

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

**ИЗУЧЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ФЕРМЕНТОВ  
ПРОЛАЙВ VS ЛИКВИД И ПРОТОФЕРМ FR ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА  
ГЛЮКОЗНОГО СИРОПА ИЗ ВТОРИЧНЫХ ПРОДУКТОВ  
ГЛУБОКОЙ ПЕРЕРАБОТКИ ЗЕРНА ПШЕНИЦЫ**

Выпускная квалификационная работа  
обучающегося по направлению подготовки 19.03.01 Биотехнология  
очной формы обучения, группы 07001316  
Найденовой Анны Борисовны

Научный руководитель  
Старший преподаватель кафедры  
биотехнологии и микробиологии  
Живина Н.И.

БЕЛГОРОД 2017

## ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение.....	3
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	8
1.1. Лизин как аминокислота.....	8
1.1.1. Влияние на организм.....	11
1.1.2. Усвояемость аминокислоты и суточная норма.....	12
1.1.3. Предостережения, последствия дефицита и избытка.....	14
1.1.4. Источники лизина.....	14
1.2. Производство L-лизина на ЗАО «Завод Премиксов №1».....	16
1.3. Химическая схема производства.....	20
1.4. Технологическая рецептура и схема производства.....	20
1.5. Приготовление стерильных питательных сред и посевного материала.....	25
1.6. Получение препаратов лизина.....	29
Глава 2. ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	33
2.1. Объект исследования.....	33
2.2. Условия, оборудование и методы исследования.....	34
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	59
3.1. Ферментативный гидролиз.....	59
3.2. Процесс ферментации.....	68
3.3. Статистическая обработка полученных данных.....	77
ВЫВОДЫ.....	79
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	80

## Введение

Ограниченный характер природных ресурсов планеты становится все более ощутимым. Сегодня нет простого и простого способа изменить эту тенденцию. Производство и использование продуктов более важны для большинства потребителей, чем то, как этот продукт производится и что происходит с ним после использования. Меньшая часть людей, занимающихся физическим производством, все меньшая часть общества, извлекает материалы и превращается в полезные продукты.

Отходы производства - остатки сырья, материалов и полуфабрикатов, которые образуются при производстве этого продукта, которые частично или полностью потеряли свое качество и не соответствуют стандартам (технические характеристики). Эти остатки после соответствующей обработки могут использоваться в производстве или потреблении. [7]

Отходы потребления непригодны для дальнейшего использования (по назначению) промышленных и бытовых изделий (например, из пластмасс и резиновых изделий, из строя из огнеупорного кирпича, теплоизоляции печей и т. Д.). [19]

Побочные продукты образуются при физической и химической переработке сырья наряду с основными продуктами производства, но не являются целью производственного процесса. В большинстве случаев это продукт, у них есть ГОСТ, ТУ и утвержденные цены, их выпуск планируется. Чаще всего это компоненты, содержащиеся в сырье, которые не используются в этом продукте, или продукты, полученные экстракцией или обогащением основного сырья; Их обычно называют побочными продуктами (например, попутный газ при добыче нефти).

Вторичные материальные ресурсы (БМП) представляют собой набор отходов производства и потребления, которые могут использоваться в качестве основного или вспомогательного материала для производства целевых продуктов. [19, 36]

Лизин является первой лимитирующей аминокислотой в корме для свиней, а второй - кормом птиц. В растительных продуктах он содержится в небольших количествах, поэтому в диетах животных и домашней птицы часто недостаточно. L-лизин сульфат улучшает пищеварение, способствует увеличению биологической ценности съедобного растительного белка и диеты в целом, катализирует процессы ферментативных превращений, участвует в метаболизме белков и углеводов, снижает содержание триглицеридов в сыворотке, способствует усвоению кальция и поддерживает баланс азота в теле. Он участвует в производстве антител, гормонов и ферментов, способствует образованию коллагена и тканевого ремонта, служит источником энергии, стимулирует синтез белка в организме, рост и образование костей, стимулирует деление клеток и их синтез. Лизин используется для профилактики и лечения различных инфекций и герпеса. Вещество показало свою эффективность при лечении и профилактике стоматита. По некоторым данным, он эффективен при стенокардии и мигрени. Важно для диабетиков, потому что регулярное потребление аминокислот может снизить уровень сахара.

В нашем регионе только одно предприятие специализируется на производстве L-лизин сульфата – ЗАО «Завод Премиксов №1». Флагманом компании выступает инновационный биотехнологический комплекс по производству аминокислоты L-лизин сульфат мощностью 57 000 тонн продукции в год на основе технологии глубокой переработки зерна пшеницы. Производство лизина основано на ферментации сахаросодержащего сырья специализированными штаммами микроорганизмов. Принимая решение о выборе технологии и штамма для производства лизина, предприятие в первую очередь руководствовалось требованиями безопасности продукции для здоровья животных и человека. Именно поэтому за основу взят штамм-продуцент лизина *Corynebacterium glutamicum*. Штамм не является зоопатогенным, фитопатогенным и не представляет опасность по каким-либо другим причинам. Штаммы

*Corynebacterium glutamicum* – отнесены к группе GRAS (Generally recognized as safety) – общепризнанно безопасными.[35]

Характеристики:

- Внешний вид - гранулы размером от 0,3 до 2,0 мм;
- Запах - слабый специфический;
- Цвет - от светло-желтого до коричневого цвета;
- Массовая доля влаги - не более 5,0%;
- Содержание лизина, в пересчете на СВ – не менее 51,0 %;
- Гранулометрический анализ, доля гранул с размерами от 0,3 до 2,0 мм - не менее 90,0;
- Металломагнитная примесь - не более 30,0 мг/кг;

В товарном продукте L—лизин содержится в форме L—лизин сульфата с содержанием действующего вещества не менее 51 %, а также другие аминокислоты, витамины и микроэлементы, что повышает биологическую ценность данной товарной формы.

Содержание дополнительных аминокислот, не менее:

- Метионин + цистин — 0,35%;
- Метионин — 0,30%;
- Треонин — 0,56%;
- Триптофан — 0,10%;
- Аргинин — 0,56%;
- Изолейцин — 0,39%;
- Лейцин — 0,63%;
- Валин — 0,53%;
- Аланин — 0,75%;
- Глицин — 0,50%;
- Серин — 0,31%
- Аспарагиновая кислота — 0,80%.

Гарантийный срок хранения: не менее 2 лет со дня изготовления препарата.

Норма ввода L—лизин сульфата зависит от состава корма, вида и возраста животных и определяется в соответствии с существующими в РФ нормами и технологией ввода аминокислот.

L—лизин сульфат совместим со всеми лекарственными препаратами, ингредиентами кормов и другими кормовыми добавками.

Продукцию животноводства после применения L—лизин сульфата можно использовать в пищевых целях без ограничения. [23]

При разработке методик, используемых на предприятии, участвует научно-исследовательская лаборатория. Также она принимает участие в проверке продукта, полученного на выходе производства. Но основная задача персонала – сделать так, чтобы это производство было минимально затратным и прибыльным. Поэтому эксперименты в лаборатории на поиск более дешевых источников питания микроорганизмов проводятся не только с первичными, но и с вторичными продуктами переработки.

Настоящая дипломная работа направлена на изучение возможности применения ферментов Пролайв BS ликвид и Протоферм FP для производства глюкозного сиропа из вторичных продуктов глубокой переработки зерна пшеницы.

Для достижения поставленной цели сформулированы следующие задачи:

1. Провести процесс смешанного гидролиза крахмала Б с помощью ферментов Пролайв BS ликвид и Протоферм FP;
2. Изучить степень гидролиза углеводной и протеиновой фракций;
3. Произвести пересчет рецептуры питательных сред и выявить влияние гидролизованного крахмала Б на рост микроорганизмов продуцентов при помощи экспериментальной ферментации.



## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Лизин как аминокислота

Лизин - это аминокислота, которая является частью всех белков в организме человека. И, несмотря на то, что это ключевой элемент, необходимый для нормального функционирования организма, организм не может поддерживать лизин, поэтому важно заботиться о качестве вашего рациона.

1889 год считается годом «рождения» аминокислотного лизина. Именно тогда казеин был выведен из лизина, а в 1955 году в Соединенных Штатах можно было получить гидрохлорид лизина. В это время в Штатах они пытались создать особый вид хлеба, насыщенного лизином, который они планировали продавать людям, чей рацион далеко не сбалансирован. Но эта идея не была поддержана. С 1970-х годов лизин использовался в качестве добавки к корму для животных, а культуристы использовались для быстрого роста мышечной массы.

В последние годы Российская Федерация резко сократила поголовье скота и, как следствие, импорт мясных продуктов увеличился до неприемлемого уровня. [19, 46]

Одной из причин снижения производства мясных продуктов является ухудшение качества корма и увеличение их стоимости, что связано с почти полным прекращением производства кормового белка из-за их неконкурентоспособности с измененной ценой состав. Сегодня кормовой белок почти полностью импортируется.

Однако есть альтернативное решение проблемы улучшения качества корма. Известно, что дефицит белка может быть компенсирован за счет контроля за подачей незаменимых аминокислот, прежде всего для устранения дефицита аминокислоты, который находится в относительном минимуме, затем в следующем и так далее, поскольку достижение не- - протеина, а именно, содержание наиболее дефицитных незаменимых

аминокислот. Порядок ограничения включает в себя следующие элементы: животные и птицы. Аминокислотный состав ингредиентов корма и требования к различным аминокислотам хорошо известны и хорошо известны.

Таким образом, для зерновых злаков и всех сельскохозяйственных животных и домашней птицы предельными аминокислотами являются метионин, лизин, триптофан и треонин.

В настоящее время в России в сельском хозяйстве птицеводство является ведущей отраслью. При кормлении домашней птицы первой предельной аминокислотой является лизин, второй - метионин, который производится как в России, так и за рубежом химическим синтезом и поставляется на российский рынок в достаточном количестве.

Эффект использования незаменимых аминокислот, в частности L-лизина, основан на том факте, что белок зерновых - основной компонент корма для сельскохозяйственных животных и домашней птицы - имеет неблагоприятный состав, который образует его аминокислоты. Один из них - L-лизин - в дефиците и не может быть синтезирован в теле животного.

Как правило, дефицит устраняется путем введения в рацион так называемого. «Белки» (белковые) добавки, богатые L-лизином, такие как рыба и мясо-костная мука, соя и подсолнечная мука, гидролиз и кормовые дрожжи. Однако дефицит, как упоминалось выше, может быть устранен путем простого введения соответствующего количества кристаллического L-лизина в сырье.

В развитых странах потребление L-лизина быстро растет - 12-15% от годового роста - и приблизилось сегодня к 500 тысячам тонн в год. До начала экономических реформ СССР был крупнейшим производителем L-лизина (до одной трети мирового производства в середине 1980-х годов). [3, 23, 46]

Лизин играет важную роль в организме - сочетается с витаминами, укрепляет иммунитет, сохраняет здоровье. Обеспечить себя этой аминокислотой легко - это во многих продуктах разных категорий. Но

неправильная кулинария (слишком длительная термообработка) может значительно уменьшить, а иногда и полностью «выжать» все полезное из продукта.

Как и многие другие аминокислоты, лизин часто используется для наращивания мышц и накопления коллагена, который является важным компонентом хряща, соединительной ткани и кожи. Вы хотите нарастить мышцы? Стоит подумать о потреблении достаточного количества лизина. Кроме того, аминокислота способствует абсорбции кальция из кишечника, что впоследствии способствует производству гормонов, ферментов и антител и, кроме того, стимулирует выработку креатинина (необходимый для переработки жиров в энергию). Кроме того, аминокислота обладает успокаивающими свойствами, что делает ее эффективной в борьбе с депрессией, стрессом и беспокойством.

Лизин используется для профилактики и лечения различных инфекций и герпеса. Вещество показало свою эффективность при лечении и профилактике стоматита. По некоторым данным, он эффективен при стенокардии и мигрени. Важно для диабетиков, потому что регулярное потребление аминокислот может снизить уровень сахара. [20]

### **1.1.1. Влияние на организм**

#### **1. Холестерин.**

В тканях печени лизин превращается в карнитин, который помогает организму избавиться от лишних жиров. И, как показали исследования, регулярное потребление лизина приводит к уровню «плохого» холестерина.

#### **2. Кости.**

Кальций имеет решающее значение для здоровья костей. Лизин помогает организму поглощать этот полезный элемент и замедляет его экскрецию, что помогает укрепить костную ткань. С возрастом плотность скелета

уменьшается, а это означает, что потребность в лизине возрастает. Эта аминокислота особенно полезна для людей с остеопорозом.

### 3. Герпес.

В альтернативной медицине лизин активно используется для лечения вирусного герпеса. Будучи противовирусными стандартами, он блокирует свою жизнеспособность. Существует мнение, что диета, богатая лизином, способна предотвратить рецидив герпеса, и если вирус уже «вышел», то сыпь заживает быстрее и менее болезненно. Между тем, в официальной медицине, аминокислота как лекарство против вируса не используется.

### 4. Рост.

Являясь основным компонентом белков, аминокислота достигает правильного развития организма, способствует росту у детей. Отсутствие лизина может привести к остановке роста.

### 5. Стресс, беспокойство.

Диета, состоящая из лизинсодержащих продуктов, защищает организм от воздействия нервных расстройств, уменьшает беспокойство, позитивно влияет на эмоциональное состояние человека.

### 6. Анестезия.

Существует мнение, что лизин обладает противовоспалительными и обезболивающими свойствами. Хотя ученые не могут это на 100 процентов, как продолжается исследование. Но первые положительные результаты уже зарегистрированы.

### 7. Сердце.

Лизин может облегчить стенокардию, особенно если она работает в сочетании с витамином С. [19, 20, 21]

### 1.1.2. Усвояемость аминокислоты и суточная норма

Лизин существует в двух «вариантах»: L и D. Для человеческого тела только L-лизин «в зубах». Но для того, чтобы ассимиляция была полной, аминокислота должна использоваться в сочетании с витаминами А, В1, С, а также с железом и биофлавоноидами.

Во-вторых, лизин может «работать» в организме только в присутствии другой аминокислоты - аргинина. Кстати, идеальными продуктами, объединяющими оба вещества, являются разные виды сыров и ферментированные молочные продукты. В других случаях вы можете придумать комбинацию продуктов с обязательным присутствием орехов, шоколада, желатина. Эти продукты являются отличными источниками аргинина.

Безопасная дневная норма лизина составляет дозу от 1 до 3 г. Но обычно норма определяется индивидуально, исходя из возраста, а также состояния здоровья. Например, для лечения герпеса вам нужна доза, которая немного выше общепринятой ежедневной рекомендации. Люди, страдающие сердечными расстройствами, определяют количество требуемой аминокислоты индивидуально. [13]

Кроме того, существуют нюансы, когда суточная норма лизина должна быть увеличена. Обычно это относится к людям, которые следуют нежирной диете или придерживаются диеты с низким содержанием липидов.

Вторая категория - люди в возрасте. Особую потребность в дополнительных дозах лизина испытывают пожилые мужчины.

Третья группа, чье меню должно включать больше белковой пищи, - вегетарианцы. Это связано с тем, что белки из продуктов животного и растительного происхождения поглощаются с различной интенсивностью.

