

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

ИНСТИТУТ ФАРМАЦИИ, ХИМИИ И БИОЛОГИИ

КАФЕДРА ОБЩЕЙ ХИМИИ

**АНАЛИТИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ В ТЕХНОЛОГИИ  
ПОЛУЧЕНИЯ ТРЕОНИНА**

Магистерская диссертация  
обучающегося по направлению подготовки 04.04.01 Аналитическая химия  
очной формы обучения, группы 11001740  
Картавых Арины Павловны

Научный руководитель  
к.х.н., доцент  
Глухарева Н.А.

Рецензент  
к.х.н. Дробницкая Н.В.

БЕЛГОРОД 2019

## СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	3
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	5
1.1 Треонин, общие сведения.....	5
1.2 Биосинтез треонина.....	7
1.3 Промышленный способ получения треонина.....	9
1.4 Обзор методов анализа.....	10
2 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	18
2.1 Получение треонина.....	18
2.2 Методы исследования.....	19
2.2.1 Определение содержания свободного аммиачного азота.....	19
2.2.2 Определение содержания глюкозы в культуральной жидкости.....	22
2.2.3 Определение содержания сухих веществ высушиванием до постоянной массы.....	23
2.2.4 Определение содержания сухих веществ рефрактометрическим методом.....	24
2.2.5 Определение оптической плотности.....	25
2.2.6 Определение физической плотности.....	26
2.2.7 Определение содержания свободных фосфатов.....	26
2.2.8 Определение содержания аминокислот с помощью ВЭЖХ.....	28
3 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	31
ВЫВОДЫ.....	47
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	48

## ВВЕДЕНИЕ

Аминокислоты являются неотъемлемым компонентом в питании человека и животных. Треонин не синтезируется в организме животного или птицы, его вводят в корма как добавку, способствующую росту скелетной мускулатуры, синтезу пищеварительных ферментов и иммунных белков, глицерина, а также через цикл трикарбоновых кислот получению энергии [1–3]. В настоящее время основной путь получения аминокислот в промышленном масштабе – биотехнологическое производство. В последние десятилетия объем производимых микробиологическим синтезом аминокислот составил более полутора миллионов тонн. Основные аминокислоты, получаемые с помощью процессов ферментации и используемые в качестве полезных добавок – L-лизин, L-глутаминовая кислота, L-треонин и L-триптофан. В производстве L-лизина и L-глутаминовой кислоты используются микроорганизмы *Corynebacterium glutamicum*, а при получении L-треонина – *Escherichiacoli* [3,4].

В ЗАО «Завод Премиксов № 1» (г. Шебекино, Белгородская обл.) в настоящее время осуществляется производство лизина в виде лизин-сульфата. В перспективе планируется производство треонина, в связи с чем проводится экспериментальная отработка технологии процесса. В этом плане следует рассматривать не только стадии биотехнологического производства указанных аминокислот, их сходство и различие в зависимости от конечной цели процесса, но и осуществление технологического и микробиологического контроля. Необходимо выбрать и отработать методики химического анализа применительно к процессу синтеза треонина, основываясь на известных методах контроля в производстве лизина.

Таким образом, актуальность работы обусловлена необходимостью применения методов химического анализа в микробиологическом синтезе треонина, что позволит контролировать этапы репликации при производстве в промышленном масштабе и своевременно корректировать технологический процесс.

Работа выполнялась в научно-исследовательской лаборатории (Аналитический отдел) ЗАО «Завод Премиксов № 1».

Целью работы являлось определение возможности использования аналитических методов для контроля на различных стадиях микробиологического синтеза треонина.

Были поставлены следующие задачи:

1. Выявить наиболее информативные химические анализы, сопровождающие технологию получения треонина.
2. Установить взаимосвязь химических анализов с результатами микробиологического синтеза треонина.

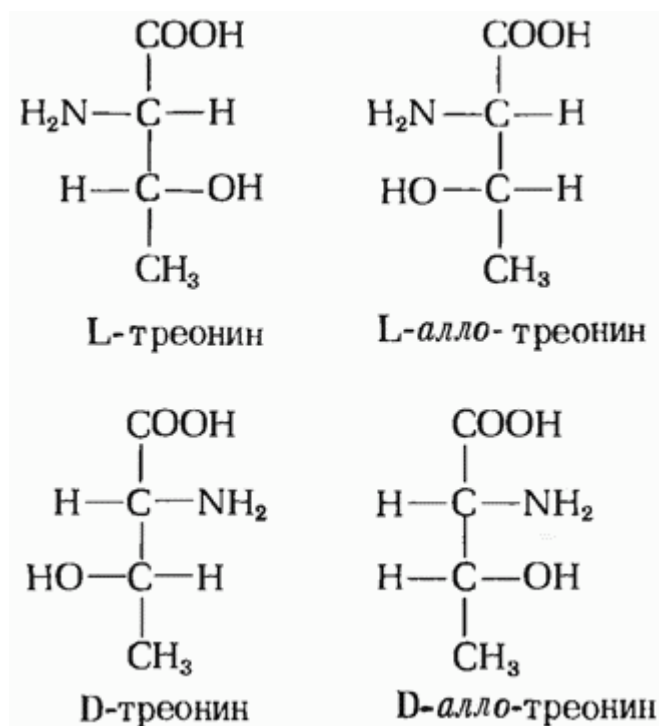
Объектом исследования являются методики аналитического контроля, сопровождающие технологию получения треонина.

## 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Треонин, общие сведения

Треонин (Thr) – алифатическая аминокислота (2-амино-3-гидроксибутановая кислота), в молекуле которой содержится гидроксильная группа [5]. Впервые была выделена в 1935 г. В.К. Роузом.

В молекуле треонина присутствуют два ассиметрических атома углерода, что обуславливает существование четырех оптических изомеров: L- и D треонина, а также L- и D аллотреонина [6].



Из представленных стереоизомеров в состав белков организма человека входит только один – L-треонин. D-треонин – его энантиомер. Два других изомера диастереоизомеры или аллоформы, которые соответственно могут существовать в L- и D-формах. Известно также, что D- и L аминокислоты отличаются по вкусу: первые – горькие, вторые – сладкие [7].

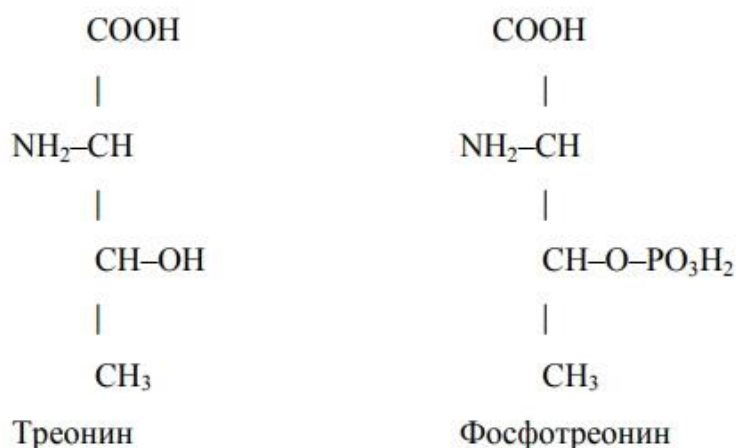
При химическом способе получения аминокислоты обычно образуется рацемическая смесь, т.е. оптически неактивная смесь L- и D-изомеров. D-

аминокислоты, очевидно, не играют важной физиологической роли в организме животных и человека, хотя в органах и тканях содержатся активные ферменты, катализирующие их распад.

Бактериями и растениями треонин синтезируется из аспарагиновой кислоты через стадию образования гомосерин-о-фосфата в соответствии с реакцией: о-фосфо-L-гомосерин + H<sub>2</sub>O ↔ L-треонин + ортофосфат [8].

Кислотно-основные свойства треонина обусловлены присутствием карбоксильной и аминогруппы, при этом для карбоксильной группы  $pK_a = 2,6$  и соответственно для  $-NH_3^+$   $pK_a = 10,4$ . Аминокислоты, в боковой цепи которых нет дополнительных функциональных групп, характеризуются  $pI$  (изоэлектрическая точка) в слабокислой области около 6. Присутствие слабокислотных функциональных групп ( $-OH$ ,  $-SH$ , амидная группа) приводит к сдвигу  $pI$  в более кислую область (5,0–5,7). Для треонина значение  $pI$  составляет 5,6 [5].

Необходимо отметить, что гидроксильная группа треонина может фосфорилироваться с образованием сложного эфира фосфорной кислоты – фосфотреонина:



Как и все остальные аминокислоты, треонин реагирует с солями двухвалентной меди с образованием координационных соединений, окрашенных в синий цвет, которые могут быть выделены в виде синих кристаллов.

Треонин относится к числу незаменимых аминокислот. Он участвует в построении мышечного белка и поддерживает нужный протеиновый баланс в организме; улучшает состояние сердечно-сосудистой системы, печени и иммунной системы, а также служит дополнительным источником энергии. При недостатке треонина отмечается потеря аппетита и повышенная возбудимость нервной системы с последующим ее истощением. Треонин повышает прочность костей и эмали зубов. Пищевые добавки, содержащие треонин, могут быть полезны вегетарианцам, употребляющим мало животных белков или не употребляющим вовсе. Треонин-содержащие препараты, призванные устранить возможный недостаток аминокислоты, выпускают обычно в форме микрогранулированного порошка. Каких-либо побочных действий или противопоказаний к применению не установлено. Количество дополнительно необходимого L-треонина зависит от возраста и особенностей основного рациона питания [9].

Треонин участвует в образовании коллагена и эластина, обладает гликогенными воздействием; активизирует иммунную систему, участвуя в образовании иммуноглобулинов и антител; стимулирует процессы роста тканей; способствует энергообмену в мышечных клетках [10].

## 1.2 Биосинтез треонина

Путь биосинтеза незаменимых аминокислот был установлен в основном в результате биохимических и генетических исследований в процессах с участием бактерий. Для большинства бактерий и высших растений биохимические пути образования аминокислот этой группы сходны. Продуцентом треонина являются микроорганизмы *Escherichia coli* (кишечная палочка). Схема биосинтеза приведена на рис.1.1 [12,13].

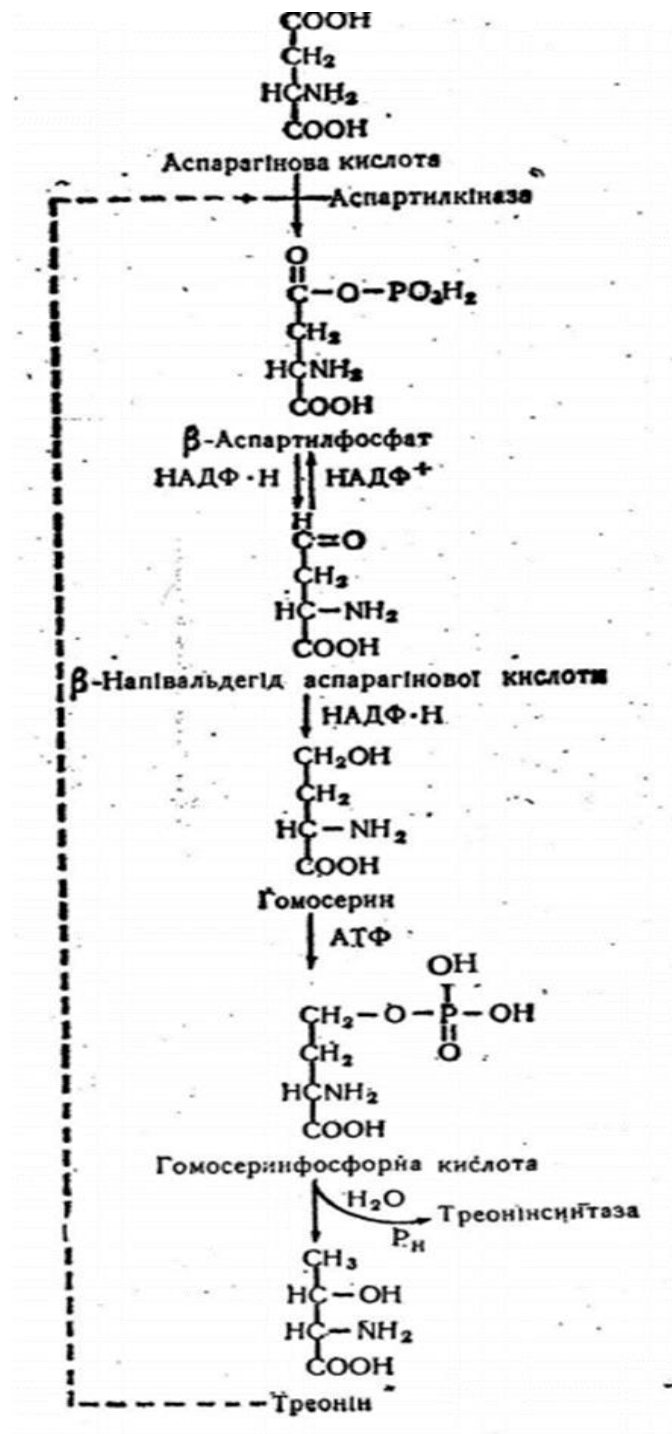


Рис.1.1. Биосинтез треонина

Процесс биосинтеза аминокислот (лизина, треонина, метионина, изолейцина) начинается фосфорилированием аспарагиновой кислоты с участием аллостерического фермента аспараткиназы, активность которого ингибируется совместным действием двух аминокислот – лизина и треонина, если они накапливаются в клетках бактерий в избыточной концентрации. Если



понизить концентрацию одной из этих аминокислот, то синтез другой будет осуществляться даже при условии, когда она накапливается в довольно высокой концентрации [13].

В ходе биосинтеза из аспаргиновой кислоты образуется гомосерин – аналог серина. Гомосерин образуется в результате ряда реакций, которые в организме млекопитающих не осуществляются. Далее гомосерин фосфорилируется за счет АТФ до гомосеринфосфата (гомосеринфосфорной кислоты), который потом превращается в треонин в результате реакции, которая катализируется пиридоксальфосфатозависимой треонинсинтетазой.

