

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 БИОЛОГИИ

**МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА И
ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ШТАММА
ESCHERICHIA COLI**

Выпускная квалификационная работа

обучающегося по направлению подготовки 06.04.01 Биология
очной формы обучения, группы 07001641
Лагутиной Марины Сергеевны

Научный руководитель
д.б.н, доцент
Скоркина М.Ю.

Рецензент
ведущий научный сотрудник
Белгородского филиала
ФГБНУ «Федеральный
научный центр –
Всероссийский научно-
исследовательский институт
экспериментальной
ветеринарии имени К.И.
Скрябина и Я.Р. Коваленко
Российской академии наук»,
д.б.н., доцент Присный А.А.

БЕЛГОРОД 2018

Оглавление

Введение.....	3
Глава 1. Обзор литературы по теме исследования.....	6
1.1. Физиолого-биохимические особенности <i>E. coli</i>	6
1.2. Использование микроорганизмов в биотехнологическом процессе.....	8
1.2.1. Производство первичных метаболитов.....	8
1.2.2. Микробиологический синтез аминокислот.....	11
1.2.3. Использование микроорганизмов в биосинтезе треонина.....	16
1.2.4 Физиологическая роль треонина.....	22
Глава 2. Материал и методы исследования.....	29
2.1. Объект исследования.....	29
2.2. Методики приготовления питательных сред.....	30
2.3. Методика оживления криокультуры штамма <i>Escherihia coli</i> ВКПМ В-12204 и засев посевных колб.....	34
2.4. Методика исследования влияния различных источников аминного азота на продуктивность штамма <i>Escherihia coli</i> ВКПМ В-12204.....	35
2.5. Методы статистической обработки данных.....	37
Глава 3. Полученные результаты и их обсуждение.....	38
3.1. Морфофизиологическая характеристика штамма <i>Escherihia coli</i> ВКПМ В-12204.....	38
3.2. Влияние различных источников аминного азота на продуктивность штамма <i>Escherihia coli</i> ВКПМ В-12204.....	39
3.3. Количественный учет, полученных результатов.....	43
Выводы.....	56
Список использованной литературы.....	57
Приложения.....	63

Введение

Актуальность темы. Среди соединений полученных биотехнологическим методом аминокислоты занимают первое место по объему производства и второе место по стоимости, уступая лишь антибиотикам [Грачева и др., 2003]. С каждым годом аминокислоты находят все большее применение в качестве кормовых и пищевых добавок, сырья фармацевтической и парфюмерной промышленности [Вудворт, 1988].

Согласно расчетам аналитиков DISCOVERY Research Group объем произведенных аминокислот в России в 2016 году составил 176,6 тыс. тонн, что на 12,1% больше показателей 2015 года. В настоящее время в России производятся только две аминокислоты – метионин и лизин. Спрос на остальные аминокислоты удовлетворяется за счет импорта из других стран [Бурдаева, 2015].

На сегодняшний день в качестве монопродуктов в России можно приобрести лизин, метионин, треонин, триптофан, аргинин, валин и другие аминокислоты. Третьей по потребляемости аминокислотой на российском рынке является треонин. Если рассматривать объем всех аминокислот, ввозимых и производимых в России для продажи внутри страны, как 100%, то доля треонина составит 13%. Основная масса треонина ввозится на российский рынок из Китая, и составляет примерно 98% в общем импорте треонина, еще 5 % приходится на Венгрию и Словакию [Бурдаева, 2015].

Из всех возможных способов производства аминокислот предпочтение отдается микробиологическому синтезу. Его очевидным преимуществом является то, что микроорганизмы продуценты образуют только активные L-формы аминокислот. Тогда как химический синтез дает смесь L- и D-стереоизомерных форм. Получение D-форм нежелательно, так как они не усваиваются организмом человека и животных, а так же в большинстве аминокислот являются токсичными, исключением является метионин, у

которого обе формы являются активными и усваиваются организмами [Гринштейн и др., 1965].

Для микробиологического синтеза аминокислот применяются разнообразные штаммы микроорганизмов. Большинство диких штаммов способны продуцировать аминокислоты во внешнюю среду только в микроколичествах. Поэтому генетиками разрабатываются и создаются штаммы-мутанты, способные синтезировать аминокислоты в больших количествах. Так в последние годы для получения более эффективных штаммов-продуцентов начали применять методы генной инженерии, которые позволяют увеличить количество генов биосинтеза путем их клонирования на плазидах, что в свою очередь приводит к увеличению количества ферментов ответственных за синтез аминокислот и следовательно повышается выход продуцента [Ковалева и др., 2011].

Повысить продуктивность штаммов, можно за счет условий ферментации и подобрав наиболее подходящий состава питательных сред, которые будут использоваться для культивирования микроорганизмов.

Цель работы – изучить морфологию и функциональную активность штамма *Escherihia Coli* ВКПМ В-12204.

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

1) определить морфофизиологические характеристики штамма *Escherihia coli* ВКПМ В-12204;

2) установить и проанализировать продуктивность штамма *Escherihia coli* ВКПМ В-12204 при содержании в среде следующих источников аминного азота:

- а) дрожжевой автолизат
- б) дрожжевой экстракт
- в) дрожжевой экстракт ультрафильтрованный
- г) пептон дрожжевой
- д) пептон мясной
- е) триптон казеиновый

ж) кукурузный экстракт;

3) сравнить морфологию клеток штамма *Escherihia coli* ВКПМ В-12204 в ферментационных средах с различными источниками аминного азота.

Объект исследования: штамм *Escherihia coli* ВКПМ В-12204.

Предмет исследования: продуктивность штамма *Escherihia coli* ВКПМ В-12204 в средах содержащих разные источники аминного азота.

Научная новизна исследования состоит в том, что на основании большого круга источников были исследованы морфофизиологические особенности штамма бактерии *Escherihia coli*. В ходе проведенного исследования было выявлено влияние различных источников аминного азота на функциональную активность штамма *Escherihii coli* и определен наиболее подходящий источник аминного азота для повышения продуктивности данного штамма.

Практическая значимость работы заключается в том, что найдено большое количество компонентов сред, как источников аминного азота, а так же проведен анализ функциональной активности штамма *Escherihia coli*, при применении этих компонентов.

Структура работы. Магистерская диссертация состоит из введения, 3 глав основной части (обзор литературы, материал и методы исследования, результаты исследования, обсуждение результатов исследования) и 14 подразделов, выводов, списка использованной литературы и приложений. Работа изложена на 63 страницах машинописного текста, включает в себя 13 таблиц, 9 рисунков и 2 приложения. Список литературы включает в себя 82 наименования, из которых 63 отечественных и 19 иностранных источников.

Глава 1. Обзор литературы по теме исследования

1.1. Физиолого-биохимические особенности *E. coli*

Систематическое положение:

домен – Бактерии;

тип – Протеобактерии;

класс – Гамма-протеобактерии;

порядок – *Enterobacteriales*;

семейство – Энтеробактерии;

род – Эшерихии;

вид – Кишечная палочка (*Escherichia coli*).

Escherichia coli – это грамотрицательная палочковидная бактерия, которая была описана в 1885 году, немецким бактериологом и педиатром Теодором Эшерихом. [Vogt et al., 2005].

Широко распространена в нижней части кишечника теплокровных животных. Большинство штаммов *Escherichia coli* безвредны, однако, серотип O157:H7 может вызывать тяжёлые пищевые отравления у людей и животных [Орлов, 1965]. Непатогенные штаммы являются частью нормальной микрофлоры кишечника человека и животных. Кишечная палочка приносит пользу организму хозяина, например, она участвует в синтезе витамина К [Bentley et al., 1982], а также предотвращает развитие патогенных микроорганизмов в кишечнике [Hudault et al., 2001].

Escherichia coli не всегда обитает только в желудочно-кишечном тракте, она способна некоторое время выживать в окружающей среде, эта способность делает ее одним из важных индикаторов для исследования образцов на наличие фекальных загрязнений. Эти бактерии легко выращиваются в условиях лаборатории, поэтому кишечные палочки играют важную роль в генетических исследованиях. *Escherichia coli* является одной из наиболее изученных прокариотических микроорганизмов и одной из

важнейших биотехнологических и микробиологических объектов [Vogt et al., 2005].

Бактерия *Escherichia coli* – одна из наиболее хорошо изученных микроорганизмов. За последние пятьдесят лет были получены исчерпывающие данные о ее генетике, молекулярной биологии, биохимии, физиологии и общей биологии. Она играет одну из важнейших ролей в современной микробиологической промышленности и биоинженерии. Работа Стенли Нормана Коэна и Герберта Бойера на *Escherichia coli*, с использованием плазмид и эндонуклеаз рестрикции для создания рекомбинантной ДНК, находится у истоков современной биотехнологии [Жарикова и др., 2005]. Усовершенствование методов получения сферопластов *Escherichii coli* и их трансфекции позволили добиться достаточно высокой эффективности трансформации молекулами ДНК различных фагов.

Благодаря своим способностям размножаться простым делением на средах, содержащих только ионы Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , NH_4^+ , Cl^- , HPO_4^{2-} и SO_4^{2-} , микроэлементы и источник углерода (например, глюкозу). *Escherichia coli* стала объектом научных исследований [Ковалева и др., 2011].

При культивировании *Escherichii coli* на обогащенных жидких питательных средах, имеющих в своем составе аминокислоты, витамины, соли, микроэлементы и источники углерода, время генерации (время между формированием бактерии и ее следующим делением) в логарифмической фазе роста при температуре 37°C составляет примерно 22 мин [Шлегель, 1987; Eggeling et al., 2002].

Escherichia coli это микроорганизм, который способен к культивированию как в аэробных (в присутствии кислорода), так и в анаэробных (без кислорода) условиях. При этом для оптимальной продукции рекомбинантных белков *E. coli* обычно выращивают в аэробных условиях [Быков и др., 1987].

В случае если целью выращивания бактерий в лаборатории является синтез и выделение определенного белка, то выращивание культуры *Escherichia coli* выполняют в колбах на сложных жидких питательных средах. Для поддержания нужной температуры и обеспечения достаточной аэрации культуральной среды колбы помещают в водяную баню, в термостатируемую комнату или на шейкер и непрерывно встряхивают. Такая аэрация достаточна для размножения клеток, но не всегда – для синтеза определенного белка [Bentley et al., 1982].

1.2. Использование микроорганизмов в биотехнологическом процессе

1.2.1. Производство первичных метаболитов

Первичные метаболиты представляют собой небольшие молекулы, которые входят в состав всех живых клеток. Они являются промежуточными продуктами метаболизма, строительными блоками для макромолекул, некоторые превращаются в коферменты. Наиболее важными для промышленности являются аминокислоты, нуклеотиды, витамины, растворители и органические кислоты. Организмы, используемые для получения первичных метаболитов, подвергаются разнообразным генетическим и физиологическим мутациям, для увеличения их продуктивности и активности [Cardinale et al., 1974; Bumstein, 1974].

Аминокислоты являются веществами, из которых в природе строятся все растительные и животные белки. Они представляют огромный практический интерес. Традиционно аминокислоты применяют как пищевые и кормовые добавки, а так же в качестве медицинских и фармацевтических препаратов [Шпак и др., 1983].

Рынок аминокислот составляет более 6 миллиардов долларов США и увеличивается на 5–10% каждый год. Мировое производство аминокислот составляет 3 миллиона тонн в год (таб.1) [Burkovski et al., 2002].

Мировое производство аминокислот [Burkovski et al., 2002]

Аминокислота	Процесс получения	Тонн/Год	Рынок (долл.)
L-Alanine	энзимный	500	-
L-Arginine	ферментативный	1 200	150 млн
L-Aspartic acid	энзимный	10 000	43 млн
L-Cysteine	энзимный	3 000	4,6 млн
L-Glutamic acid	ферментативный	1 600 000	1,5 млрд
L-Glutamine	ферментативный	1 300	-
Glycine	химический	20 000	-
L-Histidine	ферментативный	400	-
L-Isoleucine	ферментативный	400	-
L-Leucine	ферментативный	500	-
L-Lysine-HCl	ферментативный	850 000	1,5 млрд
DL-Methionine	химический	400 000	2,3 млрд
L-Phenylalanine	ферментативный	12 650	198 млн
L-Proline	ферментативный	350	-
L-Serine	ферментативный	300	-
L-Threonine	ферментативный	70 000	270 млн
L-Tryptophan	энзимный	3 000	150 млн
L-Tyrosine	ферментативный	165	50 млн
L-Valine	ферментативный	500	-

Методы рекомбинантной ДНК широко используются в области производства аминокислот. Были сконструированы микробные штаммы с плазмидами, несущими аминокислотные биосинтетические опероны. Технология рекомбинантной ДНК в настоящее время используется для улучшения показателей продуктивности штаммов [Судачкова и др., 2000]. В результате генная инженерия оказала влияние на следующие показатели:

- 1) амплификация гена, отвечающего за кодировку ограничения скорости ферментативного пути;
- 2) амплификация гена, кодирующего первый фермент после точки

разветвления;

3) клонирование гена, кодирующего фермент с большей или меньшей регулировкой обратной связи;

4) введение гена, кодирующего фермент с функциональными или энергетическими преимуществами в качестве замены нормального фермента [Leuchtenberger et al., 2005].

Таблица 2

Титры аминокислотных ферментаций [Виестур и др., 1999; Krämer, 2004]

Аминокислота	Титр (г/л)
L-Alanine	75
L-Arginine	96
L-Glutamic acid	85
L-Histidine	42
L-Isoleucine	40
L-Leucine	34
L-Lysine-HCl	180
L-Phenylalanine	51
L-Proline	100
L-Serine	65
L-Threonine	100
L-Tryptophan	58
L-Tyrosine	26
L-Valine	99

Уменьшение использования мутаций позволило улучшить экскрецию аминокислот и снизить внутриклеточный контроль обратной связи. Данные изменения особенно важны в производстве триптофана и треонина. В результате генетических и физиологических изменений удалось получить улучшенные штаммы микроорганизмов, способных синтезировать более высокие концентрации аминокислот (таб. 2) [Виестур и др., 1999; Krämer, 2004].

1.2.2. Микробиологический синтез аминокислот

Наиболее перспективным и экономически выгодным является микробиологический синтез аминокислот. В настоящее время более 60% всех производимых промышленностью высокоочищенных препаратов белковых аминокислот делают именно этим способом. Его главным преимуществом, в сравнении с методами химического синтеза является возможность получения L-аминокислот на основе возобновляемого сырья [Федорова, 2000].

В последние годы при производстве аминокислот все шире используют биотрансформацию предшественников аминокислот, особенно с помощью иммобилизованных ферментов или клеток микроорганизмов, предварительно получаемых химическим путем. Промышленное производство аминокислот стало возможным после открытия способности у некоторых микроорганизмов выделять в культуральную среду значительные количества какой-либо одной аминокислоты. При этом было подмечено, что большинство из нескольких тысяч проанализированных диких штаммов микроорганизмов продуцировали аминокислоты во внешнюю среду, но в очень незначительных количествах [Федорова, 2000]. Не зафиксировано никакой связи между таксономическим положением микроорганизма и способностью к продуцированию той или иной аминокислоты. Так, среди возможных продуцентов глутаминовой кислоты отмечены организмы, из которых 30% – дрожжи, 30% – стрептомицеты, 20% – бактерии и 10% – микроскопические грибы. Лишь один из обследованных штаммов микроорганизмов – *Corynebacterium glutamicum* был способен к сверхсинтезу глутамата. Этот штамм использовали при организации первого в мире крупномасштабного производства глутаминовой кислоты микробиологическим методом в Токио (1956). В России изыскания в области промышленного синтеза аминокислот были начаты в 50-х годах прошлого столетия по инициативе академика А. А. Александрова.

