

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
ФГАОУ ВО «Северо-Кавказский федеральный университет»

**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ДЛЯ ВЫПОЛНЕНИЯ ЛАБОРАТОРНЫХ
РАБОТ ПО ДИСЦИПЛИНЕ ОСНОВЫ ПРОМЫШЛЕННОЙ
БИОТЕХНОЛОГИИ (ЧАСТЬ 1)**

Направление подготовки
Профиль

19.03.01 – Биотехнология
Промышленная биотехнология

Ставрополь

2026

В методических указаниях к лабораторным занятиям по дисциплине «Основы промышленной биотехнологии» для студентов направления 19.03.01 Биотехнология приведены методы анализа ассимиляции различных углеводов культурами дрожжей, исследования влияния физико-химических факторов внешней среды на ростовые процессы микроорганизмов. Представлены способы лабораторного культивирования дрожжей и молочнокислых микроорганизмов, методики количественного учета биомассы микроорганизмов и определения целевых продуктов микробного синтеза и ферментативного катализа.

Методические указания соответствуют программе дисциплины «Основы промышленной биотехнологии».

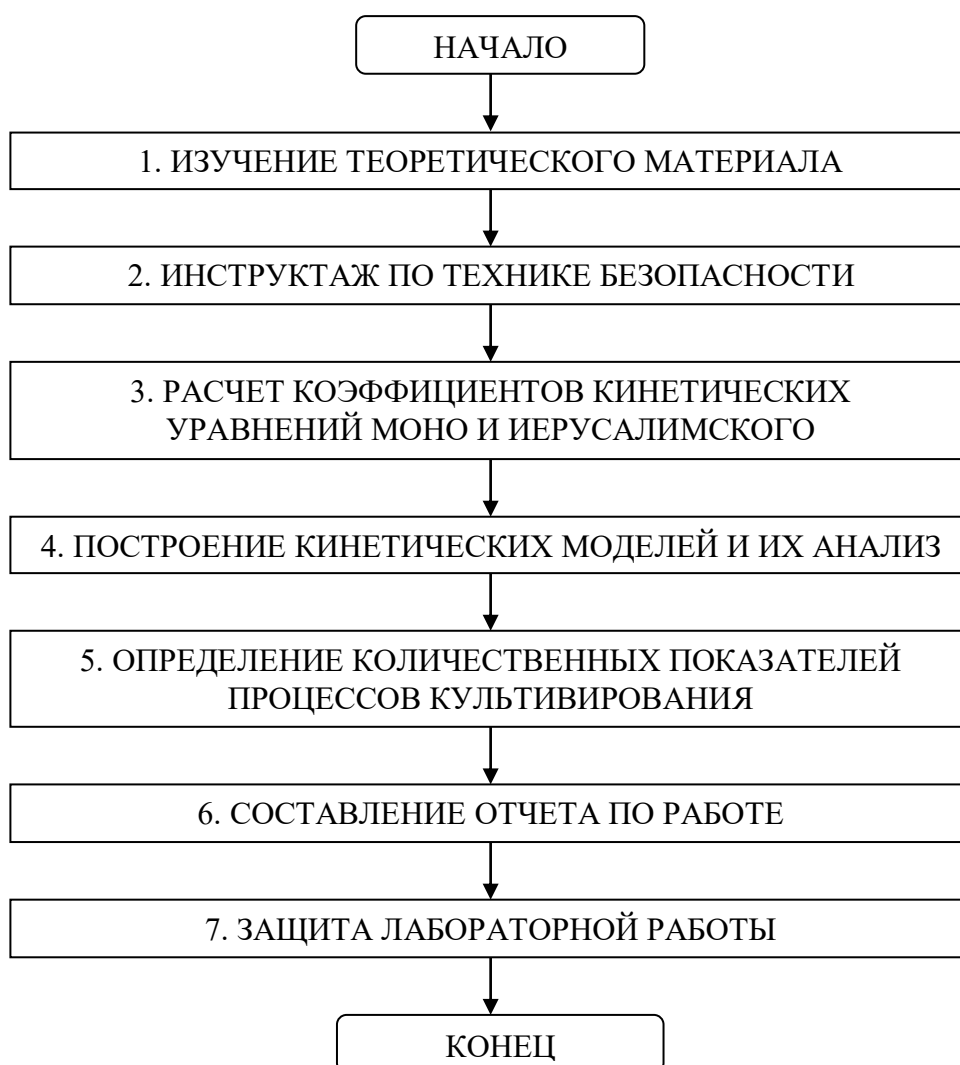
Составители: заведующий кафедрой прикладной биотехнологии,
д-р техн. наук Лодыгин А. Д.
ассистент кафедры прикладной биотехнологии
Гарибян Л.В.

Рецензент – профессор, д-р техн. наук Рябцева С. А.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 1
ИЗУЧЕНИЕ КИНЕТИЧЕСКИХ ЗАКОНОМЕРНОСТЕЙ
РОСТА МИКРООРГАНИЗМОВ

Цель работы: изучить общие принципы моделирования ростовых процессов, влияние концентраций субстрата и продуктов метаболизма на удельную скорость роста; рассчитать коэффициенты кинетических моделей роста микроорганизмов; определить количественные показатели процессов культивирования.

АЛГОРИТМ ПРОВЕДЕНИЯ РАБОТЫ



Блок 1. В промышленной биотехнологии огромное значение имеют процессы культивирования микроорганизмов, включающие в качестве основной стадии рост и размножение культуры. Для количественного описания таких процессов проводятся исследования по кинетике накопления биомассы или целевых продуктов.

Основной задачей подобных исследований является получение кинетической модели, отражающей функциональную зависимость *удельной скорости роста* микроорганизмов (μ) от концентрации субстрата (S) или продуктов метаболизма (P).

Наиболее простые модели основаны на количественном описании логарифмической фазы роста микроорганизмов, которую можно выразить экспоненциальными функциями различной степени сложности. Вводя понятие предельной концентрации микроорганизмов $[X_\infty]$, данный участок S-образной кривой роста можно описать уравнением общего вида:

$$[X] = [X_\infty] / (1 + \exp(K_0 + K_1 * \tau + K_2 * \tau^2 + \dots + K_n * \tau^n)) \quad (1),$$

где $[X]$ - концентрация микроорганизмов, г/л;

τ - продолжительность культивирования, ч;

$K_0, K_1, K_2, \dots, K_n$ – эмпирические константы.

Общие недостатки такого подхода к описанию кривой роста заключаются в том, что константы уравнения (1) не имеют физического смысла, могут быть найдены только по результатам конкретного эксперимента и, как следствие, применимы в строго ограниченной области.

Значительно большее распространение получила модель экспоненциального роста, исходящая из следующих положений:

- увеличение численности популяции микроорганизмов есть результат актов удвоения каждой особи, которая делится через определенные промежутки времени g (*время генерации*);
- рост, развитие и деление любой клетки происходит независимо от других микроорганизмов;

- в некоторых пределах изменение концентрации компонентов питательной среды не влияет на время генерации, которое определяется только типом микроорганизмов и условиями культивирования.

Данная модель описывается уравнениями вида:

$$[X] = [X_0] * 2^{\tau / g} \quad (2),$$

$$\ln ([X] / [X_0]) = \ln 2 * \tau / g = \mu * \tau \quad (3).$$

Таким образом, рассматриваемая модель устанавливает функциональную зависимость текущей концентрации микроорганизмов от удельной скорости роста, которая, в свою очередь, обратно пропорциональна времени генерации. Вместе с тем, очевидно, что данная модель соответствует лишь процессу размножения бактерий, поскольку другие микроорганизмы способны увеличивать биомассу отличными от рассмотренной схемы способами. Тем не менее, если концентрацию микроорганизмов выражать через количество абсолютно сухой биомассы (АСБ) в единице объема, экспоненциальная модель достоверно описывает все варианты размножения, характерные для дрожжей и мицелиальных культур.

Экспоненциальная модель роста предполагает отсутствие функциональной зависимости между концентрацией источников углерода, энергии, других компонентов питательной среды и удельной скоростью роста; в то же время, результаты многочисленных экспериментальных исследований подтверждают наличие подобной взаимосвязи. В связи с этим, ряд исследований по кинетике роста микроорганизмов был посвящен установлению влияния концентрации питательных веществ в среде на интенсивность развития культуры.