В работе [14], например, подробно обсуждается биосинтез треонина и роль *Escherichia coli*.

### 1.3 Промышленный способ получения треонина

В промышленности L-аминокислоты, такие как L-треонин, L-изолейцин получают путем ферментации с использованием бактерий, производящих аминокислоты. Производство треонина может базироваться в основном на ферментации штаммов и мутантов *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Brevibacterium flavum* и *Corynebacterium glutamicum* с использованием углеводов в качестве субстратов, обычно используются штаммы *Escherichia coli* благодаря их быстрому росту и физиологическим характеристикам [15].

Технология заключается в выращивании культуры микроорганизмов в ферментере, в котором содержатся питательные вещества. Используют природные бактериальные штаммы или их искусственные мутанты. Для получения треонина осуществляется культивирование микроорганизмов *Escherichia coli*. В ферментер в ходе процесса периодически или предпочтительно непрерывно подаются питательные компоненты. В качестве источника углерода в ферментер подаются сахара – глюкоза, фруктоза, сахароза. Возможно использование и других сахаров. В ходе процесса концентрацию сахаров регулируют, поддерживая ее на определенном уровне, обеспечивающем эффективный рост биомассы. Питательными компонентами

являются соединения, являющиеся источником фосфора, серы, азота. Источниками азота, являющимся фактором роста, могут быть аммиак, соли аммония (например, сульфат, карбонат, хлорид, фосфат, карбонат, ацетат), а также мочевины. Другой фактор роста – источник фосфора в виде фосфорной кислоты, гидрофосфата и дигидрофосфата калия. Сера как необходимый незаменимый компонент обычно вносится в виде сульфата аммония причем концентрация серы должна поддерживаться на определенном рекомендуемом уровне. В качестве пример способ получения треонина описан в патенте [16].

Обычно процесс включает следующие стадии:

1. Культивирование микроорганизмов и пре-ферментация.
2. Проведение основной ферментации с получением культуральной жидкости (бульона), содержащего целевой продукт аминокислоту и биомассу.
3. Концентрирование, высушивание ферментационного бульона, отделение целевого компонента.

На стадиях пре-ферментации и основной ферментации необходимо поддержание температуры на определенном уровне 33–35°C и  $pH \approx 7$ .

Для обеспечения эффективности процесса в ходе его необходимо поддерживать концентрации компонентов на определенном уровне, контролировать рост биомассы, контролировать содержание целевого продукта. Для этого используются химические и физико-химические методы анализа.

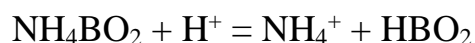
#### **1.4 Обзор методов анализа**

В биотехнологическом производстве аминокислот обычно контролируют содержание аммиачного азота, фосфатов, сахаров в ферментационной смеси, содержание аминокислот.

Методы определения аммиака подробно описаны в монографии [17]. Наиболее часто используемым методом количественного определения аммиака как в водных, так и в неводных средах является прямое титрование после

поглощения аммиака избытком кислоты. Титрование проводят с индикаторами, для которых рН перехода находится в интервале 4–5. Наиболее распространенный титриметрический метод был предложен Кьельдалем в 1883 г. Согласно этому методу пробу, содержащую органические и неорганические соединения азота разлагают кипячением с серной кислотой в присутствии катализатора, азот переходит в сульфат аммония. Затем в смесь добавляют щелочь и отгоняют образовавшийся аммиак, который поглощается избытком титрованной серной кислоты. Избыток кислоты оттитровывают щелочью. В качестве поглощающего аммиак раствора удобно использовать 4%-ный раствор борной кислоты. Удобство обусловлено тем, что раствор борной кислоты не изменяется при хранении в посуде из стекла пирекс, при поглощении аммиака не нужно точно отмеривать объем поглощающего раствора и использовать титрованный раствор щелочи.

При взаимодействии аммиака с борной кислотой образуется борат, который титруют затем кислотой.



Для определения небольших концентраций аммиака применяют модифицированный метод Кьельдаля, заключающийся в титровании системы борная кислота/аммиак сульфаминовой кислотой. Известна также модификация метода Кьельдаля без применения отгонки. В этом варианте метода ионы аммония окисляют гипогалогенитами до азота.

К кислотно-основным методам определения аммиака относится также формальдегидный метод, в основе которого лежит реакция

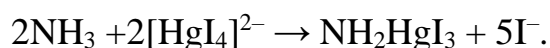


Образовавшуюся кислоту титруют щелочью. Предложен также метод обратного титрования с использованием этой реакции.

Известны методы определения аммиака, основанные на его способности давать комплексы с ионами меди. К этой же группе относится комплексометрическое титрование иона аммония комплексоном ртутным.

К инструментальным методам определения аммиака можно отнести кондуктометрический, потенциометрический, спектрофотометрический методы. Известно, что кондуктометрический метод применялся для определения аммиака в коксовом газе, однако для анализа многокомпонентных жидких систем он непригоден. Для определения ионов аммония могут быть использованы ион-селективные электроды. Описано определение ферментов по количеству ионов аммония, образующихся при ферментативном гидролизе аминокислоты, с помощью специального стеклянного электрода [17].

Одним из распространенных и общепринятых способов определения аммиака и солей аммония является метод Несслера. Метод основан на образовании коллоидного раствора, окрашенного в красно-бурый цвет, при взаимодействии аммиака и ионов аммония с реактивом Несслера (щелочным раствором  $K_2[HgI_4]$ ) в соответствии с реакцией:



Образовавшийся коллоидный раствор поглощает свет в довольно широком диапазоне длин волн и при определенных условиях интенсивность окраски пропорциональна концентрации определяемого вещества. В зависимости от ожидаемого содержания аммиака проводят измерения с помощью спектрофотометра при длинах волн 400–425 нм (меньше 0,2 мг  $NH_3$ ) или 500–580 нм (~1 мг). Описаны различные модификации метода Несслера, различные способы приготовления реактива. Однако определению мешают окрашенные органические соединения, амины, альдегиды, ацетон.

В биотехнологическом производстве аминокислот предпочтительным считается метод Кьельдаля.

В технологии микробиологического производства аминокислот в качестве фактора роста используются фосфаты. В ходе процесса необходимо определение фосфора (фосфатов) для контроля роста культуры.

Количественные методы определения фосфора в различных объектах хорошо известны, обзор многочисленных методов приведен в монографии [19].

Большинство химических методов основано на реакциях фосфат-ионов  $\text{PO}_4^{3-}$  с различными реагентами. Поэтому, если в анализируемых образцах в в соединениях фосфор находится в иных степенях окисления, предварительно проводят окисление. Наиболее точными считаются гравиметрические методы определения фосфора, однако их применение при содержании фосфора менее 0,05% дает неверные результаты.

Известны несколько видов титриметрического определения фосфора.

Молибдатный метод (фосфоромолибдатный метод) предложен еще в 1893 г. Он основан на осаждении фосфоромолибдата аммония, последующем растворении осадка в растворе щелочи известной концентрации и титровании избытка щелочи кислотой. При взаимодействии фосфат-ионов с молибдатом аммония образуется осадок фосфоромолибдата, который промывают (обычно 1%-ным раствором азотной кислоты, затем 1%-ным раствором нитрата калия). Взаимодействие его со щелочью можно описать уравнением:



Титрование избытка щелочи ведут в присутствии фенолфталеина.

Известны различные модификации алкалиметрического метода, например при растворении осадка добавляют формальдегид, нейтрализованный по фенолфталеину, для связывания ионов аммония. Основным преимуществом алкалиметрического метода считается быстрота выполнения анализа. Фосфоромолибдатным способом определяют фосфор в самых различных объектах – сталях, чугунах, рудах, нефтепродуктах, моющих средствах, вине, в органических веществах.

Титриметрический магниальный метод заключается в осаждении фосфата магния/аммония  $\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , который растворяют в избытке кислоты известной концентрации с последующим титрование избытка кислоты щелочью в присутствии метилового красного или метилового оранжевого. Метод применяется для определения фосфора в удобрениях, в моче и др.

Известны варианты титриметрических методов, в которых осаждаются фосфаты цинка/аммония  $ZnNH_4PO_4$  или марганца/аммония  $MnNH_4PO_4$ , промытые осадки растворяют в избытке кислоты, оттитровывают щелочью.

Определение фосфатов возможно также методом прямого осадительного титрования солями различных металлов либо осаждением фосфора в виде фосфатов серебра и др. солей с последующим титрованием ионов металлов.

Среди методов определения фосфора следует выделить фотометрические методы. Большинство из них основано на реакции образования желтого либо синего фосфорномолибденового комплекса, а также на образовании желтого фосфорнованадиевомолибденового комплекса. При взаимодействии фосфатов с молибдатом аммония в кислой среде образуется фосфорно-молибденовая гетерополикислота. Ее восстановление приводит к комплексному соединению, окрашенному в синий цвет, получившему название «молибденовая синь». В качестве восстановителей предложено использовать олово, оксалаи олова, сульфат железа (II) иодоводород, гидрохинон, аминафтолсульфокислоту с смеси с гидросульфитом, аскорбиновую кислоту в кислой среде и многие другие.

Состав восстановленной фосфорномолибденовой кислоты зависит от природы восстановителя и условий восстановления.

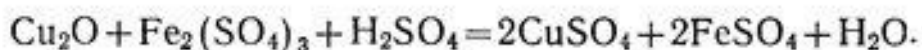
В качестве примера можно привести определение фосфатов в воде[19]. Фосфаты реагируют в кислой среде с молибдатом аммония с образованием гетерополикислоты  $H_7[P(Mo_2O_7)_6] \cdot nH_2O$ . Восстановление ее аскорбиновой кислотой в присутствии антимонитартрата калия  $K(SbO)C_4H_4O_6$  приводит к образованию молибденовой сини. Максимум поглощения образовавшейся молибденовой сини наблюдается при длине волны 882 нм.

Известны также фотометрические методы, основанные на образовании соединений фосфорномолибденовой кислоты с гексацианоферратами в аммиачных растворах, сероводородом в щелочной среде, с галловой кислотой в нейтральной среде, с трифенилметановыми красителями.

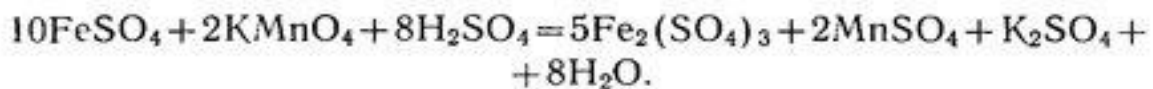
Сахара в процессе микробиологического синтеза аминокислот – фактор роста. В ходе процесса необходимо поддержание концентрации сахаров на определенном уровне для эффективного роста биомассы. Поэтому необходим контроль концентрации сахаров. Известны различные методы определения содержания сахаров [20–22], которые применяются при анализе различных объектов.

Химические методы основаны на способности карбонильных групп восстанавливающих сахаров окисляться различными окислителями. При использовании в качестве окислителя феллинговой жидкости в реакции образуется оксид меди (I), количество которого и определяют. Метод используют для определения глюкозы, маннозы, мальтозы, галактозы, инвертного сахара. Для каждого из сахаров составлены таблицы, в которых содержатся количественные соотношения между углеводом и восстановленной медью. Не рекомендуется использовать метод при наличии в анализируемом растворе солей аммония, аминокислот, пептонов, которые способствуют растворению  $\text{Cu}_2\text{O}$ .

Количество выделяющегося  $\text{Cu}_2\text{O}$  можно определить перманганатометрическим методом. Сначала проводят реакцию окисления  $\text{Cu}_2\text{O}$  солью трехвалентного железа (сульфатом) в кислой среде:



В свою очередь количество железа (II) определяются титрованием перманганата калия:



Рефрактометрические методы определения сахаров основаны на зависимости между показателем преломления и концентрацией сахарозы, причем, чем выше содержание сахара, тем выше показатель преломления. Метод используют в пищевой промышленности для определения сахара, например, в пищевых концентратах. Измеряют показатель преломления

жидкости, содержащей сахар, рассчитывают его концентрацию, используя значение показателя преломления воды. При исследовании продуктов, содержащих молоко, осаждают предварительно белки.

Содержание глюкозы определяют также по реакции расщепления глюкозы ферментом глюкозооксидазой, в результате которой образуется перекись водорода. В настоящее время разработано специальное оборудование, в котором проводится эта реакция и определяется количество перекиси водорода.

Количественные методы определения аминокислот можно разделить на основные группы: титриметрические, хроматографические, спектрофотометрические, электрохимические методы анализа.

Примером титриметрического метода является нейтрализация растворов аминокислот в органических растворителях щелочью. Используются диметилформамид, ацетон, этанол, пропанол. Титрование в среде этих органических растворителей становится возможным, так как они подавляют ионизацию аминогрупп. Метод используется в фармации [23], например, для титрования аминокaproновой кислоты в диметилформамиде или в ацетоне, метионина в ДМФА.

Известен метод Серенсена («формольного титрования»). К аминокислоте добавляют формальдегид для блокирования аминогруппы, в результате образуется устойчивое метиленовое производное, усиливаются кислотные свойства аминокислоты. Далее титруют водным раствором гидроксида натрия, как обычно, без добавления органических растворителей. Может быть использован для других аминокислот. Титрование можно вести в присутствии фенолфталеина или потенциометрически.

Соединения с  $-SH$  группой можно определять методом окислительно-восстановительного, а именно иодометрического, титрования. Добавляют раствор иода (окислитель) и оттитровывают избыток раствором тиосульфата натрия в присутствии крахмала.



Для количественного спектрофотометрического определения аминокислот используется реакция с нингидрином либо с аллоксаном. При взаимодействии с нингидрином продукт характеризуется максимумом поглощения при  $\lambda$  568 нм. Расчет проводят с использованием оптической плотности стандартного раствора.

Для количественного определения аминокислот в различных объектах широко применяется метод обращено-фазовой ВЭЖХ [24, 25]. В качестве примера этот метод используется для определения лизина, метионина и треонина в кормах [26]. При биотехнологическом производстве аминокислот методу ВЭЖХ отдается предпочтение.