И четвертая категория людей, которые также не должны пренебрегать лизином, являются спортсменами и подвержены сильному физическому стрессу. В противном случае они столкнутся с такими проблемами, как воспаление сухожилий и истощение мышц.

### **1.1.3. Предостережение, последствия дефицита и избытка**

Использование фармакологических аналогов натуральной аминокислоты не рекомендуется для людей с почечной недостаточностью или заболеваниями печени. Отравление может вызвать тошноту, диарею, боль в животе, а также усугубить нефрит или заболевания печени.

Дефицит лизина происходит крайне редко. Дефицит вещества может проявлять симптомы, напоминающие нормальный грипп. Кроме того, возможны тошнота, рвота, усталость, головокружение, камни в почках. Женское бесплодие также может быть вызвано дефицитом лизина. Тяжелая форма дефицита проявляется гормональным дисбалансом, который влияет на репродуктивную систему, останавливает рост у детей. Последствием недостатка вещества считается анемия, склонность к вирусным заболеваниям, проблемы с работоспособностью мужской репродуктивной системы, нарушения менструального цикла у женщин, выпадение волос, покраснение глаз (сосудистая сеть на глазной мембране появляется). [9, 33]

В зоне риска люди, которые не имеют свежих фруктов и овощей, молочных продуктов и мяса в рационе. Вместо этого они злоупотребляют сладкой, содовой и неправильно приготовленной пищей.

Кроме того, регулярный стресс может вызвать развитие дефицита лизина, последствия которого все труднее преодолеть. Нервные удары способствуют более быстрой «расходованию» лизина. Если стрессовая ситуация повторяется довольно часто за короткое время, организму не хватает времени для пополнения запасов утраченной аминокислоты. Впоследствии тело становится уязвимым для вирусных атак.

Учитывая, что лизин лишен способности накапливаться в тканях организма, казалось бы, нет необходимости говорить об опасностях передозировки. Более того, многие эксперты склонны думать, что эта аминокислота не способна нанести вред человеку. И даже если в организме есть излишки, тогда они принесут пользу - они станут дополнительным источником силы.

Между тем, есть еще одна точка зрения на проблему, более теоретическая. Некоторые исследователи считают, что тошнота, диарея и судороги в брюшной полости могут указывать на то, что в организме, называемом лизином, слишком много аминокислот. Кроме того, избыточное вещество, по их мнению, может спровоцировать образование желчных камней и увеличить количество триглицеридов. Считается, что использование аптечного лизина в высоких дозах в течение длительного времени может повысить уровень холестерина. [21]

#### **1.1.4. Источники лизина**

Известно, что лучшими источниками протеинов являются пищевые продукты животного происхождения. Но когда дело доходит до пополнения лизина из белковых продуктов, даже вегетарианцам не о чем беспокоиться. Список продуктов, богатых лизином, огромен. А сторонники различных пищевых систем могут выбрать для себя наиболее приемлемые варианты. Но стоит помнить, что зерновые после обработки и даже в сочетании с сахаром теряют почти все запасы лизина. И в то же время среди растительных продуктов наибольшая концентрация аминокислот содержится в бобовых.

Овощи: листовые, такие как шпинат и капуста, цветная капуста, сельдерей, бобовые, соя, чечевица.

Фрукты: груши, папайя, абрикосы, бананы, яблоки.

Орехи: миндаль, кешью.

Молочные продукты: сыр (творог, сыр, пармезан), йогурты, молоко, яйца.

Мясо: красный, свинина, баранина, птица (индейка, курица).

Рыба: треска, сардины.

Взаимодействие с другими веществами:

1. Аминокислота увеличивает токсичность аминогликозидов.
2. Вместе с антибиотиками лизин может вызывать аллергические реакции в виде диареи и тошноты.
3. Не принимайте высокие дозы кальция на фоне аминокислоты. Увеличение абсорбции питательных веществ может привести к гиперкальциемии.
4. Для ассимиляции лизина необходима обязательная комбинация с аргинином.
5. Комбинация, полезная для организма, представляет собой «коктейль» из лизина, железа, витаминов С, А, В1, биофлавоноидов. Эта комбинация максимизирует преимущества белков.

Среди всех аминокислот всего три, которые играют жизненно важную роль для человеческого организма. И лизин - один из них. Без адекватного пополнения запаса этого вещества прекратится производство ферментов и гормонов, регенерация и рост тканей. Без регулярного производства аминокислот сосуды теряют свою силу, и связки станут эластичными, и даже молочные железы перестанут функционировать по мере того, как планируется природа. И наоборот: не следует беспокоиться о возможных инсультах, сердечных приступах, остеопорозе и атеросклерозе, если в вашем традиционном меню есть место для продуктов с высоким содержанием белков и, следовательно, лизина. [2, 29]

## **1.2. Производство L-лизин сульфата на ЗАО «Завод Премиксов №1»**

В мае 2015 г. в Центре инновационных биотехнологий ЗАО «Завод Премиксов №1» была произведена первая промышленная партия аминокислотной кормовой добавки сульфат L-лизина. Сегодня предприятие, расположенное в Шебекинском районе Белгородской области, вышло на стабильный режим работы, а выпускаемый им продукт L-лизин сульфат 65%-

ный уверенно завоевывает российский рынок. Производственные мощности (57 тыс. т продукции в год) позволяют обеспечить не менее 70% потребности российских сельхозтоваропроизводителей в лизине, гарантируя при этом безопасность и стабильно высокое качество выпускаемого продукта.

Именно сульфатная форма лизина приобретает сегодня все большую и большую популярность. На практике доказано, что применение сульфата лизина в комбикормах для животных (куры-несушки, цыплята-бройлеры, свиньи) более эффективно в сравнении с использованием монохлоргидрат лизина. [28, 30]

Существенным преимуществом L-лизин сульфата является отсутствие в составе хлора. В отличие от сульфатной формы ввод монохлоргидрата лизина приводит к завышению в корме уровня хлора в комбикормах при их балансировании по лизину. А, как известно, избыток хлора в рационе вызывает такие негативные эффекты, как снижение иммунитета и нарушение обмена веществ. Применение L-лизин сульфата позволяет избежать нежелательных последствий, получить хорошую сохранность и высокую живую массу. [37]

При составлении рецептов комбикормов для свиней и птицы важно учитывать баланс электролитов, т.к. его поддержание позволяет достигнуть максимальной продуктивности. При замене монохлоргидрат лизина на сульфатную форму легче набирается баланс электролитов в рецепте. Эффект от применения L-лизин сульфата прослеживается даже при использовании в рационе повышенного количества балансирующих натрий- и хлор добавок: рецепт получается дешевле и, главное, потери мяса при хранении сокращаются.

Помимо действующего вещества L-лизин сульфата (не менее 65%), в данной кормовой добавке содержатся сопутствующие компоненты: дополнительные аминокислоты (от 7 до 10%), растительные белки,

органические кислоты, минеральные соли (натрия, калия, магния, железа), фосфор в усвояемой форме. Всё это способствует повышению питательной ценности продукта. [40]

*Таблица 1.2.* Состав и питательная ценность L-лизин сульфата ЗАО «Завод Премиксов №1»

Компоненты и показатели	Содержание
Основное вещество L-лизин	Не менее 51%
Дополнительные аминокислоты, не менее	
метионин + цистин	0,35%
метионин	0,30%
треонин	0,56%
триптофан	0,10%
аргинин	0,56%
изолейцин	0,39%
лейцин	0,63%
валин	0,53%
аланин	0,75%
глицин	0,50%
серин	0,31%
аспарагиновая кислота	0,80%
Обменная энергия	407 ккал / 100 г
Сырой протеин (N x 6,25)	65%
Валовой и усвояемый фосфор	0,20%

L-лизин сульфат, выпускаемый ЗАО «Завод Премиксов №1» по сравнению с аналогичными продуктами других производителей обладает следующими преимуществами: при его производстве используются, во-

первых, высокопродуктивный непатогенный штамм-продуцент и, во-вторых дополнительный протеин в виде биомассы клеток.

Касаясь первого преимущества, следует сказать, что аминокислоту L-лизин сульфат получают путем микробиологического синтеза с использованием культур *Corynebacterium glutamicum*, которые обладают высокой продуктивностью, не являются зоопатогенными, фитопатогенными, отнесены к группе GRAS (Generally recognized as safety) – общепризнанно безопасные. L-лизин сульфат не содержит ГМО, обладает 100%-ной биологической доступностью.

В настоящее время в мире кормовые аминокислоты выпускаются в двух основных формах: содержащие инактивированные клетки микроорганизмов - продуцентов и не содержащие их, то есть очищенные от их биомассы. При использовании в технологии производства безопасных штаммов-продуцентов, очистка от биомассы клеток не обязательна (необходима только инактивация), а при использовании условно-патогенных микроорганизмов – обязательна. Недобросовестные производители, которые применяют в технологии условно-патогенные штаммы, например *E.coli*, и не очищают конечный продукт от их клеток, подвергают опасности здоровье животных, поставляя на рынок кормовые добавки в виде лизина сульфата 50-70% концентрации. Такие кормовые добавки содержат 30-50% массы микроорганизмов-продуцентов, в частности *E.coli*, биомасса которых не разрешена для использования в кормовых целях, так как в их клеточной стенке находятся токсичные вещества – эндотоксины (липополисахариды). [37]

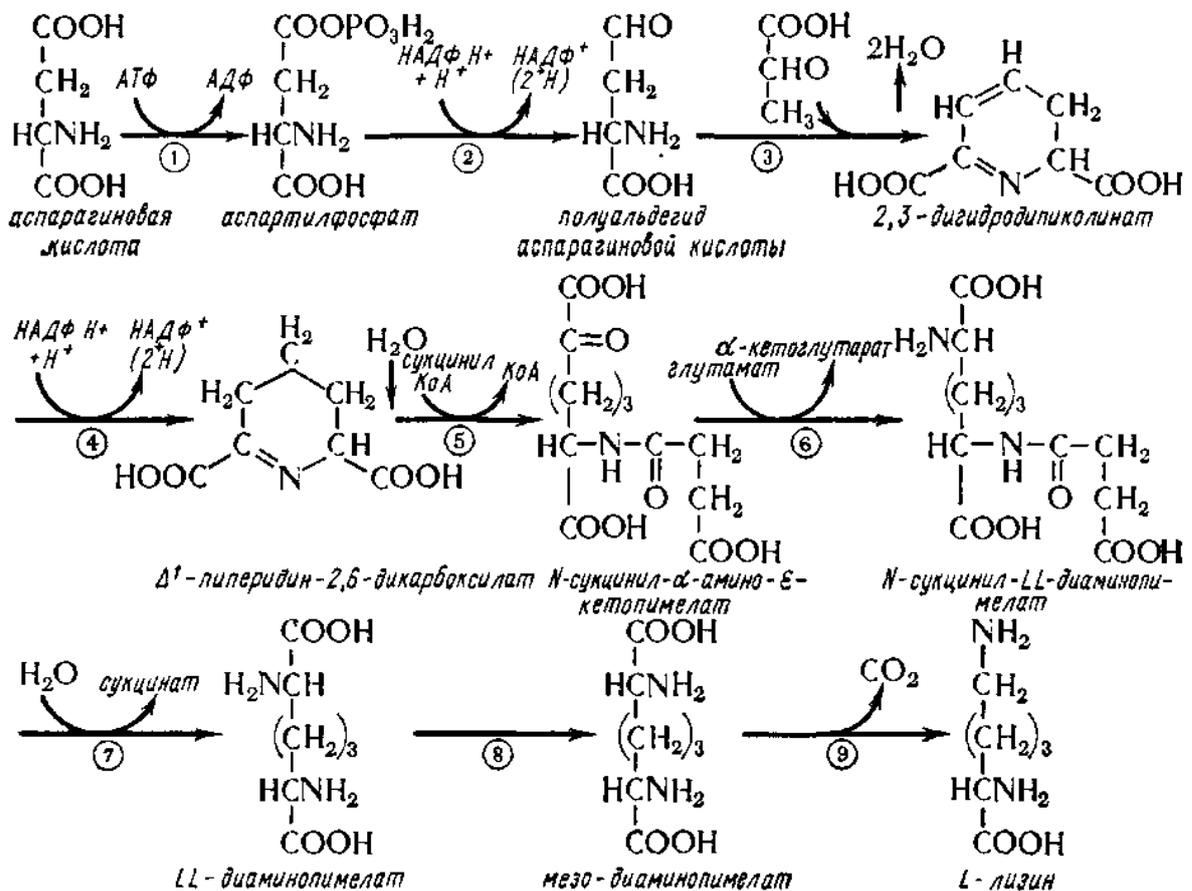
В отличие от этого, гигиеническими нормативами РФ установлены предельно допустимые концентрации микроорганизмов-продуцентов лизина *Corynebacterium* и *Brevibacterium* и их компонентов в воздухе рабочей зоны, в атмосферном воздухе населенных мест, что является фактом

безопасного использования этих микроорганизмов в производстве лизин-сульфата. [46]

### 1.3. Химическая схема производства

Химизм образования молекулы лизина показан на рис. 1.

Рис. 1. 3. Химизм биосинтеза лизина

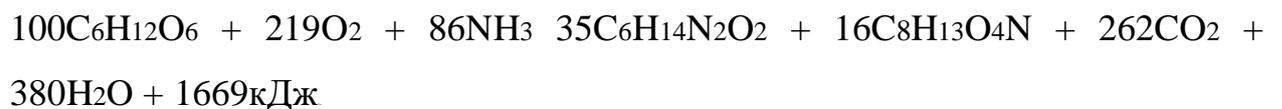


При получении лизина необходимо исключить нежелательные побочные процессы. Таким образом, при недостаточной аэрации образование аланина или молочной кислоты может происходить вместо синтеза лизина. Очень важным фактором является концентрация дефицитных аминокислот -

гомосерина, метионина и треонина в среде. Для нормального роста и биосинтеза лизина культура *Brevibacterium* sp. Оптимальная концентрация треонина составляет 800 мг, метионин - 200 мг на литр питательной среды. Кроме того, для развития культуры требуется тиамин в концентрации 200 мкг на 1 литр среды. Важным регулятором процесса является биотин. Такая же культура *Brevibacterium* sp. 22 при концентрации биотина в среде, равной 1-4 мкг / л, продуцирует глутаминовую кислоту и концентрацию 15-20 мкг / л лизина. Считается, что биотин изменяет проницаемость клеточной мембраны. При концентрации биотина 2,5 мг / л также стимулируется образование молочной кислоты. [22, 49]

Важную роль играет треонин, являющийся обязательным фактором роста на начальном этапе ферментации. Однако его концентрация не должна быть большой, поскольку на последующих стадиях ферментации (в синтезе лизина) она может действовать как ингибитор ферментативной аспараткиназы. Присутствие лизина увеличивает ингибирующие свойства треонина.

В производственных условиях, если выход лизина составляет 35,7% от использованных сахаров, полная конверсия глюкозы, аммиака и кислорода в лизин и клеточную биомассу может быть описана уравнением:



В правой части этого уравнения первый член указывает количество лизина, полученного из глюкозы. Из 1 молекулы глюкозы образуются 0,35 молекулы лизина. Второй член характеризует образование биомассы. Из уравнения видно, что для обработки каждой молекулы глюкозы требуются 2,19 молекулы кислорода. Это означает, что интенсивность аэрации во время роста культуры должна составлять 2-4 г O<sub>2</sub> в час на 1 литр среды.