Решение данной задачи осложнено тем, что используемые в биотехнологии питательные среды являются многокомпонентными и сбалансированными по составу, то есть содержащими источники углерода, азота, фосфора, кислорода, макро- и микроэлементов в таком качественном и количественном соотношении, которое обеспечивает рост и развитие культуры. Однако скорость размножения клеток даже при использовании сбалансированной среды ограничивается концентрацией одного из компонентов среды, определяющего интенсивность

протекания ключевых реакций («узкого места») метаболизма клетки. Данный компонент принято называть лимитирующим субстратом.

Наиболее широко используемая модель, количественно описывающая влияние концентрации лимитирующего субстрата S на скорость роста культуры, была дана в работах Моно. Используя экспериментальные данные о влиянии потребления субстрата на прирост биомассы, Моно предложил уравнение, носящее в настоящее время его имя:

$$\mu = \mu_{\max} * [S] / (K_s + [S]) \quad (4),$$

где $\mu_{\max}$ – значение удельной скорости роста, максимальное при развитии культуры на данном субстрате, 1/с;

K_s – константа, численно равная концентрации субстрата, при которой удельная скорость роста составляет $\mu = \mu_{\max} / 2$, г/л.

Уравнение Моно дополняет экспоненциальную модель роста, выявляя зависимость между текущими значениями концентраций биомассы и лимитирующего субстрата:

$$d[X] / d\tau = \mu * [X] = \mu_{\max} * [X] * [S] / (K_s + [S]) \quad (5).$$

Уравнение Моно послужило основой для разработки ряда моделей, учитывающих влияние концентрации компонентов питательной среды на скорость роста микроорганизмов. Наиболее распространенными из них являются:

- модель Мозера

$$\mu = \mu_{\max} * [S]^n / (K_s + [S]^n) \quad (6),$$

- модель Андрюса:

$$\mu = \mu_{\max} [S] / (K_s + [S] + (S^2/K_i)) \quad (7),$$

- модель Перта:

$$\mu = \mu_0 + \mu_1 [S] / (K_s + [S]) \quad (8)$$

Графическая интерпретация уравнений Моно, Мозера и Андрюса представлена в приложении 1.

Общим недостатком экспоненциальной модели в варианте, использующем уравнение Моно, является ее пригодность только для описания процессов непрерывного культивирования. При описании этим уравнением данных по

периодическому культивированию было установлено, что удельная скорость роста в течении длительных промежутков времени не зависит от концентрации субстрата, а фаза торможения роста, как правило, обусловлена накоплением в среде продуктов метаболизма.

В связи с этим, ряд кинетических моделей основан на рассмотрении влияния концентрации продуктов метаболизма отдельно или совместно с концентрацией лимитирующего субстрата на удельную скорость роста. Графическая интерпретация наиболее распространенных из них представлена в приложении 1.

Н.Д. Иерусалимский предложил использовать для описания экспериментальных данных по торможению роста микроорганизмов продуктами метаболизма зависимость, аналогичную уравнению Михаэлиса - Ментен, используемого при анализе кинетики ферментативных реакций:

$$\mu = \mu_{\max} * K_p / (K_p + [P]) \quad (9).$$

Данное уравнение достаточно широко используется для интерпретации данных по периодическому культивированию. В случаях, когда ограничиться учетом действия продуктов, пренебрегая ролью субстрата, невозможно, используют уравнение Моно – Иерусалимского:

$$\mu = \mu_{\max} * K_p * [S] / ((K_s + [S]) * (K_p + [P])) \quad (10).$$

Данное уравнение позволяет оценить совместное влияние на рост культуры субстрата и продуктов метаболизма, основываясь на экспоненциальной модели роста и современных представлениях о кинетике ферментативного катализа. Однако сложная схема определения констант $\mu_{\max}$, K_p , K_s существенно ограничивает практическое использование уравнения Моно – Иерусалимского, тогда как уравнение Моно в настоящее время является основой для оценки общих кинетических закономерностей роста микроорганизмов. В частности, влияние условий культивирования (рН, температуры, интенсивности аэрации и других факторов), как правило, оценивают по изменению констант уравнения Моно.

Блок 3. Для определения коэффициентов кинетических моделей используют данные кинетических экспериментов, приведенные в приложении 2. Расчет констант проводится методом наименьших квадратов, для чего уравнения

кинетических моделей преобразуют к регрессионным зависимостям. Например, уравнение Моно в данном случае примет вид:

$$1 / \mu = (1 / \mu_{\max}) + (K_s / \mu_{\max}) * (1/S) \quad (11).$$

Обозначив $1 / \mu = Y$; $1 / \mu_{\max} = B_0$; $K_s / \mu_{\max} = B_1$; $1/S = X$; получим линейное регрессионное уравнение вида:

$$Y = B_0 + B_1 * X \quad (12).$$

Коэффициенты уравнения (11) рассчитывают по формулам:

$$B_0 = (\Sigma Y_i * \Sigma (X_i^2) - \Sigma X_i * \Sigma (X_i * Y_i)) / \Delta \quad (13),$$

$$B_1 = (N * \Sigma (X_i * Y_i) - \Sigma X_i * \Sigma Y_i) / \Delta \quad (14),$$

где N - число опытов;

$$\Delta = N * \Sigma (X_i^2) - (\Sigma X_i)^2 \quad (15).$$

Аналогичные преобразования проводят с уравнением Иерусалимского и с помощью формул (12), (13) и (14) определяют константы $B_0' = 1 / \mu_{\max}'$ и $B_1' = 1 / (\mu_{\max}' * K_p)$.

Блок 4. По результатам расчета кинетических коэффициентов уравнений Моно и Иерусалимского строят графические зависимости, отражающие влияние концентрации лимитирующего субстрата и продуктов метаболизма на рост культуры.

Блок 4. По данным приложения 3 проводят расчет количественных показателей процессов культивирования по схеме, представленной в таблице 1.

Таблица 1. – Расчет количественных показателей процессов культивирования.

Показатель	Обозначение, размерность	Расчетная формула
1	2	3
Удельная скорость роста	X , 1/ч	$\mu = (X_1 - X_0) / (X_1 * \tau)$
Коэффициент разбавления ^(*)	D , 1/ч	$D = \mu$
Продуктивность по биомассе	Q_x , г/(л*ч)	$Q_x = (X_1 - X_0) / \tau$
Продуктивность по продукту	Q_p , г/(л*ч)	$Q_p = (P_1 - P_0) / \tau$
Удельная скорость потребления субстрата	q_s , г/(г*ч)	$q_s = (S_0 - S_1) / (X_1 * \tau)$

продолжение таблицы 1

1	2	3
Удельная скорость образования продукта	q_p , г/(г*ч)	$q_p = (P_1 - P_0) / (X_1 * \tau)$
Выход биомассы из субстрата (экономический коэффициент)	$Y_{x/s}$, г/г	$Y_{x/s} = \mu / q_s = (X_1 - X_0) / (S_0 - S_1)$
Выход продукта из субстрата	$Y_{p/s}$, г/г	$Y_{p/s} = q_p / q_s = (P_1 - P_0) / (S_0 - S_1)$

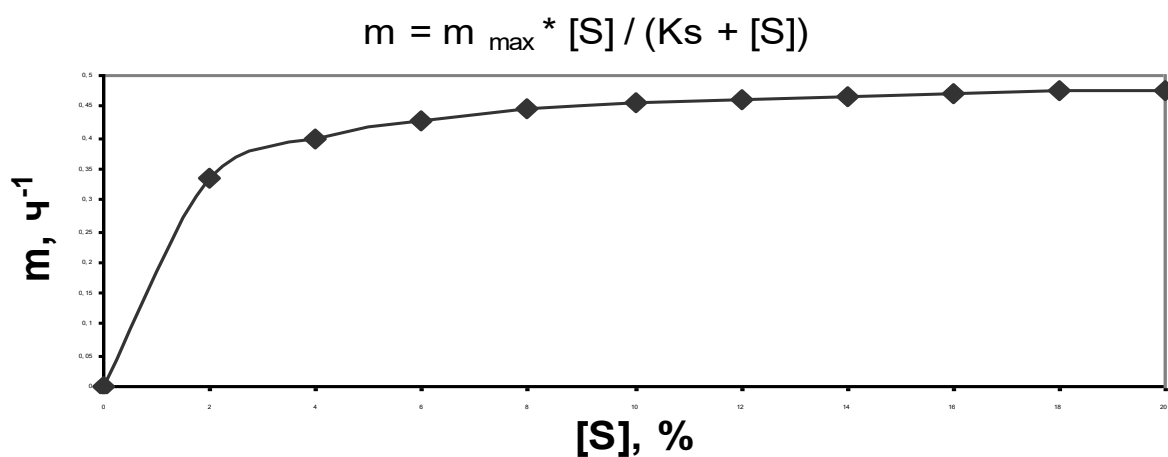
(* - для непрерывного процесса.