## 2 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### 2.1 Получение треонина

Микробиологический синтез треонина проводился в ЗАО «Завод Премиксов №1» (г. Шебекино) при отработке технологии получения треонина в условиях предприятия.

Синтез включал следующие стадии:

1. Размораживание клеточной суспензии из криопробирки (штамм В-12204 РБК-4) (1-2 мл).
2. Подготовка питательной среды и перенос культуры клеток в посевную колбу (ПК) (100-150 мл).
3. Посевной материал из ПК переносили в посевной ферментер (ПФ) объемом 1000 мл, где выдерживали при температуре 33 °С и рН 7 в течение 12-14 часов. В ходе процесса измеряли оптическую плотность реакционной смеси (методику см. ниже). По достижении необходимого значения этого параметра смесь переносили в рабочий ферментер (РФ).
4. Стадия основной или рабочей ферментации (РФ) длилась около 40–42 часов с получением культуральной жидкости (КЖ), содержащей треонин.

Заключительным этапом при микробиологическом производстве аминокислот является сушка продукта с получением целевого продукта—аминокислоты. В ходе отработки технологии микробиологического синтеза треонина сушку не проводили. Таким образом, анализу подвергали смеси из посевного ферментера и из рабочих ферментеров в ходе процесса ферментации.

Схема процесса приведена на рис. 2.1.

Из посевного ферментера отбирали нулевую пробу в момент посева, потом отбор проб производили в зависимости от того, как бактерии поглощали кислород (процесс контролировали технологи предприятия с использованием специальных таблиц на компьютере). В посевном ферментере процесс вели до достижения значения оптической плотности 20 либо больше (это была последняя проба), после чего проводили пересев в рабочие ферментеры.



Рис. 2.1. Получение треонина

Для контроля процесса на стадии основной ферментации пробы на анализ отбирали из трех рабочих ферментеров каждые 4 часа.

## 2.2 Методы исследования

Для анализа культуральной жидкости применяли нижеперечисленные методы контроля. За основу были взяты методики [19, 26–32].

### 2.2.1 Определение содержания свободного аммиачного азота

Метод используется для определения свободного аммиачного азота в ферментационных пробах. Аналитический контроль проводился для проверки потребления бактериями азота. Анализ проводили с использованием автоматической дистилляционной установки «FOSSKjeltec™8200 AutoDistillationUnit» и бюретки.

Ионы аммиака, присутствующие в пробе, превращаются в аммиак при добавлении щелочи, при паровой дистилляции аммиак переходит в приемную колбу, содержащую борную кислоту и индикаторы – метиловый красный и бромкрезоловый зеленый. При взаимодействии аммиака и кислоты образуется

борат аммония  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{BO}_3$ . Возрастающая концентрация аммиачного азота в камере приводит к изменению цвета от красного к зеленому. Далее раствор титруется раствором 0,1 Н серной кислоты до светло-красной окраски, для определения количества аммония, связанного борной кислотой.

Количество азота в пробе рассчитывается по известному объему пробы и использованного для титрования объема раствора серной кислоты.

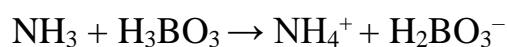
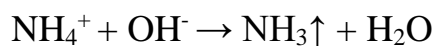
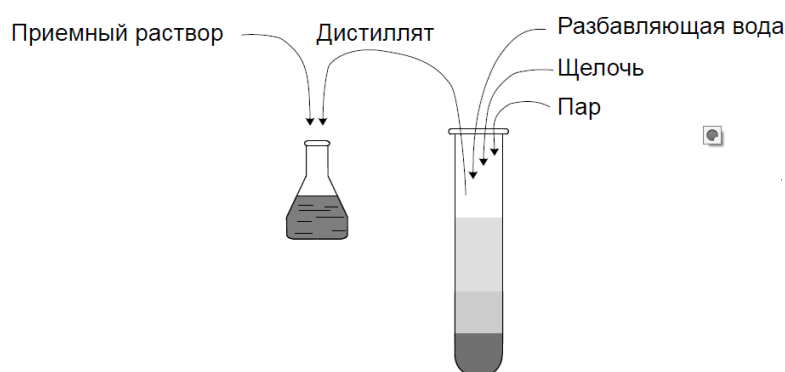


Рис. 2.2 Схема проведения анализа

Приборы и реактивы:

- автоматическая дистилляционная установка «FOSSKjeltec™8200 AutoDistillationUnit»
- колбы Кельдаля (дистилляционная насадка)
- весы теххимические
- конические колбы, 250 см<sup>3</sup>
- автоматическая пипетка с регулируемым объемом 500–5000 мкл
- бюретка
- кислота серная, 0,1 н стандартизированный раствор
- гидроксид натрия, раствор с массовой долей 35 – 40 %
- раствор метилового красного

- раствор бромкрезолового зеленого
- борная кислота с массовой долей 4%

### *Проведение испытания.*

Выполнение анализа проводили в соответствии с инструкцией к прибору.

Перед началом работы выполняли контрольный опыт. Для этого помещали дистилляционную пробирку в аппарат. Проверяли, чтобы в емкостях было достаточное количество воды, очищенной при помощи обратного осмоса, 40%-ного NaOH и раствора 4%-ной борной кислоты. Включали аппарат и выполняли парогенерацию, по окончании которой содержимое колбы титровали 0,1н раствором серной кислоты

Для выполнения измерения отбирали пробу массой около 5 г в колбу Кельдаля и записывали точную массу. Колбу помещали в аппарат и запускали прибор. После проведения процесса парогенерации извлекали приемную колбу. Содержимое колбы оттитровывали 0,1н раствором серной кислоты.

После титрования образцов вычисляли содержание азота в пробе по формуле:

$$\omega(N) = \frac{(V_1 - V_2) \cdot M \cdot 14,007 / 1000}{m} \cdot 100\% \quad (2.1)$$

где  $V_1$  – объем  $H_2SO_4$  для титрования пробы,  $см^3$ ;

$V_2$  – объем  $H_2SO_4$  для титрования контрольной пробы,  $см^3$ ;

$m$  – масса пробы, г;

$M$  – молярная концентрация  $H_2SO_4$ , моль/ $дм^3$ ;

14.007/1000 – коэффициент пересчета для азота в г/ $дм^3$ .

### **2.2.2 Определение содержания глюкозы в культуральной жидкости**

Измерение молярной концентрации глюкозы в культуральной жидкости (КЖ) осуществляли с помощью автоматического анализатора «Энзискан-

ультра». Пределы допускаемой основной относительной погрешности прибора  $\pm 6\%$ .

Работа анализатора «Энзискан-Ультра» основана на амперометрическом измерении концентрации перекиси водорода, которая образуется при расщеплении глюкозы ферментом глюкозооксидазой. Количество перекиси водорода пропорционально содержанию глюкозы в исследуемой пробе. При окислении перекиси водорода появляется электрический сигнал (ток), который преобразуется в постоянное напряжение и измеряется аналогово-цифровым преобразователем.

Приборы и реактивы:

- автоматический анализатор глюкозы «Энзискан-ультра»
- автоматическая пипетка с регулируемым объемом 100 – 1000  $\mu\text{л}$
- центрифуга с центрифужными пробирками типа Эппиндорф
- мерные колбы на 10  $\text{см}^3$
- буферный раствор ,  $\text{pH}=7,2-7,4$

*Проведение испытания.*

Перед проведением измерений прибор откалибровали по калибровочному раствору глюкозы с известной молярной концентрацией 10  $\text{ммоль}/\text{дм}^3$ ).

Ферментационные пробы объемом 1  $\text{мл}$  центрифугировали. Центрифугат КЖ анализировали.

Диапазон концентраций глюкозы в культуральной жидкости может составлять от 2 до 30  $\text{ммоль}/\text{дм}^3$  . При высоких концентрациях ( $>25\text{ммоль}/\text{дм}^3$ ) глюкозы в пробах делали разведение в 20 раз. Для этого в мерную колбу на 10  $\text{см}^3$  вносили 0,5  $\text{см}^3$  пробы, доводили до метки водой. Набирали дозатором разведенную пробу (50  $\mu\text{кл}$ ), удаляли салфеткой капли пробы с наконечника дозатора и вводили пробу в прибор, в канал «Ввод пробы». Результат автоматически выводился на дисплее прибора.

Результат измерений получали в  $\text{ммоль}/\text{дм}^3$ , для перевода в  $\text{г}/\text{дм}^3$  использовали формулу:

$$C = \frac{C_m * 180 * n}{1000}, \quad (2.2)$$

где n – разведение,

$C_m$  – показание прибора, ммоль/дм<sup>3</sup>;

180 – молярная масса глюкозы.

### **2.2.3 Определение содержания сухих веществ высушиванием до постоянной массы**

Содержание сухих веществ в культуральной жидкости определяли по ГОСТ 5900-79. Высокое содержание сухих веществ является характеристикой качества продукта.

Сущность метода заключается в высушивании анализируемой пробы продукта при определенной температуре и определении потери массы по отношению к исходной массе анализируемой пробы.

Приборы и реактивы:

- сушильный шкаф электрический с терморегулятором
- весы аналитические
- эксикатор
- бюксы для взвешивания
- щипцы тигельные

*Проведение испытания.*

В чистый бюкс, высушенный до постоянной массы, помещали отобранную пробу (1,0±0,5) г, взвешивали с точностью до 0,001 г, жидкость равномерно распределяли на дне бюкса. Открытый бюкс и крышку сушили при температуре (103±2)°С. По окончании сушки бюкс закрывали и охлаждали в эксикаторе до комнатной температуры, затем взвешивали. Первое взвешивание проводили через 2 ч высушивания, последующие – через каждые 30 мин. Постоянную массу считали достигнутой, если разница между двумя

взвешиваниями не превышала 0,005 г. Массовую долю влаги ( $\omega$ ) в процентах вычисляли по формуле:

$$\omega = \frac{(m_1 - m_2) * 100}{m_1 - m} \quad (2.3)$$

где  $m_1$  – масса бюкса с навеской до высушивания, г;

$m_2$  – масса бюкса с навеской после высушивания и охлаждения, г;

$m$  – масса пустого бюкса, г.

#### **2.2.4 Определение содержания сухих веществ рефрактометрическим методом**

Показатель преломления растворов измеряли на рефрактометр «АТАГОРХ-5000СХ Refractometer». Рефрактометр отградуирован по сахарозе. Измеряемый показатель преломления соответствует определенному содержанию сухой сахарозы в растворе.

Величина содержания сухих веществ в исследуемых пробах, определенная на рефрактометре, называется видимым содержанием сухих веществ. Это значение отличается от истинного, так как пробы часто содержат много веществ, которые не являются сахарами. Истинное содержание сухих веществ меньше видимого.

Для проведения испытания отбирали незначительное количество ферментационной пробы пипеткой Пастера и наносили каплю на измерительное стекло прибора, проводили измерение по инструкции к прибору.

#### **2.2.5 Определение оптической плотности**

*Сущность метода.*

Культуральная жидкость представляет собой дисперсную систему. Уменьшение интенсивности проходящего через бактериальную суспензию света обусловлено главным образом его рассеянием. При помощи



спектрофотометра измеряется пропускание – доля световой энергии, прошедшей через бактериальную суспензию ( $I/I_0$ ).

Для разбавленных дисперсных систем выполняется соотношение, аналогичное закону Бугера-Ламберта-Бера:  $D = \lg \frac{I_0}{I} = \tau l$ , где  $l$  – толщина слоя рассеивающей жидкости,  $\tau$  – мутность, которая пропорциональна концентрации дисперсной фазы.

Таким образом, измеряемая оптическая плотность пропорциональна концентрации дисперсной фазы. В частности, для одноклеточных организмов оптическая плотность пропорциональна сухому весу клеток, и измерение оптической плотности может использоваться как альтернатива традиционному методу подсчета клеток. Для получения корректных результатов необходимо иметь стандартную кривую роста для конкретных микроорганизмов, которая соотносит оптическую плотность с подсчетом клеток и подсчетом по сухой массе клетки.

При высокой концентрации клеток может иметь место многократное рассеяние света клетками, что приведет к получению некорректного результата измерения. Данное явление возникает при измерении оптической плотности выше 0,5. В таком случае пробу необходимо разбавлять.

Посредством измерения оптической плотности с течением времени можно быстро оценить скорость роста культуры.

Приборы и реактивы:

- спектрофотометр «UNICO 2800UV/VISSPECTROPHOTOMETR»
- мерные колбы на 50 см<sup>3</sup>
- кюветы
- автоматическая пипетка с регулируемым объемом 20 – 1000 мкл

*Проведение испытания.*

Вносили определенное количество ферментационной пробы в зависимости от разведения (разведение зависит от попадания в диапазон 0,2-

0,5 показания прибора). Измерение проводили при длине волны 600 нм. Записывали показание прибора и обрабатывали результат, показание прибора умножали на разведение.

### 2.2.6 Определение физической плотности

Плотность культуральной жидкости определяли по ГОСТ 3900-85.

С помощью автоматической пипетки с регулируемым объемом отбирали 1000 мкл ферментационной жидкости и переносили на часовое стеклышко на аналитические весы. Взвешивали и рассчитывали плотность

### 2.2.7 Определение содержания свободных фосфатов

Определение растворенных фосфатов в ферментационной жидкости проводили методом, описанным в [19]. Ортофосфат-ионы, присутствующие в пробе, реагируют в кислой среде с молибдатом аммония с образованием фосфорно-молибденовой кислоты  $H_7P(Mo_2O_7)_6$ , которая восстанавливается аскорбиновой кислотой в присутствии антимоилтартрата калия до с образованием фосфорно-молибденового комплекса – молибденовой сини.

Определение молибденовой сини осуществляют спектрофотометрически при длине волны  $\lambda = 890$  нм.

Определение ортофосфатов в ферментационных пробах проводится в присутствии серной кислоты, в кислой среде может гидролизироваться некоторая часть полифосфатов или лабильных органических соединений фосфора, присутствовавших в анализируемой пробе жидкости, но известно, что доля таких соединений невелика, поэтому на практике этим вкладом пренебрегают.