Штаммы продуценты перспективные для производства аминокислот подвергаются постоянному улучшению посредством селекции мутантов с измененной генетической программой и регуляторными свойствами. К распространенным объектам селекции продуцентов относят микроорганизмы родов *Brevibacterium*, *Micrococcus*, *Corynebacterium*, *Arthrobacter* [Шпак и др., 1983].

Разработка технологической схемы получения отдельной аминокислоты полностью базируется на знании путей и механизмов регуляции биосинтеза определенной аминокислоты. Необходимого дисбаланса метаболизма, обеспечивающего сверхсинтез целевого продукта, достигают методом строго контролируемых изменений состава и условий среды [Shoemaker et al., 1950]. Характерная особенность процессов получения аминокислот микробиологическими методами, равно как и других биотехнологических производств, – абсолютное использование побочных продуктов, что превращает их основную массу в безотходные и экологически чистые технологии. К примеру, осадок микроорганизмов-продуцентов и промывные воды, содержащие ценные компоненты, такие, как белки, остатки аминокислот, витаминов, минеральных солей и микроэлементов, высушивают и используют в качестве кормовых препаратов [Федорова, 2000].

В качестве продуцентов аминокислот используют штаммы, модифицированные на генном уровне, обладающие способностью к сверхсинтезу аминокислот. Наиболее лучшими продуцентами аминокислот считаются ауксотрофные мутанты, то есть микроорганизмы, не имеющие целого ряда ферментных систем, вследствие этого они довольно требовательны к составу питательной среды, в которой должно присутствовать большое количество факторов роста. В качестве продуцентов аминокислот используют грамположительные бесспорные бактерии рода *Corynebacterium*, *Brevibacterium* и *Micrococcus* [Yukawa et al., 1981].

Продуцирование аминокислот происходит внутри бактериальной клетки в виде свободных аминокислот, которые затем выделяются в окружающую среду. Наибольшее накопление аминокислот осуществляется в середине экспоненциальной фазы роста. Секретом большинства производственных процессов с применением микроорганизмов является изменение условий среды: за счет этого и достигается синтез избыточных количеств желаемого продукта. Необходимого дисбаланса метаболизма достигают методом эмпирического изменения следующих факторов: концентрация субстрата, pH, концентрации продукта или путем установления критических уровней содержания веществ (ионов металлов, органических добавок) в среде [Umbarger, 1978].

При переводе биопроцессов образования аминокислот на коммерческую основу были выработаны новые методы желаемых изменений метаболизма у организмов-продуцентов, нацеленных на увеличение выхода промежуточных продуктов, образование которых в других условиях находится под строгим метаболическим контролем.

Для синтеза аминокислот бактерии стали применять с начала 50-х гг., при этом штаммы микроорганизмов постоянно улучшали методами генной инженерии, выделяя ауксотрофные мутанты, и мутанты с модифицированными регуляторными свойствами. Для обеспечения образования аминокислот в больших количествах, в любом случае необходимо изменить систему регуляции обмена веществ: для этого необходимо либо стимулировать потребление субстрата на некоторых путях биосинтеза и выделение аминокислот в среду, либо подавить побочные реакции и процессы деградации аминокислот [Yukawa et al., 1981].

Применяемые в промышленности микроорганизмы подразделяют на несколько видов: дикие штаммы, ауксотрофные мутанты, регуляторные мутанты и ауксотрофные регуляторные мутанты [Айала и др., 1987]. Промышленные штаммы, как правило, несут некоторое количество мутаций, затрагивающих механизмы регуляции целевой аминокислоты и ее

предшественников. Производство таких аминокислот, как L-глутамат, L-валин, L-аланин, и L-пролин, при участии диких штаммов микроорганизмов основано либо на использовании присущих этим микроорганизмам особенностей метаболизма, либо на стимуляции образования аминокислот в ответ на изменение условий внешней среды [Березов и др., 1983].

Синтезировать аминокислоты способны бактерии многих родов. К примеру, виды *Corynebacterium* или *Brevibacterium*, выращиваемые на углеродном сырье, на этиловом спирте или ацетате при наличии необходимого количества биотина в питательной среде способны синтезировать до 85 г/л глутамата [Безбородов, 1984]. Для накопления этой аминокислоты необходимым условием считается абсолютное или частичное угнетение активности α -кетоглутаратдегидрогеназы. Синтез продукта увеличивается при добавлении β -лактамных антибиотиков, ПАВ и жирных кислот. Путем изменения условий среды процесса ферментации, в ходе которого синтезируется L-глутамат, может быть переключен на синтез L-глутамин или L-пролина. При высокой концентрации биотина и ионов аммония формируются благоприятные условия для синтеза L-пролина, а при больших концентрациях ионов аммония и цинка в слабо кислой среде увеличивается синтез L-глутамин [Hudault et al., 2001].

Ауксотрофные мутанты не имеют способности к образованию ингибиторов метаболического пути. Они работают по принципу отрицательной обратной связи, так как определенная ключевая ферментативная реакция у них отсутствует, поэтому при культивировании мутантного штамма в среде с минимальной концентрацией необходимого питательного ингредиента они способны образовывать избыточные количества вещества-предшественника [Айала и др., 1987].

Ауксотрофные мутанты так же применяются и в тех случаях, когда необходимо получить соединения, являющиеся конечными продуктами разветвленных цепей метаболических реакций, так, к примеру, L-аспарат является одним предшественником для L-лизина, L-треонина, L-метионина и

L-изолейцина [Тюкавкина и др., 2005]. Первая реакция в процессе образования данных аминокислот катализируется аспартокиназой, активность, которой может быть ингибирована по механизму отрицательной обратной связи при совместном действии L-лизина, L-треонина. У мутантов ауксотрофных по гомосерину или треонину (метионину) значительно уменьшается внутриклеточная концентрация L-треонина, что снимает блокаду с аспартокиназы и позволяет клеткам накапливать L-лизин [Calvo et al., 1971].

Ауксотрофные мутанты имеют способность накапливать конечные продукты неразветвленных путей биосинтеза. В этих случаях приходится отбирать мутанты с частично нарушенной регуляцией биосинтеза, что позволяет получить повышенный выход конечного продукта. Такие мутанты называются регуляторными, их отбирают по устойчивости к аналогам аминокислот или среди ревертантов ауксотрофов. В основе применения аналогов аминокислот лежит сходство с природными аминокислотами. Они ингибируют рост бактерий, но этот эффект может быть уменьшен путем добавления соответствующей аминокислоты. Таким образом, аналоги выступают в роли искусственных, работающих по принципу отрицательной обратной связи, ингибиторов ферментов, обеспечивающих биосинтез природных аминокислот и одновременно подавляют процесс включения их в белки. Появление мутантов, устойчивых к этим мощным ингибиторам, означает, что регуляторные ферменты соответствующего пути обмена становятся у них нечувствительными к аналогу. Для увеличения выхода можно воспользоваться как ауксотрофией, так и дефектами регуляции одновременно [Кошелев и др., 2009]. Так, у *Corynebacterium glutamicum* и *Brevibacterium flavum* сверхпродукции L-треонина не наблюдается, так как не происходит сочетанного ингибирования по механизму отрицательной обратной связи аспартокиназы L-треонином, и L-лизином, а L-треонин ингибирует гомосеридегидрогеназу. Мутант, устойчивый к аналогу треонина синтезирует в избыточном количестве треонин, так как его ферменты

ингибированные этой аминокислотой, десенсибилизированы. Гомосеридегидрогеназа и киназа, принимающие участие в синтезе треонина также «выключаются» L-метиокином, и поэтому ауксотрофы по метионину образуют L-треонин с еще большим выходом [Юкельсон, 1968].

Возможность получить регуляторные мутанты появилась благодаря генной инженерии. Она является важнейшим прогрессивным способом изменения генетической программы организма в целях создания высокопродуктивных штаммов промышленных микроорганизмов. Успехи современной генетической инженерии существенно влияют на промышленную биотехнологию [Красноштанова и др., 2001]. Яркий пример больших возможностей генетической инженерии - создание во ВНИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов штамма *E. coli* для получения треонина. В результате были изменены не только регуляторные свойства фермента аспартаткиназы, но и питательные потребности штамма. Введение в геном бактерии нового гена обеспечило бактерии возможность использования в качестве источника углерода сахарозу, основного дисахарида традиционного промышленного сырья - свекловичной мелассы [Гранберг, 1987]. Перечисленные манипуляции наряду с амплификацией плазмид, содержащих оперон треонина, позволили значительно увеличить производительность штамма бактерии и получить за 40 часов ферментации 100 г L-треонина на 1 литр культуральной жидкости [Стеценко и др., 1982].

1.2.3. Использование микроорганизмов в биосинтезе треонина

Традиционно L-аминокислоты в промышленном масштабе могут быть получены методом ферментации с использованием штаммов микроорганизмов, выделенных из природных источников, или их мутантов, специально модифицированных для того, чтобы увеличить продукцию L-аминокислот. Бактериями треонин синтезируется из аспарагиновой кислоты через стадию образования гомосерин-о-фосфата в соответствии с реакцией:

о-фосфо-L-гомосерин + H₂O ↔ L- треонин + ортофосфат [Эппликовист и др., 1985].

Путь биосинтеза незаменимых аминокислот был согласован в основном вследствие биохимических и генетических исследований с бактериями. В большинстве бактерий и высших растений биохимические пути образования аминокислот этой группы подобные [Квеситадзе и др., 2002; Манаков и др., 1990].

Углеродным скелетом этой аминокислоты является образование с гомосерина, четырехуглеродного аналога серина [Леннинджер, 1985]. Гомосерин образуется из аспаргиновой кислоты вследствие ряда реакций, которые в организме млекопитающих не образуются. Это видно из схемы биосинтеза треонина (рис. 1). Треонин также необходим в организме для биосинтеза аминокислот глицина и серина [Стеценко и др., 1982; Физер и др., 1970].

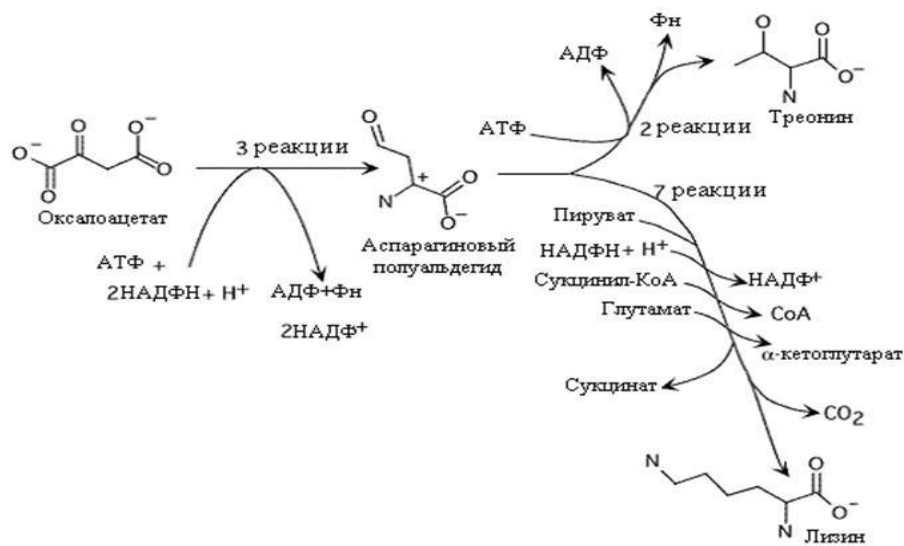


Рис. 1. Биосинтез треонина [Стеценко и др., 1982]

Гомосерин фосфорилируется дальше за счет АТФ до гомосеринфосфата, который потом превращается в треонин вследствие реакции, которая катализируется пиридоксальфосфатозависимой треонинсинтетазой [Елинов, 1989; Стеценко и др., 1982].

Для биосинтеза треонина используются разнообразные бактерии, но основной из них и с наибольшей продуктивностью этой аминокислоты является *Escherichia coli*.

В регуляции биосинтеза треонина в клетках *Escherichia coli* есть некоторые особенности. У кишечной палочки нет механизма согласованного ингибирования ферментативной активности. Кроме того, имеет место «репрессия» всего комплекса треониновых ферментов при избытке треонина или изолейцина и это похоже на «согласованную репрессию». Самостоятельно или по отдельности ни треонин, ни изолейцин не репрессируют синтез ферментов [Егорова и др., 2003].

Производство аминокислот в виде высокоочищенных кристаллических препаратов строится по схеме, типичной для получения и выделения вторичных метаболитов [Жарипов и др., 2003; Катлинский и др., 2005]. Наиболее распространенный одноступенчатый микробиологический синтез любой аминокислоты предполагает размножение в несколько стадий исходной культуры продуцента на агаризованной среде, выращивание в посевных колбах, размножение культуры в посевных ферментерах и в дальнейшем осуществляют выращивание культуры в рабочих ферментерах [Даниляк и др., 1995].

Поскольку в одноступенчатом способе производства аминокислот в качестве продуцентов используются ауксотрофные мутанты, требующие для своего роста и биосинтеза вторичных метаболитов среды, содержащие легкоусваиваемые источники углерода, азота и такие биологически активные вещества, как витамины, его организация возможна только в строго асептических условиях [Катлинский и др., 2005; Печуркин и др., 1990]. При этом особое внимание обращается не только на стерилизацию используемых питательных сред и подаваемого воздуха, всего технологического оборудования и коммуникаций, но и на строжайшее соблюдение всех регламентных требований, обеспечивающих строго асептическое промышленное культивирование данного микроорганизма [Бекер, 1978;

Жарикова, 2005].

Ферментация в ферментере состоит из четырех стадий: наработка рабочей партии культуры, выращивание инокулята в колбах, получение посевного материала в ферментере, проведение основного процесса биосинтеза в рабочем ферментере [Burkovski et al., 2002].

Для получения биомассы *Escherichii coli* в лабораторных условиях, для проведения биосинтеза в ферментерах на агаризованной среде в течение 24 часов при температуре 37°C. Затем в качалочные колбы Эрленмейера объемом 750 мл с 20 мл рабочего раствора среды (табл. 3) для посевной для посевной культуры, микробиологической петлей вносят биомассу. Далее качалочные колбы инкубируют в термостатируемой качалке при 37°C в течение 5–8 часов при скорости перемешивания 250 об./мин [Кафаров и др., 1985].

Таблица 3

Состав раствора среды для посевной культуры [Кафаров и др., 1985]

Наименование компонента	Содержание (г/л)
Дрожжевой экстракт	35
Глюкоза	2,5
NaCl	2,5
K ₂ HPO ₄ *3H ₂ O	3.28

По достижению оптической плотности 5–7 в колбу вносится ½ объема 50% стерильного раствора глицерина. Далее разливают клеточную суспензию в криопробирки объемом 2 мл. Пробирки хранятся в специальных контейнерах в низкотемпературном биоморозильнике при температуре - 80°C. Для проведения ферментации криопробирку достают с закладки, размораживают при комнатной температуре. Стадия наработки и хранения рабочих партий культур позволяет стандартизовать процесс [Божков, 2005; Vogt et al., 2005].

Это важная технологическая операция для обеспечения производства

достаточным количеством высококачественной биомассы клеток продуцента для засева посевных ферментеров [Бекер и др., 1990; Мосичев и др., 1982].

Перед началом процесса ферментации в посевном ферментере необходимо обеспечить достаточное количество посевного материала для его засева. Для выращивания инокулята производится засев клеточной суспензией из закладки посевных качалочных колбах объемом 750 мл с 20 мл рабочего раствора посевной среды (табл. 3). Колбы инкубируются в термостатируемой качалке при 37°C в течении 5–8 часов при скорости перемешивания 250 об./мин до достижения оптической плотности выше 5 ед. Полученным инокулятом засевают посевной ферментер [Варфоломеев и др., 1990; Евстигнеева, 1991].