Блок 5. Отчет о работе должен включать:

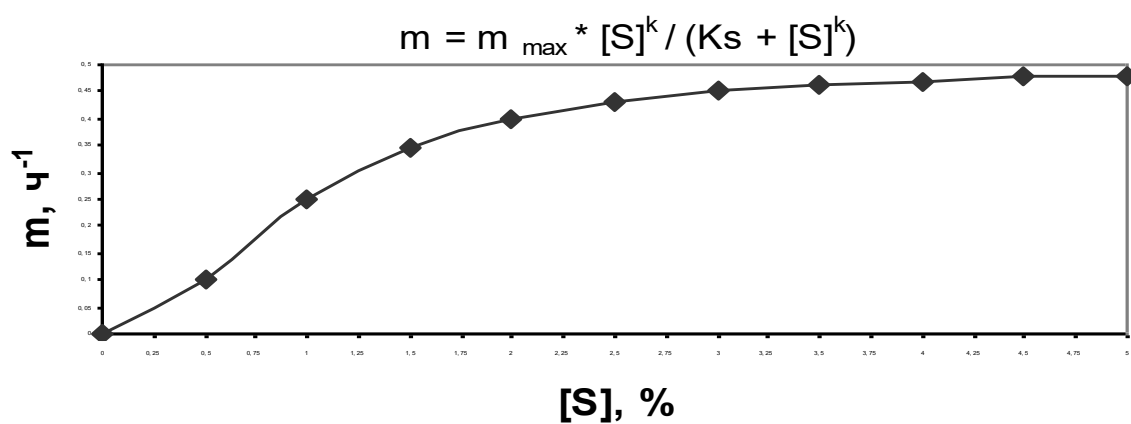
- титульный лист;
- цель работы и алгоритм выполнения;
- краткое теоретическое обоснование;
- расчет коэффициентов кинетических уравнений;
- графическую интерпретацию кинетических моделей;
- расчет показателей процессов культивирования;
- выводы.

Блок 6. Контрольные вопросы:

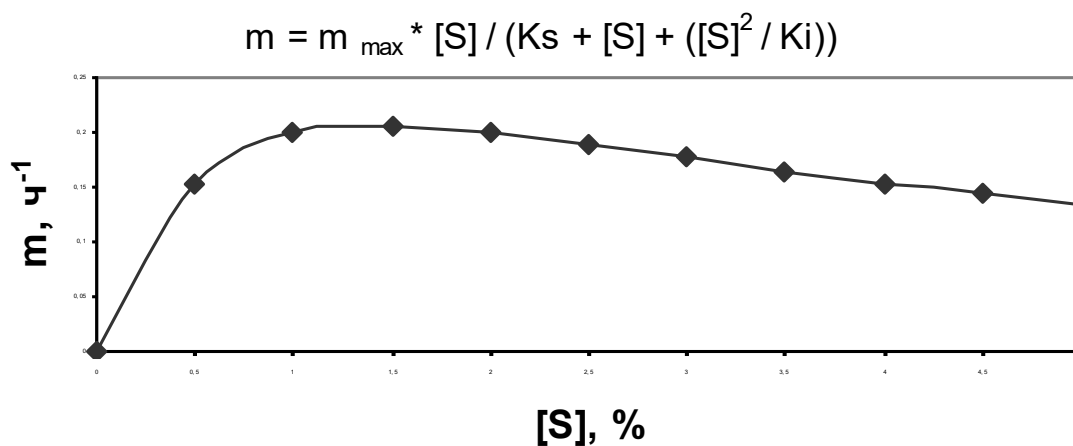
- экспоненциальная модель роста, ее математическое выражение;
- модели Моно, Андрюса, Мозера, Перта, их математическое выражение и графическая интерпретация;
- модели, основанные на зависимости удельной скорости роста от концентрации продуктов метаболизма;
- уравнение Моно - Иерусалимского, модели, учитывающие совместное влияние субстрата и продуктов метаболизма на удельную скорость роста;
- схема расчета кинетических коэффициентов уравнений Моно и Иерусалимского;
- количественные показатели процессов культивирования.



а)

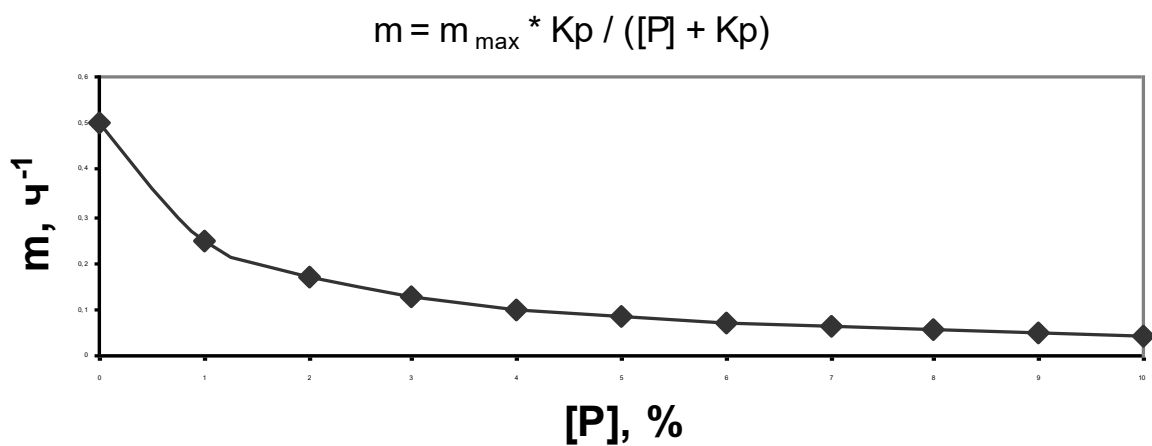


б)

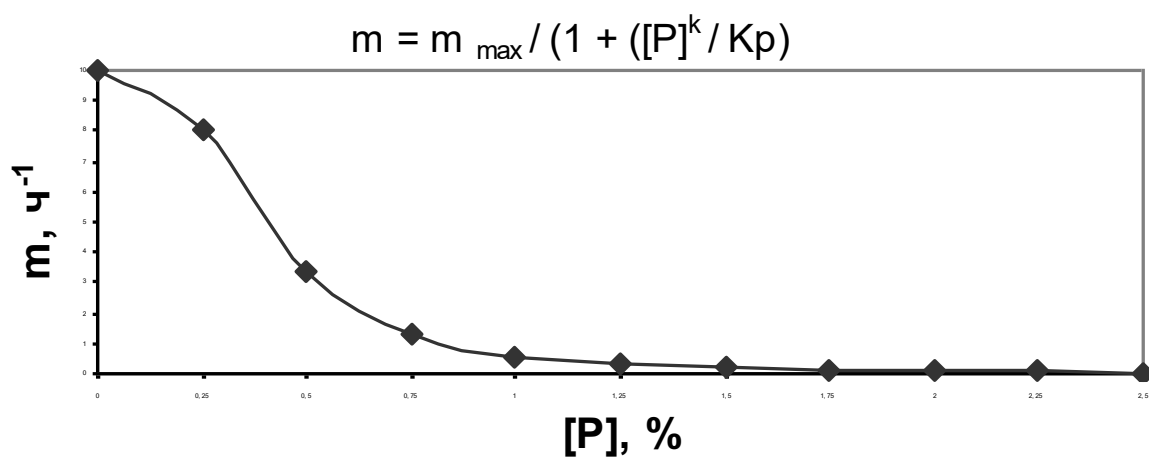


в)