Приборы и реактивы:

- спектрофотометр «UNICO 2800UV/VISSPECTROPHOTOMETER»
- мерные колбы на 50 см<sup>3</sup>
- автоматическая пипетка с регулируемым объемом 100 – 1000 мкл
- конические колбы на 100 см<sup>3</sup>
- пипетка на 15 см<sup>3</sup>

- цилиндр на 100 см<sup>3</sup>
- антимоилтартрат калия, водный раствор с массовой долей 0,26%
- молибдат аммония, водный раствор 0,96%-ный,
- кислота аскорбиновая, водный раствор 10%-ный
- кислота серная, 20%-ная
- дигидрофосфат калия, раствор с концентрацией 0,1 мг/см<sup>3</sup>

#### *Проведение испытания.*

Предварительно проводили калибровку по дигидрофосфату калия.

100 мкл ферментационной пробы вносили в мерную колбу на 50 см<sup>3</sup> (разводили в 500 раз для попадания в диапазон 0,5 – 2,5), и доводили до метки дистиллированной водой.

В отдельной колбе готовили окрашивающий раствор, смешивая 50 см<sup>3</sup> серной кислоты, 50 см<sup>3</sup> раствора молибдата аммония, 20 см<sup>3</sup> раствора антимоилтартрата калия и 20 см<sup>3</sup> раствора аскорбиновой кислоты (концентрации растворов см. выше).

В коническую колбу на 100 см<sup>3</sup> вносили пипеткой 15 см<sup>3</sup> окрашивающей смеси и 50 см<sup>3</sup> анализируемого раствора. Раствор помещали в темное место на 30 мин. После развития окраски проводили измерение оптической плотности раствора на спектрофотометре при длине волны  $\lambda = 890$  нм в кювете 1 см.

Содержание фосфатов рассчитывали, используя калибровочный график.

### **2.2.8 Определение содержания аминокислот с помощью ВЭЖХ**

#### *Сущность метода.*

Метод [29] используется для определения одной или более из следующих аминокислот: L-треонин, L- аланин, L- метионин, L-валин и L-лизин. Для образцов, содержащих несколько аминокислот, которые трудно разделить, необходимо привлечение градиентного элюирования для достижения хорошего разделения аминокислот.

Определение треонина в культуральной жидкости в ходе процесса осуществляли на хроматографе DionexUltiMate-3000 HPLC, снабженном программным обеспечением Chromeleon 7, которое используется для управления насосом, детектором, автосэмплером. Анализируемые пробы разводятся в воде, в автосэмплере проба смешивается с раствором орто-фталевого альдегида, и затем автоматически подается в инжекторный клапан. Разделение проводится на колонке C18 при использовании флуоресцентного детектора. В качестве элюента применяется фосфатный буферный раствор (pH 3,0-3,05), содержащий метанол, 2-пропанол, ацетонитрил и деионизированную воду.

Условия хроматографирования приведены в таблице 2.1.

Таблица 2.1.

## Условия хроматографирования

Колонка	Нержав. сталь, 150×3 мм, эндкепированный октадецилсилилсиликагель (C18)
Предколонка	соответствует используемой колонке, 4 × 3 мм
Подвижная фаза	Элюент – фосфатный буфер (pH 3-3,05) растворитель ВЭЖХ, 2-пропанол, ацетонитрил вода.
Скорость потока 0,425 мл/мин	
Температура колонки 40 °С	
Флуоресцентный детектор. Длины волн, 340 и 440 нм	
Объем вводимой пробы – 3 мкл. Время регистрации хроматограммы – 10-15 мин	

На аналитических весах в колбу на 100 см<sup>3</sup> взвешивали приблизительно 0,2000 г ферментационной пробы с точностью до 4 знака после запятой. В колбу вносили 5 см<sup>3</sup> внутреннего стандарта – орнитина, доводили до метки дистиллированной водой. Раствор перемешивали и фильтровали (микрофильтр 45 мкм). Часть отфильтрованной пробы хроматографировали. Результат записывали и обрабатывали.

На рис. 2.3, 2.4 приведены примеры хроматограмм. На них наблюдаем выход треонина (2-3 минута), аланина (3-3,5 минута) и внутреннего стандарта орнитина (5-6 минута).

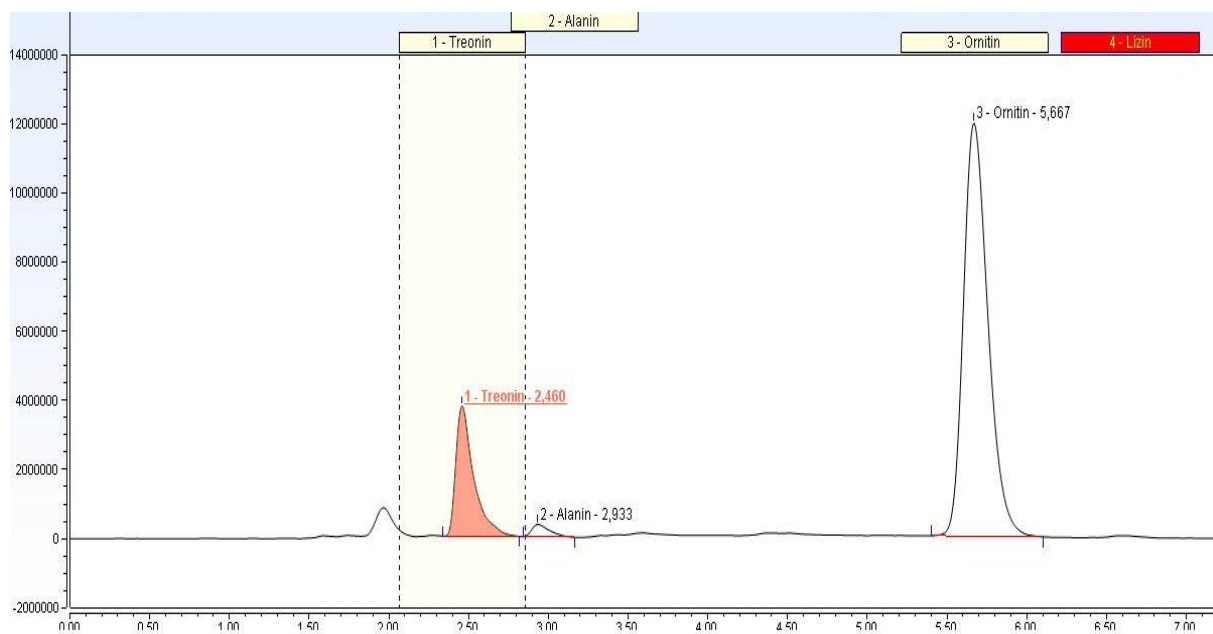


Рис.

2.3. Пример хроматограммы для посевного ферментера (время роста – 13 часов)

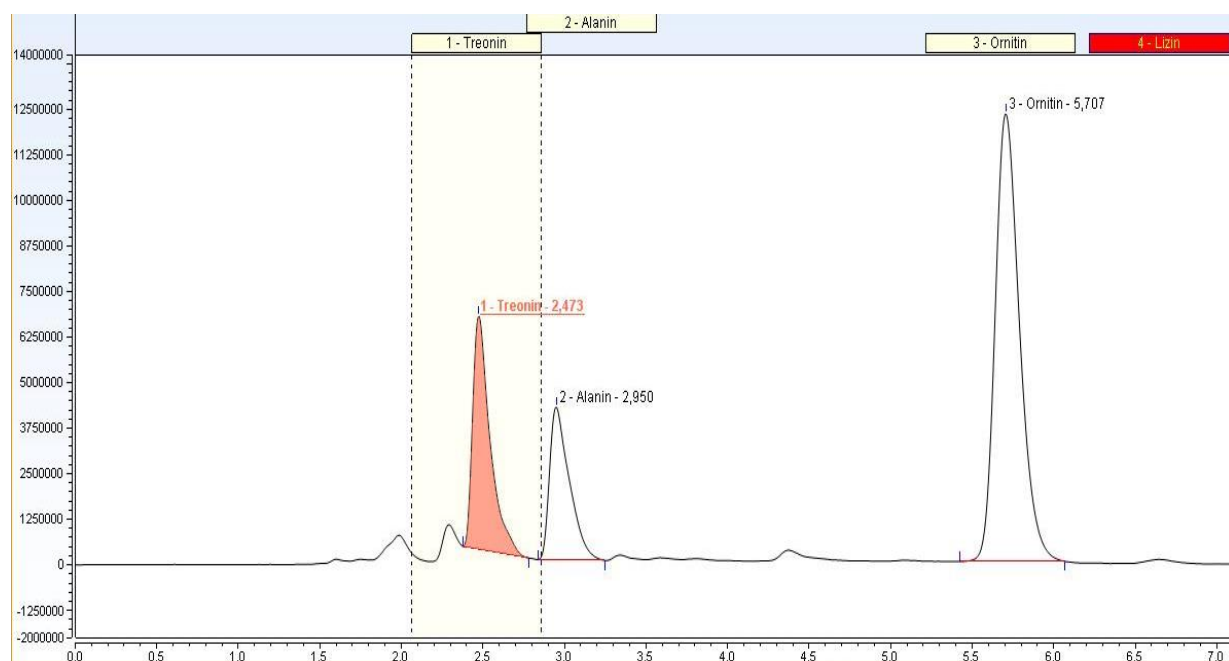


Рис 2.4. Пример хроматограммы для рабочего ферментера (время роста – 24 часа)

### 3 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Было проведено свыше 50 экспериментальных циклов получения треонина.

Ниже представлены результаты анализов в ходе проведённых процессов ферментации (см табл.3.1 – 3.2). В качестве примеров даны результаты, полученные для двух посевных ферментеров (№1 и №5). В их среды были добавлены разные пеногасители, которые влияют на протекания процесса. Пеногаситель может тормозить процесс, в зависимости от фирмы пеногасителя и количества, добавляемого в среду. В посевных ферментерах по результатам химических анализов наблюдается рост оптической плотности, что говорит о увеличении числа клеток (см рис. 3.1, 3.4). Анализ оптической плотности, на стадии посевных ферментеров является наиболее информативным, так как по их значению судят о росте биомассы, дальнейшем биосинтезе треонина и об отсутствии ингибирующих факторов (тормозящих рост клеток).

Таблица 3.1.

Результаты анализов в процессе синтеза треонина в посевном ферментере 1

Время роста, ч	Азот, %	A (D)	Глюкоза, г/л	Сухие вещества по ГОСТ, %	Сухие вещества (реф), %	Фосфаты, мг/л	Треонин, г/л
0	0,083	0,95	32,90	4,90	4,75	606,5	-
13	0,080	23,20	0,19	3,68	3,43	374,0	11,74

Вспомогательным показателем роста биологической массы является снижение уровня глюкозы в культуральной жидкости и уменьшение концентрации фосфатов, которые является ростовым фактором в производстве клеточных структур. Уменьшение концентрации фосфатов и глюкозы

свидетельствует о потреблении их клетками, что отображено на рис 3.2 – 3.3, 3.5 – 3.6.

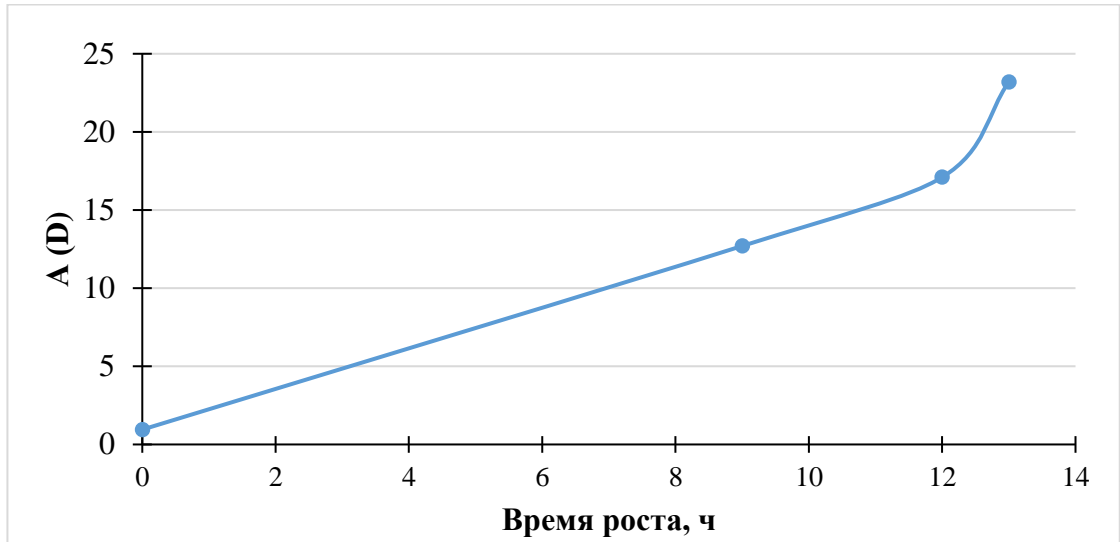


Рис. 3.1. Зависимость оптической плотности культуральной жидкости от времени для посевного ферментера 1

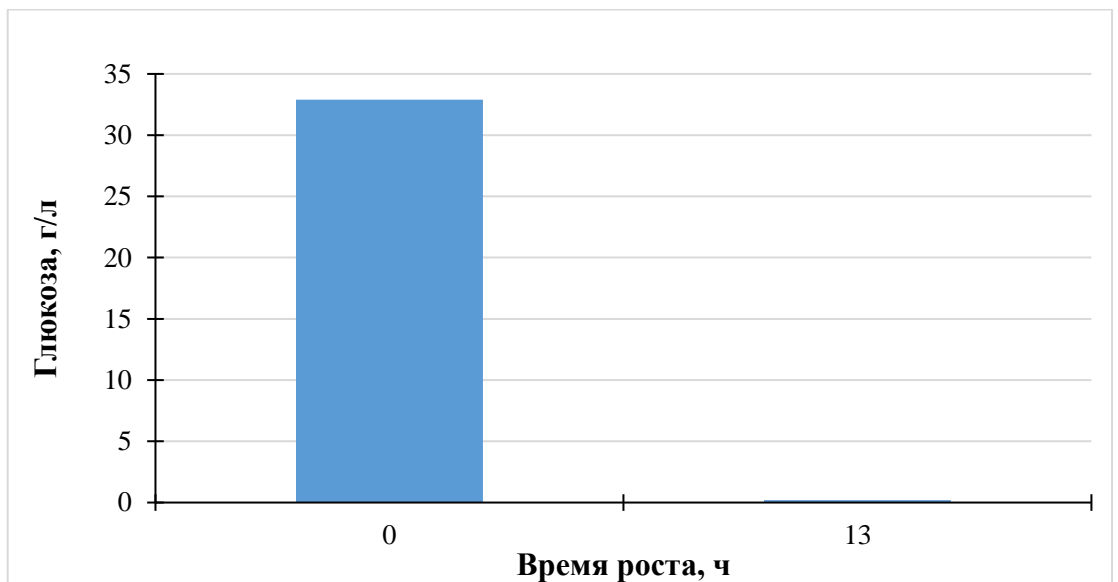


Рис 3.2. Содержание сахаров в начале и остаточных сахаров в конце процесса в посевного ферментере 1