## 1.4. Технологическая рецептура и схема производства

- Сжижение

Индикатор уровня утолщения суспензии А-крахмала, остающейся на крахмальной установке, составляет около 20,5 °. (Бом). РН суспензии доводят до 5,4-5,6 и добавляют кофактор фермента.

Дозированные порции фермента непрерывно подаются в суспензию, которую нагревают с помощью инжектора пара до температуры ок. 105-110 ° С, после чего суспензию помещают в сборную трубу в течение времени, равного ок. 5 минут, при той же температуре, чтобы уменьшить уровень вязкости. Затем продукт помещают в сверхбыстрый циклон, чтобы снизить температуру до 95 ° С.

- Многоступенчатый реактор

Суспензию крахмала желатиновой консистенции переносят в реактор, где происходит полный процесс сжижения. Время пребывания суспензии в реакторе составляет ок. 100-110 минут, в зависимости от степени, необходимой для дальнейшего формирования сахара, для получения желаемого продукта (для достижения DE (эквивалент декстрозы (D-глюкоза) и спектр сахара). Затем гидролизат подается в сахаровую систему.

- Осахаривание

Если DE превышает 30, гидролизат из реакторов сжижения охлаждают до 55-60 ° С, а затем уровень рН регулируют в соответствии с ферментами, используемыми для образования сахара. Ферментные части автоматически и непрерывно подаются дозирующими насосами в гидролизат. Сахарирование происходит в смесителях при температуре 55-60 ° С и рН 4,5-5,0. Процесс длится 60 часов, после чего показатель DE составляет 98.

- Угольная обработка

На этом этапе окрашенные компоненты поглощаются активированным углем. Неочищенный гидролизат нагревают в теплообменнике до

достижения идеальной температуры поглощения цвета и переносят в резервуар, в который добавляется активированный уголь.

- Подготовка фильтра и угольной суспензии

Секция обработки угля, вакуумные фильтры и свечные фильтры используют суспензии различных типов. Для получения этих суспензий в сухой секции производственного объекта устанавливается система распыления порошка. В этой системе в потоке воды могут быть растворены большие мешки с фильтрующей средой (фильтрующей средой) или углеродным порошком.

- Вакуумная фильтрация

В этом процессе уголь, нерастворимые белки и жиры отделяют от гидролизата на поверхности вакуумного фильтра фильтрующим слоем целлюлозы, что приводит к чистому гидролизату.

- Фильтры-свечки

После фильтрации гидролизат направляется в фильтр-свечку, способный устранить из суспензии все тонкие частицы.

- Выпаривание

После очищения, перед тем, как перейти в выпариватель, гидролизат выводится в буферный резервуар. Сгущение происходит в многокорпусном выпаривателе, согласно пленочному принципу, где гидролизат течет сверху вниз, как кипящая пленка по внутренней стенке вертикальных нагревательных труб.

Выпариватель снабжен термодатчиком для обеспечения оптимальной экономии расходования пара. Давление потока и пара контролируется автоматически. Сгущение происходит при относительно низкой температуре, которая обеспечивает мягкую и деликатную очистку продукта. Конечное содержание сухого вещества будет  $> 70\%$  для того, чтобы исключить разжижение при ферментации. [28]

В зависимости от назначения из культуральной жидкости можно получить различные микробиологические препараты: жидкий концентрат лизина (ЖКЛ), сухой кормовой концентрат лизина (ККЛ), кристаллический лизин.

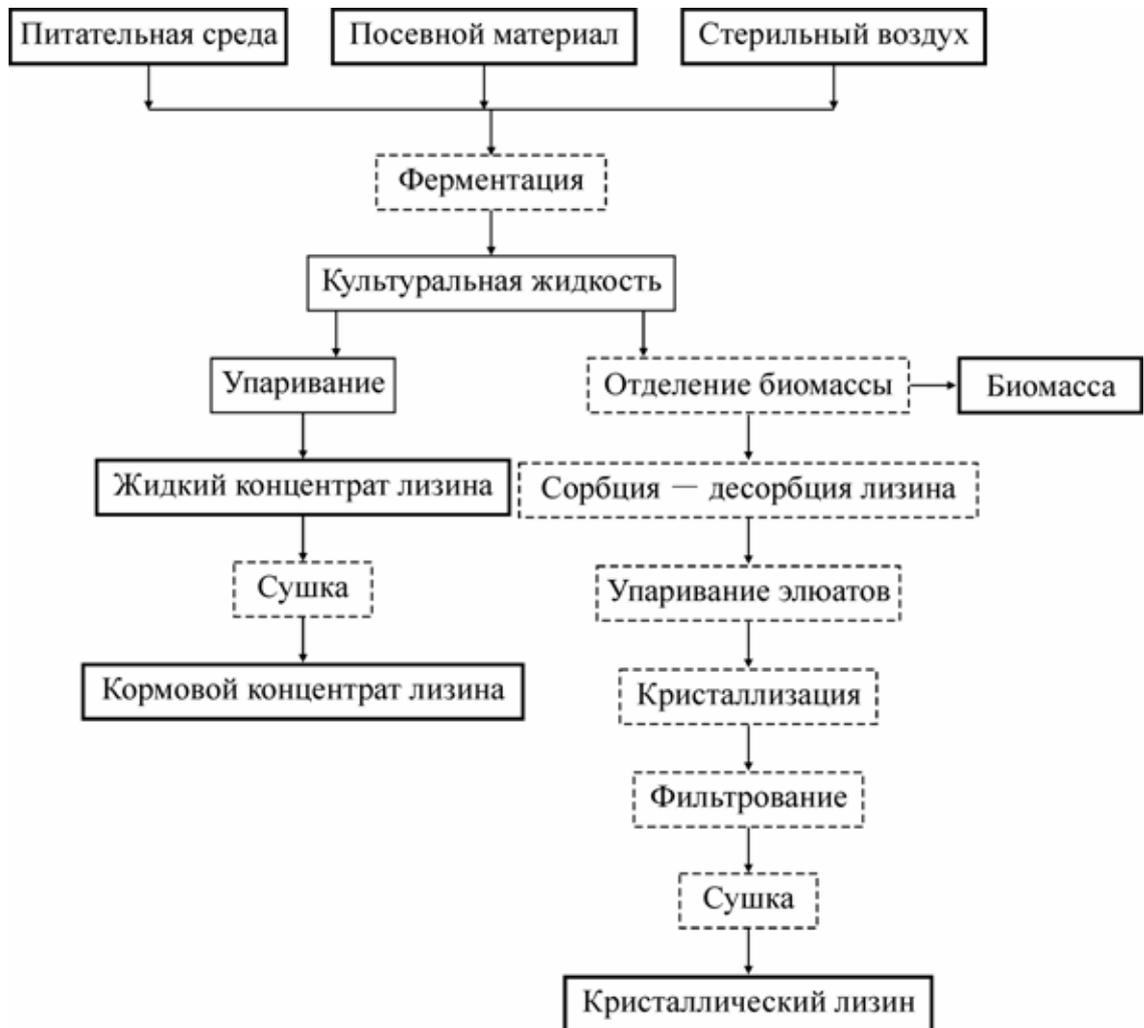


Рис. 1. 4.1. Технологическая схема производства лизина

Для биосинтеза лизина используют гомосериндефицитные мутанты ауксотрофных бактерий родов *Brevibacterium*, *Micrococcus*, *Corynebacterium*.

В промышленных условиях в качестве источника углерода применяют фуражное зерно, мелассу, гидрол, гидролизаты целлюлозосодержащего сырья, крахмал, а также уксусную кислоту.

### 1.5. Приготовление стерильных питательных сред и посевного материала

Все продуценты лизина являются биотин-зависимыми микроорганизмами. Количество биотина в среде должно быть намного выше (29 мкг / л), чем это необходимо для нормального роста и развития микробной клетки (4-5 мкг / л). Если количество биотина снижается до 1-2 мкг / л, биосинтез лизина замедляется, но образование глутаминовой кислоты одновременно возрастает. [1]

Источником биотина, витаминов и ряда аминокислот обычно являются кукурузный экстракт и свекла меласса. Максимальный биосинтез лизина наблюдается в средах с сахарозой (табл. 1.6.1.)

Таблица 1.6.1. Влияние источника углерода (концентрация 7,5 %) на биосинтез L-лизина продуцентом *Brevibacterium flavum*

Источник углерода	Лизин, г/л	Ассимиляция сахара, %
Глюкоза	22,0	7,6
Сахароза	25,0	7,1
Галактоза	1,0	0,7
Ксилоза	3,5	2,5
Манноза	6,0	4,5
Рамноза	2,0	1,3
Арабиноза	Следы	0,7

Существенной в усвоении углеродсодержащих соединений является их концентрация в питательной среде. Наибольшее количество лизина было получено на средах, содержащих 10-12% сахарозы. При более высоких концентрациях сахарозы удельный темп роста производителя снижается, а коэффициент конверсии сахара ( $Y_P / S$ ) уменьшается.

Семя готовится в два этапа: сначала в колбах, а затем в посевных машинах с аэрацией (11 / мин) и интенсивном перемешивании и автоматическом регулировании температуры ( $300\text{ }^\circ\text{C}$ ) и  $\text{pH} = 7$  в соответствии с правилами.

Если в качестве источника углерода используют уксусную кислоту (ацетат аммония), то из-за ингибирующего действия ацетатных ионов на рост клеток при концентрациях выше 2% фракционная подача субстрата осуществляется по мере ее потребления.

Промышленными производителями лизина являются гомосерин-дефицитные мутанты ауксотрофных бактерий родов *Brevibacterium*, *Micrococcus*, *Corynebacterium*.

Клетки *Brevibacterium* sp. Культуры представляют собой фиксированные грамположительные стержни длиной 1,2-2,5 мкм, но иногда они могут иметь овальную или круглую форму.

Клетки имеют максимальную длину в логарифмической фазе роста. В быстрорастущих клетках рибосомальный белково-синтезирующий аппарат хорошо экспрессируется, а в медленно растущем, но интенсивно синтезируемом лизине - мембранной системе. В клетках, интенсивно синтезирующих лизин, ферменты цикла Кребса, многие из которых связаны с мембранами, также очень активны. [35]

Среди источников азота наиболее часто используют соли аммония и кукурузный экстракт (получают обработкой кукурузных жмыхов серной кислотой при  $90\text{--}100\text{ }^\circ\text{C}$ ), кислотные гидролизаты дрожжей или казеина. Последние содержат необходимые ауксотрофному штамму аминокислоты и витамины. Оптимальное соотношение углерода и азота в среде составляет

11:1 (при его увеличении выход лизина падает, при уменьшении накапливается аланин). В питательной среде также должны содержаться соли калия, магния и фосфора (табл. 1.6.2.).

*Таблица 1.6.2.* Состав питательных сред при выращивании продуцента лизина (%)

<b>Компоненты</b>	<b>Посевной аппарат</b>	<b>Промышленный ферментер</b>
Меласная среда		
Меласса (по содержанию сахара)	7,5	7–12
Кукурузный экстракт (содержание СВ 50 %)	2	1,2–1,5
Сульфат аммония	2	2
Однозамещенный фосфат калия	0,05	0,05
Двухзамещенный фосфат калия	0,05	0,05
Мел	1	1
Пенегаситель синтетический	0,1	0,1
Вода	Остальное	Остальное
рН среды	6,9–7,0	7,0–7,2
Ацетатная среда		
Ацетат аммония	1,5	1,5
Глюкоза	1,0	1,0
Однозамещенный фосфат калия	0,02	0,02
Сульфат магния	0,04	0,04
Сульфат аммония	3,0	3,0
Гидролизат соевой муки	1,5	1,5

Процесс получения лизина требует строгих асептических условий. Рост производственной культуры лизина производителю обычно осуществляют в ферментерах, объем которых составляет 50, 63 или 100 м<sup>3</sup>. Семенной материал в количестве 5-10 об. % Объем питательной среды поступает в ферментер. Сразу же после посева в него вводят воздух, нагретый до 50 ° С, исходя из 1 объема воздуха на 1 объем среды в минуту при давлении 0,12-0,13 МПа.

Время ферментации составляет 55-72 ч, процесс проводят при интенсивном перемешивании среды при температуре 28-32 ° С, рН 7,0-7,5 (поддерживается добавлением аммиачной воды к среде) и периодическим кормлением стерильного пеногасителя.

Процесс культивирования состоит из двух этапов. В первый день клетки потребляют около 25% углеводов и азотистых веществ; В это время почти вся биомасса накапливается. На втором этапе скорость накопления биомассы резко снижается, но лимфа накапливается в QL. В конце процесса титрующее средство (аммиачная вода) больше не потребляется, а концентрация лизина составляет 60-100 г / л, биомасса накапливается 10-15 г / л (СВ), коэффициент потребления сахара на лизин составляет 25-35%. [41, 42]

### **1.6. Получение препаратов лизина**

В зависимости от назначения из КЖ можно получить различные микробиологические препараты: жидкий концентрат лизина (ЖКЛ), сухой кормовой концентрат лизина (ККЛ), кристаллический лизин.

Жидкий концентрат лизина. Для получения ЖКЛ и ККЛ культуральную жидкость, содержащую 10–13 % СВ, подкисляют HCl до рН = 5,0 и добавляют 0,15% раствор гидросульфита натрия для стабилизации лизина. Стабилизированную культуральную жидкость упаривают под вакуумом до 35–40 % СВ.

Концентрат сухого лизина получают путем сушки ЛКЛ в распылительных сушилках до содержания влаги 5-6%. Сухой ККЛ очень

гигроскопичен, поэтому сразу после сушки он упаковывается в полиэтиленовые пакеты.

Менее гигроскопичный ККЛ получают путем сушки ЛКЛ вместе с наполнителями (костная мука, кормовые дрожжи, пшеничные отруби и т. Д.).

Состав кормовых препаратов включает, помимо лизина, другие аминокислоты, а также витамины, макро- и микроэлементы, которые более подробно описаны в таблице 1.8.1.

*Таблица 1.8.1. Химический состав кормовых препаратов лизина*

<b>Компонент</b>	<b>Содержание</b>
Аминокислоты, масс. % от массы СВ	
Лизин	15–20
Глутаминовая кислота	2,5–3,7
Валин	1,2–4,8
Аланин	1,3–3,1
Аспарагиновая кислота	0,8–1,4
Лейцин	0,6–1,1
Пролин	0,3–2,8
Глицин	0,6–0,9
Аргинин	0,3–0,8
Тирозин	0,4–0,7
Метионин	0,4–0,6
Изолейцин	0,4–0,6
Фенилаланин	0,2–0,6
Триптофан	0,5–0,6
Серин	0,4–0,6
Треонин	0,3–0,6
Гистидин	0,2–0,3

Цистеин	0,2–0,3
Азотистые вещества, масс. % от массы СВ	
Общий азот	5,2–7,9
Протеин (N×6,25)	37,5–49,4
Азот:	
белковый	1,9–3,6
α-аминный	0,9–2,0
аммиачный	0,3–1,4
Бетаина	0,82–1,66
Бетаин	6,0–13
Витамины, мкг/г	
Тиамин (витамин В1)	1,7–9,7
Рибофлавин (витамин В2)	84,2–160
Пантотеновая кислота (витамин В3)	30–60
Фолиевая кислота (витамин В4)	10–20
Пиридоксин (витамин В6)	100–340
Никотиновая кислота (витамин РР)	8–10
Другие органические вещества, масс. % от массы СВ:	
редуцирующие вещества	4,6–12,7
Жиры	1,3
клетчатка	0,3
Минеральные вещества, масс. % от массы золы	
Зола, масс. % от массы СВ	19,0–28
Кальций	5,2–12,5
Калий	28,6–33,6
Натрий	0,8
Магний	1,1–1,5
Железо	0,1–0,25

Фосфор	2,2–4,4
Кремний	10,9–11,5
Микроэлементы, мг/100 г	
Цинк	1821
Кобальт	67,8
Кадмий	476,7
Молибден	545,9
Марганец	3071
Медь	280

Кристаллический лизин выделяют из QL после разделения биомассы.

