА 24.05.17			5% II ПРОБА 24.05.17		
78	82	73	нет данных			64	17	64	29	5		8	12	
Средняя арифметическая простая														
77,6666 7						48,3333 3			17			10		
Дисперсия														
20,3333 3						736,333 3			288			8		

Стандартное отклонение													
11,7189						9,89949			2,64575			3	
3						5			1				
Ошибка выборочной средней													
4,78423						4,94974			1,52752			1,22474	
3						7			5			5	