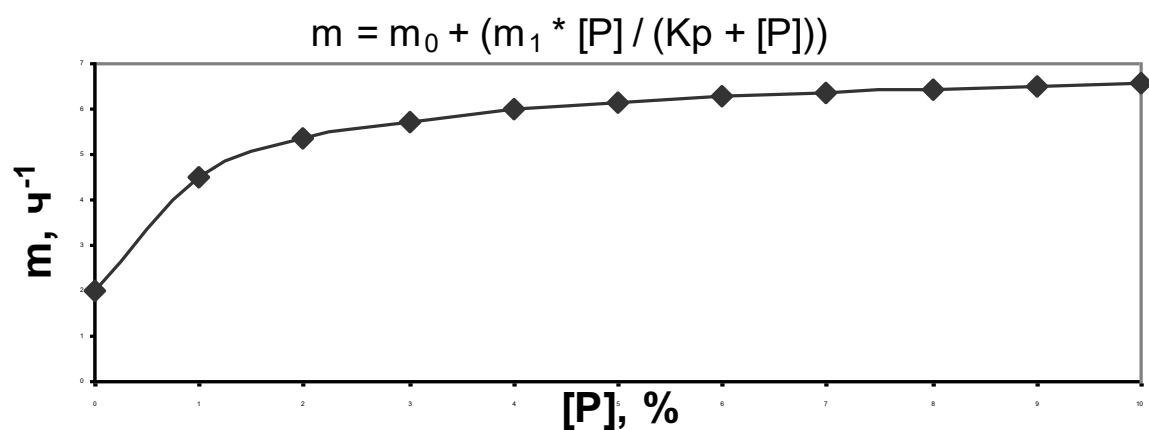
Рисунок 1 – Кинетические модели роста, учитывающие влияние концентрации питательного субстрата на удельную скорость роста: а) модель Моно, б) модель Мозера, в) модель Андрюса.



а)



б)



в)

Рисунок 2 – Кинетические модели роста, учитывающие влияние концентрации продуктов метаболизма на удельную скорость роста: а) модель Иерусалимского, б) модель Бергтера, в) стимулирующий продукт.

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

№ варианта	Микроорганизм	Субстрат	Продукт	Данные кинетических экспериментов для уравнения			
				Моно		Иерусалимского	
				μ, 1/ч	S, г/л	μ, 1/ч	P, г/л
1	Saccharomyces cerevisiae	Глюкоза	Этанол	0,12	40	0,19	130
				0,28	80	0,24	90
				0,31	120	0,35	65
2	Candida utilis	Этанол	Уксусная к-та	0,27	55	0,27	145
				0,59	85	0,35	110
				0,68	115	0,69	75
3	Aspergillus niger	Фруктоза	Лимонная к-та	0,06	20	0,06	40
				0,12	35	0,07	25
				0,14	50	0,11	10
4	Penicillium chrysogenum	Фруктоза	Пенициллин	0,03	10	0,03	75
				0,11	20	0,05	40
				0,14	30	0,11	5
5	Bacillus subtilis	Крахмал	Интерферон	0,09	1	0,23	28*10 ⁻³
				0,58	5	0,34	15*10 ⁻³
				0,75	9	0,68	2*10 ⁻³
6	Streptomyces griseus	Глюкоза	Пенициллин	0,04	28	0,02	55
				0,09	38	0,04	30
				0,11	48	0,09	5
7	Brevibacterium flavum	Глюкоза	Глютаминная к-та	0,03	34	0,02	26
				0,18	37	0,07	15
				0,22	40	0,23	4
8	Bacillus megaterium	Сахароза	Аланин	0,04	16	0,03	8,5
				0,09	26	0,05	4,5
				0,11	36	0,14	0,5
9	Clostridium acetobutylicum	Глюкоза	Бутанол	0,04	18	0,04	4,8
				0,09	38	0,06	2,8
				0,11	58	0,11	0,8
10	Blakeslea trispora	Белок	Каротин	0,06	14	0,05	0,45
				0,13	27	0,08	0,25
				0,16	40	0,19	0,05
11	Lactobacillus bulgaricus	Лактоза	Молочная к-та	0,11	4,5	0,12	80
				0,21	10	0,15	100
				0,24	15,5	0,24	120
12	Propionibacterium shermanii	Молочная к-та	Пропионовая к-та	0,23	60	0,42	2,5
				0,39	75	0,27	5,0
				0,43	90	0,23	7,5

ПРИЛОЖЕНИЕ 3

№ вари- анта	Концентрация, г/л					Продолжитель- ность культивирования, τ, ч
	биомассы		субстрата		продукта	
	X ₀	X ₁	S ₀	S ₁	P ₁	
1	0,5	2,5	130,0	35,3	140,6	48
2	1,0	11,5	35,5	8,3	152,3	72
3	0,25	12,8	100,0	45,7	39,6	50
4	0,5	5,4	32,5	10,3	78,4	90
5	0,15	4,9	10,0	0,7	0,03	96
6	2,5	23,3	45,0	17,8	6,2	84
7	0,3	3,1	45,0	32,5	27,5	64
8	0,45	9,3	40,0	15,4	9,4	60
9	0,55	2,5	82,5	26,8	4,2	50
10	0,2	4,3	42,0	12,6	0,53	78
11	0,5	0,75	150,0	20,0	115,5	120
12	1,0	1,65	85,5	61,4	6,5	168

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 2

ИЗУЧЕНИЕ СТЕХИОМЕТРИИ ФЕРМЕНТАЦИОННЫХ ПРОЦЕССОВ И МЕТОДОВ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

Цель и содержание работы: изучить принципы стехиометрии ферментационных процессов и расчета выхода биомассы из углеродного субстрата, методы культивирования микроорганизмов; исследовать в экспериментальных условиях процессы периодического и полунепрерывного культивирования дрожжей.

Теоретическое обоснование.

Разница между стехиометрией химических и микробиологических процессов состоит в том, что наряду с веществами, имеющими определенную химическую формулу, учитывается биомасса, состоящая из ряда индивидуальных веществ (белков, нуклеиновых кислот, липидов и т. д.). Все эти вещества записывают целой совокупностью. Отсюда следует, что точной «формулы» биомассы нет. Однако для работы со стехиометрическим уравнением и подбора коэффициентов необходим эмпирический вид «формулы» биомассы. За основу такой формулы выбран элементный состав основных таксономических групп микроорганизмов. Данный подход основан на том, что содержание химических элементов в микроорганизмах практически постоянно (таблица 2. 1).

Таблица 2. 1 – Элементный состав биомассы микроорганизмов

Микроорганизмы	Элементный состав, %						
	С	N	O	H	P	S	Зола
Дрожжи	47,0	7,5	30,0	6,5	1,5	1,0	6,5
Бактерии	53,0	12,0	20,0	7,0	3,0	1,0	4,0
Грибы	48,0	5,0	30,0	7,0	3,5	1,0	5,5

Разделив массу каждого элемента в 100 г биомассы (% , г/100 г) на его атомную массу, получим количество грамм-атомов в 100 г абсолютно сухой биомассы.

Это позволяет записать упрощенную эмпирическую формулу приведенного элементарного состава биомассы: для дрожжей $C_{3,92}H_{6,5}O_{1,88}N_{0,54}P_{0,05}S_{0,03}$, для бактерий $C_{4,42}H_{7,0}O_{1,25}N_{0,86}P_{0,1}S_{0,03}$, для грибов $C_{4,00}H_{7,0}O_{1,88}N_{0,36}P_{0,12}S_{0,03}$.

В стехиометрических расчетах обычно пренебрегают элементами, составляющими малую часть состава биомассы (сера, зольные элементы) и используют формулу биомассы микроорганизмов, приведенную к одному моль углерода (С-моль), Данная формула получила название брутто-формулы биомассы микроорганизмов: для дрожжей $CH_{1,66}O_{0,48}N_{0,14}P_{0,01}$, для бактерий $CH_{1,58}O_{0,28}N_{0,19}P_{0,02}$, для грибов $CH_{1,75}O_{0,47}N_{0,09}P_{0,03}$.

При проведении стехиометрических расчетов ферментационных процессов наибольший интерес с учетом выхода представляет углеродный субстрат как самый дорогостоящий.