Для приготовления продуктов питания пригодны препараты лизина с содержанием основного вещества (моноклоргидрата лизина) от 70% и выше. Допускается окрашивать кристаллы в желтый и светло-коричневый цвета. Для медицинских изделий предъявляются более жесткие требования; Для парентерального питания содержание основного вещества должно составлять не менее 99%.

В нормальном ходе процесса доля боковых аминокислот не превышает 3% от содержания лизина, а доля микробных клеток составляет 1,5%. Для отделения биомассы от QL используются саморазгружающиеся сепараторы, а также фильтрация с помощью инкрустационного слоя либо на барабанном вакуумном фильтре, либо на фильтровальных прессах с последующим промыванием осадка водой.

Растворы, содержащие лизин после подкисления соляной кислотой ( $\text{pH} = 5,0 \times 5,2$ ) и введения стабилизатора ( $\text{NaHSO}_3$ ), концентрируют выпариванием в вакууме до 45-50% СВ. Полученный концентрат подвергают кристаллизации, которую проводят при 5-12 ° С в течение 1-2 дней. Осадок отделяют от маточного раствора в проточных промышленных центрифугах, а затем сушат в распылительной сушилке или в псевдооживленном слое.

Готовый продукт, как правило, окрашен в коричневый цвет и содержит не менее 70% основного вещества.

Другим способом выделения лизина является процесс ионного обмена. Для этого раствор продукта подкисляют  $H_2SO_4$  до  $pH = 1,6-2,0$ , что приводит к образованию дикатиона аминокислоты. После хемосорбции на катионите (КУ-2х8), используемом в форме  $H^+$  или  $NH_4^+$ , выделяют примеси нейтральной и кислотной природы. Аминокислоты элюируются из катионита с 0,5-5% гидроксидом аммония, раствор выпаривают, подкисляют  $HCl$  до  $pH 4,9$  и  $5,0$  и концентрат кристаллизуют при  $5-12^\circ C$  с получением кристаллов монохлоргидрата лизина цвета желтого или светло-коричневого цвета, которые после сушки содержат 90-95% основного материала и 1,0-12,5% золы. Для получения препарата с более высокой чистотой схема очистки включает стадию обработки раствора активным углеродом, перекристаллизацию из 50% этанола и т. Д. [48, 49]

## ГЛАВА 2. ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1. Объект исследования

Объектом исследования данной дипломной работы является процесс ферментативного гидролиза **крахмала В**.

Ферментативный гидролиз крахмала В проводится для того, чтобы разрушить молекулу крахмала до моно- и ди- сахаров (только такие фрагменты могут потреблять микроорганизмы).

Традиционно в технологии применяют крахмал А. С помощью амилолитических ферментов разрывают крахмал на глюкозу, тем самым получая готовый компонент для питательной среды.

Крахмал В отличается от крахмала А тем, что в нем есть примесь протеина до 5%. Поэтому мы берем амилазы, добавляем протеазы и, тем самым, «рвем» крахмальные и белковые молекулы одновременно.

Для постановки эксперимента используются следующие ферментные препараты:

Протоферм FP - ферментный препарат кислой грибной протеазы. Гидролизует пептидные связи в белках. Способствует повышению физиологической активности дрожжей, улучшает показатели сбраживания суслу. Позволяет получить сусло, обогащенное аминокислотами. Ускоряет брожение на 40% и увеличивает выход спирта на 2%.

Пролайв BS ликвид - Ферментный препарат нейтральной бактериальной протеазы. Гидролизует белок сырья. Интенсифицирует спиртовое брожение. Способствует снятию белкового осадения и нагара на оборудовании. [50]

### 2.2. Условия, оборудование и методы исследований

При постановке эксперимента использовались следующие методы:

- Измерение молярной концентрации глюкозы в пробе,
- Измерение градуировочных растворов,
- Методики приготовления питательных сред,
- Определение количества сухих веществ в пробе на автоматическом цифровом рефрактометре,
- Определение оптической плотности пробы на спектрофотометре,
- Определение свободных фосфатов на спектрофотометре,
- Определение свободного аммиачного азота в пробах (метод Кьельдаля)
- Методика определения лизина с помощью жидкостной хроматографии
- Методика работы с настольным биореактором Minifors,
- Метод истощающего штриха (при микробиологическом контроле),
- Статистическая обработка результатов разностным методом.

Данные обрабатывались программой Microsoft Office Excel 2007.

**Основное оборудование, применяемое во время постановки эксперимента в химической лаборатории НИЛ:**

- автоматический анализатор глюкозы «Энзискан ультра»,
- спектрофотометр,
- анализатор белка и свободного аммиачного азота «Кьельтек 8200»,
- программируемый цифровой рефрактометр ATAGO.
- настольный биореактор «Minifors».

Автоматический анализатор глюкозы «Энзискан ультра» мембранного типа предназначен для измерения концентрации молярной глюкозы в культуральной жидкости. Пределы допустимой базовой относительной погрешности устройства составляют  $\pm 6\%$ .

Принцип анализатора основан на амперометрическом определении концентрации перекиси водорода, которая образуется при расщеплении

глюкозы ферментами глюкозооксидазы. В результате реакции появляется электрический сигнал, он преобразуется в постоянное напряжение и измеряется аналого-цифровым преобразователем. Дозировка образцов осуществляется дозатором со встроенным датчиком синхронизации.

Датчик начинает цикл измерения, а система выпуска раздатчика обеспечивает синхронную инъекцию образца в измерительную ячейку, нажав кнопку «Пуск» на корпусе дозатора. Микропроцессорная система обеспечивает измерение температуры в измерительной ячейке, автоматическое изменение продолжительности стирки в зависимости от концентрации глюкозы в образце. Анализатор имеет бесшумную систему стирки.

### **Калибровка автоматического анализатора глюкозы «Энзискан ультра»**

Калибровку анализатора проводят при каждом включении прибора, и если анализатор информацией на экране предлагает перейти к калибровке (по прошествии 4 часов после последней калибровки). Калибровку и другие необходимые измерения проводим в режиме «Сыворотка».

Калибровка:

1. Подготовили флакон калибровочного раствора глюкозы 10ммоль/л.
2. Берем дозатор, устанавливаем на него наконечник, открываем флакон с калибровочным раствором.
3. Промываем камеру ячейки, нажав кнопку «Промывка».
4. Дозатором прибора набираем раствор глюкозы из флакона. Вводим раствор в канал ввода путем нажатия кнопки дозатора до второго упора, достаем дозатор из канала ввода и только затем отпускаем кнопку дозатора.
5. Через 10 секунд на дисплее появляется результат: 1200. Результат представлен в условных единицах. Значение должно быть в диапазоне от «0400» до «1300». Если значение меньше «0400» или постоянно меняется в диапазоне более 3%, то это происходит по причинам: мембрана повреждена или неправильно установлена; датчик имеет плохое хлорсеребряное

покрытие;загрязнение датчика; Калибровка проводится двукратно. При калибровке, если последующее значение тока совпадает с предыдущим – анализатор откалиброван.

6. На экране «Энзискан ультра» появилось: «Калибр.ОК», то есть анализатор откалиброван.

### **Измерение молярной концентрации глюкозы в пробе.**

Для анализа брали центрифугат КЖ. Пробу разводили дистиллированной водой. Для данной пробы используем разведение 1:50. То есть в 10 мл.колбу, добавляем 0,2 мл. (дозатором на 200мкл) центрифугата культуральной жидкости, избегая попадания в дозатор осадка, оставшегося после центрифугирования; доводим до метки дистиллированной водой. Закрываем колбу пробкой и тщательно перемешиваем раствор.

1. На дозатор анализатора глюкозы надеваем новый наконечник. Набираем дозатором разведенную пробу (нажатие до первого упора), салфеткой удаляем капли пробы с наконечника дозатора и вводим в канал «ввод пробы», нажатие производим до второго упора и не отпускаем, пока дозатор не удален из канала.

2. Через 10 секунд на дисплее появляется результат и автоматически включается «Промывка».

Обработка результатов: для перевода моль/л. в г/л.:

$$C = (C_m * 180 * n) / 1000,$$

где n - разведение,

C<sub>m</sub> - результат на дисплее прибора, моль/л.

**Спектрофотометр ЮНИКО-2800** – самая экономичная модель в линейке спектрофотометров ЮНИКО. Прибор разработан для отечественных лабораторий, имеет один луч в диапазоне от 190 до 1100 нанометров, размер спектральной щели равен 4-м нанометрам. При сканировании со скоростью до 1000 нм/мин этот спектрофотометр имеет очень высокую точность

определения оптической плотности, имеет установку длины волны с шагом 0,1 нанометр и при этом имеет отличную стабильность работы.

### **Определение оптической плотности пробы на спектрофотометре**

Измеряем оптическую плотность на спектрофотометре на длине волны 390 нм. Образец разбавляют дистиллированной водой несколько раз. Мы заполняем кювету раствором для сравнения (дистиллированная вода). Мы устанавливаем кювету с управляющим решением на пути света. Нажмите кнопку 100% Т до нуля. Затем возьмите чистую кювету, используя одноразовую пипетку, заполните кювету раствором образца. Мы установили кювету раствором образца в спектрофотометре. Ручка для перемещения держателя кюветы вводится в рабочую зону с помощью кюветы с раствором образца. Нажимаем кнопку START. Результат отображается на экране.

Измерение градуировочных растворов:

1. Заполняем кювету первым градуировочным раствором. Помещаем в кюветный держатель на пути прохождения света.
2. Настраиваем спектрофотометр таким образом, пока на дисплее не отобразится первая цифра значения концентрации. Повторяем эту операцию, пока все цифры не будут отображены в области значения. Нажимаем SAVE. Вставляем значение «STD. No 1=», Повторяем эту операцию до тех пор, пока все цифры не будут отображены в области значения «STD. No 1=». Нажимаем SAVE. Вставляем значение «STD. No 1=», нажимаем ENTER. Теперь значение поглощения первого градуировочного графика отображается на дисплее рядом с номером 1 (колба №1). Нажимаем ENTER.
3. Повторяем эти действия по отношению ко всем градуировочным растворам. Полученные результаты (концентрация фосфора): 1 - 0,254 мг/л; 2 – 0,527 мг/л; 3 – 0,750 мг/л; 4 – 1,018 мг/л; 5 – 1,253 мг/л.

Преимуществом Кьельтека является гибкость методов: в отличие от спектрометров, он позволяет определять различные фракции азота.

Анализатор белка и азота представлен в трех модификациях: ручной, автоматический и полуавтоматический. В зависимости от ваших потребностей, Кьельтек может быть оснащен расходомерами для 8 или 20 образцов. Общее время анализа на приборе Кьельтек уменьшается в 3 раза по сравнению с традиционным методом Кьельдаля, потребление энергии снижается на 95%, а потребление реагента - на 50%.

### **Техническое ежедневное обслуживание аппарата Кьельтек 8200.**

Очистка парогенератора, шлангов и распылительной головки:

1. Помещаем в пробирку для дистилляции 5 – 10 мл дистиллированной воды,
2. Включаем программу парогенерации на 5 минут,
3. Включаем «слив пробирки» для промывки шлангов.

Очистка поддона и защитной дверцы:

1. После промывки системы водой и паром извлекаем из установки поддон и защитное стекло,
2. Промываем их водой, ополаскиваем дистиллированной водой, просушиваем и помещаем части на место.

### **Приготовление химических реактивов, необходимых для определения свободных фосфатов на спектрофотометре**

Приготовление химических реактивов, необходимых для определения свободных фосфатов на спектрофотометре: приготовление тартрата (калий сурьмавиннокислый): Берем 2,66г. калия сурьмавиннокислого растворяем в колбе на 1000мл. Доводим дистиллированной водой до метки. Закрываем колбу пробкой и тщательно перемешиваем;приготовление основного раствора гидрофосфата калия с концентрацией 0,1 мг/мл: Берем 0,4393г гидрофосфата калия предварительно высушенного в течение 4 часов при температуре 105 градусов и растворяем в колбе на 1000 мл. Доводим

дистиллированной водой до метки. Закрываем колбу пробкой и тщательно перемешиваем.

#### Реактивы.

1. Молибдат аммония.

9,6 г молибдата аммония растворить в колбе на 1000 мл.

2. Аскорбиновая кислота.

20 г аскорбиновой кислоты растворить в колбе на 200 мл.

3. Раствор серной кислоты.

К 800 мл воды добавить 112 мл концентрированной серной кислоты. охладить и довести объём до 1000 мл.

4. Тартрат (калий сурьмавиннокислый).

2,66 г калий сурьмавиннокислого растворить в колбе на 1000 мл.

5. Основной раствор  $K_2PO_4$  с концентрацией 0,1мг/мл.

0,4393 г  $KH_2PO_4$  предварительно высушенного в течении 4 часов при температуре  $105^{\circ}C$  растворить в колбе на 1000 мл.

6. Окрашивающая смесь.

Смешивать растворы непосредственно перед анализом.

В конической колбе смешать:

50 мл  $H_2SO_4$  20 мл тартрата 50 мл молибдата аммония

20 мл аскорбиновой кислоты. Хранить только 4 часа.

Калибровочные растворы. Ниже, в таблице 2.2.1 указано разведение для калибровки.

№ стандарта	Объем $KHP_04$ , мл	Объем колбы, мл	Концентрация фосфора, мг/л
-------------	---------------------	--------------------	-------------------------------

1	0,5	100	0,5
2	1	100	1
3	1,5	100	1.5
4	2	100	1
5	2,5	100	2,5

Таблица 2.2.1. Разведение для калибровки при анализе определения свободных фосфатов на спектрофотометре

Раствор сравнения: в колбе смешать 50 мл дистиллированной воды и 15 мл окрашивающей смеси.

Стандарты для калибровки: смешать 50 мл стандарта и 15 мл окрашивающей смеси.

Раствор сравнения и стандарты стоят 30 мин (минимум). Затем строим калибровку.

Приготовление индикаторного раствора метилового красного:

1. Растворяем 0,1г. метилового красного в 100мл. этанола.
2. Реактив хранится в темном прохладном месте (в шкафу для реактивов) в течение 1 года.

### **Определение свободного аммиачного азота в пробах (метод Кьельдаля)**

Определение свободного аммиачного азота проводим на аппарате Кьельтек.