Среду для посевного ферментера готовится следующим образом. В дистиллированной воде растворили навеску кукурузного экстракта – 12 г, K_2HPO_4 – 1,25 г, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 1 г. В раствор добавили по 1 мл стоковых растворов $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (30 г/л), $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (21 г/л) и лимонной кислоты (140 г/л). Объем смеси довели до 940 мл дистиллированной водой. Значение рН среды составляло 3,8–4,0 ед. Среду перенесли в ферментер и добавили 0,5 мл пеногасителя и стерилизовали автоклавированием в течении 20 минут при 121°C [Егоров, 1986; Елинов, 1995]. Перед началом культивирования в среду вносили 92,5 мл стерильного раствора моногидрата глюкозы (770 г/л), рН среды довели до уровня 6,9–7,2 добавлением раствора 25% NH_4OH . Далее производится засев инокулята в ферментер. Значение рН время ферментации поддерживается на уровне 6,9 ед. добавлением титранта, раствора 25% NH_4OH . Культивирование в посевном ферментере проводится до достижения оптической плотности культуры значения 25 ед. при длине волны 600 нм. Далее посевную культуру переносят в рабочий ферментер [Вейлас, 1964; Грачева, 1980].

Среду для основного процесса готовили следующим образом. В дистиллированной воде растворили навеску кукурузного экстракта – 10 г, K_2HPO_4 – 2,5 г, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 1,5 и $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0,5 г. В раствор добавили по

1 мл стоковых растворов $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (30 г/л), $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (21 г/л) и лимонной кислоты (140 г/л) [Виестур, 1987]. Объем смеси довели до 950 мл дистиллированной водой. Среду перенесли в ферментер, вносили 0,5 мл пеногасителя и стерилизовали автоклавированием в течении 20 минут при 121°C . Перед началом культивирования в ферментер вносят через инокулятницу 30 мл стерильного раствора моногидрата глюкозы (550 г/л), значение pH среды доводят до уровня 6,9–7,2 добавлением шприцем 2,5 мл раствора 25% NH_4OH . Посевную культуру вносили до стартового значения оптической плотности при 600 нм равного 2 ед. [Волова, 1999; Beers et al. 1952]. Основной процесс ферментации проводят при 33°C и скорости перемешивания 1000 об/мин. Раствор подпитки, глюкоза 51,1% подается в среду автоматически для поддержания условий лимита по глюкозе. Расход продуваемого воздуха составляет 1,0 л/(л*мин). Значение pH время ферментации поддерживается на уровне 6,9 ед. добавлением титранта, раствора 25% NH_4OH . Продолжительность основного процесса составляет 36 часов. На протяжении ферментации пробы отбираются каждые 4 часа. В пробах измеряется показатели pH, ОП, сухих веществ, азота, глюкозы и содержание треонина. После проведения ферментации культуральная жидкость поступает на стадию выделения и очистки [Грачева, 1992; Скоупс, 1985]. Которая происходит в следующем порядке: культуральная жидкость подвергается ультрафильтрации, затем проводят ее сушку, концентрирование, обесцвечивание и кристаллизацию. После этого проводят центрифугирование и повторную сушку. Данная последовательность подходит для получения кормового треонина. Для фармацевтической промышленности треонин подвергается дополнительным ступеням очистки [Крылов, 2001; Османов и др., 2005].

1.2.4 Физиологическая роль треонина

Треонин – это незаменимая моноаминокарбоновая аминокислота или 2-амино-3-гидроксибутановая кислота или α -амино- β -оксимасляная кислота (рис.2) [Гранберг, 1987; Имашев, 2000].

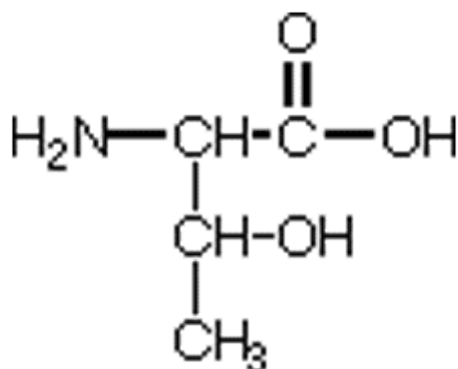


Рис. 2. Строение аминокислоты треонина [Гранберг, 1987]

Данную аминокислоту открыл Вильям Камминг Роуз в 1935 году при изучении питания крыс [Волова, 2008; Гурская, 1966]. Впервые выделена она была из гусиных перьев. Данная аминокислота необходима для поддержания работы иммунной системы, способствует нормальному росту организма. Так же наряду с другими аминокислотами участвует в образовании природных белков. Для человека является незаменимой аминокислотой, и суточная потребность для взрослого человека составляет 0,5 г, для детей приблизительно – 3 г. Для получения дневной нормы треонина, необходимо разнообразно и полноценно питаться. Источниками треонина являются мясные и молочные продукты, рыба, грибы, яйца, различные крупы, меньше его в орехах, бобах и семенах (табл. 4) [Форстера и др., 1990].

Таблица 4

Содержание треонина в некоторых продуктах [Форстера и др., 1990]

Продукт (100 г)	Содержание треонина (мг)	Количество продукта (г)	Количество готового блюда (г)
1	2	3	4
Соя	1,39	36	79,2

1	2	3	4
Фасоль	0,98	51,0	112,2
Чечевица	0,96	52,0	114,4
Сыр Голландский	0,95	52,6	52,6
Сыр Российский	0,92	54,3	54,3
Курица	0,89	56,0	64,4
Семечки подсолнечника	0,89	56,0	67,2
Говядина	0,80	62,1	71,4
Кунжут	0,77	65,0	78,0
Арахис	0,74	67,5	81,0
Свинина	0,65	78,0	90,0
Творог	0,65	78,0	78,0
Грецкий орех	0,59	85,0	102,0
Фундук	0,57	87,7	105,0
Гречка	0,51	98,0	313,6
Пшено шлифованное	0,40	125,0	400,0
Овес приготовленный	0,33	151,0	181,0
Манка	0,32	156,0	500,0
Горошек зеленый консервированный	0,15	333,0	400,0
Сливки	0,13	384,0	384,0
Молоко, кефир	0,11	454,0	454,0
Белый рис приготовленный	0,10	500,0	600,0
Картофель	0,10	500,0	600,0

Следует отметить, что содержание треонина в готовом продукте отличается от содержания его в сыром продукте. Так, например, при жарке мяса содержание треонина увеличивается на 10–15%, а при тушении или запекание – уменьшается на такое же количество.

Треонин довольно легко усваивается организмом, но для этого он нуждается в присутствии витаминов группы В, в частности наиболее полезными для него являются витамины В₃ и В₆. Так же помимо этого важна

концентрация магния в организме, поскольку от этого элемента так же зависит, правильность усвоения аминокислоты.

При недостатке треонина в организме человека проявляются такие симптомы как мышечная слабость, нарушение концентрации внимания, потеря мышечной массы, задержка роста и развития, психическое расстройство, депрессия. Так же нехватка данной аминокислоты отрицательно сказывается на состоянии кожных покровов, волос, ногтей и зубов. Но обычно человек получает необходимое количество треонина с едой, поэтому при сбалансированном и полноценном питании дефицитное состояние не возникает. Кроме этого треонин участвует в образовании коллагена и эластина, обладает гликогенным воздействием, участвуя в образовании иммуноглобулинов и антител, стимулирует процессы роста тканей, способствует энергообмену в мышечных клетках [Грачева и др., 1980].

При избытке треонина в организме начинает накапливаться мочевая кислота. В больших количествах она неблагоприятно сказывается на общем состоянии организма и приводит к расстройству некоторых систем, в частности почек и печени, а также способствует повышению кислотности.

Структурная функция. Треонин входит в состав практически всех белков человеческого организма, в том числе фермента пепсина, участвующего в переваривании протеинов в желудочно-кишечном тракте, а также белков соединительной ткани глиаина и фибрина. В большинстве природных белков его содержание 2–6% [Shoemaker et al., 1950].

К спиртовой группе ОН присоединяется сахарное кольцо, образуя гликопептиды, входящие в состав соединительной ткани, выполняющей функцию опоры для внутренних органов, заполняющей все промежутки между функциональными тканями. Гликопептиды вместе с коллагеном и гиалуроновой кислотой заполняют внутреннее пространство организма.

Треонин входит в состав зубной эмали. Без достаточного потребления этой аминокислоты начнется разрушение структуры зубов, а там и кариес не за горами.

Участие в аминокислотном обмене. Треонин – ведущая аминокислота для нормального функционирования соединительной ткани. В организме она превращается в глицин и серин, а те, в свою очередь, идут на построение коллагена и эластина - также соединительно-тканых белков.

Коллаген в организме есть везде. Мышечные фасции – пленки, структурирующие мышечное волокно, связки, сухожилия, чехлы, покрывающие внутренние органы – везде есть коллаген, погруженный в матрикс из гликопротеидов – этакого вязкого желе, которое сообщает упругость и растяжимость тканям [Debabov, 1982].

Потребность в треонине в детском возрасте в 12 раз больше, чем во взрослом: дети интенсивно растут, то есть растут кости, мышцы, связки, сосуды, а это значит, что на конвейер, вырабатывающий белки соединительной ткани должны постоянно поступать строительные аминокислоты: треонин и синтезирующиеся из него глицин и серин. При недостаточном поступлении этих аминокислот в организм у детей развиваются сколиоз, плоскостопие, мышечная дистрофия, слабость сердечной мышцы, близорукость и кариес [Якубе и др., 1985].

В организме треонин участвует в синтезе коллагена и эластина, которые, в свою очередь, участвуют в укреплении сосудов и мышц.

Участие в жировом обмене. Треонин наряду с метионином и аспарагиновой кислотой помогает печени расщеплять жиры и жирные кислоты. Он входит в состав многих ферментов, утилизирующих жиры. Недостаток треонина в продуктах питания способствуют развитию жировой дистрофии печени [Шпак и др., 1983].

Пищеварительная функция. Треонин входит в состав пищеварительного фермента пепсина, участвующего в расщеплении белков в

желудочно-кишечном тракте. Он помогает при непереносимости некоторых продуктов питания, например глютена пшеницы.

Антитоксическая функция. За счет подвижной группы ОН, треонин соединяется с токсическими веществами и дезактивирует их, а потом выводит из организма .

Иммуностимулирующая функция. Треонин участвует в синтезе иммуноглобулинов и антител, которые защищают организм от инфекций [Block et al., 1947].

Нейромедиаторная функция. Треонин является источником для образования тормозного медиатора ГАМК. Как предшественник нейромедиатора, он используется в комплексном лечении депрессии, и других заболеваний нервной системы [Leuchtenberger et al., 2005]. Он улучшает память, повышает концентрацию внимания, увеличивает работоспособность, поднимает настроение. Как предшественник другого нейромедиатора, аминокислоты глицина, добавки треонина бывают, полезны при лечении бокового амиотрофического склероза и рассеянного склероза. Применяется в комплексном лечении алкоголизма и наркомании, т.к. снижает тягу к веществам, вызывающим зависимость [Патов и др., 1979].

В сельском хозяйстве треонин применяется для кормления животных и способствует росту скелетной мускулатуры, синтезу пищеварительных ферментов и иммунных белков, синтезу глицерина, получению энергии (через цикл трикарбоновых кислот). Желудочно – кишечный эпителий (клетки слизистой, слизь и пищеварительные ферменты) и некоторые иммунные белки особенно богаты треонином. Эксперименты показали, что небольшой дефицит треонина гораздо сильнее влияет на синтез иммуноглобулина, чем на рост тела [Сассон, 1987].

Треонин является одним из нескольких возможных предшественников заменимой кислоты глицина, которая синтезируется организмом животных, и в этом смысле треонин играет определенную роль в регулировании усвоения пищи. Ключевыми ферментами метаболизма треонина у птиц и свиней

являются, соответственно, треонинальдолаза и треониндегидрогеназа. Поскольку оба этих фермента катализируют необратимые реакции, глицин не может служить метаболическим источником треонина. Углеродный скелет треонина может послужить источником энергии, окисляясь в цикле лимонной кислоты, куда он вводится в виде пирувата. Поэтому при недостатке треонина в рационе у животных наблюдается снижение потребления кормов и упитанности, истощение, нарушение деятельности желудочно-кишечного тракта и развития мышечной ткани [Патов и др., 1979].

Поскольку треонин не синтезируется организмом, он должен поступать с кормами и добавками. Во многих видах зерновых – пшенице, ячмене, сорго – и других компонентах кормов треонин содержится в недостаточном количестве и переваримость его, особенно свиньями, бывает мала. Добавка чистых аминокислот в рацион свиней позволяет без снижения темпов роста уменьшить содержание протеина в корме и улучшить его использование [Безбородов, 1984]. Общеизвестно, что если целевой задачей является минимальная жирность туши (максимальное содержание белка), потребность в аминокислотах оказывается выше, чем при задаче максимальной скорости или эффективности роста. В некоторых случаях отмечается тенденция к возрастанию жирности у свиней, получающих корм с пониженным содержанием белка и добавками аминокислот.

В птицеводстве уделяется серьезное внимание задаче снижения уровня протеина в корме за счет введения концентрированных аминокислот, что обеспечивает оптимальное развитие ремонтного молодняка и максимальную яичную продуктивность у кур-несушек, и максимальный прирост живой массы и конверсию корма у бройлеров. Первой и второй лимитирующими аминокислотами в птицеводстве являются метионин и лизин. Включение треонина в корма для бройлеров и несушек, уже содержащие добавки метионина и лизина, является также эффективным особенно на начальных этапах роста [Боярский и др., 1985].

Для компенсации дефицита используется кормовой треонин, синтезированный в промышленных условиях путем ферментации (табл. 5). Синтезированный треонин в чистом виде представляет собой белый кристаллический порошок с содержанием активного вещества не менее 98,5%. Препарат имеет низкое содержание пыли и летучих веществ. Его вводят в минеральные корма и комбикорма, премиксы, заменители молока [Гореликова, 2004].

Таблица 5

Физико-химические показатели L-треонина кормового [Гореликова, 2004]

Наименование показателя	Норма
Внешний вид	Кристаллический порошок или гранулы
Массовая доля вещества, %, не менее	98,5
Потери при сушке, %, не менее	0,5
Содержание золы, %, не более	0,5
Молекулярная масса	119,10
Насыпная плотность, кг/м ³	650
Размер частиц, мкм:	
20-50%	менее 63
45-80%	63-150
3-10%	более 150
pH 5% водного раствора	5,1-5,6

Применение кормовой добавки треонина эффективно в свиноводстве и птицеводстве, а также при выращивании молодняка крупного рогатого скота. Добавка чистых аминокислот, в том числе треонина, в рацион животных и птицы дает возможность снизить количество протеина в корме, улучшить использование кормов, сохраняя при этом темпы роста живой массы. Количество зависит от содержания аминокислот в корме, вида и возраста животных и птицы. В среднем, эффективное количество треонина в рационах составляет: для поросят 0,5–2,0 кг/т, свиноматок 0,1–1,5, откорма свиней 0,2–1,5; для цыплят – бройлеров, несушек, индейки 0,1–1,0; в заменителях цельного молока для телят 0,5–3,0 кг/т [Боярский, 1985].

Глава 2. Материал и методы исследования

2.1. Объект исследования

Штамм *Escherichia coli* имеет регистрационный номер ВКПМ В-12204. Родовое и видовое название культуры *Escherichia coli* К 12.

Согласно паспорту обладает следующими характеристиками:

- Культурально-морфологические особенности штамма с указанием среды: по форме клеток – короткие толстые палочки (длина ~ 2 мкм, диаметр ~ 1 мкм), возможен полиморфизм, в препарате располагаются беспорядочно, не спорообразующие; на среде LB образует приплюснутые колонии с неровными краями, на минимальной среде образует колонии с эффектом лизиса (smooth phenotype).

- Область применения штамма – продуцент аминокислоты.

- Продукт, синтезируемый штаммом – треонин.