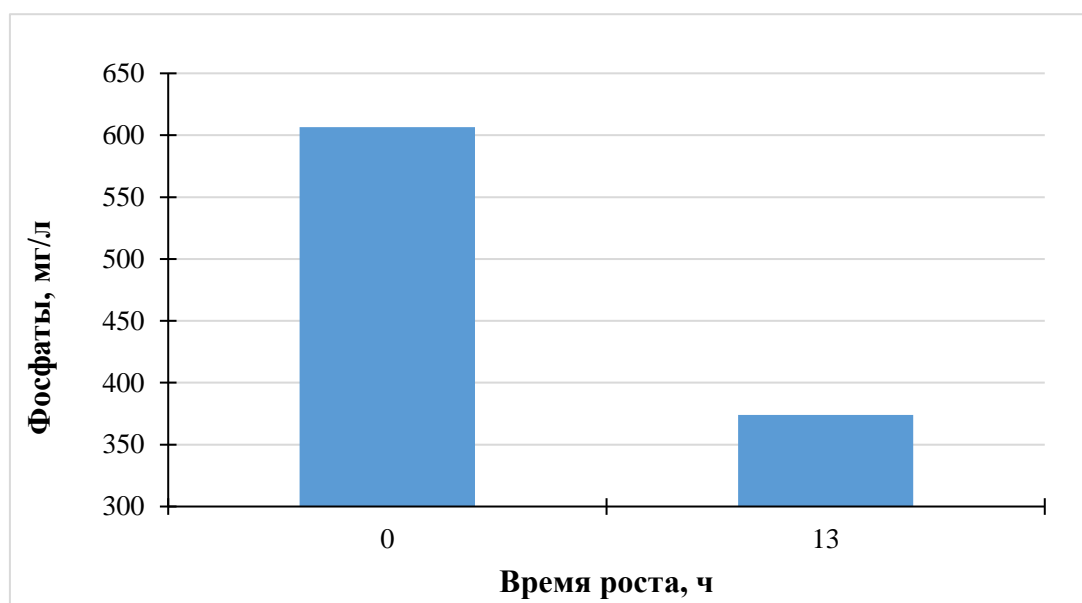


Рис 3.3. Содержание свободных фосфатов в начале и конце процесса в культуральной жидкости для посевного ферментера 1

Аналогичные результаты были получены и для процесса в ферментере 5. Однако, уменьшение концентрации глюкозы и фосфатов несколько менее существенное, чем в первом посевном ферментере. Такие различия зависят от разного состава сред, а точнее от разных производителей пеногасителей добавленных в среду. По результатам анализа видно, что пеногаситель добавленный в среду посевного ферментера 5 не на много тормозит процесс.

Таблица 3.2.

Результаты анализов в процессе синтеза треонина в посевном ферментере 5

Время роста, ч	Азот, %	A (D)	Глюкоза, г/л	Сухие вещества по ГОСТ, %	Сухие вещества (реф), %	Фосфаты, мг/л	Треонин, г/л
0	0,147	1,30	29,59	5,14	4,94	638,5	-
13	0,110	22,35	6,84	3,99	4,10	456	7,66



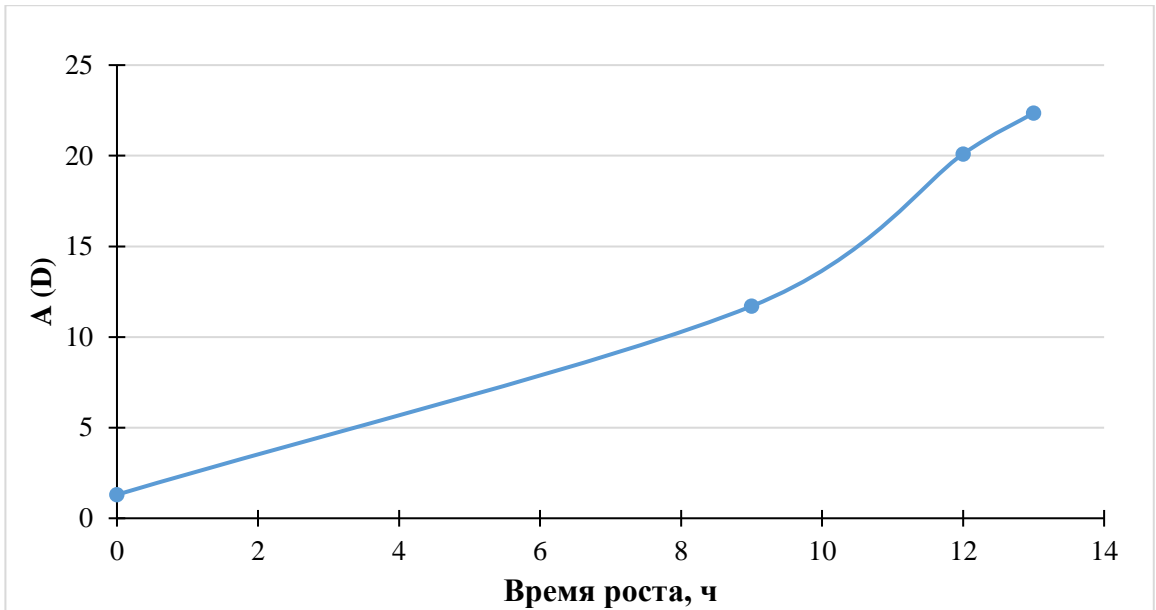


Рис. 3.4. Зависимость оптической плотности культуральной жидкости от времени для посевного ферментера 5

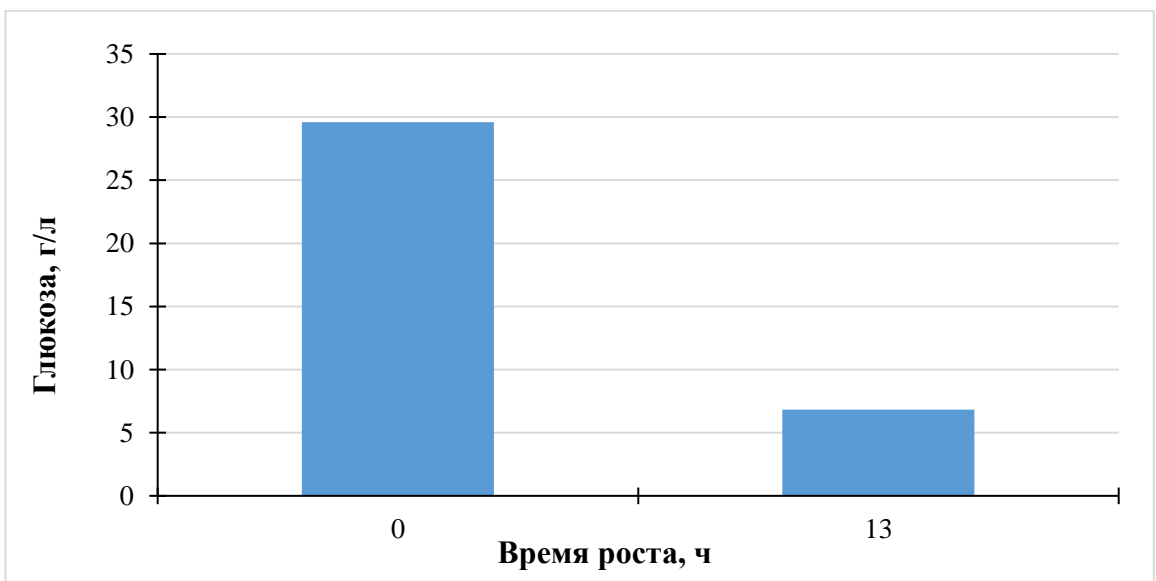


Рис 3.5. Содержание остаточных сахаров в начале и конце процесса в культуральной жидкости в посевном ферментера 5

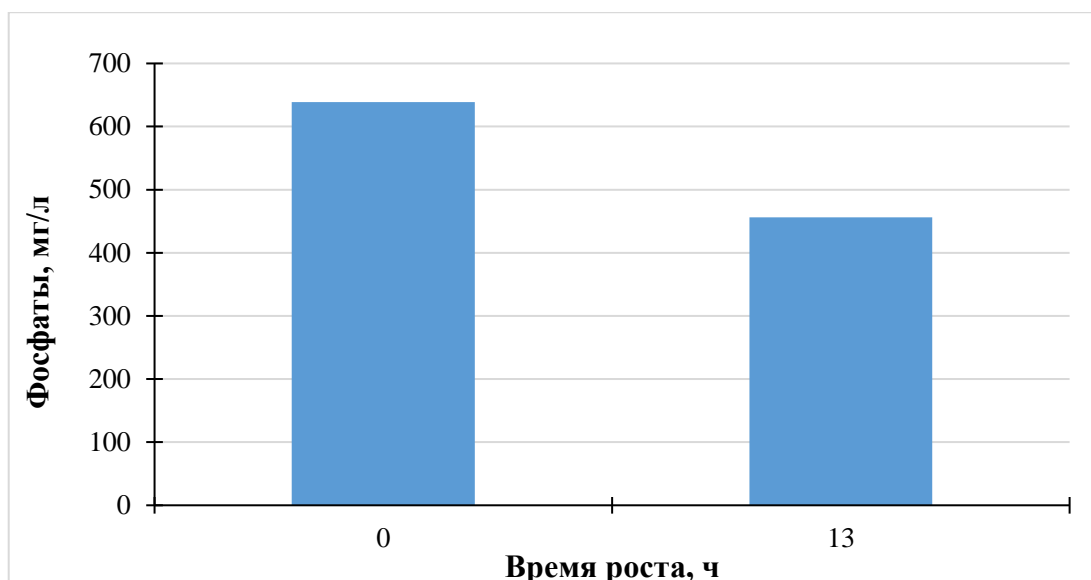


Рис 3.6. Содержание свободных фосфатов в начале и конце процесса в культуральной жидкости для посевного ферментера 5

Ферментационную смесь из посевного ферментера 1 пересевали далее в рабочие ферментеры 1 и 2, а из посевного ферментера 5 – в рабочие ферментеры 5 и 6, где проходил процесс основной ферментации. Результаты анализов в ходе процесса в рабочих ферментерах представлены в таблицах (см. табл.3.3 – 3.6).

Рост оптической плотности (см рис 3.7, 3.11, 3.15, 3.19), уменьшение концентрации фосфатов (3.10, 3.14, 3.18, 3.22) говорят о росте клеток и выработке ими аминокислот, что соответствует увеличению концентрации треонина (см рис 3.8, 3.12, 3.16, 3.20) в культуральной жидкости. Для эффективного процесса ферментации необходимо поддержание концентрации глюкозы на уровне не более 6 ммоль/л (см рис 3.9, 3.13, 3.17, 3.21). Глюкозную подпитку осуществляли периодически в ходе процесса. Количество добавляемой глюкозы зависело от содержания ее в ферментационной жидкости, установленного по результатам анализа. При избытке глюкозы, бактерии перестанут получать кислород и продуцировать аминокислоты.

Таблица 3.3.