Пробирку для дистилляции помещаем в химический стакан и устанавливаем на весы. Отбираем пробу одноразовой пипеткой. Примерно 2г. Дистилляционную пробирку переносим в камеру прибора. Закрываем дверцу аппарата. Нажимаем старт. Процесс идет примерно 5 минут. После проведения процесса парогенерации извлекаем и аппарата Кьельтек приемную колбу. В ней раствор, имеющий розовую окраску. Содержимое

колбы оттитровываем раствором 0,1N серной кислоты при помощи цифровой бюретки. Расчет результатов основан на исходной массе или объеме в г или мл используемой пробы.

$$\% N = \frac{(V1 - V2) * M * 14,007 / 1000}{\text{Масса}} * 100$$

Где:

V1 – объем титранта для пробы в мл,

V2 – объем титранта для контроля в мл,

Масса – масса или объем пробы,

M – используемая молярность серной кислоты,

14,007/1000 – коэффициент преобразования для азота (N) в г/л

**Рефрактометр** - прибор для измерения показателей преломления света в различных средах. Автоматический рефрактометр Atago RX предназначен для высокоточных и воспроизводимых измерений. Значение Brix (мера массового отношения растворённой в воде сахарозы к жидкости) для концентраций инвертированного сахара или высокофруктозного кукурузного сиропа может быть измерено в диапазоне 0-95% с высокой точностью  $\pm 0.05\%$ . Рефрактометр RX оснащён функцией автоматической температурной компенсации.

### **Определение количества сухих веществ в пробе на автоматическом цифровом рефрактометре**

Почистили и вытерли поверхность призмы рефрактометра бумажной салфеткой. Одноразовой пипеткой набираем несколько миллилитров пробы. Капаем несколько капель образца на поверхность призмы. Закрываем крышку. Нажимаем кнопку START. На экране изображена температура пробы и ее охлаждение или нагревание до нужной. На экране появляется результат Brix (%). Значение сохраняется на экране в течение одной минуты. Затем 2 раза снова протираем призму бумажной салфеткой, смоченной дистиллированной водой.

### **Методика определения лизина с помощью жидкостной хроматографии:**

Этот метод используется для определения L-лизина и других аминокислот.

Для образцов, содержащих несколько аминокислот, которые трудно разлагаются, необходим способ градиентного элюирования для достижения хорошего разделения всех аминокислот. Образцы разбавляли в воде, экстрагировали фталальдегидом и затем анализировали на колонке C-18 с помощью противофазной высокоэффективной жидкостной хроматографии с использованием флуоресцентного детектора. Элюент представляет собой фосфатный буферный раствор (pH 4,0-4,1), содержащий метанол, 2-пропанол, ацетонитрил и ультрачистую воду. Для всех образцов и стандартов добавляется внутренний стандарт L-орнитин. Вода, используемая для приготовления элюента и стандартных растворов, а также для разбавления образцов и стандартов должна быть высокой чистоты (ASTM тип I), что означает ионное сопротивление  $\leq 18,2 \text{ M}\Omega \times \text{см}$  и общий уровень органического углерода ТОС - Общий органический углерод), равный 1-2 частям на миллиард (частей на миллиард).

Программное обеспечение Chromeleon 7 используется для управления насосом, детектором и автосамплером и для расчета степени конденсации аминокислот. Газообразный азот барботируется через элюент во время приготовления. Элюенты помещаются в штатив для безопасного и функционального размещения резервуаров с растворителями в верхней части насоса. Градиентный насос оснащен активной системой промывки обратной промывки и функцией дегазации. В автосамплере образец смешивают с раствором офталинового альдегида и затем подают в клапан инжектора. Автосамплер установлен в компьютерном программном обеспечении Chromeleon, и последовательность готова к анализу стандартов и образцов. Вместе с последовательностью вам нужно выбрать программу и метод. Программа управляет насосом, т.е. Поток, состав элюентов, детектор и время анализа. Метод сообщает, как программное обеспечение Chromeleon вычисляет и рисует пики. Когда запускаются стандарты с известными

степенями загущения аминокислот, программное обеспечение Chromeleon может рассчитать степень конденсации аминокислот в образцах. Образцы разбавляют добавлением сверхчистой воды до утолщения в диапазоне от 50 до 500 мг / л (1-лизин, HCl).

### Методики приготовления питательных сред

Гидролизат пшеничной клейковины и экстракт кукурузы являются основным источником факторов роста культуры. В ходе экспериментов изменился процент содержания ГПГ и КЭ, который был введен в питательные среды.

Таблица 2.2.2. Состав ферментационной среды для контроля продуктивности посевного материала V=100 мл

Компоненты	Количество
H <sub>2</sub> O	45,0 мл
КН <sub>2</sub> РО <sub>4</sub>	0,1 г
Аммоний хлористый	0,74 г
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	0,1 г
Кальций углекислый	1,25 г
50% ГПГ	10 мл
α-биотин 0,02% раствор	0,05 мл
Довести водой до 74,6 мл	
Стерилизовать при t=116 °С 30 минут	
Глюкоза	11,5 г
H <sub>2</sub> O	15 мл
Стерилизовать при t=116 °С 30 минут	
Тиамин 0,05% водный раствор	0,4 мл

Взять 50 мл кислого ГПГ довести рН до 6,6 25% аммиачной водой, добавить воды до 100 мл.

Берется 11,5 г глюкозы, растворяется в 8 мл воды на водяной бане, после первого растворения довести водой до 15,0 мл. Глюкозу стерилизуют отдельно при температуре  $116 \pm 1$  °С, при давлении 0,08 Мпа в течении  $30 \pm 1$  минут.

Раствор тиамин 0,005 % стерилизуем отдельно при температуре  $105 \pm 1$  °С в течении  $30 \pm 1$  минут, при давлении 0,05 Мпа.

В химическом стакане объемом 500 мл градуированный цилиндр заполняют 45 мл дистиллированной воды. Мы взвешиваем 0,1 г  $\text{KN}_2\text{PO}_4$  на весах, 0,1 г  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1,25 г карбоната кальция, 0,74 г хлорида аммония, добавляют 0,05 мл 0,02% d-биотина.

Отдельно от среды 50 мл 50% раствора ГПГ, полученного на стадии получения гидролизата пшеничного глютена перед добавлением в среду, нейтрализуют 25% раствором аммиака до рН 6,6 и добавляют 100 м воды. Поскольку концентрация аммония в аммиачной воде уменьшается со временем, другое количество аммиачной воды может пойти на нейтрализацию ГПГ. Добавить 10 мл ГПГ в среду для приготовления, все компоненты смешивают с магнитной мешалкой до полного растворения.

Чтобы иметь 50% ГПГ и 50% КЭ в растворе, необходимо взять 2,5 мл кислоты и довести до 5 мл воды. В стакан с компонентами среды также добавляют 2,5 мл КЭ и добавляют воду до 82,1 мл. Для приготовления 30% ГПГ и 70% КЭ, берут 1,5 мл кислого ГПГ и доводят до 3 мл водой. 3,5 мл КЭ добавляют в стакан с компонентами среды и доводят до 81,1 мл водой. Другие процедуры приготовления пищи не изменяются.

Мы корректируем рН среды до 7,8-8,0 раствором 25% аммиачной воды, после автоклавирования рН снижается до 7-7,1. Добавляем

дистиллированную воду до 74,6 мл и затор. Среду выливают по 5 мл каждый в качающиеся колбы Эрленмейера емкостью 100 мл, затем их закрывают пробками из хлопковой смолы, связывают пергаментом и автоклавируют при  $116 \pm 1$  °С при давлении 0,08 МПа в течение  $30 \pm 1$  минут ,

В случае заражения вся партия питательной среды отбрасывается, колбы автоклавируются.

После стерилизации колбу охлаждают и к среде добавляют стерильный раствор 0,005% тиамин и раствор глюкозы в ламинарный шкаф. После этого контроль проводится по стерильности и химическому анализу.

В дополнение к колбе, в этом эксперименте использовался лабораторный ферментер. Состав ферментационной среды приведен ниже.

Таблица 2.2.3. Ферментационная среда с содержанием ГПГ 50% и КЭ 50%

Р-р 1 стерилизовать при $t=121^{\circ}\text{C}$ 20 минут		
Состав	Количество	Единицы
$\text{NH}_4 \cdot 2\text{SO}_4$	44,04	Г
$\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,054	Г
$\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,054	Г
$\text{MgSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	2,520	Г
Ортофосфорная кислота (85%)	2,03	Г
Пенегаситель	2,03	Г
Добавочная вода	До 878	мл
Р-р 2 стерилизовать при $t=121^{\circ}\text{C}$ 20 минут		

Кукурузный экстракт	79,5	мл
Р-р 3 стерилизовать при $t=121^{\circ}\text{C}$ 20 минут		
Гидролизат клейковины	79,5	мл
Р-р 4 стерилизовать при $t=121^{\circ}\text{C}$ 20 минут		
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	3,00	г
Добавочная вода	До 50	мл
Р-р стерилизовать при $t=121^{\circ}\text{C}$ 20 минут и добавить р-ры 1,2,3,4		
Крахмальная патока 67% DE 95,5%	48	г
Добавочная вода	До 100	мл
Р-р 6 стерилизовать фильтром и добавить к р-ам 1,2,3,4,5 после стерелизации		
d-биотин 0,02% спиртовой р-р	2,7	мл
Тиамин 0,005% водный р-р	10,8	мл
Описание сахарной подпитки		
Глюкоза	1300	г
Описание ростовой подпитки		
Кукурузный экстракт	100	мл
Вода	100	мл

Гидролизат клейковины	100	мл
Подпитка сульфат аммония		
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	120	г
Вода	180	г

Таблица 2.2.3. Ферментационная среда с содержанием ГПГ 30% и КЭ 70%

Р-р 1 стерилизовать при t=121°C 20 минут		
Состав	Количество	Единицы
NH <sub>4</sub> *2SO <sub>4</sub>	31,20	г
MnSO <sub>4</sub> *5H <sub>2</sub> O	2,88	г
FeSO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O	2,88	г
Ортофосфорная кислота(85%)	6	г
Пенегаситель	1,08	г
Добавочная вода	До 875	мл
Р-р 2 стерилизовать при t=121°C 20 минут		
Кукурузный экстракт	120	мл
Р-р 3 стерилизовать при t=121°C 20 минут		
Гидролизат клейковины	73,8	мл
Р-р 4 стерилизовать при t=121°C 20 минут		

КН <sub>2</sub> Р <sub>0</sub> 4	1,20	Г
Добавочная вода	До 50	мл
Р-р стерилизовать при t=121°C 20 минут и добавить р-ры 1,2,3,4		
Крахмальная патока 72,85% DE 95,5%	50	Г
Добавочная вода	До 65	мл
Р-р 6 стерилизовать фильтром и добавить к р-ам 1,2,3,4,5 после стерелизации		
d-биотин 0,02% спиртовой р-р	5,4	мл
Тиамин 0,005% водный р-р	10,8	мл
Описание сахарной подпитки		
Глюкоза	1300	Г
Описание ростовой подпитки		
Кукурузный экстракт	100	мл
Вода	100	мл
Гидролизат клейковины	150	мл
Подпитка сульфат аммония		
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	120	Г
Вода	180	Г

Таблица 2.2.3. Ферментационная среда с содержанием КЭ

Р-р 1 стерилизовать при t=121°C 20 минут		
Состав	Количество	Единицы
NH <sub>4</sub> *2SO <sub>4</sub>	31,20	Г
MnSO <sub>4</sub> *5H <sub>2</sub> O	2,88	Г
FeSO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O	2,82	Г
Ортофосфорная кислота(85%)	6	Г
Пенегаситель	1,08	Г
Добавочная вода	До 940	МЛ
Р-р 2 стерилизовать при t=121°C 20 минут		
Кукурузный экстракт	138,0	МЛ
Р-р 3 стерилизовать при t=121°C 20 минут		
КН <sub>2</sub> РО <sub>4</sub>	1,20	Г
Добавочная вода	До 50	МЛ
Р-р 4 стерилизовать при t=121°C 20 минут и добавить р-ры 1,2,3		
Крахмальная патока 72,85% DE 95,5%	38	Г
Добавочная вода	До 65	МЛ
Р-р 5 стерилизовать фильтром и добавить к р-ам 1,2,3,4 после стерелизации		
d-биотин	0,02%	6
		МЛ

спиртовой р-р		
Тиамин 0,005% водный р-р	11	мл
Описание сахарной подпитки		
Глюкоза	1300	г
Описание ростовой подпитки		
Кукурузный экстракт	100	мл
Вода	100	мл
Подпитка сульфат аммония		
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	120	г
Вода	180	г

Таблица 2.2.3. Ферментационная среда с содержанием ГПП

Р-р 1 стерилизовать при t=121°C 20 минут		
Состав	Количество	Единицы
NH <sub>4</sub> *2SO <sub>4</sub>	63,84	г
MnSO <sub>4</sub> *5H <sub>2</sub> O	2,88	г
FeSO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O	2,88	г
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	4,08	г
Пенегаситель	1,08	г

Добавочная вода	До 730	мл
Р-р 2 стерилизовать при $t=121^{\circ}\text{C}$ 20 минут		
ГПГ	190,0	мл
Р-р 3 стерилизовать при $t=121^{\circ}\text{C}$ 20 минут		
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	11,64	г
Добавочная вода	До 200	мл
Р-р 4 стерилизовать при $t=121^{\circ}\text{C}$ 20 минут и добавить р-ры 1,2,3		
Крахмальная патока 72,85% DE 95,5%	38	г
Добавочная вода	До 65	мл
Р-р 5 стерилизовать фильтром и добавить к р-ам 1,2,3,4 после стерелизации		
d-биотин 0,02% спиртовой р-р	5,40	мл
Тиамин 0,005% водный р-р	10,80	мл
Описание сахарной подпитки		
Глюкоза	1300	г
Описание ростовой подпитки		
ГПГ	150	мл
Подпитка сульфат аммония		
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	120	г

Вода	180	г
------	-----	---

### Стерилизация посуды

Стерилизация лабораторной посуды приводит к полному разрушению всех типов микроорганизмов. Существуют различные способы стерилизации: пар, сухой поток горячего воздуха, фильтрация и другие. Выбор метода стерилизации зависит от свойств микрофлоры на поверхности.

Микроорганизмы отличаются по своей структуре клетками и мембранами, что определяет их чувствительность к температуре. Например, необратимые процессы в пневмококковых клетках начинаются при температуре 45-50 ° С, а в клетках стафилококка - при 60-70 ° С. И такие термофильные бактерии, как *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Thermoactinomyces vulgaris* и другие, растут при температуре 60 -70 ° С. Под воздействием высокой температуры происходит денатурация клеточных белков, что приводит к гибели микроорганизмов. [31, 34]

Перед стерилизацией лабораторную посуду промывают и сушат. Все колбы и пробирки плотно закрыты хлопко-марлевыми пробками. Верхняя пробка, завернутая в пергамент или фольгу, чтобы пробки не промокли. Лабораторную посуду стерилизуют, сухим жаром при температуре 175°С 1 часа и в автоклаве при давлении 1,5 атм. в течение 1 часа, для уничтожения спор микроорганизмов – 90 минут при 2 атм.