- Активность (продуктивность штамма, другие производные показатели – 8–10 г/л при ферментации в пробирках в ФС среде через 24 часа роста; около 100 г/л за 40 часов ферментации в ферментере в среде с кукурузным экстрактом.

- Способ определения активности штамма с указанием метода – ВЭЖХ

- Способ, условия и состав сред для длительного хранения штамма – лиофилизация, жидкая LBc 15% глицерином.

- Сведения о безопасности использования штамма:

1) Штамм не является генетически модифицированным и не содержит генов других организмов, перенесенных генов резистентности, генетических изменений, связанных с использованием генно-технических методик.

2) Штамм не является зоопатогенным, фитопатогенным и не представляет опасности по каким-либо другим причинам.

- Срок хранения штампа: 5 лет в лиофильно высушенном виде.

- Оптимальная температура роста 33–37 °С

- Оптимальное значение рН для роста штамма 6,9–7,2 ед.

2.2. Методики приготовления питательных сред

Состав и приготовление питательной среды (*Среды А*) для выращивания инокулята в колбах (г/л):

- 1) дрожжевой экстракт – 35 г;
- 2) калий фосфорнокислый однозамещенный – 2,52 г;
- 3) натрия хлорид – 2,50 г;
- 4) глюкоза – 3,0 г;
- 5) вода до 1000 мл.

рН среды до 7,1–7,3 доводят раствором 40% гидроксида натрия. Среду переливают в стеклянную бутылку вместимостью 1,0 л закрывают крышкой и двойным колпачком из оберточной бумаги, обвязывают шпагатом и автоклавируют при температуре (116 ± 2) °С, давлении 0,08 МПа в течение (30 ± 1) мин. После стерилизации банку со средой охлаждают и проводят контроль качества и стерильности среды.

Контроль стерильности проводят, посредством высева на чашку Петри с агаризованной средой LB с биотином и глюкозой.

Контроль качества среды проводят по следующим показателям : ОП среды, рН среды, содержание глюкозы, азота и сухих веществ в среде.

Если среда соответствует всем нормам качества и стерильности ее помещают в холодильник и используют для выращивания инокулята. Срок годности среды 1 месяц.

Состав и приготовление ферментационной среды для контроля продуктивности клона и посевного материала (г/л):

- 1) дрожжевой автолизат (сух.) – 2,0 г;
- 2) сульфат аммония – 10,0 г;
- 3) калий фосфорнокислый однозамещенный – 2,0 г;
- 4) сульфат железа семиводный – 0,02 г;
- 5) сульфат марганца пятиводный – 0,02 г;
- 6) натрия хлорид – 0,6 г;

- 7) глюкоза – 40,0 г;
- 8) сульфат магния семиводный – 0,4 г;
- 9) кальций углекислый – 20,0 г;
- 10) вода до 1000 мл.

pH среды доводят до 7,2 раствором 40% гидроксида натрия и еще раз перемешивают. Доливают очищенную воду до объема 820 мл и перемешивают. Среду переливают в стеклянную бутылку вместимостью 1,0 л закрывают крышкой и двойным колпачком из оберточной бумаги, обвязывают шпагатом и автоклавируют при температуре (121 ± 2) °C, давлении 0,08 МПа в течение (20 ± 1) мин.

Отдельно стерилизуют:

- 0,5% раствор магния сернокислого семиводного – в течение (20 ± 1) мин при температуре (121 ± 2) °C, давлении 0,08 МПа,
- 50% раствор глюкозы – в течение (20 ± 1) мин при температуре (121 ± 2) °C, давлении 0,08 МПа,
- 20 г кальция углекислого – в течение (20 ± 1) мин при температуре (121 ± 2) °C, давлении 0,08 МПа.

Ферментационные среды с дрожжевым экстрактом, дрожжевым экстрактом ультрафильтрованным, пептоном дрожжевым, пептоном мясным и триптоном казеиновым готовятся по той же методике, что и ферментационная среда с дрожжевым автолизатом.

Состав и приготовление ферментационной среды для контроля продуктивности клона и посевного материала с кукурузным экстрактом (г/л):

- 1) кукурузный экстракт (сух.) – 10,0 г;
- 2) или кукурузный экстракт (сжижен) – 20,0 г;
- 3) сульфат аммония – 10,0 г;
- 4) калий фосфорнокислый однозамещенный – 2,0 г;
- 5) сульфат железа семиводный – 0,02 г;
- 6) сульфат марганца пятиводный – 0,02 г;
- 7) натрия хлорид – 0,6 г;

- 8) bis-tris буфер – 50,0 г;
- 9) глюкоза – 40,0 г;
- 10) сульфат магния семиводный – 0,4 г;
- 11) вода до 1000 мл.

После растворения всех солей на весах взвешивают (50,0±0,1) г буфера Bis-TRIS и переносят в стакан. Доводят pH среды до 7,2 раствором 20% соляной кислоты и еще раз перемешивают. Доливают очищенную воду до объема 840 мл и перемешивают. Среду переливают в стеклянную бутылку вместимостью 1,0 л закрывают крышкой и двойным колпачком из оберточной бумаги, обвязывают шпагатом и автоклавируют при температуре (121±2) °С, давлении 0,08 МПа в течение (20±1) мин.

Отдельно стерилизуют:

- 0,5% раствор магния сернокислого семиводного – в течение (20±1) мин при температуре (121±2) °С, давлении 0,08 МПа,
- 50% раствор глюкозы – в течение (20±1) мин при температуре (121±2) °С, давлении 0,08 МПа,

Готовят 50% раствор глюкозы. Раствор переносят в банку объемом 0,1 л, закрывают крышкой и двумя колпаками из оберточной бумаги, которые фиксируют шпагатом. Раствор стерилизуют в автоклаве и после остывания добавляют в ферментационную среду.

Готовят совместно раствор сульфата железа семиводного (0,2%) и сульфата марганца пятиводного (0,2%), которые растворяют в 1,8% растворе лимонной кислоты. Раствор хранят в холодильнике при температуре (6±2) °С в течение 1 месяца.

После стерилизации банки со средой, 50% раствором глюкозы и 0,5% раствором магния сернокислого семиводного охлаждают. В ламинарном шкафу стерильно соединяют все компоненты среды и проводят контроль качества и стерильности. Контроль стерильности проводят, посредством высева на чашку Петри с агаризованной средой LB с биотином и глюкозой.

Контроль качества среды проводят по следующим показателям: ОП среды, рН среды, содержание глюкозы, азота и сухих веществ в среде. Если среда соответствует всем нормам качества и стерильности ее помещают в холодильник и используют для проверки продуктивности инокулянта. Срок годности среды 1 месяц.

Состав и приготовление агаризованной питательной среды LB с биотином и глюкозой (г/л):

- 1) пептон – 10 г;
- 2) дрожжевой экстракт – 5 г;
- 3) хлористый натрий – 10 г;
- 4) глюкоза – 5 г;
- 5) агар – 15 г;
- 6) вода до 1,0 л, рН 7,0–7,1.

Все компоненты среды, за исключением глюкозы, стерилизуются вместе.

Готовят 50% раствора глюкозы. Раствор переносят во флакон вместимостью 25 мл, закрывают плотно крышкой и стерилизуют в автоклаве в течение (30 ± 1) минут при температуре (116 ± 2) °С, давлением 0,05 МПа. На колбу наносят этикетку с указанием наименования содержимого, концентрации и даты приготовления. Раствор хранят в холодильнике при температуре (6 ± 2) °С в течение 1 месяца.

Готовят агаризованную питательную среду (1,0 л): в 0,7 л очищенной воды растворяют $10,0 \pm 0,1$ г пептона, $5,0 \pm 0,1$ г дрожжевого экстракта, $10,0 \pm 0,1$ г хлористого натрия. Перемешивают с помощью магнитной мешалки и доводят рН раствора до $(7,1 \pm 0,1)$ раствором 40% гидроокиси натрия. Затем в среду добавляют $(15,0 \pm 0,1)$ г агара и доводят объем до 1,0 л. Среду переливают во флакон, закрывают крышкой и двумя колпачками из оберточной бумаги, которые фиксируют шпагатом, и автоклавируют при температуре (116 ± 2) °С, давлением 0,08 МПа в течение (30 ± 1) минут. После стерилизации бутылку охлаждают до (70 ± 2) °С и к среде в ламинарном

шкафу стерильной добавляют 10 мл стерильного 50% раствора глюкозы. Затем там же агаризованную среду разливают в стерильные чашки Петри по (25±5) мл. Дают среде застыть и убирают чашки в термостат, где хранят при температуре (32±1) °С. Чашки Петри с агаром необходимо перед использованием выдержать в течение 2 суток.

Состав и приготовление агаризованной питательной среды LA (Среда Лурия) (г/л):

- 1) пептон – 15 г;
- 2) дрожжевой экстракт – 5 г;
- 3) хлористый натрий – 5 г;
- 4) агар – 15–20 г;
- 5) вода до 1,0 л, рН 7,0–7,1

Все компоненты среды перемешивают с помощью магнитной мешалки, доливая очищенную воду до (1,0±0,01) л, доводят рН раствора до (7,1±0,1) 40 % раствором гидроксида натрия и еще раз перемешивают. Банку закрывают крышкой и двумя колпачками из оберточной бумаги, обвязывают шпагатом и автоклавируют при температуре (116±2) °С, давлении 0,08 МПа в течение (30±1) мин. После стерилизации банку охлаждают до (70±2)°С и в ламинарном шкафу агаризованную среду по (25±5) мл разливают в стерильные чашки Петри. Дают среде застыть и убирают чашки в термостат, где хранят при температуре (32±1) °С. Чашки Петри с агаром необходимо перед использованием выдержать в течение 2 суток.

2.3. Методика оживления криокультуры штамма *Escherichia coli*

ВКПМ В-12204 и засев посевных колб

Криопробирку, содержащую 2 мл замороженной культуры, достают из биоморозильника, где ее хранят при температуре -80°С, и проводят размораживание при температуре 21–23°С в течение (30±5) минут периодически встряхивая.

В ламинарном шкафу в стерильные колбы Эрленмейера объемом 1,0 л, при помощи стерильного мерного цилиндра, наливают по 75 мл стерильной питательной *Среды А*.

Засев культуры на питательную *Среду А*, проводят из расчета 1 криопробирка на 150 мл среды. В данном случае засев культуры проводят следующим образом – дозатором отбирают 0,850 мл культуры из криопробирки и переносят в колбу с 75 мл *Среды А*. Засевается 2 колбы.

Колбы с посевной *Средой А* и культурой клеток помещают на шейкер и производят выращивание инокулята при температуре 37°C, 320 об./мин в течение 6 часов.

Через 6 часов роста, колбы снимают с шейкера, производят высев на стерильность, а так же отбирают пробу для измерения ОП и рН, и засева инокулята на ферментационную среду для проверки продуктивности.

2.4. Методика исследования влияния различных источников аминного азота на продуктивность штамма *Escherihia coli* ВКПМ В-12204

Исследование влияния различных источников аминного азота на продуктивность штамма *Escherihia coli* ВКПМ В-12204 проводилась на колбах и включала в себя следующие этапы:

Подготовка и стерилизация необходимого оборудования и посуды:

- 1) колбы Эрленмейера объемом 1,0; 0,25 и 0,1 л;
- 2) стеклянный цилиндр объемом 0,1 л;
- 3) стеклянные пипетки объемом 25 и 10 мл;
- 4) дозатор Ленпипет объемом 100–1000 мкл;
- 5) наконечники объемом 100–1000 мкл.

Приготовление и стерилизация питательных, ферментационных и агаризованных сред, необходимых для проведения опыта.

Наработка посевного материала для проведения опыта.

Выполняли отбор 24 мл инокулята стерильной стеклянной пипеткой из колбы Эрленмейера (объемом 1,0 л) с заранее выращенным посевным материалом, 21 мл инокулята переносили в стерильную колбу Эрленмейера (объемом 0,1 л).

3 мл помещали в стерильную пробирку с закручивающейся крышку и измеряли ОП и рН.

В 21 колбу Эрленмейера (объемом 0,25 л) разливали по 15 мл разных ферментационных сред (каждую среду исследовали в 3 проворностях) и вносили по 1,0 мл посевного инокулята. Колбы подписывали и помещали на шейкер на 37°C, 320 об./мин, на 24 часа.

Всего исследовали 7 ферментационных сред с различным источником аминного азота (таб. 6):

Таблица 6

Ферментационные среды и источники аминного азота

Название ферментационной среды (ФС)	Содержание аминного азота (%)
ФС с дрожжевым автолизатом	$\geq 3,0$ %
ФС с дрожжевым экстрактом	$> 4,0$ %
ФС с дрожжевым экстрактом ультрафильтрованным	$> 5,0$ %
ФС с пептоном дрожжевым	$> 4,0$ %
ФС с пептоном мясным	$\geq 3,0$ %
ФС с триптоном казеиновым	$\geq 2,5$ %
ФС с кукурузным экстрактом и буфером Bis-TRIS	$\geq 2,0$ %

Колбы снимали с шейкера через 24 часа роста, делали высев на стерильность на чашки Петри с агаризованной средой Лурия для визуального контроля стерильности и соответствия морфологических характеристик. Так же проводили микропирование, методом «живой капли», для визуального контроля размеров клеток продуцента.

Во всех колбах проводили измерения оптической плотности, рН, содержания сухих веществ, остаточной глюкозы и треонина.

Измерение оптической плотности производили на однолучевом сканирующем спектрофотометре UNICO 2800, производитель – United Products & Instruments, Inc., США. В данном измерении использовали метод спектрофотометрии для определения количества клеток в среде (концентрации клеток).

Измерение показаний pH проводили на pH-метре Sartorius PP-15 (Sartorius AG, Германия). Использовали потенциометрический метод, который основан на измерении ЭДС электродной системы.

Определение содержания сухих веществ проводили на анализаторе влажности Sartorius MA 100 (Sartorius AG, Германия). В данном приборе используется метод определения сухих веществ высушиванием инфракрасными лучами.

Измерение остаточной глюкозы в пробах осуществляли глюкозооксидазным методом на автоматическом анализаторе глюкозы «Энзискан Ультра» мембранного типа (ООО «НПФ» «ЛАБОВЭЙ», Россия).

Определение концентрации треонина осуществляли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на хроматографе Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific, USA).

2.5. Методы статистической обработки данных

Данные полученные в результате экспериментальных исследований обработаны методами вариационной статистики. Рассчитывали средние арифметические, ошибку средней арифметической, стандартное отклонение, коэффициент вариации, ошибку разностей. Экспериментальные данные представлены в виде среднеарифметических величин с их стандартными ошибками. Достоверность различий между контрольными и опытными пробами определяли с использованием t–критерия Стьюдента ($P_{0,95}$ и $P_{0,99}$).

Глава 3. Полученные результаты и их обсуждение

3.1. Морфофизиологическая характеристика штамма

Escherihia coli ВКПМ В-12204

Были изучены морфофизиологические особенности штамма *Escherihia coli* ВКПМ В-12204 на всех этапах культивирования микроорганизма. Установлено, что культура клеток после разморозки наиболее приближена к паспортным характеристикам: преобладание бактерий одного размера (длина ~ 2 мкм, диаметр ~ 1 мкм), наличие полиморфных форм и делящихся клеток незначительно или вовсе отсутствует (рис. 3).