В качестве углеродного субстрата могут использоваться различные вещества: глюкоза, крахмал, этанол, метанол, парафины нефти (н-алканы), метан и другие. Эти вещества можно также пересчитать на С-моль. Рассчитав молекулярную массу С-моля субстрата и сравнив ее с массой С-моля биомассы, можно найти теоретический выход биомассы, при условии, что весь углерод субстрата перейдет в углерод биомассы (таблица 2. 2).

Таблица 2. 2 – Расчет стехиометрического выхода биомассы для различных субстратов

Субстрат	Химическая формула	Молекулярная масса субстрата	Молекулярная масса С-моля субстрата	Стехиометрический выход биомассы	Фактический выход биомассы, г/г
Глюкоза	$C_6H_{12}O_6$	180	30	0,82	0,5
Крахмал	$(C_6H_{12}O_6)_n$	$180n$	30	0,82	0,5
Целлюлоза	$(C_6H_{12}O_6)_n$	$180n$	30	0,82	0,5
Этанол	C_2H_5OH	46	23	1,07	0,75
Метанол	CH_3OH	32	32	0,77	0,5
Парафины (н-алканы)	$(CH_2)_nH_2$	$14n+2$	14	1,76	1,0
Метан	CH_4	16	16	1,54	0,62

Для всех субстратов теоретический (стехиометрический) выход биомассы меньше фактически измеренного в реальных процессах культивирования микроорганизмов выхода. Чтобы объяснить эти расхождения, ввели понятие «энергетический выход» биомассы. Это понятие базируется на том, что в каждом субстрате заключена энергия, которая зависит от *степени восстановленности* субстрата γ_s которую легко определить, если известна формула вещества. При этом, как и в биомассе, учитывают основные элементы – углерод, водород, кислород и азот. Обобщенная формула субстрата – $C_mH_nO_pN_q$.

Степень восстановленности зависит от числа так называемых «доступных электронов», или «редоксонов». Принимают, что один атом углерода имеет 4 доступных электрона, один атом водорода 1 доступный электрон. Кислород доступных электронов не имеет, а наоборот, как бы забирает на себя 2 электрона, т.е. имеет отрицательное число (-2) доступных электронов. То же и с азотом, который забирает 3 доступных электрона.

Итак, для обобщенной формулы субстрата $C_mH_nO_pN_q$ степень восстановленности рассчитывают по формуле:

$$\gamma_s = 4 * m + n - 2 * p - 3 * q, \quad (1)$$

Для субстратов, как и для биомассы, можно ввести понятие С-моля и пересчитать для таких С-молей степень восстановленности. Это позволяет сравнивать между собой различные субстраты. Биомасса, как и другие вещества, согласно «формуле» может быть оценена по степени восстановленности (обозначение уже не γ_s а γ_x).

В. К. Ерошиным введено понятие *энергетический выход биомассы*, представляющий собой отношение энергии в субстрате к энергии, заключенной в биомассе:

$$\eta = \gamma_s / \gamma_x, \quad (2)$$

Величина η показывает, какое количество С-молей биомассы можно получить из одного С-моля субстрата исходя из соотношения энергий. В формуле (3. 4) выход выражен в С-молях биомассы на С-моль субстрата. От него можно перейти к экономическому коэффициенту:

$$Y_s = \eta * M_x / M_s, \quad (3)$$

где M_x и M_s – молекулярные массы С-молей биомассы и субстрата соответственно.

Аппаратура и материалы: термостат, магнитная мешалка, рефрактометр, центрифуга лабораторная, шкаф сушильный, колбы термостойкие емкостью 200 – 250 см³, пипетки стерильные на 1 см³ и 10 см³, бюксы алюминиевые, компоненты питательных сред, дрожжи пивные или хлебопекарные.

Указания по технике безопасности

Студенты могут быть допущены к работе только после ознакомления с правилами техники безопасности. Знание студентами правил техники безопасности преподаватель проверяет и фиксирует в журнале. При выполнении анализов нужно быть внимательным, соблюдать осторожность, все операции проводить аккуратно, без спешки, в рабочем халате. Категорически запрещается принимать пищу за лабораторным столом и пробовать на вкус химические вещества. При работе с термостатами, сушильными шкафами, магнитными мешалками следует соблюдать общие правила электробезопасности, категорически запрещается отбор проб из термостатов и сушильных шкафов во включенном состоянии.

Методика и порядок проведения работы.

Порядок проведения работы представлен в виде блок-схемы алгоритма на рисунке 2. 1.

Пояснения к блокам.

БЛОК 1. По данным приложения 4 с использованием формул (1), (2), (3) проводят расчет степени восстановления углеродного субстрата и биомассы продуцента, энергетического выхода биомассы, экономического коэффициента.

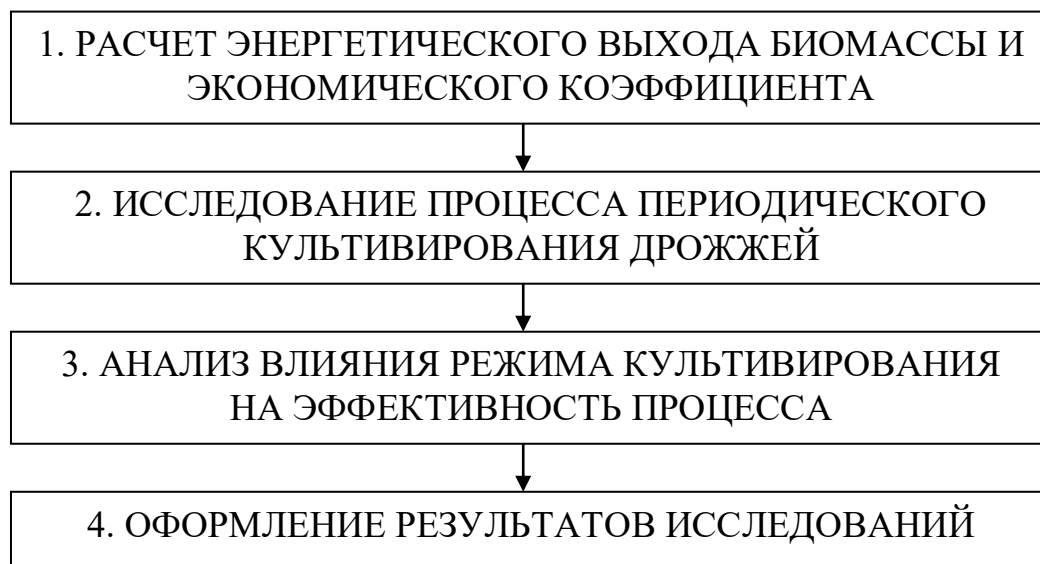


Рисунок 2.1 – Блок-схема алгоритма проведения лабораторной работы «Изучение стехиометрии ферментационных процессов и методов культивирования микроорганизмов»

Результаты расчетов представляют в виде таблицы (таблица 2. 3).

Таблица 2. 3 – Результаты расчетов энергетического выхода биомассы и экономического коэффициента

№ варианта	Продуцент	Углеродный субстрат	Показатель	Расчетное значение
			Степень восстановленности: - субстрата - биомассы	
			Энергетический выход биомассы	
			Молекулярная масса С-моля: - субстрата - биомассы	
			Экономический коэффициент	

БЛОК 2. Для изучения влияния режимов культивирования дрожжей на показатели эффективности процесса ферментации используют питательную среду следующего состава (г/л): глюкоза – 50,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 3,5; $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ – 0,8; KCl – 0,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,25; FeSO_4 – 0,15; ZnSO_4 – 0,015.

Подготовленные питательные среды разливают в термостойкие колбы и стерилизуют автоклавированием при температуре 125 °С и давлении 0,5 МПа в течение 20 минут или кипячением в течение 1 часа. По завершении процесса стерилизации питательные среды охлаждают до температуры инокуляции культуры дрожжей (32-34) °С. В исходных питательных средах определяют массовую долю сухих веществ рефрактометрическим методом.

Рабочую культуру хлебопекарных (*Saccharomyces cerevisiae*) или пивных (*Saccharomyces carlsbergensis*) дрожжей выращивают на питательной среде

аналогичного состава в течение 24 ч при температуре (32-34) °С. Полученные культуры используются в качестве посевного материала.