Бактериальные петли из хромовой проволоки стерилизуются в пламени газовой горелки непосредственно перед посевом. Такой метод стерилизации называется прокаливанием. Петля должна быть расположена горизонтально в нижней, самой крутой части пламени горелки. Кроме того, петля переносится в вертикальное положение, красный, сначала на нижний, затем верхняя часть провода нагревается и держатель петли горит. Кальцинирование обычно

занимает 4-6 секунд. Петли для стерильного посева должны храниться в ламинарной коробке.

Стерилизацию пара под давлением проводят в автоклаве. Автоклавирование происходит путем нагревания материала насыщенным паром при давлении выше атмосферного давления. С увеличением давления температура насыщенных паров увеличивается. С увеличением давления температура кипения жидкостей начинает возрастать, становится возможным стерилизовать их при  $100^{\circ}\text{C}$  или выше, не допуская кипения и, следовательно, испарения. Продолжительность паровой стерилизации под давлением зависит от химического состава стерилизованного материала, типов присутствующих в нем микроорганизмов и объема сосудов, в которых проводится стерилизация.

Автоклав представляет собой толстостенное герметичное устройство, в котором создается условие давления насыщенного пара. У них может быть другой дизайн, но принцип работы тот же. Эти 2 камеры - большие (стерилизация) и небольшие (водяной пар), обмениваются друг с другом трубопроводом с клапаном. Камера водяного пара соединена снаружи трубой с водяным стеклом, краном и воронкой, через которую поступает дистиллированная вода. Рабочая камера, в зависимости от материала, подлежащего стерилизации, имеет клапан выпуска воздуха, манометр для определения давления пара и предохранительный клапан для выхода пара с сильным увеличением давления.

### **Стерилизация аппаратов**

Асептические условия культивирования — это проведение данного процесса без посторонней микрофлоры. Важным требованием в культивировании производственного штамма микроорганизма-продуцента является защита среды от посторонней микрофлоры. Обеспечить асептические условия в масштабах крупного производства можно с помощью двух путей.

Первый путь — это обеспечение технологической гигиены производств.

К ним относятся комплексы приемов и средств, снижающих загрязненность посторонней микрофлорой производственной среды и блокирующих распространение производственных продуцентов в помещениях.

Второй способ - использование технических решений и методов использования специального технологического оборудования (фильтров, стерилизаторов) или реализация специальных требований к аспидам для создания основного технологического оборудования (культиваторов), приборов, трубопроводов и труборазъемов. Конечной целью процессов, которые выполняются с помощью этого оборудования, является стерилизация. Стерилизуемость и герметичность аппарата и трубопроводов позволяет проводить процесс культивации в асептических условиях. Он также включает стерильность аэрирующего воздуха, питательной среды и пеногасителя и других компонентов, введенных в культиватор. [30, 46]

Методы обеспечения стерильности и герметичности аппаратов и трубопроводов включают обработку насыщенным паром. Этот метод является более надежным, экономичным и удобным по сравнению с химическими веществами в производственных условиях.

Создание необходимой температуры во всех участках внутренней полости и ее поддержание в течение определенного периода времени обеспечивается термическим методом обработки насыщенным водяным паром.

В аппарате трудно стерилизовать такие места, как ниппели, места ввода датчиков измерительной аппаратуры, более низкие спуски и проводки трубопроводов - тупиков, которые образуются на ветвях и в точках крепления к приборам.

Стерильность должна поддерживаться на протяжении всего рабочего цикла, который длится несколько дней. Это требование может быть

выполнено только в том случае, если устройство и трубопроводы правильно герметизированы.

Ввод вала перемешивающего устройства является уязвимым местом, которое обеспечивает герметичность устройства. Обычные сальники с мягкой начинкой часто использовались для обеспечения герметичности, но оказалось, что они не обеспечивают необходимую герметичность. Из-за избыточного давления утечка масла происходит внутри машины. Он содержит постороннюю микрофлору.

Также к уязвимым местам, в связи с герметичностью, необходимо включать и запорные клапаны, которые в больших количествах оснащены оборудованием и трубопроводами. Стандартная сальниковая коробка требует много работы во время ее работы и не всегда обеспечивает требуемую степень герметичности.

Во время процесса термообработки внутренних полостей аппарата пара конденсируется на стенах. В то же время воздух выпускается из парогазовой смеси, которая накапливается на поверхности конденсатной пленки и отделяет ее от пара. В результате при содержании пара в 0,5% воздуха коэффициент теплоотдачи от пара к стенке падает на 40% и при концентрации воздуха 1% - более чем в несколько раз. Через созданный воздушный барьер молекулы пара могут проходить только через диффузию. Для повышения эффективности термической обработки оборудования необходимо минимизировать содержание воздуха в паровоздушной смеси, доступной в аппарате. Кроме того, перед началом обработки необходимо тщательно удалить воздух из устройства, продувая его паром; По возможности уменьшить потери тепла, особенно в нестерилизованных областях (фитинги, фитинги). Они должны быть защищены от теплоизоляции. Эти рекомендации подтверждаются практическим опытом.

### **Подготовка и работа с лабораторными ферментерами**

Использование лабораторных биореакторов позволяет легко оптимизировать развитие процессов культивирования микробиологических культур.

Автоклавируемый лабораторный ферментер используется для оценки влияния на коэффициент и выход, состав среды и условия ферментации, такие как температура, рН и растворенный кислород. Аналогичным образом эксперименты по стратегиям питания (периодическое брожение) могут быть успешно проведены в рамках лабораторного брожения. После разработки оптимальных условий ферментации вы можете увеличить до ферментеров. Также лабораторные ферментеры подходят для учебного процесса.

Ферментеры оснащены датчиком рН, электродом растворенного кислорода ( $pO_2$ ), датчиком пены, датчиком температуры (Pt 100) и насосами для добавления питательной среды, антивспенивателя, кислоты и щелочи для контроля рН. Средство можно автоклавируют отдельно в колбах и после охлаждения стерильный ферментер. После регулирования температуры, рН и растворенного кислорода, модификатор может быть перенесен в ферментер через сыворотку на верхнем уровне или, например, перекачивается в сахарную питательную колбу. [28]

При проведении экспериментов по ферментации лизина полезно иметь выходной газоанализатор, подключенный к ферментерам, для контроля концентрации диоксида углерода и кислорода в газах, выходящих из ферментера.

При периодической ферментации исходная концентрация сахара является относительно низкой, чтобы избежать ингибирования субстрата. Как следствие, этот состав сахара должен быть добавлен до истощения углеводов. Сульфат аммония необходим для образования конечного продукта лизинсульфата. Гидроксид аммония используют для регулирования рН в культуральной жидкости.

Большинство ферментаций лизина проводят в виде повторного ферментации с периодическим кормлением, что означает, что ферментация начинается с небольшого объема, а затем в раствор подается сахар и сульфат аммония (необязательно добавляются минералы и витамины). Когда достигается определенный рабочий объем, частичное количество продолжает добавляться через регулярные промежутки времени, пока поток продолжается.

## Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 3.1. Ферментативный гидролиз

Как и для всех других полисахаридов, для крахмала характерна реакция гидролиза – взаимодействие с водой в присутствии катализаторов, которыми выступают кислоты. Крахмал может гидролизоваться частично образуя в качестве продуктов декстрины –  $(C_6H_{10}O_5)_x$  – вещества с молекулярной массой значительно ниже, чем у крахмала.

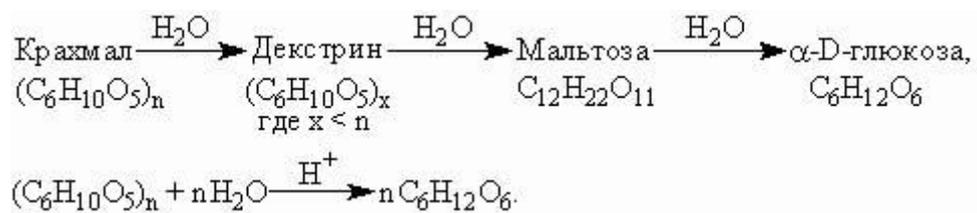


Рис. 3.1.1. Полная схема гидролиза крахмала

Если гидролиз крахмала протекает полностью, образуется глюкоза ( $C_6H_{12}O_6$ ). Этот процесс естественный и протекает в процессе переваривания пищи в желудке. [49]

Изучение возможности применения ферментов Пролайв BS ликвид и Протоферм FP для производства глюкозного сиропа из вторичных продуктов глубокой переработки зерна пшеницы мы начинали с постановки ферментативного гидролиза. Исходя из того, что по стандартной методике при работе с крахмалом А нам требовалось содержания СВ=67,4, а DE=96,8, то чтобы соблюдать методику мы взяли крахмала Б в 2 раза больше, т.к. начальное содержание сухих веществ там было в 2 раза меньше.

Методика ферментативного гидролиза с ферментными препаратами Пролайв BS ликвид и Протоферм FP (исправленная):

1. Взвесили 102,04 г крахмала;
2. Приготовили суспензию (в колбе на 500 мл с узким горлом и водоотводной трубкой довели водой крахмал до метки);
3. Измерили рН суспензии – 6,04. С помощью 0,1Н раствора соляной кислоты довели до значения 5,56 (норма варьируется в диапазоне – 5,5-5,8);
4. На анализаторе влажности определяем содержание сухих веществ в крахмале – 28,04%;
5. Взвешиваем на аналитических весах 0,1028 г фермента  $\alpha$ -амилазы (Clearflow);
6. Добавляем в суспензию фермент, перемешиваем;
7. Ставим колбу с суспензией на плиту. На водяной бане постепенно нагреваем, тщательно перемешивая.

Максимальная температура водяной бани на этой стадии - 75°C, максимальная температура суспензии - 70°C.

8. Таким образом, по истечению 25 минут суспензия разжижается – наступает вторичная стадия разжижения крахмала;
9. Доводим температуру суспензии до 90°C, поддерживаем ее 4 часа. Наступает стадия осахаривания;
10. Остужаем суспензию до 55°C, опустив ее в водяную баню с такой же температурой;
11. С помощью 0,1Н раствора соляной кислоты довели до значения 4,43;
12. На аналитических весах взвешиваем фермент Пролайв BS ликвид. Масса навески – 0,0346 г.
13. Добавляем вспомогательный фермент – глюкоамилазу. Масса навески – 0,2055 г.

14. Оставляем суспензию на водяной бане на 48-55 часов при постоянном перемешивании магнитной мешалкой.

Каждые 4 часа брались пробы на измерение содержания глюкозы. Результаты трех повторностей отражены в таблицах и сравнительном графике.

Таблица 3.1.1. Опыт 1. 26.07.16

№п/п	Время	Разведение	Содержание глюкозы, г/л
1	14:30	1:10	13,6
2	18:00	1:49	133,24
3	22:00	1:100	155,56
4	2:00	1:111	156,87
5	6:00	1:100	286,64
6	10:00	1:213	202,85
7	14:00	1:200	217,22
8	18:00	1:191	202,69
9	22:00	1:202	243,88
10	2:00	1:208	188,71
11	6:00	1:209	143,0
12	10:00	1:199	207,23
13	14:00	1:200	217,08
14	16:00	1:200	223,08

- Содержание лизина – 0,012 г/л
- Содержание NH<sub>3</sub> – 0,022 %

Таблица 3.1.2. Опыт 2. 1.08.16

№п/п	Время	Разведение	Содержание глюкозы, г/л
1	14:30	1:10	12,4
2	18:00	1:49	123,72
3	22:00	1:100	113,27
4	2:00	1:100	165,23
5	6:00	1:100	133,64
6	10:00	1:213	310,04
7	14:00	1:200	144,12
8	18:00	1:191	165,62
9	22:00	1:202	248,23
10	2:00	1:208	143,70
11	6:00	1:209	134,4
12	10:00	1:199	158,71
13	14:00	1:200	196,23
14	16:00	1:200	193,44

- Содержание лизина – 0,015 г/л
- Содержание NH<sub>3</sub> – 0,043 %

Таблица 3.1.3. Опыт №3. 4.07.17

№п/п	Время	Разведение	Содержание глюкозы, г/л
1	14:30	1:10	7,6
2	18:00	1:49	102,75
3	22:00	1:100	183,24

4	2:00	1:100	246,78
5	6:00	1:100	278,64
6	10:00	1:213	309,82
7	14:00	1:200	247,32
8	18:00	1:191	252,69
9	22:00	1:202	258,88
10	2:00	1:208	258,71
11	6:00	1:209	193,0
12	10:00	1:199	224,23
13	14:00	1:200	217,08
14	16:00	1:200	253,08

- Содержание лизина – 0,018 г/л
- Содержание NH<sub>3</sub> – 0,052 %

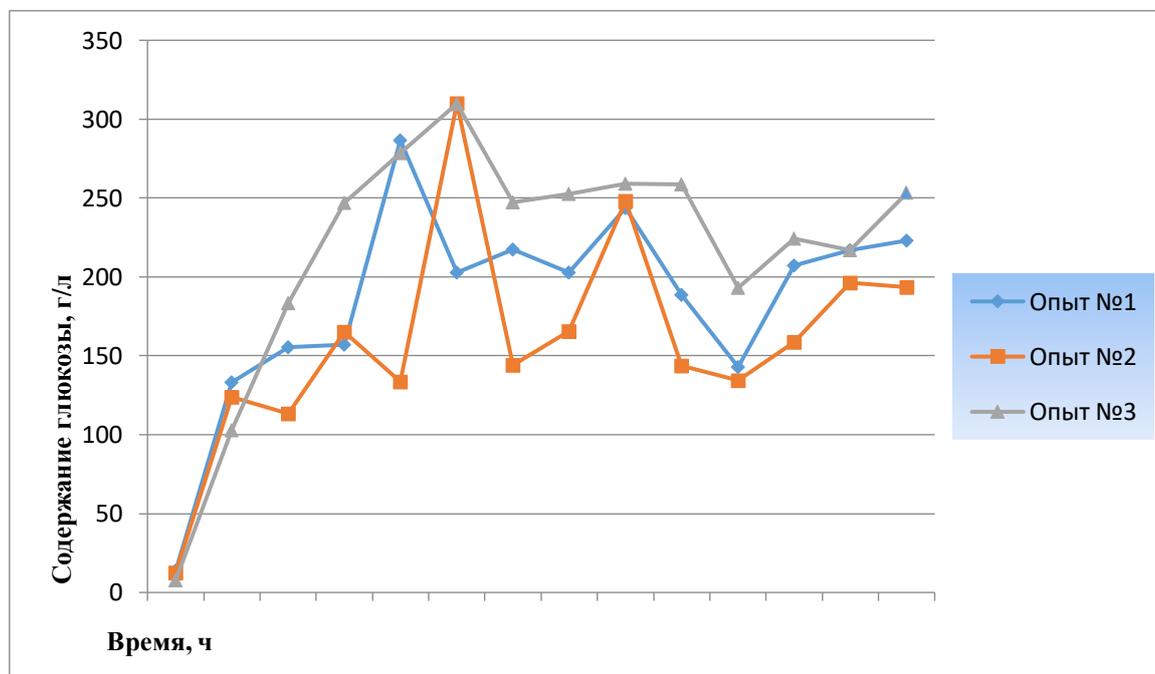


Рис. 3.1.2. График повторностей ферментативного гидролиза с использованием ферментного препарата «Пролайв BS ликвид»

Тот же самый ферментативный гидролиз мы воспроизвели, добавляя ферментный препарат «Протоферм FP». Результаты трех повторностей отражены в таблицах и сравнительном графике.