Результаты анализов в процессе синтеза треонина в рабочем ферментере 1

Время роста, ч	Азот, %	Треонин, г\л	Сухие вещества (реф.), %	Оптическая плотность	Плотность, г\л	Глюкоза, г\л	Фосфаты, мг\л	Сухие вещества по ГОСТ, %
0	0,082		2,48	0,89		11,99	582,5	2,51
4	0,087		2,61	9,95	0,9737	3,4		
8	0,085		2,89	12,95	0,9744	1,13		
12	0,201	13,35	4,00	19,35	0,9770	3,29		
16	0,095	22,36	5,52	24,60	0,9788	6,08		
20	0,077	33,5	6,71	37,30	0,9806	0,22		
24	0,066	48,63	8,58	40,70	0,9972	0,17		
28	0,119	59,26	10,17	58,40	0,9985	0,14		
32	0,064	72,01	11,27	51,30	0,9992	0,12		
36	0,091	79,3	12,51	47,40	1,0050	0,16		
40	0,221	86,83	13,55	61,40	1,0014	0,14	76,8	13,55

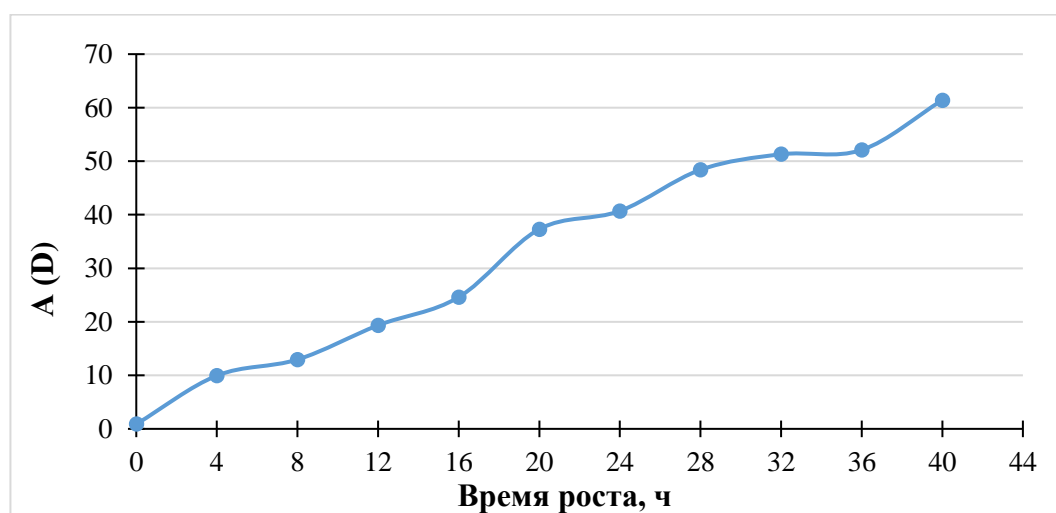


Рис. 3.7. Зависимость оптической плотности культуральной жидкости от времени в рабочем ферментере 1

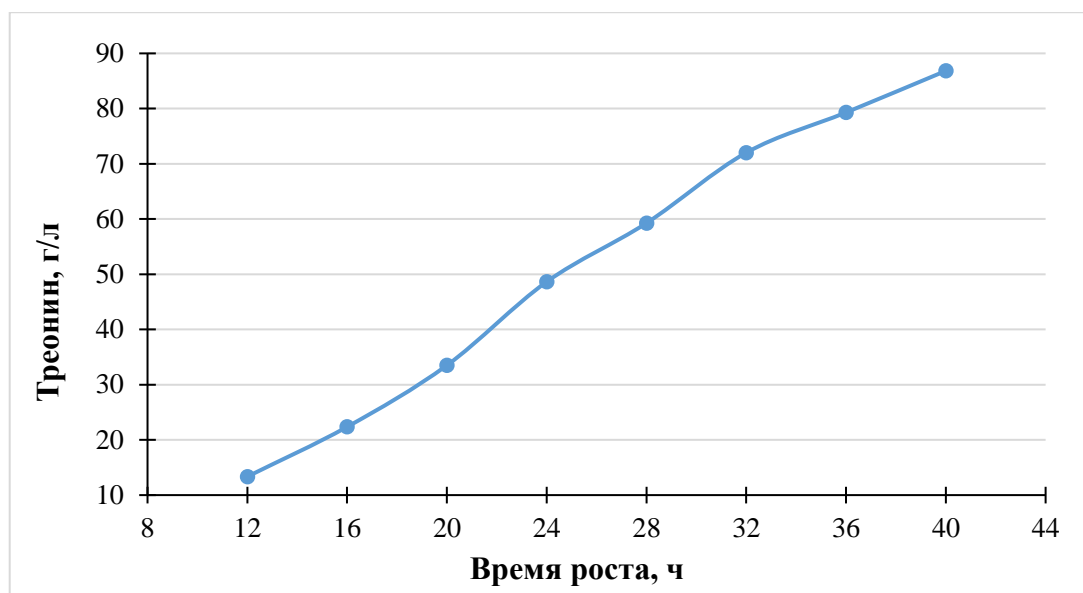


Рис. 3.8. Зависимость содержания треонина в культуральной жидкости от времени в рабочем ферментере 1

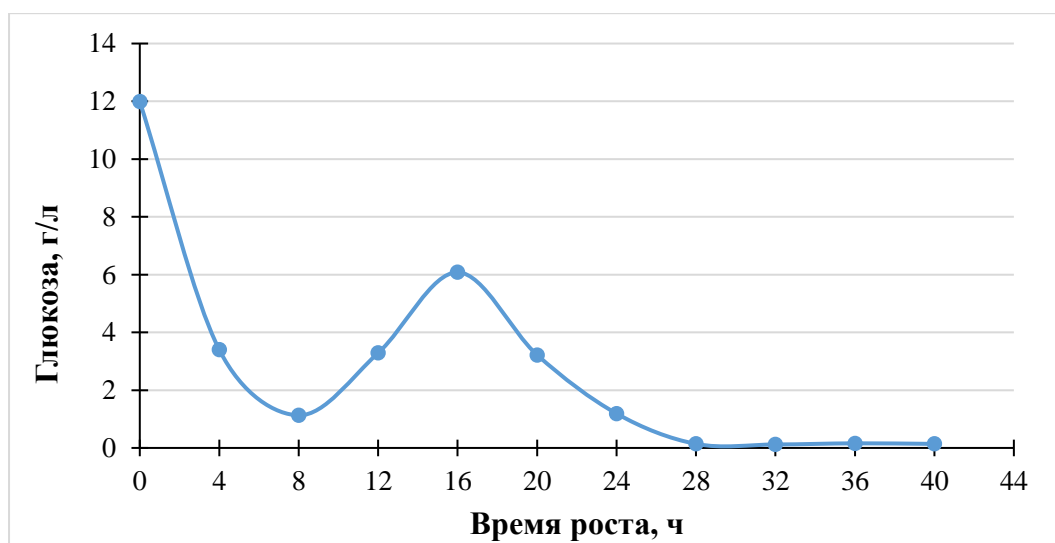


Рис 3.9. Зависимость содержания остаточных сахаров в культуральной жидкости от времени для рабочего ферментера 1

На рис 3.9 приведена зависимость содержания остаточных сахаров в культуральной жидкости от времени в рабочем ферментере 1. Резкий рост глюкозы в интервале от 8 до 12 часов, свидетельствует о нарушении подачи глюкозной подпитки. Уменьшение роста глюкозы с 16 до 40 часов, говорит о

исправлении технологического процесса и активном потреблении бактериями ГЛЮКОЗЫ.

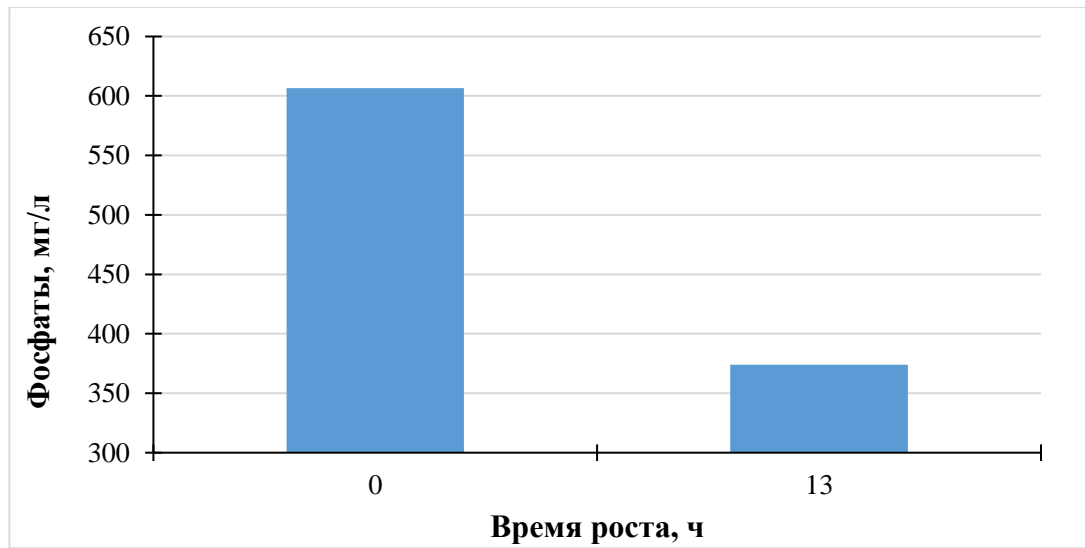


Рис 3.10. Зависимость содержания свободных фосфатов в начале и конце процесса в культуральной жидкости от времени для рабочего ферментера 1.

Таблица 3.3.

Результаты анализов в процессе синтеза треонина в рабочем ферментере 2

Время роста, ч	Азот, %	Треонин, г\л	Сухие вещества (реф.), %	Оптическая плотность	Плотность, г\л	Глюкоза, г\л	Фосфаты, мг\л	Сухие вещества по ГОСТ, %
0	0,078		2,52	1,26		12,92	581,0	2,51
4	0,105		2,53	10,23	0,9707	3,4		
8	0,103		2,76	13,15	0,9721	1,41		
12	0,102	11,75	3,43	16,25	0,9744	0,99		
16	0,098	19,91	5,07	22,3	0,9762	0,84		
20	0,095	34,10	6,48	31,3	0,9855	0,70		
24	0,096	48,51	7,00	43,7	0,9950	0,57		
28	0,094	64,25	10,17	47,4	0,9961	0,44		
32	0,091	76,09	11,59	51,3	0,9973	0,22		
36	0,092	82,24	12,70	53,4	0,9985	0,17		
40	0,095	94,13	13,80	55,2	0,9998	0,17	72,3	13,87

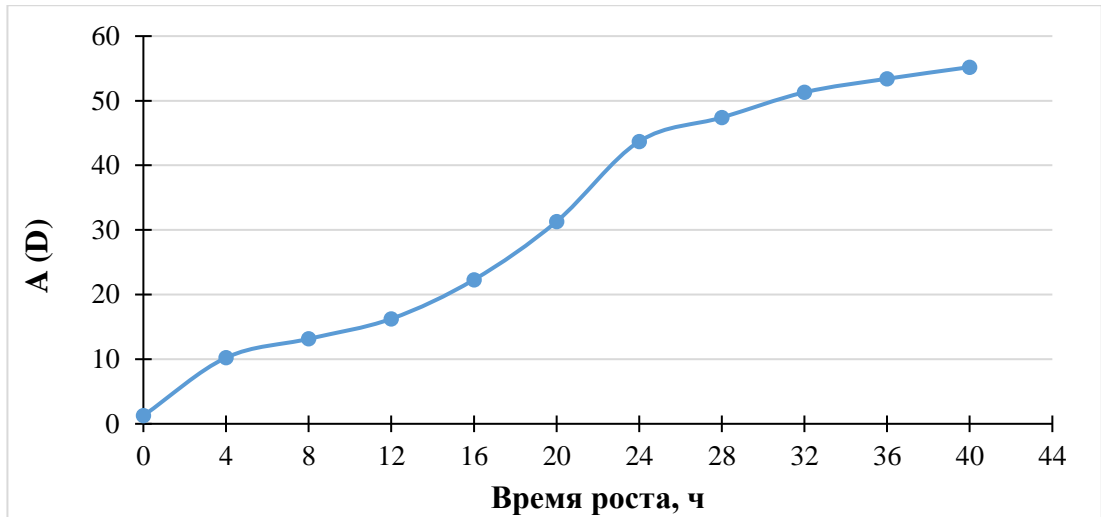


Рис. 3.11. Зависимость оптической плотности культуральной жидкости от времени в рабочем ферментере 2

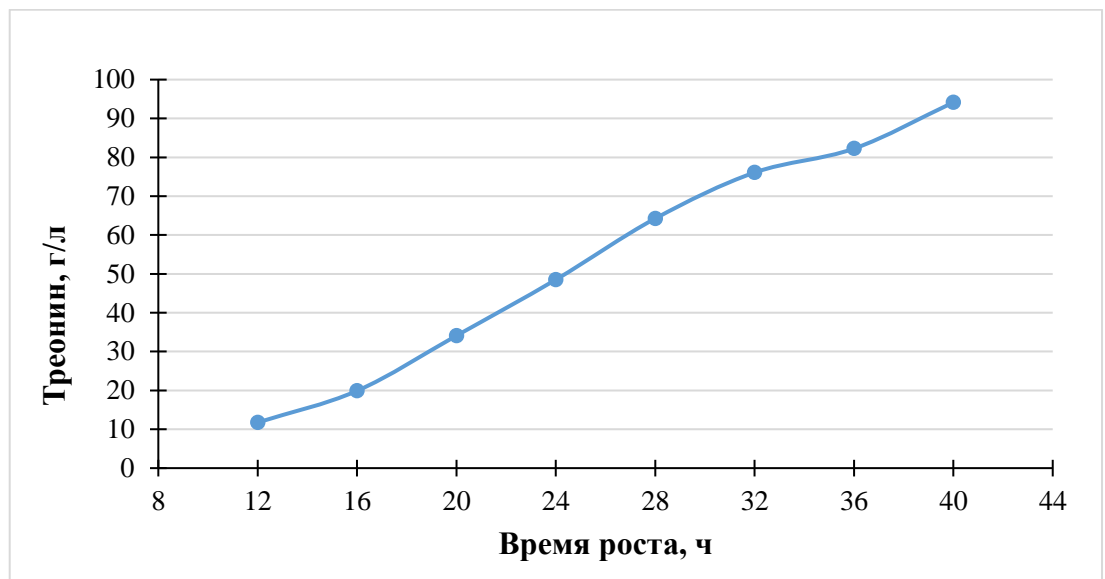


Рис. 3.12. Зависимость содержания треонина в культуральной жидкости от времени в рабочем ферментере 2

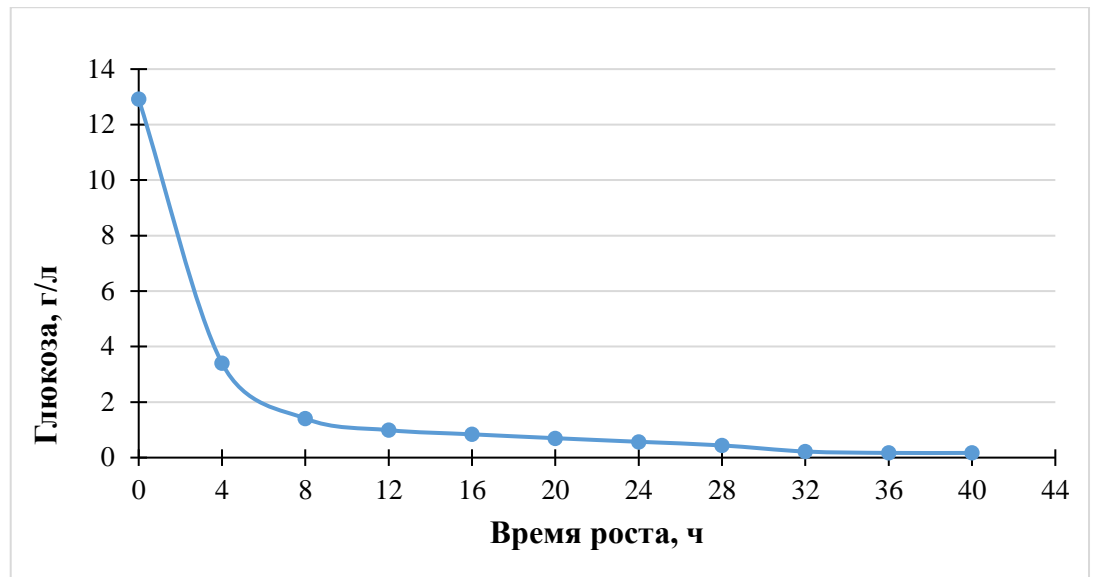


Рис. 3.13. Зависимость содержания остаточных сахаров в культуральной жидкости от времени в рабочем ферментере 2