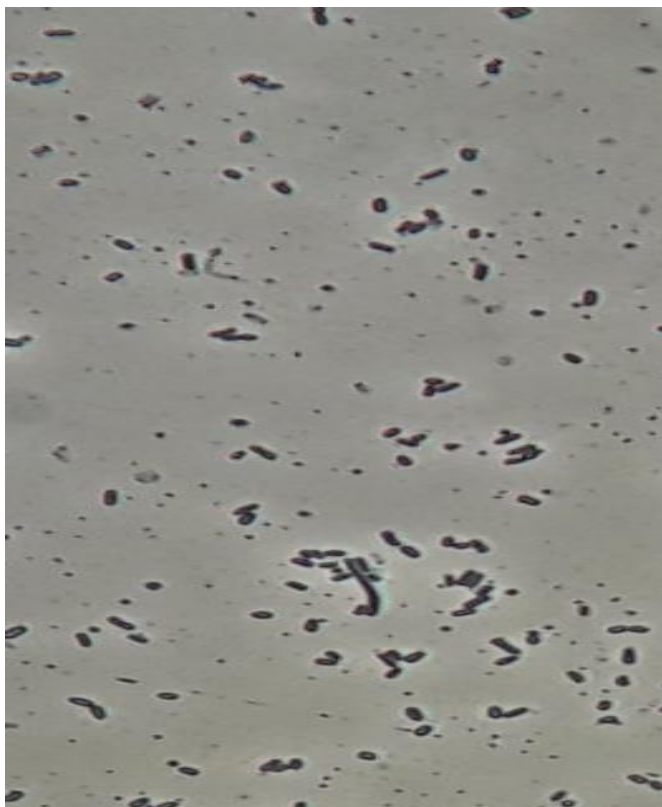


Рис. 3. Культура клеток *Escherihia coli* ВКПМ В-12204 после разморозки (световая микроскопия, ув. X 800)

В посевных колбах с питательной *Средой А* после 6 часов роста наблюдали увеличение количества делящихся клеток (цепочки по 2–е), а так же появление полиморфных форм бактерий (рис. 4).

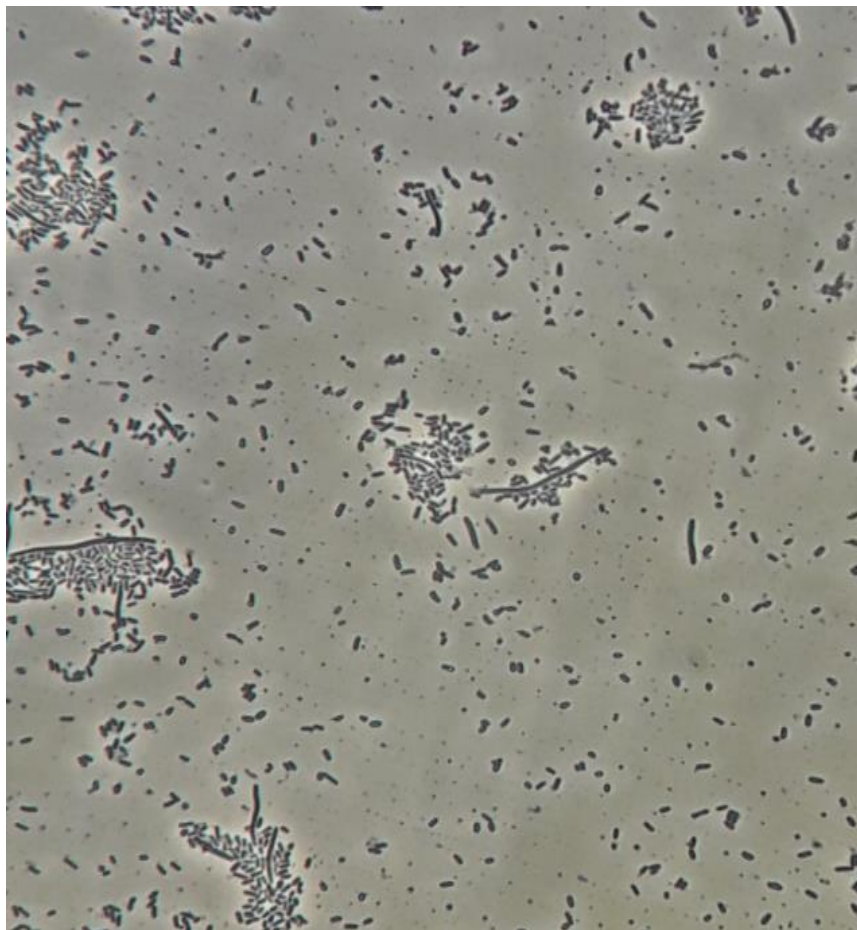


Рис.4. Культура клеток *Escherihia coli* ВКПМ В-12204 в питательной *Среде А* (световая микроскопия, ув. X 800)

В колбах Эрленмейера с ферментационными средами после 24 часов культивирования, наблюдали большое количество клеток с полиморфизмом, значительное увеличение числа клеток в среде, а так же уменьшение делящихся бактерий, что вызвано постепенным старением клеток.

3.2. Влияние различных источников аминокислотного азота на продуктивность штамма *Escherihia coli* ВКПМ В-12204

В результате проведенных экспериментов был зафиксирован хороший рост культуры клеток на всех ферментационных средах (табл. 7, приложение 1).

Средние значения продуктивности *Escherihia coli* ВКПМ В-12204 при культивировании штамма в средах с различными источниками аминного азота

№ п.п.	Источник аминного азота	Часы роста	Глюкоза (остат.)	ОП	pH	Содержание треонина, мг
1	Дрожжевой автолизат	24	16,67±0,75	10,01±0,68	5,25±0,03	5,43±0,15
2	Дрожжевой экстракт	24	18,01±0,58	8,64±0,73	5,29±0,04	4,12±0,14
3	Дрожжевой экстракт ультрафильтрованный	24	0,33±0,30	17,56±1,33	7,23±0,13	8,35±0,20
4	Пептон дрожжевой	24	18,20±0,49	10,05±0,12	5,32±0,02	3,26±0,07
5	Пептон мясной	24	15,15±0,16	8,81±0,05	5,32±0,02	1,69±0,03
6	Триптон казеиновый	24	14,73±0,22	9,90±0,22	5,33±0,02	1,86±0,05
7	КЭ + буфер Bis-TRIS	24	0	22,39±1,44	6,33±0,04	11,44±0,17

Примечание: ОП – оптическая плотность – это мера непрозрачности слоя вещества для световых лучей, является характеристикой ослабления оптического излучения в слоях различных веществ. Измерение ОП применяется для количественного определения концентраций различных веществ в растворах, суспензиях клеток и др.

При анализе высевов на чашках Петри с агаризованной средой Лурия рост посторонней микрофлоры не обнаружен. При микрокопировании нами наблюдались крупные клетки с хорошо видимым полиморфизмом (наличие клеток разной величины и формы).

По морфологии клетки соответствуют описанию штамма в паспорте: короткие толстые палочки с закругленными концами (длина ~ 2 мкм, диаметр ~ 1 мкм), не подвижные, в препарате расположены беспорядочно, споры не образуют (рис. 5–8).

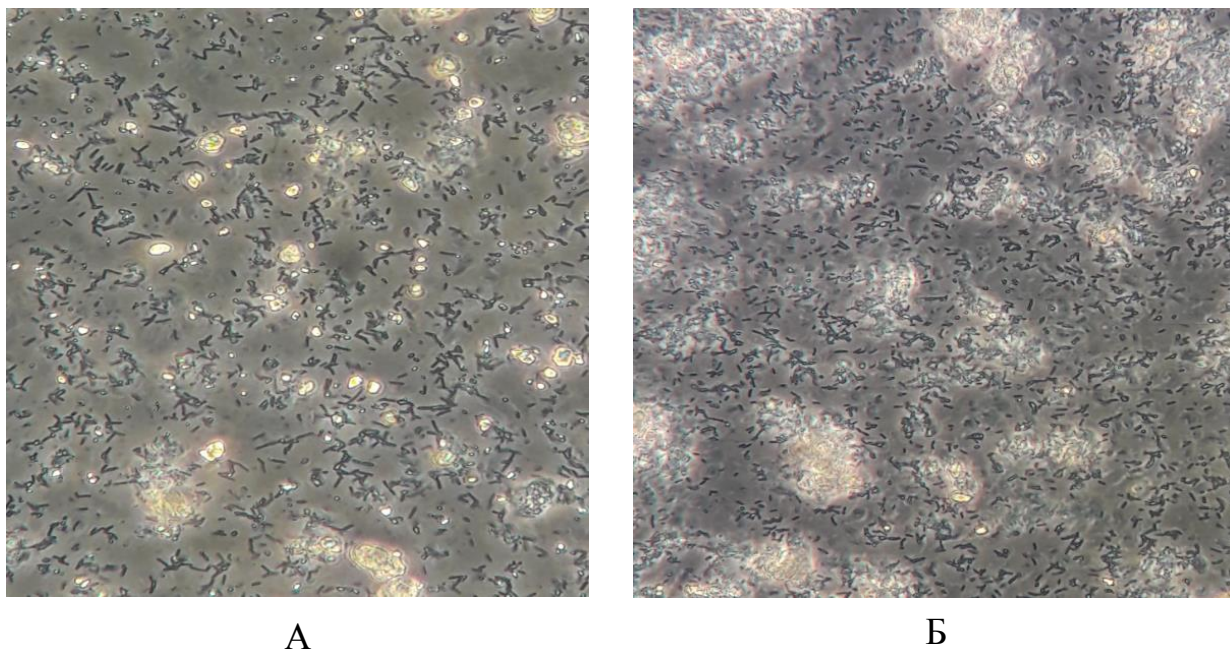


Рис.5. Культура клеток *Escherihia coli* ВКПМ В-12204 после 24 часов роста на ферментационной среде с А) дрожжевым автолизатом и Б) дрожжевым экстрактом (световая микроскопия, ув. X 800)

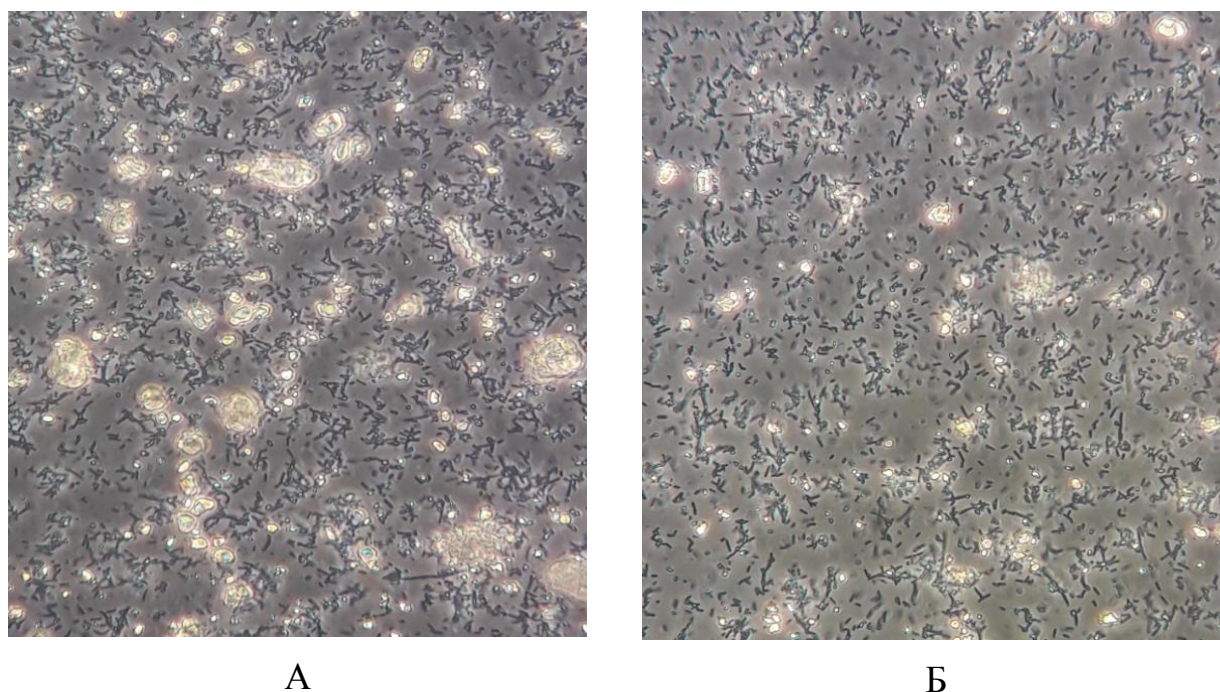


Рис.6. Культура клеток *Escherihia coli* ВКПМ В-12204 после 24 часов роста на ферментационной среде с А) дрожжевым экстрактом ультрафильтрованным и Б) пептоном дрожжевым (световая микроскопия, ув. X 800)

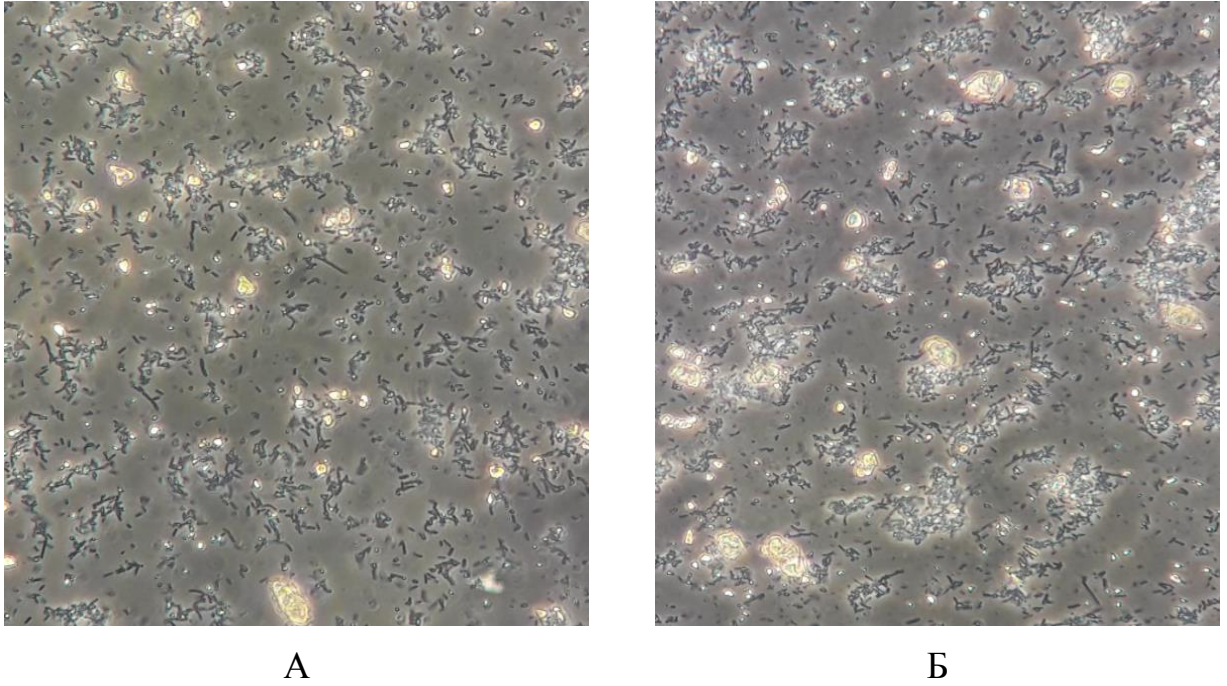


Рис.7. Культура клеток *Escherichia coli* ВКПМ В-12204 после 24 часов роста на ферментационной среде с А) пептоном мясным и Б) триптоном казеиновым (световая микроскопия, ув. X 800)

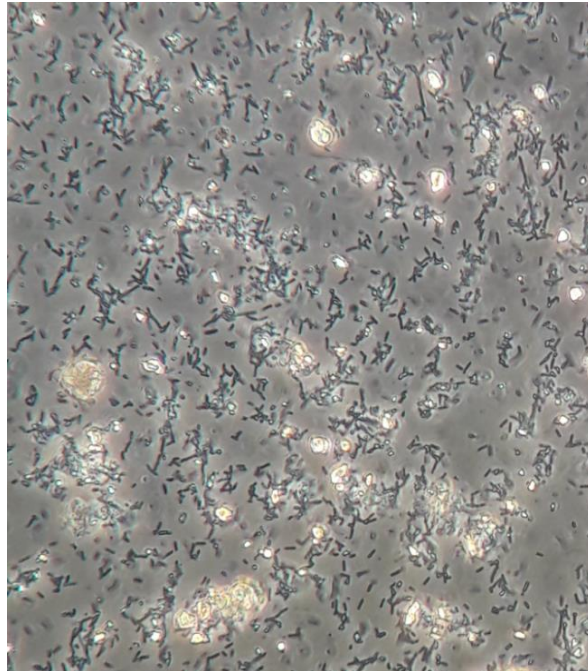


Рис.8. Культура клеток *Escherichia coli* ВКПМ В-12204 после 24 часов роста на ферментационной среде с кукурузным экстрактом (световая микроскопия, ув. X 800)

В культуре клеток четко выражен полиморфизм, который, может быть, связан с особенностями состава ферментационных сред, который в свою очередь оказал влияние на склонность клеток *Escherihii coli* к мутациям и появлению более коротких или же более длинных клеток.