Таблица 3.1.4. Опыт 1. 8.08.16

№п/п	Время	Разведение	Содержание глюкозы, г/л
1	14:30	1:10	5,5
2	18:00	1:50	132,18
3	22:00	1:100	171,37
4	2:00	1:100	188,12
5	6:00	1:100	214,65
6	10:00	1:111	176,88
7	14:00	1:200	113,64
8	18:00	1:200	112,43
9	22:00	1:200	126,62
10	2:00	1:200	112,30
11	6:00	1: 200	126,08
12	10:00	1:215	122,27
13	14:00	1:228	121,63
14	16:00	1:224	190,57

- Содержание NH<sub>3</sub> – 0,022 %
- Содержание лизина – 0,002 г/л

Таблица 3.1.5. Опыт 2. 11.08.16

№п/п	Время	Разведение	Содержание глюкозы, г/л
1	14:30	1:10	6,2
2	18:00	1:50	104,13
3	22:00	1:100	142,76
4	2:00	1:100	121,12
5	6:00	1:100	210,62
6	10:00	1:111	216,23
7	14:00	1:200	215,86
8	18:00	1:200	113,13
9	22:00	1:200	113,45
10	2:00	1:200	123,30
11	6:00	1: 200	124,68
12	10:00	1:215	212,27
13	14:00	1:228	224,63
14	16:00	1:224	212,57

- Содержание NH<sub>3</sub> – 0,026 %
- Содержание лизина – 0,005 г/л

Таблица 3.1.6. Опыт 3. 15.08.16

№п/п	Время	Разведение	Содержание глюкозы, г/л
1	14:30	1:10	7,5
2	18:00	1:50	117,18
3	22:00	1:100	168,17
4	2:00	1:100	174,96

5	6:00	1:100	216,00
6	10:00	1:111	246,75
7	14:00	1:200	211,68
8	18:00	1:200	256,69
9	22:00	1:200	236,62
10	2:00	1:200	230,40
11	6:00	1: 200	226,08
12	10:00	1:215	224,23
13	14:00	1:228	235,68
14	16:00	1:224	222,57

- Содержание NH<sub>3</sub> – 0,031 %
- Содержание лизина – 0,009 г/л

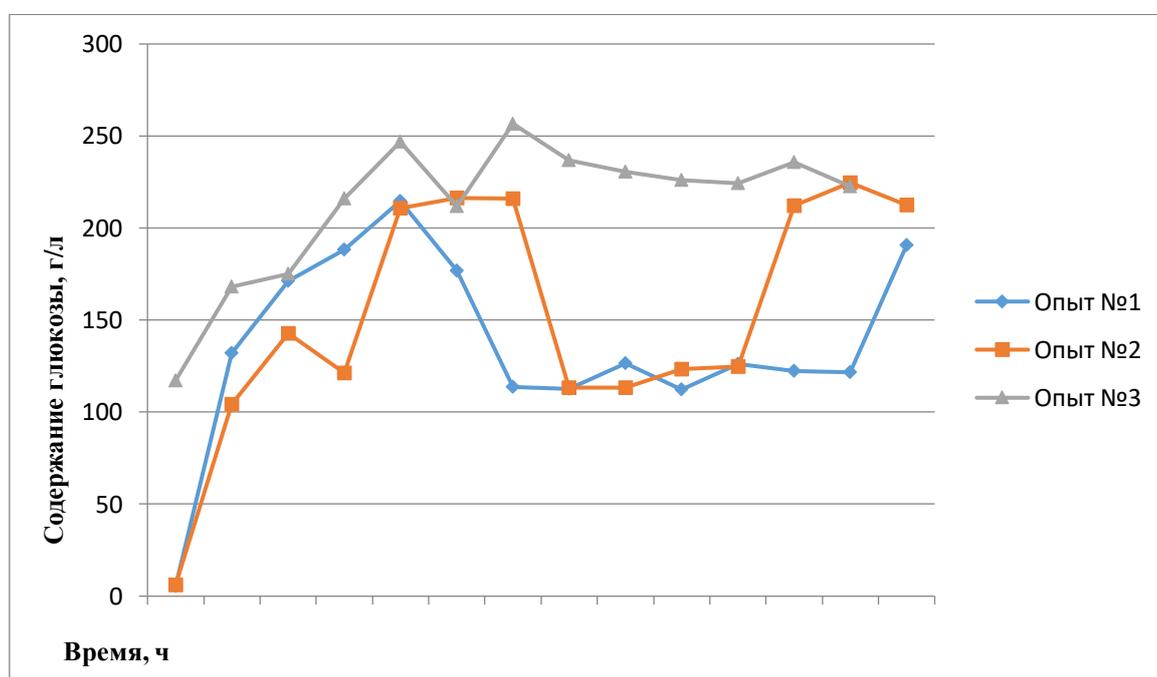


Рис. 3.1.3. График повторностей ферментативного гидролиза с использованием ферментного препарата «Протоферм FP»

Исходя из графиков выше, можно сделать вывод, что при использовании ферментного препарата «Пролайв BS ликвид» при ферментативном гидролизе получилось содержание глюкозы и лизина значительно выше, чем при использовании ферментного препарата «Протоферм FP».

Для того, чтобы проверить, действительно ли среда, гидролизованная при помощи ферментного препарата «Пролайв BS ликвид» пригодна для микроорганизмов и процесса биосинтеза лизина в целом, мы решили запустить процесс ферментации на основе этой же среды.

Полученная среда в колбе, содержащая все необходимые компоненты для роста, необходима для инокуляции *Corynebacterium glutamicum B-11167*. Производимая культура может использоваться для инокуляции лабораторных ферментеров. Чтобы убедиться, будет ли среда с крахмалом В и ферментными препаратами пригодна для данных микроорганизмов, мы воспроизводим процесс биосинтеза.

Среда для инокулянта во встряхивающейся колбе должна быть подобна среде, которая будет использоваться на стадиях ферментации. С другой стороны, важным условием является производство инокулянта, сопоставимого при каждой инокуляции. Следовательно, среда должна быть химически определена, но схожа с основными компонентами в среде в производственных ферментерах. [35]

Важным условием является то, чтобы культура во встряхивающейся колбе в процессе инкубации ни при каких условиях не испытывала ограничений в кислороде. Так как штамм очень чувствителен к ограничению в кислороде, важно поддерживать низкий уровень содержания среды во встряхивающейся колбе. Добавление  $\text{CaCO}_3$  во встряхивающуюся колбу предотвращает слишком сильное падение исходного уровня. С другой стороны, при добавлении карбоната кальция затрудняется измерение оптической плотности (OD).

Культура должна быть в поздней экспоненциальной фазе роста, когда культура в дрожажной колбе передается ферментеру. Прививка ферментера в это время уже оптимальна, и можно избежать потери времени, затраченного на лаг-фазу.

## **3.2. Процесс ферментации**

### **Ферментационная среда**

Среда должна быть приготовлена в трех частях. Первая часть содержит азотные и минеральные источники, вторая часть содержит раствор сульфата аммония и третья часть содержит сахарный раствор. Три раствора автоклавируются отдельно.

Витаминные растворы добавляются к сахарному раствору или объединенной среде в сосуде через мембрану в верхнем слое. В ферментации с порционной подпиткой или с повторяющейся порционной подпиткой элементы (подпитка) добавляются в культуру, когда поглощен почти весь исходный сахар. Подпитка состоит из 40% сульфата аммония с добавляемыми минералами и 60% сахарного раствора с добавляемыми витаминами (опционно). Поток подпитки в культуру зависит от скорости потребления, следовательно, концентрация сахара и аммиака-N должна быть прослежена с помощью автономных опытов.

### **Автоклавирование и охлаждение сосуда**

Подготовленные смоченные сосуд и колбы для реагентов и подпитки должны быть автоклавированы при 121°C в течение 30 минут.

После того, как заканчивается цикл автоклавирования, нужно оставить сосуд в автоклаве до того момента, пока он не охладится до оптимальной комфортной температуры. После того, как сосуд охладился, переместить сосуд ферментера на базовый блок Minifors.

Подготовили базовый блок для работы путем введения заданных значений для температуры, pH, pO<sub>2</sub>:

- Температура 30 °C
- pH: 7,0 ± 0,2
- pO<sub>2</sub>: 20 % поглощения.
- Аэрация: 1 объем воздуха/объем ферментера/минута

### **Заполнение ферментера**

Если буферный раствор соляной кислоты был добавлен в емкость для ферментации, его следует удалить асептически перед добавлением среды.

Поместили сосуд в ламинарный рабочий стол и удалили буферный раствор через пробоотборник шприцем.

Культурную азотно-аммониевую среду переносили в ферментер под действием силы тяжести, поднимая колбу выше уровня открытия сосуда средой. К раствору сахара добавляли растворы витамина.

После отвинчивания колпачков из колб реагентами один за другим асептически выливали соответствующий реагент в колбу, предназначенную для этого реагента. Асептически исходный сахарный раствор переносили в колпачки для макияжа.

### **Подсоединение сосуда к базовому блоку**

Далее установили сосуд ферментера на базовый блок и подсоединили. Очень важно как можно быстрее подсоединить датчик pO<sub>2</sub> к базовому блоку и поляризовать его. Его необходимо подсоединить как минимум за 2 часа до готовности.

В остальное время можно выполнить оставшиеся приготовления, подсоединив датчик pH, поместив датчик Pt-100 в карман в верхней пластине и подсоединив датчик пены, подсоединив впускную трубку для воздуха к верхней части расходомера, убрав зажим на впуске воздуха в рассеиватель.

## Процесс ферментации

Встряхивающиеся колбы для инокуляции должны быть инокулированы в соответствующее время, примерно за 16 часов до запланированного времени инокуляции ферментера. Оптическая плотность при 650 нм культуры должна быть между 4 и 6.

Добавили исходную сахарную среду и раствор сульфата аммония в ферментационную среду в сосуде. Отрегулировали рН до 7,0. Записали вес сосуда со средой. Когда температура будет отрегулирована до 30,0°C, рН будет установлен на заданном значении, датчик рО<sub>2</sub> поляризован и одно значение откалибровано (100% насыщенности) и установлено на рабочем заданном значении, насосы заполнены и готовы к использованию – время инокулировать ферментер.

1. Перед инокуляцией взяли пробу среды и подготовили слои питательной среды для проверки стерильности.
2. Также выполнили контрольные измерения рН и измерили оптическую плотность.
3. Подготовили слои питательной среды для контроля инокулянта и пробы из первого ферментера на нулевой временной отметке.
4. Взяли 2 встряхивающиеся колбы с инокулянтом из встряхивающего инкубатора и поместили в ламинарный рабочий стол. Налили содержимое двух колб и переместили асептически 300 мл содержимого в питательную колбу, поместили их в штатив и откачали инокулянт в ферментер. Записали вес ферментера. Оставшаяся часть инокулянта используется для контроля моносеpticности (питательные слои и микроскоп), OD (оптическая плотность) 650 и рН.
5. Ферментация началась и с помощью пробоотборника должна быть немедленно отобрана первая проба. Объем пробы должен быть от 10 до 20 мл, в зависимости от того, сколько анализов должно быть проведено. Записывали объемы проб в таблице. Сразу же заменили

колбу для проб новой стерильной колбой для следующей пробы. Сделали контрольную проверку первой пробы.

6. В процессе ферментации пробы должны отбираться каждые 4 часа.
7. Отмечали каждую ошибку и данные, полученные в ходе наблюдений, в журнале записи текущей информацией.
8. При ферментации с порционной подпиткой или с повторяющейся порционной подпиткой важно начинать добавление подпитки как можно скорее, как только уровень сахара в ферментационном бульоне будет равен нулю. (рН возрастает)
9. На стадии производства лизина остаточная концентрация сахара должна быть близкой к нулю и свободному аммиаку N, 2-4 г /л.
10. При повторяющейся порционной подпитке сбор ферментационного бульона (несколько капель) выполняется таким образом, чтобы рабочий объем сохранялся на более-менее постоянном уровне.
11. Собранные капли дезактивируются путем регулирования рН до 4,0 посредством добавления 4М серной кислоты. Частичные капли анализируются вместе с последними каплями для содержимого лизина, сахаром и аммиаком-N.
12. Анализатор выходящих газов, соединенный с выходящими газами из ферментера, может быть очень полезен для принятия решения по добавке подпитки и скорости потока подпитки.
13. При ферментации записывали все ошибки и делали пометки по весу ферментера, колб с подпиткой и колб с реагентами так, чтобы можно было впоследствии рассчитать выход.

Когда производство лизина останавливается или замедляется, и нет остаточного сахара, это означает, что ферментация может быть завершена. Отрегулировали рН до 4,0 с помощью 4 М серной кислоты и собрали последние капли (сбор) в колбу с синим колпачком.

Опыт проводился в трех повторностях, результаты отражены в таблицах ниже.