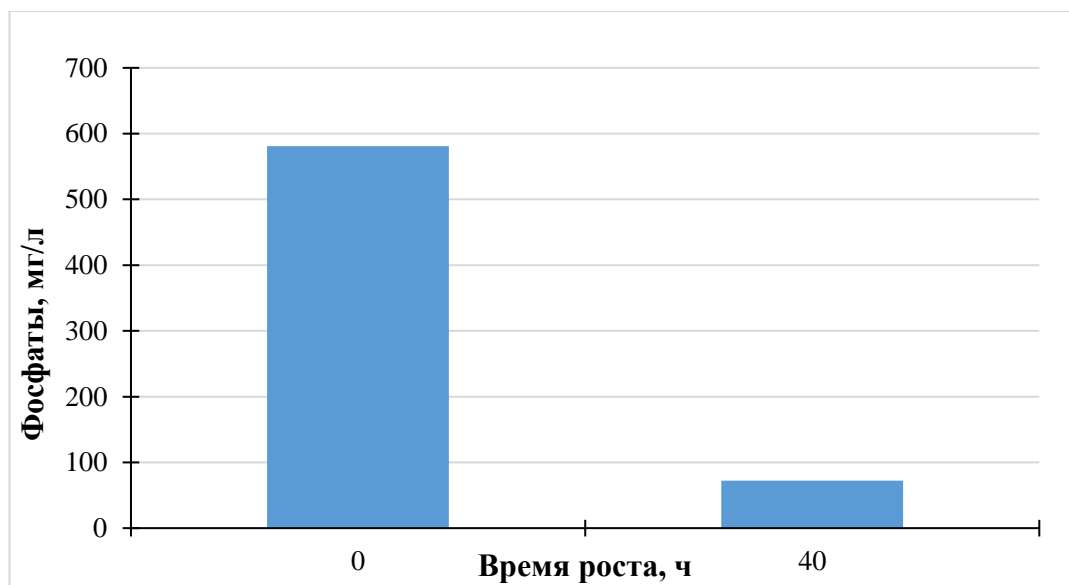


Рис 3.14. Содержание остаточных сахаров в начале и конце процесса в культуральной жидкости для рабочего ферментера 2

Таблица 3.4.

Результаты анализов в процессе синтеза треонина в рабочем ферментере 5

Время роста, ч	Азот, %	Треонин, г\л	Сухие вещества (реф.), %	Оптическая плотность	Плотность, г\л	Глюкоза, г\л	Фосфаты, мг\л	Сухие вещества по ГОСТ, %
0	0,074		2,68	1,76		12,24	565,5	2,65
4	0,105		2,47	10,28	0,9882	3,46		
8	0,112		3,04	17,30	0,9897	2,49		
12	0,118	14,02	4,43	25,10	0,9919	1,10		
16	0,120	21,78	5,41	31,10	0,9930	0,76		
20	0,124	34,79	7,24	44,60	0,9942	0,51		
24	0,126	51,26	8,85	50,80	0,9955	0,40		
28	0,127	61,57	10,25	57,00	0,9961	0,24		
32	0,126	69,31	11,63	62,60	0,9970	0,19		
36	0,130	81,71	12,47	64,20	0,9974	0,13		
40	0,131	88,89	13,44	66,20	1,0012	0,09	92,6	13,40

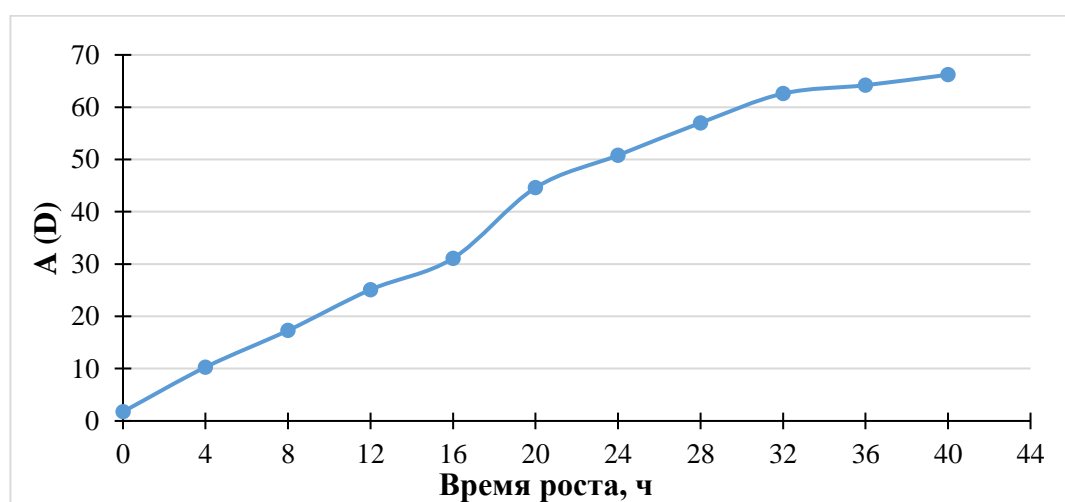


Рис. 3.15. Зависимость оптической плотности культуральной жидкости от времени в рабочем ферментере 5



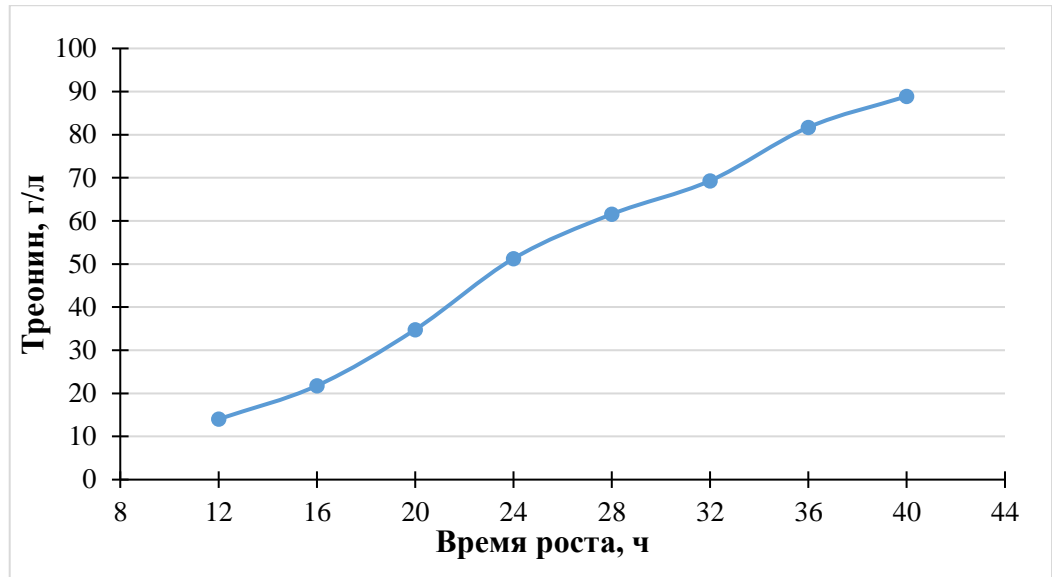


Рис. 3.16. Зависимость содержания треонина в культуральной жидкости от времени в рабочем ферментере 5

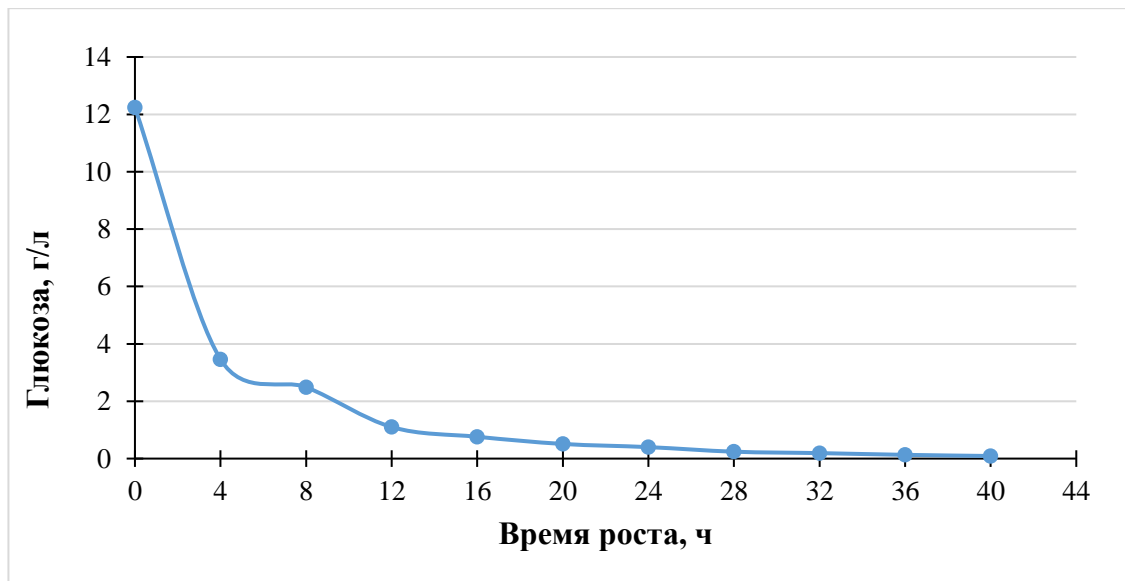


Рис. 3.17. Зависимость содержания остаточных сахаров в культуральной жидкости от времени в рабочем ферментере 5

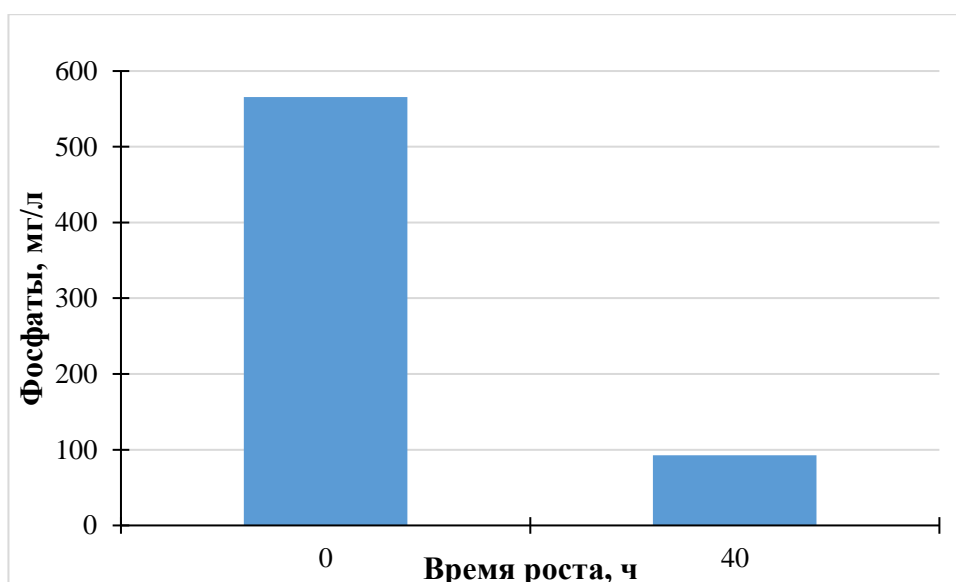


Рис 3.18. Зависимость содержания остаточных сахаров в начале и конце процесса в культуральной жидкости от времени для рабочего ферментера 5

Таблица 3.4.