3.3. Количественный учет, полученных результатов

Расчет ошибки средней арифметической для таблицы 8 осуществляли при помощи формулы (3.1):

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum(X - X_{cp})^2}{n}} \quad (3.1)$$

где σ – ошибка средней арифметической;

X – исследуемые данные;

X_{cp} – среднее арифметическое исследуемых данных;

n – число повторности в выборке.

Среднее арифметическое (X_{cp}) вычисляется по формуле (3.2):

$$X_{cp} = \frac{X_1 + X_2 + \dots + X_n}{n} \quad (3.2)$$

где X_{cp} – среднее арифметическое исследуемых данных;

X_1, X_2, X_n – исследуемые данные;

n – число слагаемых величин.

Были получены следующие результаты.

$$1) \sigma_{\text{ДА(глюкоза)}} = \sqrt{\frac{\sum(X_1 - X_{1cp})^2}{n}} = \sqrt{\frac{\sum(17,32 - 16,67)^2 + (15,62 - 16,67)^2 + (17,06 - 16,67)^2}{3}} =$$

$$\sqrt{0,5590} = 0,7477 \approx 0,75$$

$$2) \sigma_{\text{ДА(ОП)}} = \sqrt{\frac{\sum(X_2 - X_{2cp})^2}{n}} = \sqrt{\frac{\sum(9,92 - 10,01)^2 + (10,88 - 10,01)^2 + (9,93 - 10,01)^2}{3}} =$$

$$\sqrt{0,4578} = 0,6766 \approx 0,68$$

$$3) \sigma_{\text{ДА(рН)}} = \sqrt{\frac{\sum(X_3 - X_{3\text{cp}})^2}{n}} = \sqrt{\frac{\sum(5,24-5,25)^2 + (5,22-5,25)^2 + (5,29-5,25)^2}{3}} = \sqrt{0,0008} \\ = 0,0282 \approx 0,03$$

$$4) \sigma_{\text{ДА(треонин)}} = \sqrt{\frac{\sum(X_4 - X_{4\text{cp}})^2}{n}} = \sqrt{\frac{\sum(5,31-5,43)^2 + (5,35-5,43)^2 + (5,64-5,43)^2}{3}} = \\ \sqrt{0,0216} = 0,1469 \approx 0,15$$

$$5) \sigma_{\text{ДЭ(глюкоза)}} = \sqrt{\frac{\sum(X_5 - X_{5\text{cp}})^2}{n}} = \sqrt{\frac{\sum(17,21-18,01)^2 + (18,50-18,01)^2 + (18,32-18,01)^2}{3}} = \\ \sqrt{0,3308} = 0,5751 \approx 0,58$$

$$6) \sigma_{\text{ДЭ(ОП)}} = \sqrt{\frac{\sum(X_6 - X_{6\text{cp}})^2}{n}} = \sqrt{\frac{\sum(7,65-8,64)^2 + (9,37-8,64)^2 + (8,90-8,64)^2}{3}} = \\ \sqrt{0,5269} = 0,7259 \approx 0,73$$

$$7) \sigma_{\text{ДЭ(рН)}} = \sqrt{\frac{\sum(X_7 - X_{7\text{cp}})^2}{n}} = \sqrt{\frac{\sum(5,34-5,29)^2 + (5,27-5,29)^2 + (5,25-5,29)^2}{3}} = \sqrt{0,0015} \\ = 0,0387 \approx 0,04$$

$$8) \sigma_{\text{ДЭ(треонин)}} = \sqrt{\frac{\sum(X_8 - X_{8\text{cp}})^2}{n}} = \sqrt{\frac{\sum(4,08-4,12)^2 + (4,30-4,12)^2 + (3,97-4,12)^2}{3}} = \\ \sqrt{0,0188} = 0,1371 \approx 0,14$$

$$9) \sigma_{\text{ДЭУ(глюкоза)}} = \sqrt{\frac{\sum(X_9 - X_{9\text{cp}})^2}{n}} = \sqrt{\frac{\sum(0,08-0,33)^2 + (0,75-0,33)^2 + (0,17-0,33)^2}{3}} = \\ \sqrt{0,0882} = 0,2969 \approx 0,30$$

$$10) \sigma_{\text{ДЭУ(ОП)}} = \sqrt{\frac{\sum(X_{10} - X_{10\text{cp}})^2}{n}} = \sqrt{\frac{\sum(16,64-17,56)^2 + (16,60-17,56)^2 + (19,44-17,56)^2}{3}} \\ = \sqrt{1,7675} = 1,3295 \approx 1,33$$

$$11) \sigma_{\text{ДЭУ(рН)}} = \sqrt{\frac{\sum(X_{11} - X_{11\text{cp}})^2}{n}} = \sqrt{\frac{\sum(7,31-7,23)^2 + (7,04-7,23)^2 + (7,33-7,23)^2}{3}} = \\ \sqrt{0,0175} = 0,1323 \approx 0,13$$

$$12) \sigma_{\text{ДЭУ(треонин)}} = \sqrt{\frac{\sum(X_{12} - X_{12\text{cp}})^2}{n}} = \sqrt{\frac{\sum(8,33-8,35)^2 + (8,61-8,35)^2 + (8,11-8,35)^2}{3}} = \\ \sqrt{0,0419} = 0,2047 \approx 0,20$$

$$13) \quad \sigma_{\text{ПД(глюк.)}} = \sqrt{\frac{\sum(X_{13}-X_{13\text{cp}})^2}{n}} = \sqrt{\frac{\sum(17,60-18,20)^2+(18,79-18,20)^2+(18,22-18,20)^2}{3}}$$

$$= \sqrt{0,2362} = 0,4860 \approx 0,49$$

$$14) \quad \sigma_{\text{ПД(ОП)}} = \sqrt{\frac{\sum(X_{14}-X_{14\text{cp}})^2}{n}} = \sqrt{\frac{\sum(10,12-10,05)^2+(10,16-10,05)^2+(9,88-10,05)^2}{3}}$$

$$= \sqrt{0,0153} = 0,1237 \approx 0,12$$

$$15) \quad \sigma_{\text{ПД(рН)}} = \sqrt{\frac{\sum(X_{15}-X_{15\text{cp}})^2}{n}} = \sqrt{\frac{\sum(5,33-5,32)^2+(5,34-5,32)^2+(5,29-5,32)^2}{3}} =$$

$$\sqrt{0,0004} = 0,02$$

$$16) \quad \sigma_{\text{ПД(треонин)}} = \sqrt{\frac{\sum(X_{16}-X_{16\text{cp}})^2}{n}} = \sqrt{\frac{\sum(3,35-3,26)^2+(3,17-3,26)^2+(3,26-3,26)^2}{3}} =$$

$$\sqrt{0,0054} = 0,0735 \approx 0,07$$

$$17) \quad \sigma_{\text{ПМ(глюк.)}} = \sqrt{\frac{\sum(X_{17}-X_{17\text{cp}})^2}{n}} = \sqrt{\frac{\sum(15,16-15,15)^2+(15,34-15,15)^2+(14,96-15,15)^2}{3}}$$

$$= \sqrt{0,0241} = 0,1552 \approx 0,16$$

$$18) \quad \sigma_{\text{ПМ(ОП)}} = \sqrt{\frac{\sum(X_{18}-X_{18\text{cp}})^2}{n}} = \sqrt{\frac{\sum(8,76-8,81)^2+(8,88-8,81)^2+(8,80-8,81)^2}{3}} =$$

$$\sqrt{0,0025} = 0,05$$

$$19) \quad \sigma_{\text{ПМ(рН)}} = \sqrt{\frac{\sum(X_{19}-X_{19\text{cp}})^2}{n}} = \sqrt{\frac{\sum(5,34-5,32)^2+(5,30-5,32)^2+(5,32-5,32)^2}{3}} =$$

$$\sqrt{0,0003} = 0,0173 \approx 0,02$$

$$20) \quad \sigma_{\text{ПМ(треонин)}} = \sqrt{\frac{\sum(X_{20}-X_{20\text{cp}})^2}{n}} = \sqrt{\frac{\sum(1,65-1,69)^2+(1,73-1,69)^2+(1,70-1,69)^2}{3}} =$$

$$\sqrt{0,0011} = 0,0331 \approx 0,03$$

$$21) \quad \sigma_{\text{ТК(глюк.)}} = \sqrt{\frac{\sum(X_{21}-X_{21\text{cp}})^2}{n}} = \sqrt{\frac{\sum(14,48-14,73)^2+(14,69-14,73)^2+(15,02-14,73)^2}{3}}$$

$$= \sqrt{0,0494} = 0,2223 \approx 0,22$$

$$22) \quad \sigma_{\text{ТК(ОП)}} = \sqrt{\frac{\sum(X_{22}-X_{22\text{cp}})^2}{n}} = \sqrt{\frac{\sum(9,68-9,90)^2+(10,20-9,90)^2+(9,83-9,90)^2}{3}} =$$

$$\sqrt{0,0478} = 0,2186 \approx 0,22$$

$$23) \quad \sigma_{\text{TK(pH)}} = \sqrt{\frac{\sum(X_{23}-X_{23\text{cp}})^2}{n}} = \sqrt{\frac{\sum(5,32-5,33)^2+(5,32-5,33)^2+(5,36-5,33)^2}{3}} = \sqrt{0,0004} = 0,02$$

$$24) \quad \sigma_{\text{TK(треонин)}} = \sqrt{\frac{\sum(X_{24}-X_{24\text{cp}})^2}{n}} = \sqrt{\frac{\sum(1,86-1,86)^2+(1,92-1,86)^2+(1,80-1,86)^2}{3}} = \sqrt{0,0024} = 0,0490 \approx 0,05$$

$$25) \quad \sigma_{\text{КЭ(ОП)}} = \sqrt{\frac{\sum(X_{25}-X_{25\text{cp}})^2}{n}} = \sqrt{\frac{\sum(20,68-22,39)^2+(22,30-22,39)^2+(24,20-22,39)^2}{3}} = \sqrt{2,0694} = 1,4385 \approx 1,44$$

$$26) \quad \sigma_{\text{КЭ(pH)}} = \sqrt{\frac{\sum(X_{26}-X_{26\text{cp}})^2}{n}} = \sqrt{\frac{\sum(6,35-6,33)^2+(6,28-6,33)^2+(6,37-6,33)^2}{3}} = \sqrt{0,0015} = 0,0387 \approx 0,04$$

$$27) \quad \sigma_{\text{КЭ(треон.)}} = \sqrt{\frac{\sum(X_{27}-X_{27\text{cp}})^2}{n}} = \sqrt{\frac{\sum(11,25-11,44)^2+(11,67-11,44)^2+(11,40-11,44)^2}{3}} = \sqrt{0,0302} = 0,1738 \approx 0,17$$

При обработке результатов данные ферментационной среды с дрожжевым автолизатом использовали как контроль, сопоставляя их с данными полученными на ферментационных средах с дрожжевым экстрактом, дрожжевым экстрактом ультрафильтрованным, пептоном дрожжевым, пептоном мясным, триптоном казеиновым и кукурузным экстрактом (табл. 8 – 13).

Таблица 8

Обработка разностным методом данных опыта с изучением ферментационных сред с дрожжевым автолизатом и дрожжевым экстрактом

Повто- рность	Ферментационная среда		d	d - d _{cp}	(d - d _{cp}) ²
	ФС с ДЭ	ФС с ДА			
1	2	3	4	5	6
1	4,08	5,31	-1,23	0,09	0,0081

1	2	3	4	5	6
2	4,30	5,35	-1,05	0,27	0,0729
3	3,97	5,64	-1,67	-0,35	0,1225
	$x_{cp2}=4,12$	$x_{cp1}=5,43$	$d_{cp}=-1,32$	$\sum = 0,01$	$\sum (d - d_{cp})^2 = 0,2035$

Среднее арифметическое вычисляем по формуле (3.2):

$$X_{cp1} = \frac{\sum X_{дА}}{n} = \frac{5,31+5,35+5,64}{3} = 5,43 \text{ мг}$$

$$X_{cp2} = \frac{\sum X_{дЭ}}{n} = \frac{4,08+4,30+3,97}{3} = 4,12 \text{ мг}$$

Разность d_{2-1} между полученными значениями треоина вычисляем по повторениям: $4,08-5,31=-1,23$; $4,30-5,35=-1,05$; $3,97-5,64=-1,67$.

Отклонения $d - d_{cp}$ рассчитываем между каждой разностью и средним значением: $-1,23-(-1,32)=0,09$; $-1,05-(-1,32)=0,27$; $-1,64-(-1,32)=-0,35$.

Эти отклонения возводим в квадрат и суммируем, а их сумму $\sum(d - d_{cp})^2$ используем для вычисления ошибки разностей (S_{d1-2}) по формуле (3.3):

$$S_d = \sqrt{\frac{\sum(d-d_{cp})^2}{n*(n-1)}} \quad (3.3)$$

где S_d – ошибка разностей;

$\sum(d - d_{cp})^2$ – сумма отклонений между разностью и средним значением разностей;

n – число повторности в выборке.

$$S_{d1-2} = \sqrt{\frac{0,2035}{3*(3-1)}} = \sqrt{0,0339} = 0,1841 \approx 0,18$$

Обработка разностным методом данных опыта с изучением
ферментационных сред с дрожжевым автолизатом и дрожжевым экстрактом
ультрафильтрованным

Повто- рность	Ферментационная среда		d	d – d _{cp}	(d – d _{cp}) ²
	ФС с ДЭУ	ФС с ДА			
1	8,33	5,31	3,02	0,1	0,01
2	8,61	5,35	3,26	0,34	0,1156
3	8,11	5,64	2,47	-0,45	0,2025
	x _{cp3} =8,35	x _{cp1} =5,43	d _{cp} =2,92	$\sum = -0,01$	$\sum (d - d_{cp})^2 = 0,3281$

Среднее арифметическое вычисляем по формуле (3.2):

$$X_{cp3} = \frac{\sum X_{дэу}}{n} = \frac{8,33+8,61+8,11}{3} = 8,35 \text{ мг}$$

Разность d_{3-1} между полученными значениями треонина вычисляем по повторениям: $8,33-5,31=3,02$; $8,61-5,35=3,26$; $8,11-5,64=2,47$.

Отклонения $d - d_{cp}$ рассчитываем между каждой разностью и средним значением: $3,02-2,92=0,1$; $3,26-2,92=0,34$; $2,47-2,92=-0,45$.