Таблица 3.2.1. Опыт 1. Процесс биосинтеза лизина при добавлении среды с ферментным препаратом «Пролайв BS ликвид»

Время	Часы роста	Номер пробы	Микроскопия	Азот, %	Лизин (г/л)	СВ, %	Оптическая плотность, ед.	Глюкоза, г/л <u>ЭНЗИСКАН</u>
15:00	0	0	-	2,020	-	12,28	4,52	12,23
18:00	3	1	-		-	12,55	22,54	22,56
22:00	7	2	-		-	12,07	44,50	4,49
2:00	11	3	-	1,240	<u>23,79</u>	12,14	83,50	0,43
6:00	15	4	-	1,252	<u>27,43</u>	12,87	122,40	0,35
10:00	19	5	клетки крупные, группами, заражений нет	1,003	<u>50,24</u>	14,3	149,90	5,08
14:00	23	6	клетки крупные, группами, заражений нет	0,822	<u>66,09</u>	18,83	133,80	14,86
18:00	27	7	клетки крупные, группами, заражений нет	0,530	<u>77,56</u>	18,65	134,30	11,12
22:00	31	8	клетки крупные, группами, заражений нет	0,503	<u>97,72</u>	19,78	132,70	13,28
2:00	35	9	клетки крупные, группами, заражений нет	0,429	<u>103,37</u>	20,89	152,00	14

6:00	39	10	клетки крупные, группами, заражений нет	0,322	<u>107,68</u>	21,5	126,30	12,98
10:00	43	11	клетки средние, много	0,340	<u>110,14</u>	21,34	146,30	4,01
14:00	47	12	клетки средние, много	0,223	<u>120,89</u>	21,54	113,00	2,3
16:00	49	13	клетки средние, много	0,245	<u>144,11</u>	20,69	132,60	0,35

Таблица 3.2.2. Опыт 2. Процесс биосинтеза лизина при добавлении среды с ферментным препаратом «Пролайв BS ликвид»

Время	Часы роста	Номер пробы	Микроскопия	Азот, %	Лизин (г/л)	СВ, %	Оптическая плотность, ед.	Глюкоза, г/л <u>энзискан</u>
15:00	0	0	-	2,038	-	12,47	5,84	12,38
18:00	3	1	-		-	12,84	26,19	20,56
22:00	7	2	-		-	12,16	42,36	4,46
2:00	11	3	-	1,432	<u>23,79</u>	12,76	80,39	0,66
6:00	15	4	-	1,265	<u>37,43</u>	12,43	122,44	0,35
10:00	19	5	клетки крупные, группами, заражений нет	1,025	<u>60,94</u>	15,23	122,26	5,08
14:00	23	6	клетки крупные, группами, заражений	0,867	<u>76,09</u>	17,84	123,8	14,86

			нет					
18:00	27	7	клетки крупные, группами, заражений нет	0,633	<u>87,96</u>	18,36	122,8	11,12
22:00	31	8	клетки крупные, группами, заражений нет	0,679	<u>97,72</u>	19,84	126,4	13,28
2:00	35	9	клетки крупные, группами, заражений нет	0,435	<u>103,37</u>	20,63	131,0	14
6:00	39	10	клетки крупные, группами, заражений нет	0,490	<u>107,68</u>	21,29	121,2	15,98
10:00	43	11	клетки средние, много	0,323	<u>120,94</u>	21,19	127,8	4,03
14:00	47	12	клетки средние, много	0,280	<u>120,89</u>	21,28	143,0	2,4
16:00	49	13	клетки средние, много	0,223	<u>146,3</u>	20,97	138,2	0,23

Таблица 3.2.3. Опыт 1. Процесс биосинтеза лизина при добавлении среды с ферментным препаратом «Пролайв BS ликвид»

Время	Часы роста	Номер пробы	Микроскопия	Азот, %	Лизин (г/л)	СВ, %	Оптическая плотность, ед.	Глюкоза, г/л <u>ЭНЗИСКАН</u>
-------	---------------	----------------	-------------	------------	----------------	----------	---------------------------------	---------------------------------

15:00	0	0	-	2,066	-	14,38	4,88	10,29
18:00	3	1	-		-	12,83	26,15	19,16
22:00	7	2	-		-	12,02	42,8	3,12
2:00	11	3	-	1,474	<u>23,79</u>	12,29	80,7	0,67
6:00	15	4	-	1,235	<u>37,43</u>	12,49	122,4	0,32
10:00	19	5	клетки крупные, группами, заражений нет	1,000	<u>60,94</u>	15,3	129,9	5,43
14:00	23	6	клетки крупные, группами, заражений нет	0,820	<u>76,09</u>	17,93	133,8	14,94
18:00	27	7	клетки крупные, группами, заражений нет	0,630	<u>87,96</u>	18,56	132,3	11,27
22:00	31	8	клетки крупные, группами, заражений нет	0,605	<u>97,72</u>	19,36	122,7	13,21
2:00	35	9	клетки крупные, группами, заражений нет	0,467	<u>103,37</u>	20,66	132,3	14,76
6:00	39	10	клетки крупные, группами, заражений нет	0,452	<u>107,68</u>	21,2	126,3	15,22
10:00	43	11	клетки средние, много	0,342	<u>120,94</u>	21,21	126,3	4,03
14:00	47	12	клетки средние,	0,289	<u>120,89</u>	21,49	123	5,6

			много					
16:00	49	13	клетки средние, много	0,223	<u>145,7</u>	20,97	117,6	0,35

### 3.3. Статистическая обработка полученных данных

Основная задача математической статистики заключается в исследовании всей совокупности по выборочным данным в зависимости от поставленной цели, т.е. изучение вероятностных свойств совокупности: закона распределения, числовых характеристик и т.д. для принятия управленческих решений в условиях неопределенности. Необходимо, чтобы варианты повторностей были в одинаковых условиях. Основой статистических методов являются экспериментальные данные, часто называемые статистическими данными. В проведенных исследованиях определяют подлинность различий между средними арифметическими исследуемых вариантов. [32]

В расчетах мы применили разностный метод, который повышает существенность различий между вариантами и точность опыта. Разность (d) между образцами вычисляют по всем повторениям. После чего вычисляется средняя арифметическая разности ( $d_{cp}$ ). Затем рассчитывают отклонения  $d-d_{cp}$  между каждой разностью и каждым средним значением.

Все отклонения возводят в квадрат, суммируют, а их суммы  $\sum(d-d_{cp})^2$  используют для вычисления ошибок разностей ( $S_d$ ) по формуле:

$$S_{d(1-2)} = \sqrt{\frac{\sum(d - \bar{d})^2}{n(n - 1)}}$$

Вычисляют критерий Стьюдента фактический:

$$t_{(1-2)} = (\bar{x}_2 - \bar{x}_1) / s_{d(1-2)}$$

Фактические критерии следует сравнивать с теоретическими и сделанными выводами, используя правило: если фактический критерий Стьюдента равен или превышает теоретическое значение, разница между вариантами значительна с определенным уровнем значимости ( $P = 0,001, 0,01$  или  $0,05$ ). Все теоретические значения критериев Стьюдента взяты из таблицы чисел степеней свободы. [32]

Исходя из данных, полученных при эксперименте, мы произвели статистическую обработку данных, которая отражена в таблице ниже.

*Таблица 3.3.1.* Обработка разностным методом данных, полученных при биосинтезе лизина с использованием среды с ферментным препаратом «Пролайв BS ликвид».

Контроль	Эксперимент	d	d - d <sub>cp</sub>	(d - d <sub>cp</sub> ) <sup>2</sup>	Sd	td
154,2	144,1	10,1	0,90	0,81	1,62	5,68
153,2	146,3	7,4	-1,80	3,24		
155,8	145,7	10,1	0,90	0,81		
<b>X<sub>cp1</sub>=154,4</b>	<b>X<sub>cp2</sub>=145,4</b>	<b>D<sub>cp</sub>=9,2</b>	<b>∑=0</b>	<b>∑(d - d<sub>cp</sub>)<sup>2</sup>=1,62</b>		

Разница между контролем и экспериментом можно считать достоверной при уровне значимости  $p = 0,05$ .  $t_{st} = 3,18$ , т.к. критерий Стьюдента фактический больше критерия Стьюдента теоретического. Это значит, что ферментный препарат Пролайв BS ликвид наиболее пригоден для процесса биосинтеза L-лизин сульфата

## ВЫВОДЫ

В ходе дипломной работы были разработаны технологии получения лизина на базе ЗАО «Завод премиксов № 1». Проанализирована методическая литература по этой теме. В ходе экспериментов был проведен ряд биохимических анализов и определены следующие: рН, оптическая плотность, сухие вещества, глюкоза, содержание азота, выход лизина. Сбор этих показателей помог контролировать состояние культуры *Corynebacterium glutamicum-11404* в процессе биосинтеза лизина. Также во время экспериментов был воспроизведен процесс смешанного гидролиза крахмала Б с помощью ферментов Пролайв BS ликвид и Протоферм FP, изучены степени гидролиза углеводной и протеиновой фракций. На основе полученных данных был произведен пересчет рецептуры питательных сред и выявлено влияние гидролизованного крахмала Б на рост микроорганизмов продуцентов при помощи экспериментальной ферментации. В процессе смешанного ферментативного гидролиза наибольший выход лизина при ферментации получился при использовании ферментного препарата Пролайв BS ликвид.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бабицкий А.Ф. Повышение урожайных качеств семян пшеницы. Аграрная наука. – 2006. - №9 с.5-7.
2. Бейкер М.Е. Введение в Биотехнологию. - М.: Пищевая промышленность, 1978.- 228 с.
3. Безбородов, А.М. и др. Основы биотехнологии микробных синтезов. – Ростов Н. Д.: Изд-во Ростовского ун-та, 1989. – 112 с.
4. Белясова, Н.А. Микробиология: Учебник Н.А. Белясова. - Мн.: Вышэйшая шк., 2012. - 443 с.
5. Вавилов П.П., Гриценко В.В., Кузнецов В.С. и др.: Под ред. П.П. Вавилова Растениводство. – М: Агропромиздат, 1986 – 512с
6. Волова Т. Г. Биотехнология. – Новосибирск: Изд-во Сибирского отделения Российской Академии наук, 1999. – 252 с.
7. Волынкина О.В. Выращивание ценной пшеницы сделает зерновую отрасль высокоприбыльно. О.В. Волынкина «Зерновое хозяйство», 2002. - №4. – с.6-7
8. Воробьев А.А. Широбонов В.П. Медицинская и санитарная микробиология. - М.: Академия, 2003. - 464 с.
9. Воробьев, А.А. Основы микробиологии и иммунологии: Учебник для студентов среднего профессионального образования / В.В. Зверев, Е.В. Буданова, А.А. Воробьев; Под ред. В.В. Зверев. - М.: ИЦ Академия, 2012. - 288 с.
10. Герман Л. С. Комплексная технология переработки некондиционного зерна как исходная стадия биотехнологических производств: Автореф. канд. техн. наук: 03.01.06. – М., 2012. – 20 с.
11. Гигиенические требования к качеству и безопасности продовольственного сырья и пищевых продуктов.- М.: СанПиН, 2.3.2.560, 20 - 96, М., 1997. Изд. официальное.

12. Горохова, С.С. Основы микробиологии, производственной санитарии и гигиены: Учебное пособие - М.: ИЦ Академия, 2012. - 64 с.
13. Джей, Д.М. Современная пищевая микробиология. - М.: БИНОМ. ЛЗ, 2012. - 886 с.
14. Доронин В.Г. Как повысить урожайность зерновой пшеницы /В.Г. Доронин, С.В. Кривошеева «Защита и карантин растений», 2007. № 10. – с22-23.
15. Зверева Е.А. Влияние удобрений на урожайность зерновых культур и диагностика их питания /Е.А.Зверева, В.В. Конончук - «Агрохимия», 1992. - № 11. – с58-65
16. Зенин А.А., Саранин К.Н. и др. Справочник бригадира-полевода. – М: Росагрохмиздат, 1988. – 255с.
17. Зигашишен А.А., Михайлов В.С., Трухан Л.Г. Программирование урожаев в Марийской АССР. – Й-Ола: Марийское книжное издательство, 1979. – 66с.
18. Красноштанова А.А., Крылов И.А., Бабусенко Е.С. Основы биотехнологии. - М.: РХТУ им. Д.И. Менделеева, 2000.- 84 с.
19. Камышева, К.С. Основы микробиологии, вирусологии и иммунологии: Учебное пособие К.С. Камышева. - Рн/Д: Феникс, 2012. - 281 с.
20. Коротяев, А.И. Медицинская микробиология, иммунология и вирусология: Учебник для медицинских вузов, А.И. Коротяев, С.А. Бабичев. - СПб.: СпецЛит, 2012. - 760 с.
21. Красникова, Л.В. Микробиология: Учебное пособие Л.В. Красникова. - СПб.: Троицкий мост, 2012. - 296 с
22. Мартянова А.Н. Хранение и переработка сельхозсырья, 2000. - №12 – с.59-61.
23. Масихина Л.И. Новый метод к оценке качества хлебопекарной пшеницы от поля до потребителя, 2006. - № 1 – с.2-5
24. Ниловская Н.Г. Климат и продуктивность зерновых культур, 1991. - № 11. – с.87-91.

25. Пластун Н.Н. Агротехника – основа защиты озимой пшеницы, 1990 - № 1. – с. 3-6
26. Плановский А.Н., Рамм В.М., Каган С.З. Процессы и аппараты химической технологии. – Москва: Химия, 2009. – 120 с.
27. Получение лизина на основе продуктов глубокой переработки зерна: лабораторный регламент ЛР-00479942-1-2011 / ФГИУ ГосНИИгенетика. – М., 2011. – 35 с.
28. Просеков, А.Ю. Общая биология и микробиология: Учебное пособие А.Ю. Просекова. - СПб.: Просп. Науки, 2012. - 320 с.
29. Саргсян К. М. Влияние различных параметров процесса культивирования на биосинтез лизина: – М.: МГУИЭ, 2010. – С. 19 – 20.
30. Санин С.С. Влияние вредных организмов на качество зерна, 2004. - № 11. – с.14-18.
31. Сафронов А.Ф., Гатаулин А.М. и др. Система земледелия /Под ред. А.Ф. Сафронова: - М “Колос”, 2006г. – 447с.
32. Рыбаковский, О.Л. Теория статистики: Учебно-методическое пособие О.Л. Рыбаковский. - М.: РАГС, 2008. - 124 с.
33. Сазыкин Ю.О. Биотехнология. Гриф УМО вузов России.-М.: Академия, 2006. -256 с.
34. Сассон А. Биотехнология: свершения и надежды. - М: Мир,1987.- 411 с.
35. Сиротин А.А., Глухарева Н.А., Оспищева Н.В., Бондаренко В.В., Резун А.П., Зенинская Н.А. Процесс биосинтеза лизина *Corynebacterium glutamicum* В-11167 на основе сред, содержащих гидролизат пшеничного глютена, 2012. - № 6 - 9с.
36. Трисвяжский Л.А., Лесин Б.В., Курдина В.И. Хранение и переработка сельскохозяйственных продуктов. – М: Агропромиздат, 1991г. – 415с.
37. Федотова Н. В. Разработка технологии получения из зернового сырья азотсодержащих компонентов для процессов ферментации. – М., 2009. – 19 с.

38. Федотова Н. В. Ферментолизат глютена как ростовой фактор процесса ферментации – 2009. – № 4. – С. 64-68.
39. Хигинс И., Джонс Дж., Келли Д. Биотехнология. - М.: Мир, 1988. - 480 с.
40. Химический состав пищевых продуктов. Под редакцией М.Ф. Нестерина, И.М. Скурихина. - М.: Пищевая промышленность, 1979, т.2. 116.
41. Хохлов Ф.А., Жуков М.М., Ившин В.П. и др. Интенсивные технологии возделывания сельскохозяйственных культур в Марийской АССР: Йола – Марийской книжное издательство, 1986г.
42. Храмцова Е. А. Селекция продуцентов: курс лекций. – Минск: БГУ, 2011. – 132 с.
43. Черкасов Г.Н. Влияние способа основной обработки почвы на качество зерна озимой пшеницы Г.Н. Черкасов, Д.В. Дубовик Земледелие, - 2007, № 6 – с.10-11.
44. Шатилов Н.С, Экология и программирование урожайности Н.С. Шатилов Вестник сельскохозяйственной науки, - 1990. - № 11. – с.23-31.
45. Шкурпела В.П. Интенсивная технология возделывания для нечерноземной зоны. – М: Росагропромиздат, 1990. – 256с.
46. Шотин, А. Б. Автоматизация научных исследований процессов биосинтеза: Автореф. дис... канд. техн. наук: 05.13.06. – М., 2010. – 18 с.
47. Шевелуха В.С., Калашникова Е.А., Воронин Е.С. и др. Сельскохозяйственная биотехнология. - Учебник. М.: Высшая школа, 2008. - 469 с.
48. Шлегель Г. Общая микробиология. - М.: Мир, 1987. - 567 с.
49. Шур А.М. Высокомолекулярные соединения. - Москва: Высшая школа, 1981. - 656 с.
50. Яровенко В.Л., Гопгер Л.И. Производство ферментных препаратов из грибов и бактерий. - М.:Агропроиздат, 1976. - 444 с.