Для расчета исходной концентрации АСБ дрожжей $[X_0]$ образец рабочей культуры объемом 25 см³ высушивают в сушильном шкафу до постоянной массы по методике, описанной в приложении 5.

В колбы со стерильной питательной средой, подогретой до температуры инокуляции (32-34 °С), в асептических условиях вносят рабочие культуры дрожжей, выращенные на жидкой питательной среде из расчета 10 % от объема среды. Проводят культивирование дрожжей в термостате с периодическим перемешиванием культуральной жидкости на магнитной мешалке с использованием следующих режимов:

- периодический, без подпитки питательной среды и рабочей культуры дрожжей (вариант № 1);
- периодический, с дробной подпиткой питательной среды и единовременным внесением рабочей культуры дрожжей (вариант № 2);
- периодический, с дробной подпиткой питательной среды и рабочей культуры дрожжей (вариант № 3);
- полунепрерывный с чередованием циклов «культивирование – отъем части культуральной жидкости – подпитка эквивалентного объема питательной среды – культивирование» (вариант № 4).

Технологические параметры процесса культивирования дрожжей представлены в таблице 2. 4.

При проведении культивирования с подпиткой и полунепрерывной ферментации первоначально осуществляют периодический процесс в течение (50 – 70) минут. Процесс культивирования проводят в течение (120 – 150) минут. По завершении процесса биомассу дрожжей отделяют на центрифуге от культуральной жидкости (при необходимости допускается хранение полученных образцов по завершении процесса ферментации в течение не более 24 часов). При проведении процесса полунепрерывного культивирования собирают все порции культуральной жидкости для выделения биомассы дрожжей.

Концентрированную дрожжевую суспензию переносят количественно на предварительно взвешенный фильтр и высушивают в сушильном шкафу при температуре (105-110) °С до постоянной массы. В осветленной культуральной жидкости определяют содержание сухих веществ рефрактометрическим методом.

Таблица 2. 4 – Варианты периодического культивирования дрожжей.

№ варианта	Температура ферментации, °С	Условия аэрации	Режим подачи	
			питательной среды	культуры дрожжей
1	32 – 34	Перемешивание на магнитной мешалке в течение 5 минут с интервалом (15 – 20) минут	Единовременно, в начале процесса ферментации, объем – 225 см ³	Единовременно, в начале процесса ферментации, объем – 25 см ³
2			В начале процесса ферментации – 150 см ³ , дробная подпитка тремя порциями по 25 см ³ с интервалом 30 минут	Единовременно, в начале процесса ферментации, объем – 25 см ³
3			В начале процесса ферментации – 150 см ³ , дробная подпитка тремя порциями по 25 см ³ с интервалом 30 минут	В начале процесса ферментации – 17,5 см ³ , дробная подпитка тремя порциями по 2,5 см ³ с интервалом 30 минут
4			В начале процесса ферментации – 225 см ³ . Частичный отбор культуральной жидкости и дробная подпитка питательной среды объемами по 25 см ³ . Общее количество циклов «отъем – доливка» - 3.	Единовременно, в начале процесса ферментации, объем – 25 см ³

БЛОК 3. Рассчитывают основные показатели процесса культивирования дрожжей. Концентрацию абсолютно сухой биомассы дрожжей (г/л) определяют по формуле:

$$[X] = (m - m_0) * 1000 / V, \quad (4)$$

где m , m_0 – массы соответственно высушенного фильтра с дрожжами и пустого фильтра, г;

V – объем инокулируемой питательной среды, см³.

Удельную скорость роста μ (ч⁻¹) можно рассчитать из уравнения:

$$\ln ([X]/[X_0]) = \mu * \tau, \quad (5)$$

где $[X_0]$ – начальная концентрация АСБ дрожжей;

τ – продолжительность культивирования, ч.

Экономический коэффициент определяют по формуле:

$$Y = ([X] - [X_0]) / (C - C_0), \quad (6)$$

где C , C_0 – массовые доли сухих веществ соответственно осветленной культуральной жидкости и питательной среды до инокуляции дрожжей.

БЛОК 4. Обобщить результаты опытов, полученные по всем вариантам культивирования. Данные свести в таблицу 2. 5.

Таблица 2. 5 – Сводные данные по культивированию дрожжей.

Варианты культивирования	Параметры роста		Выход биомассы $[X]$, г/л
	μ , ч ⁻¹	Y	

Сформулировать выводы о влиянии условия культивирования на рост изученных культур микроорганизмов.

Содержание отчета и его форма. Отчет о выполнении работы должен включать:

- титульный лист;
- цель работы и краткое теоретическое обоснование проводимых исследований;
- алгоритм и методики проведения исследований;
- результаты исследований и расчетов, графические зависимости;
- выводы.

Контрольные вопросы и защита работы:

- основные принципы стехиометрии процессов ферментации;
- взаимосвязь стехиометрии с кинетическими закономерностями роста микроорганизмов;
- общая схема расчета выхода биомассы из углеродного субстрата;
- классификация процессов культивирования микроорганизмов;
- количественное описание глубинного периодического культивирования;
- виды и общие закономерности полунепрерывного культивирования;
- основные параметры процесса культивирования;
- методы определения параметров роста культур микроорганизмов.

ИНДИВИДУАЛЬНЫЕ ЗАДАНИЯ
для расчета энергетического выхода биомассы
и экономического коэффициента

№ варианта	Продуцент	Субстрат
1	<i>Saccharomyces vini</i>	Фруктоза $C_6H_{12}O_6$
2	<i>Saccharomyces carlsbergensis</i>	Мальтоза $C_{12}H_{22}O_{11}$
3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Этанол C_2H_5OH
4	<i>Candida tropicalis</i>	Ксилоза $C_5H_{10}O_5$
5	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	Лактоза $C_{12}H_{22}O_{11}$
6	<i>Propionibacterium shermanii</i>	Молочная кислота $C_3H_6O_3$
7	<i>Acetobacter aceti</i>	Этанол C_2H_5OH
8	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	Глюкоза $C_6H_{12}O_6$
9	<i>Penicillium roqueforti</i>	Лактоза $C_{12}H_{22}O_{11}$
10	<i>Aspergillus niger</i>	Глюкоза $C_6H_{12}O_6$
11	<i>Aspergillus awamori</i>	Арабиноза $C_5H_{10}O_5$
12	<i>Penicillium canescentis</i>	Молочная кислота $C_3H_6O_3$
13	<i>Candida guilliermondii</i>	Парафины (н-алканы) $(CH_2)_nH_2$ ($n_{cp} = 12$)
14	<i>Candida utilis</i>	Уксусная кислота CH_3COOH
15	<i>Hansenula polymorpha</i>	Метанол CH_3OH
16	<i>Methylomonas sp.</i>	Метан CH_4