Эти отклонения возводим в квадрат и суммируем, а их сумму $\sum (d - d_{cp})^2$ используем для вычисления ошибки разностей (S_{d1-3}) по формуле (3.3):

$$S_{d1-3} = \sqrt{\frac{0,3281}{3*(3-1)}} = \sqrt{0,0547} = 0,2339 \approx 0,23$$

Обработка разностным методом данных опыта с изучением ферментационных сред с дрожжевым автолизатом и пептоном дрожжевым

Повто- рность	Ферментационная среда		d	d – d _{ср}	(d – d _{ср}) ²
	ФС с ПД	ФС с ДА			
1	3,35	5,31	-1,96	0,18	0,0324
2	3,17	5,35	-2,18	-0,04	0,0016
3	3,26	5,64	-2,38	-0,24	0,0576
	x _{ср4} =3,26	x _{ср1} =5,43	d _{ср} =-2,14	$\sum = -0,1$	$\sum (d - d_{ср})^2 = 0,0916$

Среднее арифметическое вычисляем по формуле (3.2):

$$X_{ср4} = \frac{\sum X_{ПМ}}{n} = \frac{3,35+3,17+3,26}{3} = 3,26 \text{ мг}$$

Разность d_{4-1} между полученными значениями треонина вычисляем по повторениям: $3,35-5,31=-1,96$; $3,17-5,35=-2,18$; $3,26-5,64=-2,38$.

Отклонения $d - d_{ср}$ рассчитываем между каждой разностью и средним значением: $-1,96 - (-2,14)=0,18$; $-2,18 - (-2,14)=-0,04$; $-2,38 - (-2,14)=-0,24$.

Эти отклонения возводим в квадрат и суммируем, а их сумму $\sum (d - d_{ср})^2$ используем для вычисления ошибки разностей (S_{d1-4}) по формуле (3.3):

$$S_{d1-4} = \sqrt{\frac{0,0916}{3*(3-1)}} = \sqrt{0,0153} = 0,1237 \approx 0,12$$

Обработка разностным методом данных опыта с изучением ферментационных сред с дрожжевым автолизатом и пептоном мясным

Повто- рность	Ферментационная среда		d	d – d _{cp}	(d – d _{cp}) ²
	ФС с ПМ	ФС с ДА			
1	1,65	5,31	-3,66	0,08	0,0064
2	1,73	5,35	-3,62	0,12	0,0144
3	1,70	5,64	-3,94	-0,2	0,04
	x _{cp2} =1,69	x _{cp1} =5,43	d _{cp} =-3,74	∑ = 0	∑ (d – d _{cp}) ² = 0,0608

Среднее арифметическое вычисляем по формуле (3.2):

$$X_{cp5} = \frac{\sum X_{ПМ}}{n} = \frac{1,65+1,73+1,70}{3} = 1,69 \text{ мг}$$

Разность d_{5-1} между полученными значениями треонина вычисляем по повторениям: $1,65-5,31=-3,66$; $1,73-5,35=-3,62$; $1,70-5,64=-3,74$.

Отклонения $d - d_{cp}$ рассчитываем между каждой разностью и средним значением: $-3,66 - (-3,74)=0,08$; $-3,62 - (-3,74)=0,12$; $-3,94 - (-3,74)=-0,20$.

Эти отклонения возводим в квадрат и суммируем, а их сумму $\sum (d - d_{cp})^2$ используем для вычисления ошибки разностей (S_{d1-5}) по формуле (3.3):

$$S_{d1-5} = \sqrt{\frac{0,0608}{3*(3-1)}} = \sqrt{0,0101} = 0,1004 \approx 0,10$$

Обработка разностным методом данных опыта с изучением ферментационных сред с дрожжевым автолизатом и триптоном казеиновым

Повто- рность	Ферментационная среда		d	d – d _{cp}	(d – d _{cp}) ²
	ФС с ТК	ФС с ДА			
1	1,86	5,31	-3,45	0,12	0,0144
2	1,92	5,35	-3,43	0,14	0,0196
3	1,80	5,64	-3,84	-0,27	0,0729
	x _{cp2} =1,86	x _{cp1} =5,43	d _{cp} =-3,57	$\sum = -0,01$	$\sum (d - d_{cp})^2 = 0,1069$

Среднее арифметическое вычисляем по формуле (3.2):

$$X_{cp6} = \frac{\sum X_{TK}}{n} = \frac{1,86+1,92+1,80}{3} = 1,86 \text{ мг}$$

Разность d_{6-1} между полученными значениями треонина вычисляем по повторениям: $1,86-5,31=-3,45$; $1,92-5,35=-3,43$; $1,80-5,64=-3,84$.

Отклонения $d - d_{cp}$ рассчитываем между каждой разностью и средним значением: $-3,45 - (-3,57)=0,12$; $-3,43 - (-3,57)=0,14$; $-3,84 - (-3,57)=-0,27$.

Эти отклонения возводим в квадрат и суммируем, а их сумму $\sum (d - d_{cp})^2$ используем для вычисления ошибки разностей (S_{d1-6}) по формуле (3.3):

$$S_{d1-6} = \sqrt{\frac{0,1069}{3*(3-1)}} = \sqrt{0,0178} = 0,1334 \approx 0,13$$

Обработка разностным методом данных опыта с изучением
ферментационных сред с дрожжевым автолизатом и кукурузным экстрактом
с буфером Bis TRIS

Повто- рность	Ферментационная среда		d	d - d _{cp}	(d - d _{cp}) ²
	ФС с КЭ + Bis TRIS	ФС с ДА			
1	11,25	5,31	5,94	-0,06	0,0036
2	11,67	5,35	6,32	0,32	0,1024
3	11,40	5,64	5,76	-0,24	0,0576
	x _{cp2} =11,44	x _{cp1} =5,43	d _{cp} =6,00	∑ = 0,02	∑ (d - d _{cp}) ² = 0,1636

Среднее арифметическое вычисляем по формуле (3.2):

$$X_{cp7} = \frac{\sum X_{КЭ}}{n} = \frac{11,25 + 11,67 + 11,40}{3} = 11,44 \text{ мг}$$

Разность d₇₋₁ между полученными значениями треонина вычисляем по повторениям: 11,25-5,31=5,94; 11,67-5,35=6,32; 11,40-5,64=5,76.

Отклонения d-d_{cp} рассчитываем между каждой разностью и средним значением: 5,94- 6,00=-0,06; 6,32-6,00=0,32; 5,76-6,00=-0,24.

Эти отклонения возводим в квадрат и суммируем, а их сумму ∑(d - d_{cp})² используем для вычисления ошибки разностей (S_{d1-6}) по формуле (3.3):

$$S_{d1-7} = \sqrt{\frac{0,1636}{3*(3-1)}} = \sqrt{0,0273} = 0,1652 \approx 0,17$$

Вычисляем критерий существенности Стьюдента фактический:

$$t_{1-2} = \frac{X_{cp2} - X_{cp1}}{Sd_{(1-2)}} = \frac{11,44 - 5,43}{0,17} = 35,35$$

$$t_{1-3} = \frac{X_{cp3} - X_{cp1}}{Sd_{(1-3)}} = \frac{8,35 - 5,43}{0,23} = 12,70$$

$$t_{1-4} = \frac{X_{cp4} - X_{cp1}}{Sd_{(1-4)}} = \frac{3,26 - 5,43}{0,12} = -18,08$$

$$t_{1-5} = \frac{X_{cp5} - X_{cp1}}{Sd_{(1-5)}} = \frac{1,69 - 5,43}{0,10} = -37,40$$

$$t_{1-6} = \frac{X_{cp6} - X_{cp1}}{Sd_{(1-6)}} = \frac{1,86 - 5,43}{0,13} = -27,46$$

$$t_{1-7} = \frac{X_{cp7} - X_{cp1}}{Sd_{(1-7)}} = \frac{11,44 - 5,43}{0,17} = 35,35$$

Фактические критерии сравниваем с теоретическими и делаем выводы, пользуясь таким правилом: если фактический критерий Стьюдента равен или больше теоретического значения, то разница между вариантами существенна.

Теоретические значения критериев t берем из приложения 2 в приложениях для различных уровней вероятности, которые вычисляем по формуле:

$$v = (n_1 - 1) + (n_2 - 1) = (3 - 1) + (3 - 1) = 4$$

На уровне $P_{0,95}$ $t_{0,95} = 2,78$, а на уровне $P_{0,99}$ $t_{0,99} = 4,60$.

Поскольку критерий Стьюдента фактический в опытах с ферментационной средой с дрожжевым экстрактом ультрафильтрованным равен 12,70 и с ферментационной средой с кукурузным экстрактом равен 35,35, что больше $t_{0,95}$ и $t_{0,99}$, то можно делать вывод, что разность существенна. Критерий Стьюдента фактический в опытах с ферментационной средой с дрожжевым экстрактом равен $-7,28$, с ферментационной средой с пептоном дрожжевым равен $-18,08$, с ферментационной средой с пептоном мясным равен $-37,40$, с ферментационной средой с триптоном казеиновым равен $-27,46$, что меньше $t_{0,95}$ и $t_{0,99}$, то можно делать вывод, что разность несущественна.

Относительную ошибку опыта вычисляем по формуле (3.4):

$$S_{X_{cp}} \% = \frac{100 * l * \sum S_d}{1,41 * (l-1) * \sum X_{cp}} \quad (3.4)$$

где $S_{X_{cp}}$ – относительная ошибка опыта;

l – количество исследуемых сред;

$\sum S_d$ – сумма ошибок разностей;

$\sum X_{cp}$ – сумма средних значений треонина.

$$S_{X_{cp}} \% = \frac{100 * 7 * 0,93}{1,41 * 6 * 36,15} = \frac{651}{305,829} = 2,13\%$$

Поскольку значение относительной ошибки опыта составляет 2,13%, то точность опыта достаточно высока.

Анализируя данные таблицы 7, можно наблюдать зависимость продуктивности штамма от оптической плотности, остаточной глюкозы и pH среды. Высокая оптическая плотность свидетельствует о более активном размножении клеток и соответственно увеличении количества продуцируемого треонина. Кроме того продуктивность штамма *Escherihia coli* ВКПМ В-12204 зависит от значения pH среды. Чем ближе оно к нейтральному (pH = 7,0) значению, тем активнее происходит усвоение глюкозы микроорганизмами и соответственно выше показания биосинтеза треонина. Так же о продуктивности штамма можно судить по значению остаточной глюкозы, чем ближе данный показатель к нулю, в конце культивирования, тем выше продуктивность микроорганизма.

Самый наибольший выход количества треонина наблюдали при культивировании штамма в ферментационной среде с кукурузным экстрактом с добавлением буфера Bis-TRIS. Выход треонина составил 11,44 мг, что на порядок выше показаний в других ферментационных средах.

Аналогом среды с кукурузным экстрактом может служить среда с дрожжевым экстрактом ультрафильтрованным, продуктивность в ней составила 8,35 мг.

Самая низкая продуктивность штамма *Escherihia coli* ВКПМ В-12204 наблюдалась на ферментационных средах с пептоном мясным (1,69 мг) и триптоном казеиновым (1,86 мг).

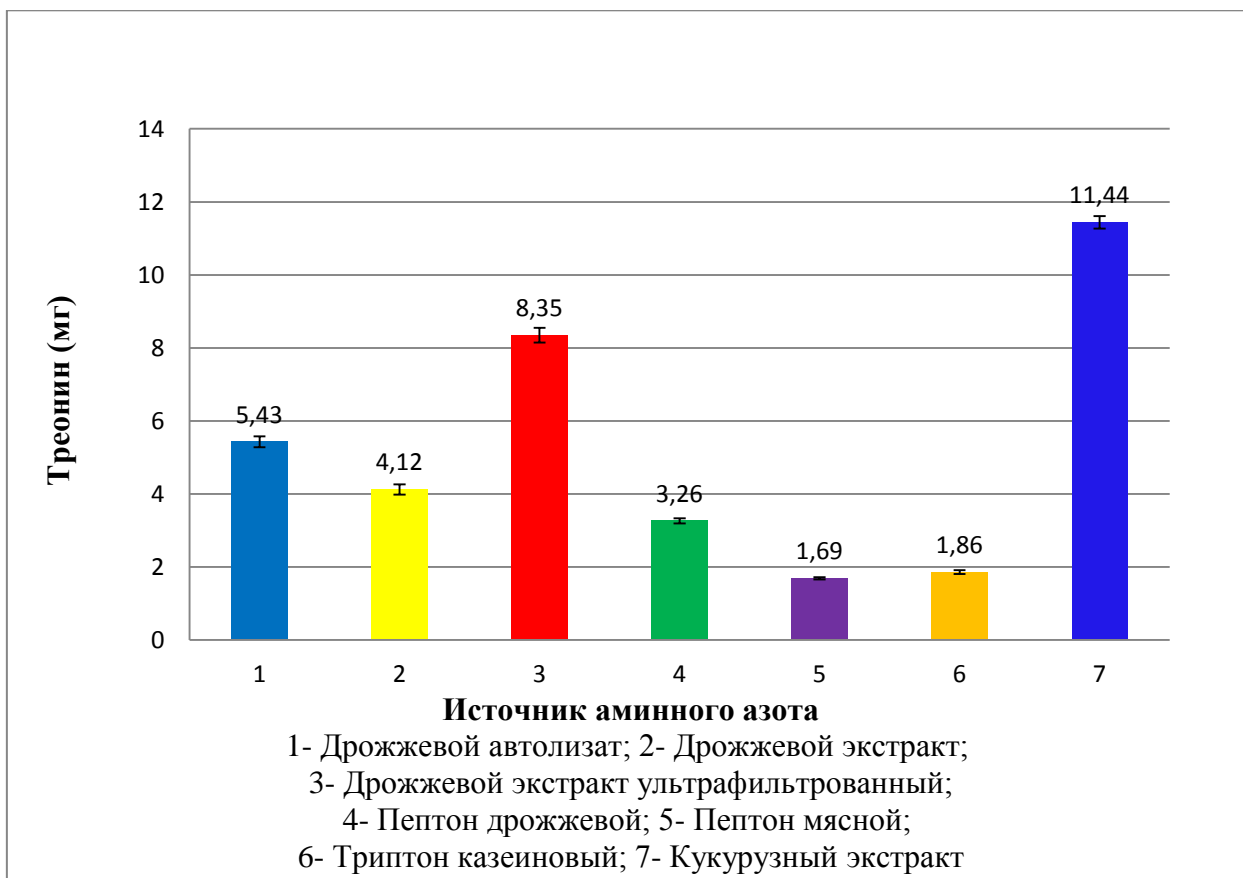


Рис.9 . Продуктивность *Escherihii coli* ВКПМ В-12204 на ферментационных средах с различными источниками аминокислотного азота

По результатам опытов была построена гистограмма (рис. 9), которая наглядно демонстрирует расхождения в показателях продуктивности штамма *Escherihia coli* ВКПМ В-12204, при культивировании на ферментационных средах с различными источниками аминокислотного азота.

Выводы

1. В ходе опытов были изучены морфобиологические особенности штамма *Escherihii coli* ВКПМ В-12204 и определено, что штамм полностью соответствует паспортным характеристикам, а именно по форме клеток – короткие толстые палочки (длина ~ 2 мкм, диаметр ~ 1 мкм), возможен полиморфизм, в препарате располагаются беспорядочно, не спорообразующие, не подвижные.

2. В ходе опытов изучена продуктивность штамма *Escherihii coli* ВКПМ В-12204 при содержании в среде следующих источников аминного азота: а) дрожжевой автолизат – 5,43 мг; б) дрожжевой экстракт – 4,12 мг; в) дрожжевой экстракт ультрафильтрованный – 8,35 мг; г) пептон дрожжевой – 3,26 мг; д) пептон мясной – 1,69; е) триптон казеиновый – 1,86; ж) кукурузный экстракт – 11,44 мг. Наиболее подходящей средой для культивирования штамма *Escherihia coli* ВКПМ В-12204 является ферментационная среда с кукурузным экстрактом с добавлением буфера Bis TRIS.