Результаты анализов в процессе синтеза треонина в рабочем ферментере 6

Время роста, ч	Азот, %	Треонин, г\л	Сухие вещества (реф.), %	Оптическая плотность	Плотность, г\л	Глюкоза, г\л	Фосфаты, мг\л	Сухие вещества по ГОСТ, %
0	0,095		2,52	1,77		12,35	566,00	2,55
4	0,103		2,57	10,78	0,9898	4,69		
8	0,105		3,12	15,10	0,9902	4,38		
12	0,110	13,13	4,25	21,45	0,9910	3,19		
16	0,121	24,31	5,53	27,70	0,9922	2,18		
20	0,125	36,17	8,32	41,50	0,9935	1,54		
24	0,126	47,14	9,73	46,20	0,9946	1,04		
28	0,135	49,16	11,51	54,00	0,9958	1,00		
32	0,132	54,96	12,82	62,00	0,9963	0,81		
36	0,140	56,32	13,05	67,00	0,9970	0,80		
40	0,142	67,98	13,25	68,24	0,9992	0,21	113,20	13,20

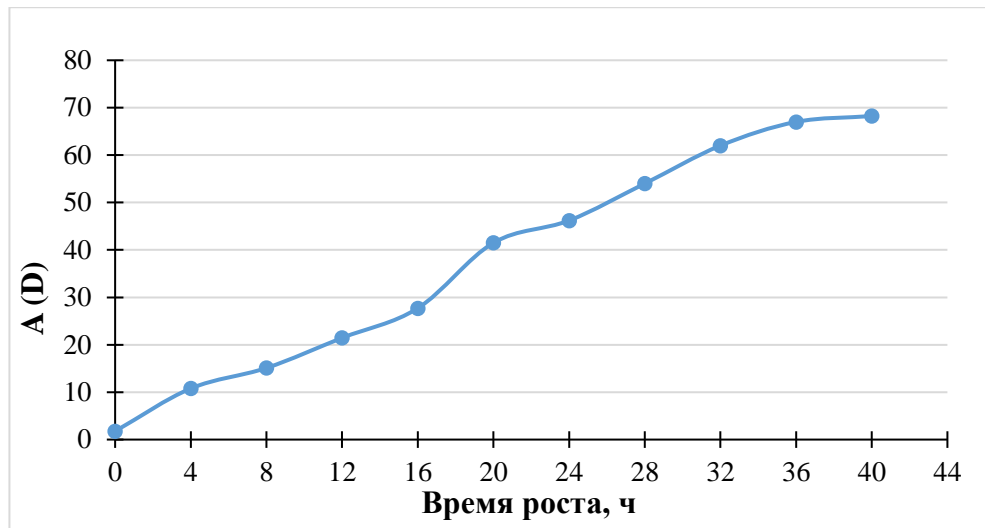


Рис. 3.19. Зависимость оптической плотности культуральной жидкости от времени в рабочем ферментере б

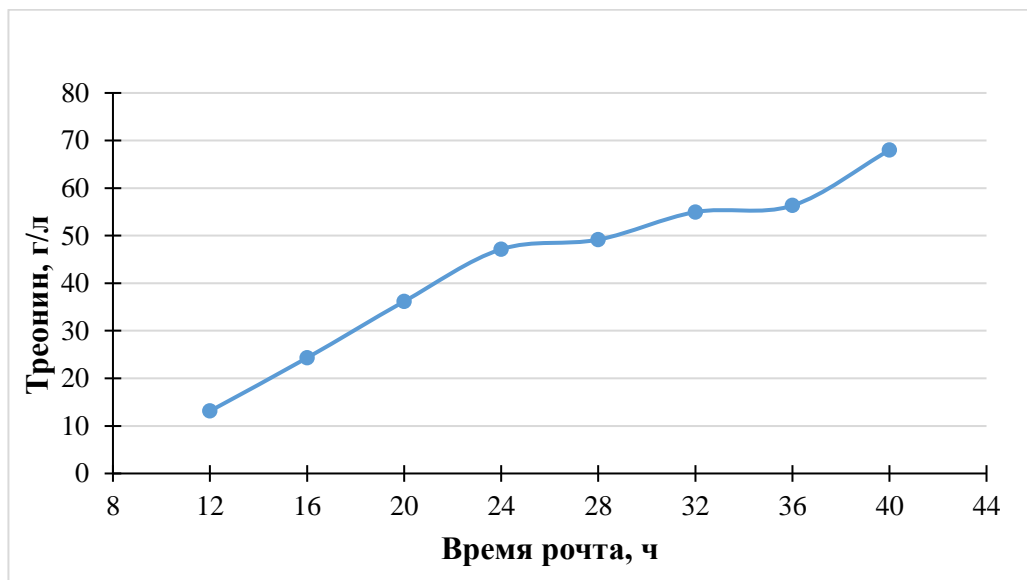


Рис. 3.20. Зависимость содержания треонина в культуральной жидкости от времени в рабочем ферментере б

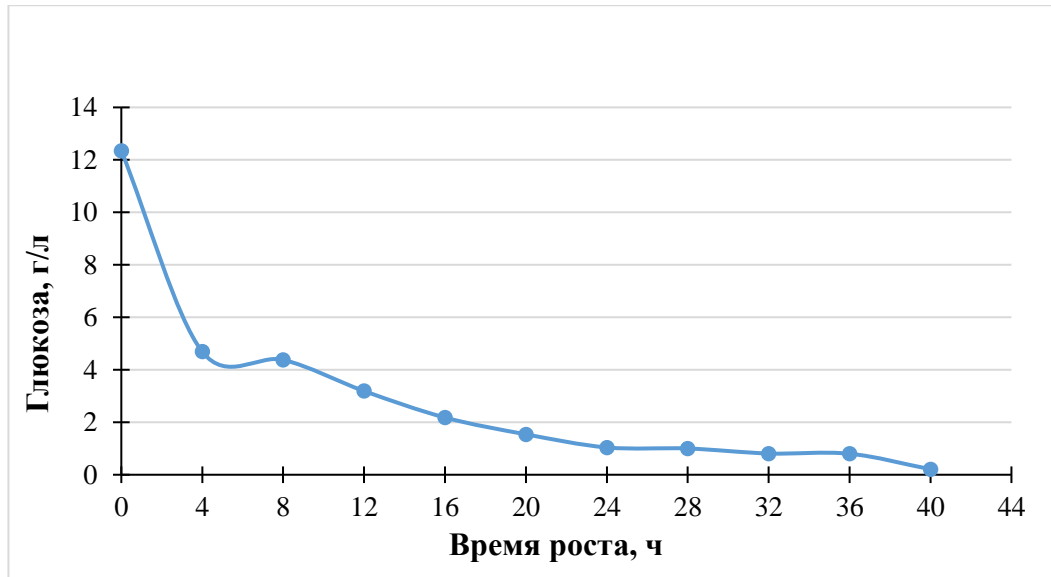


Рис. 3.21. Зависимость содержания остаточных сахаров в культуральной жидкости от времени в рабочем ферментере 5

Небольшой скачок роста глюкозы на рис 3.21 с 4 до 8 часов, говорит о накоплении глюкозы в ферментере и необходимости внести поправки в технологический процесс (уменьшение подачи глюкозной подпитки).

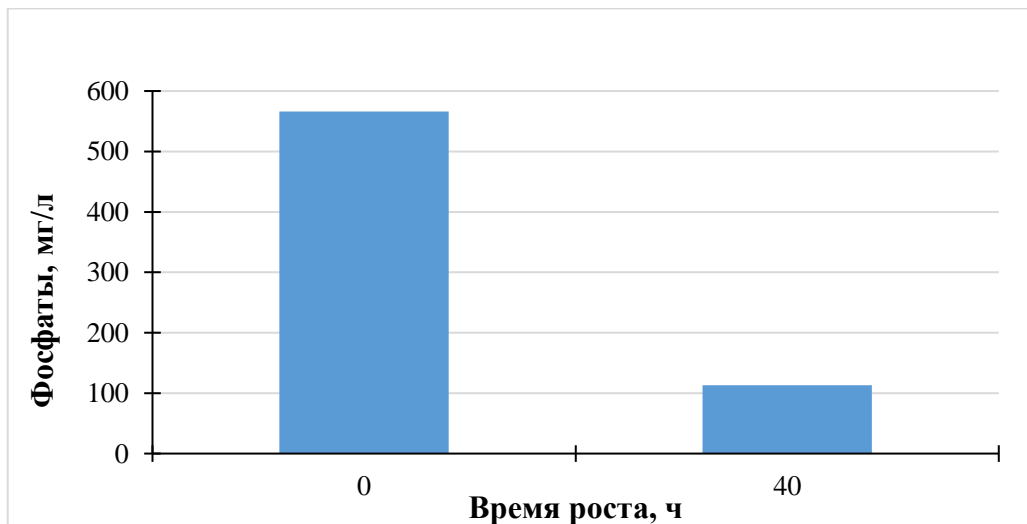


Рис 3.22. Зависимость содержания свободных фосфатов в начале и конце процесса в культуральной жидкости от времени для рабочего ферментера 6

Таким образом, на этапе экспериментальной отработки технологии получения треонина был отработан и аналитический контроль процесса. В ходе

процесса должен происходить монотонный рост содержания треонина. При соблюдении технологических параметров удалось достичь концентрации треонина в культуральной жидкости 90–100 г/л к концу процесса. Следующим этапом работы должна стать отработка процесса концентрирования и сушки культуральной жидкости.

## ВЫВОДЫ

1. Выявлены наиболее информативные химические анализы сопровождающие технологию получения треонина: в посевном ферментере – определение оптической плотности, концентрации глюкозы, в рабочем ферментере – концентрация треонина, глюкозы, оптической плотности.

2. В посевном ферментере уменьшение концентрации фосфатов, глюкозы, увеличение оптической плотности являются показателями роста биомассы для дальнейшего продуцирования треонина.

3. В рабочем ферментере контроль содержания глюкозы необходим для поддержания его на уровне не более 6 ммоль/л, что обеспечивает о эффективное продуцирование треонина.

4. При соблюдении технологических параметров процесса должен происходить монотонный рост концентрации треонина в культуральной жидкости. Удалось достичь концентрации треонина 90 – 100 г/л к концу процесса.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Северин Е. С. Биохимия: учеб. пособие . М.: Медиа, 2003. 779 с.
2. Рубан Е.Л. Биосинтез аминокислот организмами. М.: Наука, 1968. 412 с.
3. Karau A., Grayson I. Amino Acids in Human and Animal Nutrition. In: Zorn H., Czermak P. (eds) Biotechnology of Food and Feed Additives. ABE, V.143. 2014. Springer, Berlin, Heidelberg. P.228.
4. Debabov V.G. The Threonine Story. In: Microbial Production of L-Amino Acids/ ABE, V.79, 2002. Springer, Berlin, Heidelberg. P.113–136.
5. Тюкавкина Н.А., Зурабян С.Э., Белобородов В.Л. и др Органическая химия: учеб.для вузов: В 2 кн. Кн. 2: Специальный курс/под. ред. Н.А. Тюкавкиной . 2-е изд. М.: Дрофа, 2009. 595 с.
6. Тюкавкина Н.А., Бауков Ю.И. Биоорганическая химия: учеб.для вузов. М.: Дрофа, 2004. 544 с.
7. Березов Т.Т., Коровкин Б. Ф. Биологическая химия. М.: Медицина, 2004. 704 с.
8. Кучеренко Н.Е., Бабенюк Ю.Д., Васильев А.Н. и др. Биохимия: Учебник. К.: Вища школа, 1988 С.84.
9. Компендиум 2013 – лекарственные препараты / Под ред. В. Н. Коваленко. К.: Морион. ISBN: 978-966-2066-51-7. 1920 с.
10. Горчакова Н.А., Гудивок Я.С., Гунина Л.М. и др. Фармакология спорта / под общ. ред. С.А. Олейника, Л.М. Гуниной, Р.Д. Сейдуллы. К.: Олимпийская лит-ра, 2010. 640 с.
11. Sung-Jin Jo., Maeda M., Toshihiko O. Production System for Biodegradable Polyester Polyhydroxybutyrate by *Corynebacterium glutamicum*// J. Biosci. Bioeng. 2006. V.102. P.33.
12. Стеценко О.В., Виноградова Р.П. Биоорганическая химия: Учеб.пособ. К.:Вища школа, 1992. 327 с.
13. Бекер М.Е., Лиепиньш Г.К., Райпулис Е.П.. Биотехнология. М.: ВО Агропромиздат, 1990. 265 с.

14. Sang Yup Lee, Jin Hwan Park. Integration of Systems Biology with Bioprocess Engineering: L-Threonine Production by Systems Metabolic Engineering of *Escherichia Coli* //Adv. Biochem. Engin./ Biotechnol. V.120. 2010. P.1–19.
15. Ning Chen, Jin Huang , Zhi-bin Feng , Lei Yu,,Qing-yang Xu, Ting-yi Wen. Optimization of Fermentation Conditions for the Biosynthesis of L-Threonine by *Escherichia coli*.// Appl. Biochem. Biotechnol.2009. V.158. P.595–604.
16. Пат. 2402610 Российская Федерация, МПК<sub>51</sub> С 12 Р 13/08, А 23 К 1/00. Способ получения L-треонина / Като Наото, Кояма Наото, Цудзи Юитиро, Дзое Юдзи; заявитель и патентообладатель Адзиномото Ко., Инк. – № 2008103198/13; заявл. 29.06.06; опубл. 10.08.09, Бюл. № 22.
17. Волынец В.Ф., Волынец М.П. Аналитическая химия азота. М.: Наука, 1977. 307 с.
18. Федоров А.А., Черняховская Ф.В. и др. Аналитическая химия фосфора. М.: Наука, 1974. 250 с.
19. Массовая концентрация фосфатов и полифосфатов в водах. Методика выполнения измерений фотометрическим методом. РД 52.24.382–2006 (Росгидромет).–Ростов-на-Дону, 2006.
20. Филиппович Ю.Б. и др. Практикум по общей биохимии.М.: Просвещение, 1982. 311 с.
21. Плешков Б.П. Практикум по биохимии растений. М.: Колос, 1985. 255 с.
22. Коренман Я.И. Практикум по аналитической химии. Анализ пищевых продуктов. Воронеж: Воронежская гос. технол. академия, 2002.408 с.
23. Беликов В.Г. Фармацевтическая химия. М.: МЕДпрессинформ, 2007. 624 с.
24. Межгосударственный стандарт ГОСТ 32195–2013 (ISO 13903:2005). Корма, комбикорма. Метод определения содержания азота.– М.: Стандартиформ, 2014.



25. Межгосударственный стандарт ГОСТ 34230–2017. Продукция соковая. Определение свободных аминокислот методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.– М.: Стандартинформ, 2018.
26. Межгосударственный стандарт ГОСТ 33428–2015 (ISO 17180:2013). Корма, премиксы. Определение содержания лизина, метионина и треонина.– М.: Стандартинформ, 2016.
27. Государственный стандарт Российской Федерации ГОСТ Р 51417-99 (ИСО 5983:1997). Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Определение массовой доли азота и вычисление массовой доли сырого протеина. Метод Къельдаля.– М.: Госстандарт России, 2002.
28. Межгосударственный стандарт ГОСТ 13496.3-92 (ИСО 6496-83). Комбикорма, комбикормовое сырье. Методы определения влаги.– М.: Стандартинформ, 2011.
29. Межгосударственный стандарт ГОСТ 13496.21-87. Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Методы определения лизина и триптофана.– М.: Стандартинформ, 2011.
30. Национальный стандарт Российской Федерации ГОСТ Р 53883-2010 (DIN 10758:1997). Метод определения сахаров.– М.: Стандартинформ, 2011.
31. Межгосударственный стандарт ГОСТ 3900-85. Нефть и нефтепродукты. Методы определения плотности (с изменением № 1, с поправкой).– М.: Стандартинформ, 2011.
32. Межгосударственный стандарт ГОСТ 5900-2014. Кондитерские изделия. Методы определения влаги и сухих веществ.– М.: Стандартинформ, 2011.