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА АСБ ДРОЖЖЕЙ МЕТОДОМ
ВЫСУШИВАНИЯ ДО ПОСТОЯННОЙ МАССЫ

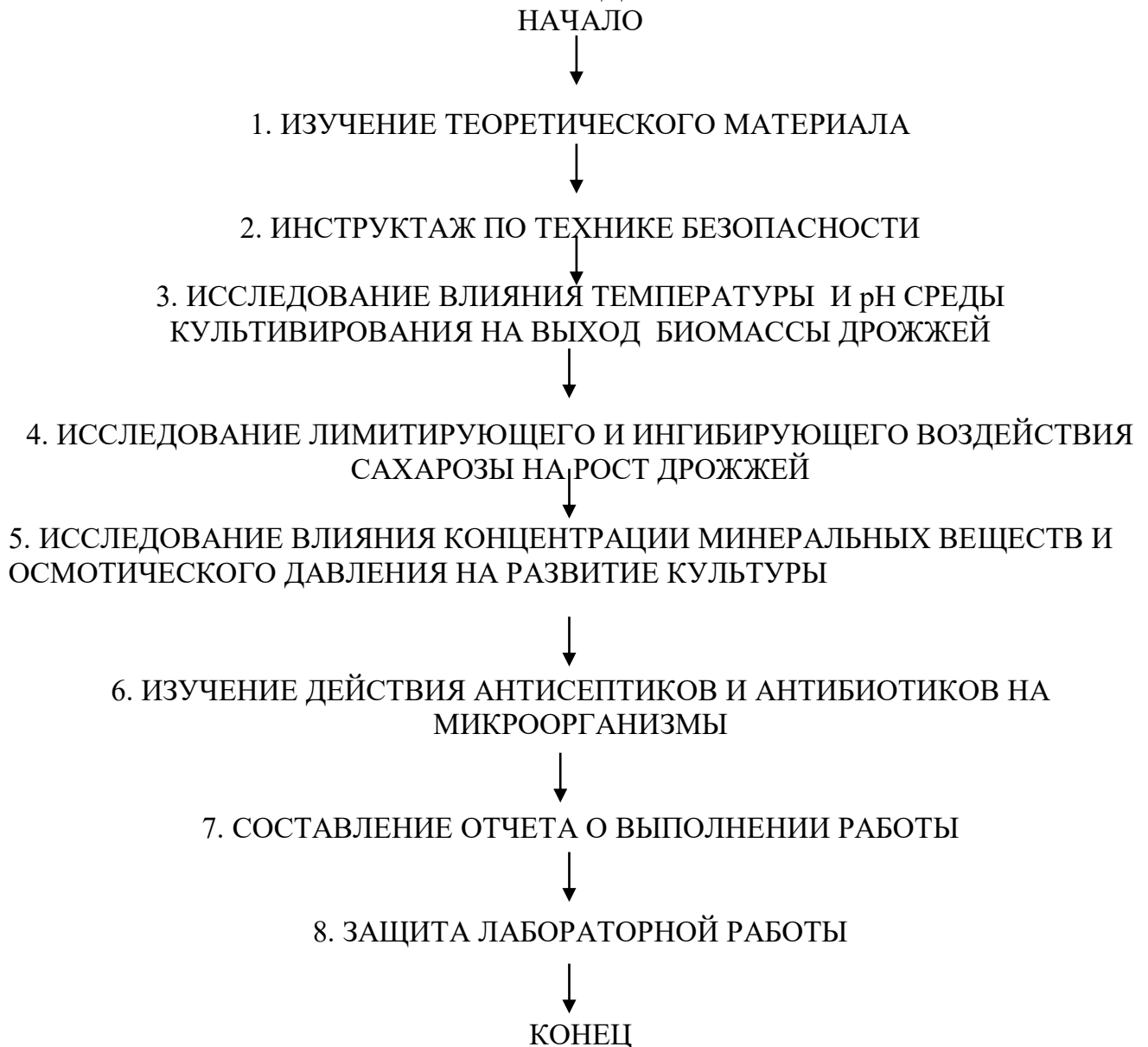
Культуральную жидкость помещают в пробирки для центрифугирования. Центрифугируют в течение 5 минут при частоте 2000-2500 об/мин. Фугат сливают через предварительно взвешенный сухой фильтр, затем на тот же фильтр количественно переносят концентрированную дрожжевую суспензию. Фильтр с дрожжевой суспензией высушивают до постоянной массы при 105-110 °С в сушильном шкафу, охлаждают в эксикаторе и взвешивают.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 3

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА РОСТОВЫЕ ПРОЦЕССЫ МИКРООРГАНИЗМОВ

Цель работы: изучить влияние физико-химических факторов на рост и микроорганизмов; определить термоустойчивость молочнокислых бактерий; исследовать влияние температуры и pH среды на выход биомассы дрожжей; изучить лимитирующее и ингибирующее воздействие субстрата на рост дрожжей; исследовать влияние концентрации растворенных веществ и осмотического давления на интенсивность роста микроорганизмов, изучить ингибирование роста микроорганизмов антисептиками и антибиотиками.

АЛГОРИТМ ПРОВЕДЕНИЯ РАБОТЫ



Блок 1. В природе влияние внешней среды является мощным фактором изменчивости и эволюции микроорганизмов. В биотехнологической промышленности знание воздействия внешних факторов на рост и развитие микроорганизмов позволяет установить оптимальные для получения целевых продуктов параметры процессов культивирования, режимы стерилизации питательных сред и оборудования, позволяющих гарантированно уничтожить вегетативные и споровые формы технологически вредной и патогенной микрофлоры, предотвратить попадание культивируемых биообъектов в окружающую среду.

Влияние того или иного фактора оценивают посредством культивирования микроорганизмов при воздействии или после воздействия исследуемого фактора. Интенсивность роста микроорганизмов оценивают по качественным (степень помутнения или плотность роста культуры) или количественным (концентрация биомассы, количество клеток) показателям. Наиболее точную оценку позволяет дать определение концентрации биомассы в единице объема культуральной жидкости, как правило, методом высушивания до постоянной массы. При исследовании роста и развития бактериальных культур, вызывающих помутнение среды количественная оценка может быть проведена с использованием турбидиметрического или нефелометрического методов.

Температура окружающей среды является одним из важнейших факторов, влияющих на скорость роста культуры и протекание биохимических процессов в клетке. В процессе эволюции каждый вид микроорганизмов приспособился к росту в определенном интервале температур. Внутри допустимого для любого вида температурного интервала наблюдается экстремальная зависимость удельной скорости роста от температуры, причем оптимум часто не превышает 2-4 °С. Температура, при которой наблюдается наиболее интенсивный рост культуры, как правило, соответствует оптимальной области действия ферментных систем, катализирующих ключевые реакции метаболизма клетки. Оптимальные области роста, как правило, находятся в пределах: для психрофилов – 7-12 °С, для мезофилов – 30-35 °С, для термофилов – 40-45 °С.

Большинство микроорганизмов плохо переносит превышение максимальных температур развития. При 55-65 °С возможна тепловая коагуляция белковых структур микробной клетки. Термоустойчивость микроорганизмов в зависимости от видовых особенностей и формы жизнедеятельности различна. Бесспорые бактерии, вегетативные формы споровых бактерий, мицелиальные грибы и дрожжи погибают при температуре 60-70 °С в течение 15-30 минут, при 80-100 °С – в течение 1-3 минут. Споры дрожжей и мицелиальных грибов погибают при 65-80 °С, большинства бактерий – при 80-100 °С в течение нескольких часов или при автоклавировании при 120 °С в течение 20 минут.

Интенсивность роста размножения микроорганизмов существенно зависит от кислотности среды. Для всех микроорганизмов характерно наличие оптимальной области pH, в пределах которой наблюдается максимальная скорость роста. Многие типы микроорганизмов имеют оптимум pH в области 5,5-7,5. Для дрожжей характерен оптимум pH при 4-6.

Многие культуры способны расти в более кислой среде, чем оптимальная. Например, дрожжи удовлетворительно растут при pH 3. Этот эффект используется при эксплуатации промышленных ферментаторов для борьбы с посторонней микрофлорой. Сдвиг pH в щелочную область подавляет рост и развитие большинства микробных культур и используется для стерилизации жидких потоков.

Объяснение роли pH основано на представлениях о pH-зависимости активности ферментов микробной клетки. При введении в состав питательных сред сильных электролитов помимо изменения pH имеет место протонирование или депротонирование клеточной мембраны и, как следствие, изменение поверхностного заряда клетки, что должно учитываться при проведении процессов культивирования.

При составлении рецептур питательных сред для культивирования микроорганизмов большое значение имеет подбор оптимальных концентраций компонентов среды, в первую очередь, источников углерода и минерального питания. При малых концентрациях в среде углеродные субстраты (углеводы,

спирты, углеводороды) лимитируют рост микроорганизмов по принципу «узкого места» метаболизма. В соответствии с кинетической моделью Моно, оптимальной является концентрация лимитирующего субстрата, соответствующая максимальной удельной скорости роста культивируемого микроорганизма.

Превышение оптимальной концентрации субстрата в среде приводит к снижению экономического коэффициента, кроме того, имеет место ингибирование роста культуры избытком субстрата. Данное явление объясняется не только субстратным насыщением ферментов клетки, но и в ряде случаев (например, при культивировании на средах с углеводами) изменением осмотического давления в среде в неблагоприятную для роста и развития микроорганизмов сторону.

Метаболические процессы протекают в определенном диапазоне значений осмотического давления в микробной клетке и внешней среде. Увеличение осмотического давления в клетке приводит к притоку растворителя и может послужить причиной разрыва клеточной оболочки. При высоких значениях осмотического давления в среде может произойти плазмолиз микробных клеток, заключающийся в концентрировании цитоплазмы за счет оттока растворителя через клеточную мембрану и, как следствие, замедление или полное прекращение метаболических процессов.