3. Наибольшая продуктивность зафиксирована при культивировании на ферментационной среде с кукурузным экстрактом и буфером Bis TRIS, наименьшая – при культивировании на ферментационных средах с пептоном мясным и триптоном казеиновым. Продуктивность культуры *Escherihia coli* ВКПМ В-12204 напрямую связана с содержанием аминного азота и другими химическими показателями ферментационной среды.

4. Морфология клеток штамма *Escherihia coli* ВКПМ В-12204 в различных ферментационных средах не изменена. Для бактериальных клеток характерен полиморфизм.

Список использованных источников

1. Айала Ф., Кайгер Дж. Современная генетика. В 3-х т. Т. 1. М.: Мир. 1987. 229 с.
2. Безбородов А. М. Биохимические основы микробиологического синтеза. М.: Легкая и пищевая промышленность. 1984. 304 с.
3. Безбородов А. М. Ферменты микроорганизмов и их применение // Биотехнология. М.: Наука. 1984. С. 45
4. Бекер М. Е. Введение в биотехнологию. М.: Пищевая промышленность. 1978. 232 с.
5. Бекер М. Е., Лиепинен Г. К., Райпулис Е. П. Биотехнология. М.: Агропромиздат. 1990. 203 с.
6. Березов Т. Т., Коровкин Б. Ф. Биологическая химия / под ред. С. С. Дейве. М.: Медицина. 1983. 704 с.
7. Божков А. И. Биотехнология. Фундаментальные и промышленные аспекты. Харьков: НТУ «ХПИ». 2005. 364 с.
8. Боярский Л. Г., Коршун В. П., Бикташев Р. У. и др. Ферментные препараты в кормлении животных. М.: Россельхозиздат. 1985. 109 с.
9. Бурдаева К. Рынок аминокислот в РФ: новости и тенденции // Сельскохозяйственное обозрение Ценовик. 2015. № 12. С. 16–25.
10. Быков В. А., Крылов И. А., Манаков М. Н. и др. Микробиологическое производство биологически активных веществ и препаратов. М.: Высшая школа. 1987. 143 с.
11. Варфоломеев С. Д., Калюжный С. В. Биотехнология. М.: Высшая школа. 1990. 296 с.
12. Вейлас С. Химическая кинетика и расчеты промышленных реакторов. М.: Химия. 1964. 176 с.
13. Виестур У. Э., Шмите И. А., Жилевич А. В. Биотехнология: Биологические агенты, технология, аппаратура. Рига: Занатне. 1987. 56, 263 с.
14. Воловая Т. Г. Биотехнология. Новосибирск: СО РАН. 1999. 252 с.

15. Волова Т. Г. Введение в биотехнологию. Красноярск: ИПК СФУ. 2008. 30, 183 с.
16. Вудворт Дж. Имобилизованные клетки и ферменты. Методы. М.: Мир. 1988. 215 с.
17. Гранберг И. И. Органическая химия. М.: Высшая школа. 1987. 396 с.
18. Грачева И. М. Технология микробного синтеза белков, аминокислот. М.: Пищевая промышленность. 1980. 400 с.
19. Грачева И. М. Технология микробных белковых препаратов, аминокислот и биоэнергия. М.: Пищевая промышленность. 1992. 383 с.
20. Грачева И. М., Кривова А. Ю. Технология ферментных препаратов. М.: Элевар. 2000. 512 с.
21. Грачева И. М., Гаврилова Н. М., Иванова Л. А. Технология микробных белковых препаратов, аминокислот и жиров. М.: Пищевая промышленность. 1980. 448 с.
22. Гринштейн Дж., Виниц М. Химия аминокислот и пептидов. М.: Мир. 1965. 824 с.
23. Гурская Г. В. Структуры аминокислот. М.: Наука. 1966. 160 с.
24. Гореликова Г. А. Основы современной пищевой биотехнологии. Кемерово: Кем ТИПП промышленности. 2004. 100 с.
25. Даниляк И. Г., Коган А. Х., Болевич С. В. Аевит и глутаминовая кислота в лечении больных бронхиальной астмой // Клиническая медицина. 1995. № 5. С. 50–53.
26. Евстигнеева Р. П. Тонкий органический синтез. М.: Химия. 1991. 184 с.
27. Егоров Н. С. Промышленная микробиология. М.: Высшая школа. 1989. 688с.
28. Егорова Т. А., Клунова С. М., Живухина Е. А. Основы биотехнологий. М.: Академия. 2008. 208 с.
29. Елинов Н. П. Основы биотехнологии. СПб.: Наука. 1995. 600 с.

30. Елинов Н. П. Химическая микробиология. М.: Высшая школа. 1989. 448 с.
31. Жарикова Г. Г. Микробиология продовольственных товаров. Санитария и гигиена. М. : Академия. 2005. 297 с.
32. Жарипов А. И., Горлов И. Ф. и др. Пищевая биотехнология: научно–практические решения в АПК. М.: Вестник РАСХН. 2003. 384 с.
33. Имашев У. Б. Основы органической химии. Уфа: УГНТУ. 2000. 272 с.
34. Катлинский А. В., Сазыкин Ю. О., Орехов С. Н., Чакалева И. И. Курс лекций по биотехнологии. М.: Академия. 2005. 152 с.
35. Кафаров В. В., Винаров А. Ю., Гордеев Л. С. Моделирование и системный анализ биохимических производств. М.: Лесная промышленность. 1985. 280 с.
36. Квеситадзе Г. И., Безбородов А. М. Введение в биотехнологию. М.: Наука. 2002. 283 с.
37. Китайгородский А. И. Органическая кристаллохимия. М.: Изд-во АН СССР. 1955. 559 с.
38. Ковалева Т. А., Сливкин А. И., Беленова А. С. Суслина С. Н. Биотехнология. Воронеж: Изд-во Воронежского государственного университета. 2011. 89 с.
39. Кошелев, Ю. А., Скиба Е. А., Аверьянова Е. В. Краткий курс биотехнологии. Бийск: Изд-во Алт. гос. техн. ун-та. 2009. 77 с.
40. Красноштанова А. А., Крылова И. А., Бабусенко Е. С. Основы биотехнологии. М.: РХТУ им. Менделеева Д. И.. 2001. 84 с.
41. Крылов И. А. Комплексная переработка биомассы промышленных микроорганизмов. М.: Наука. 2001. 393 с.
42. Леннинджер А. Основы биохимии. В 3-х т. Т. 1. М.: Мир. 1985. 661 с.

43. Манаков М. Н., Победимский Д. Г. Теоретические основы технологии микробиологических производств. М.: Агропромиздат. 1990. 272 с.
44. Мосичев М. С., Складнев А. А., Котов В. Б. Общая технология микробиологических производств. М.: Легкая и пищевая промышленность. 1982. 264 с.
45. Моисейченко В. Ф., Трифонова М. Ф., Заверюха А. Х., Ещенко В. Е. Основы научных исследований в агрономии. М.: Колос 1996. 297 с.
46. Орлов В. И. Основы микробиологии. М.: Экономика. 1965. 259 с.
47. Османов В. К., Бирюкова О. В., Борисова А. В. Методы выделения и очистки продуктов биотехнологических производств. Нижний Новгород: Изд-во НГМА. 2005. 104 с.
48. Патов В. К., Любина А. Ю. Получение аминокислот и их роль в проблеме питания. М.: Наука. 1979. 217 с.
49. Печуркин Н. С., Брильков А. В., Марченкова Т. В. Популяционные аспекты биотехнологии. Новосибирск: Наука. 1990. 250 с.
50. Сассон А. Биотехнология: свершения и надежды. М.: Мир. 1987. 411 с.
51. Скоупс Р. Методы очистки белков. М.: Мир. 1985. 358 с.
52. Стеценко О. В., Виноградова Р. П. Биоорганическая химия. Киев: Вища школа. 1992. 327 с.
53. Судачкова Н. Е., Милютин И. Л., Семенова Г. П. Белки и свободные аминокислоты в древесине сосны обыкновенной, лиственницы сибирской и лиственницы Гмелина в центральной Сибири // Химия растительного сырья. 2000. № 1. С. 69–76.
54. Тюкавкина Н. А., Бауков Ю. И. Биоорганическая химия. М.: Дрофа. 2005. 544 с.
55. Федорова Э. И. Биотехнология. Сыктывкар: СЛИ. 2000. 156 с.
56. Физер Л., Физер М. Органическая химия. М.: Химия. 1970. 638 с.

57. Форстера К. Ф., Вейза Д. А. Экологическая биотехнология. Л.: Химия. 1990. 384 с.
58. Шилова С. В., Пузакова С. М. и др. Организация производства лекарственных средств с учетом правил GMP. Химико-фармацевтическое производство, обзорная информация. М.: ВНИИСЭ1ГГИ. 1990. 36 с.
59. Шлегель Г. Общая микробиология. М.: Мир. 1987. 566 с.
60. Шпак В. С. Пути получения и использования синтетических аминокислот // Вестник АН СССР. 1983. № 2. С. 107.
61. Эппликовист Д., Де Пюи Ч., Райнхарт К. Введение в органическую химию. М.: Мир. 1985. 384 с.
62. Юкельсон И. И. Технология основного органического синтеза. М.: Химия. 1968. 848 с.
63. Якубе Х. Д., Ешкайт Х. Аминокислоты, пептиды, белки. М.: Мир. 1985. 39–40 с.
64. Beers R. F., Sizer I. W. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase // Biol. Chem. 1952. Vol. 195. P. 133–140.
65. Bentley R, Meganathan R. Biosynthesis of vitamin K (menaquinone) in bacteria. Rev.: Microbiol. 1982. 280 p.
66. Block R. J., Bolling D. The amino acid composition of proteins and foods. Springfield: Charles C. Thomas. 1947. 308 p.
67. Bumstein P. The biosynthesis of collagen // Annu. Rev. Biochem. 1974. Vol. 29. P. 43.
68. Burkovski A., Krämer R. Bacterial amino acid transport proteins: Occurrence, functions, and significance for biotechnological applications // Appl Microbiol Biotechnol. 2002. Vol. 104. P. 265–274.
69. Calvo J. M., Fink G. R. Regulation of biosynthetic pathways in bacteria // Annu. Rev. Biochem. 1971. Vol. 42. P. 40–43.
70. Cardinale G. J., Udenfriend S. Prolyl hydroxylase // Adv. Ensimol. 1974. Vol. 59. P. 245.

71. Debabov V. G. Overproduction of microbial products. London. Biotechnol. 1982. 26 p.
72. Eggeling I., Prefferle W., Sahm A. Basic biotechnology. Cambridge: Biochem. 2002. 294 p.
73. Hudault S, Guignot J, Servin AL. Escherichia coli strains colonising the gastrointestinal tract protect germfree mice against Salmonella typhimuriuminfection // Microbiol. 2001. Vol. 76. P. 47–55.
74. Krämer R. Production of amino acids: Physiological and genetic approaches // Food Biotechnol. 2004. Vol. 89. P. 7–46.
75. Leuchtenberger W., Huthmacher K., Drauz K. Biotechnological production of amino acids and derivatives: Current status and prospects // Appl Microbiol Biotechnol. 2005. Vol. 103. P. 1–8.
76. Rosenberg L. E., Sriver C. R. Disorders of amino acid metabolism, Chap. ter 11. In: Metabolic Control and Disease. Montreal: Department of Biology. 1980. 82 p.
77. Tyler B. Regulation of the assimilation of nitrogen compounds // Annu. Rev. Biochem. 1978. Vol. 126. P. 47.
78. Shoemaker D. P., Donohue J., Schomaker V., Corey R. B. The crystal structure of LS-threonine // Annu. Rev. Biochem. 1950. Vol. 72. P. 2328–2349.
79. Umbarger H. E. Amino acid biosynthesis and its regulation // Annu. Rev. Biochem. 1978. Vol. 60. P. 47–60.
80. Vogt R. L, Dippold L. Escherichia coli O157:H7 outbreak associated with consumption of ground beef // Public Health Rep. 2005. Vol. 114. P. 174–182.
81. West H. D., Garter H. E. Enzyme and Metabolic Inhibitors // Biol. Chem. 1938. Vol. 31. P.122–134.
82. Yukawa H., Terasawa M. Industrion production of biochemical by native immobilization// Chem. Econ. Review. 1981. Vol. 13. P. 16–25.

Приложения

Значения продуктивности *Escherihia coli* ВКПМ В-12204 при культивировании штамма в средах с различными источниками аминного азота.

Источник аминного азота	№ колбы п.п.	Повторность	Часы роста	Сухие вещ-ва	Глюкоза (остат.)	ОП	pH	Треонин (мг)	Высев на стерильность
Дрож. автолизат	1	1	24	2,80	17,32	9,92	5,24	5,31	стерильно
	2	2	24	2,24	15,62	10,88	5,22	5,35	стерильно
	3	3	24	2,00	17,06	9,23	5,29	5,64	стерильно
Дрож. экстракт	4	1	24	2,28	17,21	7,65	5,34	4,08	стерильно
	5	2	24	3,02	18,50	9,37	5,27	4,30	стерильно
	6	3	24	2,76	18,32	8,90	5,25	3,97	стерильно
Дрож. экстракт ультраф.	7	1	24	3,77	0,08	16,64	7,31	8,33	стерильно
	8	2	24	3,91	0,75	16,60	7,04	8,61	стерильно
	9	3	24	3,32	0,17	19,44	7,33	8,11	стерильно
Пептон дрожжевой	10	1	24	3,07	17,60	10,12	5,33	3,35	стерильно
	11	2	24	2,43	18,79	10,16	5,34	3,17	стерильно
	12	3	24	2,89	18,22	9,88	5,29	3,26	стерильно
Пептон мясной	13	1	24	3,20	15,16	8,76	5,32	1,65	стерильно
	14	2	24	3,01	15,34	8,88	5,34	1,73	стерильно
	15	3	24	3,12	14,96	8,80	5,30	1,70	стерильно
Триптон казеиновый	16	1	24	3,24	14,48	9,68	5,32	1,86	стерильно
	17	2	24	3,22	14,69	10,20	5,32	1,92	стерильно
	18	3	24	3,24	15,02	9,83	5,36	1,80	стерильно
КЭ + буфер Bis-TRIS	19	1	24	9,13	0	20,68	6,35	11,25	стерильно
	20	2	24	8,52	0	22,30	6,28	11,67	стерильно
	21	3	24	8,27	0	24,20	6,37	11,40	стерильно

1. ЗНАЧЕНИЯ КРИТЕРИЯ t НА 5, 1 И 0,1%-НОМ УРОВНЯХ ЗНАЧИМОСТИ

Число степеней свободы	Уровень значимости			Число степеней свободы	Уровень значимости		
	0,05	0,01	0,001		0,05	0,01	0,001
1	12,71	63,66	—	18	2,10	2,88	3,92
2	4,30	9,93	31,60	19	2,09	2,86	3,88
3	3,18	5,84	12,94	20	2,09	2,85	3,85
4	2,78	4,60	8,61	21	2,08	2,83	3,82
5	2,57	4,03	6,86	22	2,07	2,82	3,79
6	2,45	3,71	5,96	23	2,07	2,81	3,77
7	2,37	3,50	5,41	24	2,06	2,80	3,75
8	2,31	3,36	5,04	25	2,06	2,79	3,73
9	2,26	3,25	4,78	26	2,06	2,78	3,71
10	2,23	3,17	4,59	27	2,05	2,77	3,69
11	2,20	3,11	4,44	28	2,05	2,76	3,67
12	2,18	3,06	4,32	29	2,05	2,76	3,66
13	2,16	3,01	4,22	30	2,04	2,75	3,65
14	2,15	2,98	4,14	50	2,01	2,68	3,50
15	2,13	2,95	4,07	100	1,98	2,63	3,39
16	2,12	2,92	4,02				
17	2,11	2,90	3,97				

Магистерская диссертация выполнена мной самостоятельно. Все использованные материалы из опубликованной научной литературы и других источников имеют ссылки на них.

« ____ » _____ г.