Некоторые микроорганизмы (осмофилы) способны выживать или даже удовлетворительно развиваться при аномально высоких значениях осмотического давления в среде. При этом возможны два механизма выравнивания осмотического давления в среде и в клетке:

- микроорганизм транспортирует соли (особенно катионы) через клеточную мембрану из среды в цитоплазму;
- в цитоплазме синтезируются низкомолекулярные вещества, способные повышению в ней осмотического давления.

Наибольшее влияние из растворенных компонентов среды на осмотическое давление среды оказывают минеральные соли. Все микроорганизмы при росте и развитии нуждаются в определенном количестве минеральных источников

питания, так как входящие в их состав катионы и анионы являются активаторами ферментов клетки, влияют на проницаемость цитоплазматической мембраны, выполняют другие жизненно важные функции. Однако при определенных концентрациях минеральных солей в среде наблюдается замедление роста культур микроорганизмов, что обусловлено в первую очередь изменением осмотического давления.

Осмотическое давление связано с показателем активности воды — отношением парциальных давлений паров растворителя в газовой фазе над раствором и в растворе. Значения активности воды, определяющие границы жизнедеятельности микроорганизмов, находятся в диапазоне 0,6-0,98.

Химические вещества, губительно действующие на микроорганизмы, называют антисептиками или антимикробными агентами. Действие этих веществ зависит от химического строения, концентрации, продолжительности контакта с клеткой, чувствительности микроорганизма к данному веществу. Попадание антимикробных агентов в питательные среды даже в небольших концентрациях приводит к угнетению роста и гибели клеток культивируемого биообъекта.

Наибольшую опасность для биотехнологических процессов представляют вещества, используемые для консервирования сырья (бензойная, сорбиновая, салициловая кислоты, сульфиты и бисульфиты, муравьиная кислота и формиаты), для мойки и дезинфекции технологического оборудования (перекись водорода, хлор- и бромсодержащие соединения). Антисептики могут быть использованы для проведения химической стерилизации сред и оборудования в тех случаях, когда термическая стерилизация не применима.

Большинство антисептиков относится к группе общепротоплазматических ядов, действующих на любую животную и растительную клетку. Различают следующие механизмы действия антимикробных агентов:

- адсорбция действующего вещества на поверхности клеточной мембраны или его накопление в цитоплазме;
- химическое взаимодействие вещества с компонентами клеточной стенки или мембраны;

- прекращение нормальной жизнедеятельности клетки вследствие изменения химической реакции среды;

- постепенное или мгновенное угнетение метаболических процессов клетки.

Многие микроорганизмы в процессе жизнедеятельности вырабатывают биологически активные вещества, подавляющие развитие микробов-антагонистов – антибиотики. Существенными отличиями антибиотиков от антимикробных агентов является избирательность и специфичность, заключающиеся в направленном действии по отношению к определенному типу микроорганизмов. Антибиотики различны по химической природе и характеру действия: одни из них лишь подавляют развитие антагонистических культур, другие вызывают их гибель. Специфичность действия продуцируемых тем или иным микроорганизмом антибиотиков должна учитываться при использовании в биотехнологических процессах смешанных культур.

Блок 3. Исследование влияния температуры культивирования на интенсивность роста дрожжей проводят по следующей схеме:

- в три стерильные пробирки вносят по 10 см³ жидкой питательной среды для культивирования дрожжей и проводят в асептических условиях засев культуры (по 1 см³ дрожжевой суспензии);

- первую пробирку оставляют при комнатной температуре (20 °С), вторую помещают в термостат при 30 °С, третью – в термостат при 40 °С;

- дрожжевую культуру выращивают при указанных температурных режимах в течение 24 часов, а затем помещают в холодильник;

- на втором занятии определяют количество биомассы, выросшей в каждой из пробирок по методике, приведенной в приложении Г;

- по полученным данным строят график зависимости количества АСБ от температуры культивирования $X = f(t)$ и делают вывод о влиянии температуры на рост культуры дрожжей.

Влияние рН среды на рост и развитие дрожжей исследуют по приведенной ниже методике:

- в три стерильные пробирки вносят по 10 см³ жидкой питательной среды для культивирования дрожжей и устанавливают в них значения pH 4, 6 и 8;

- в пробирки со средой вносят по 1 см³ суспензии дрожжей и культивируют в течение 24 часов при комнатной температуре, после чего помещают пробирки в холодильник;

- на второй день исследований определяют количество АСБ по методике, приведенной в приложении Г;

- строят график, отражающий влияние pH среды на количество АСБ в координатах $X = f(pH)$ и устанавливают оптимальную для роста культуры область pH.

Блок 4. Исследование лимитирующего и ингибирующего действия субстрата на рост дрожжей проводят на модельных средах с сахарозой по следующей схеме:

- готовят три раствора сахарозы концентрацией 1, 10 и 30 %;
- растворы пастеризуют на водяной бане при 80-85 °С в течение 5 минут и охлаждают до 30-35 °С;

- в пробирки вносят в асептических условиях по 10 см³ каждого из растворов и проводят посев культуры дрожжей (доза - 1 см³);

- дрожжи культивируют при температуре 20-25 °С в течение 24 часов;
- на второй день исследований определяют концентрацию биомассы турбидиметрическим методом (приложение Г),

- по результатам исследований строят график зависимости концентрации биомассы от массовой доли сахарозы в среде.

Блок 5. Изучение влияния концентрации минеральных компонентов питательной среды на интенсивность роста культуры дрожжей проводят на примере хлорида натрия, используя приведенную ниже методику:

- готовят насыщенный (30 %-й) раствор хлорида натрия, нагревают его на водяной бане до 85-90 °С и затем охлаждают до температуры культивирования дрожжей;

- в три стерильные пробирки вносят следующие количества жидкой питательной среды для культивирования дрожжей и раствора хлорида натрия: в первую пробирку 9,5 см³ и 0,5 см³, во вторую – 8,5 см³ и 1,5 см³; в третью - 7 см³ и 3 см³, после чего проводят в асептических условиях засев культуры (по 1 см³ дрожжевой суспензии);

- пробирку оставляют при комнатной температуре на 24 часа, а затем помещают в холодильник;

- на втором занятии определяют количество биомассы, выросшей в каждой из пробирок по методике, приведенной в приложении Г;

- по полученным данным строят график зависимости количества АСБ от концентрации хлорида натрия.

Для изучения явления плазмолиза концентрированную суспензию дрожжей разводят дистиллированной водой в соотношении 1 : 10. Каплю суспензии наносят на предметное стекло и вносят в нее кристаллик соли. Через несколько минут проводят микроскопию при увеличении в 600-900 раз, наблюдая плазмолизированные клетки дрожжей.

Блок 6. Ингибирующее действие антисептиков на рост микроорганизмов на примере бензойной кислоты изучают по следующей схеме:

- вносят в три пробирки с питательной средой для культивирования дрожжей следующие количества бензойной кислоты (на 10 см³ среды): в первую пробирку 50 мг; во вторую – 100 мг; в третью - 500 мг;

- в пробирки вносят по 1 см³ суспензии дрожжей и оставляют при температуре 20-25 °С на 24 часа, после чего помещают в холодильник;

- на второй день исследований определяют концентрацию дрожжей во всех пробирках, устанавливают минимальную концентрацию бензойной кислоты, строят график зависимости концентрации дрожжей от массовой доли бензойной кислоты в растворе.

Антимикробное действие антибиотика канамицина исследуют на примере культур дрожжей, молочнокислых бактерий и плесневых грибов (по заданию преподавателя):

- для культивирования каждого из исследуемых микроорганизмов готовят две среды: контрольную (без внесения антибиотика) и опытную (вносят антибиотик в количестве 0,5-1% от объема среды), среды автоклавируют;

- проводят посевы исследуемых микроорганизмов в контрольную и опытную среды;

- выращивают исследуемые культуры при следующих параметрах: дрожжи - при температуре 20-25 °С в течение 24-30 часов, молочнокислые бактерии – при 40-42 °С в течение 18-24 часов, плесневые грибы – при 30-35 °С в течение 45-48 часов;

- проводят визуальную оценку роста культур на контрольных и опытных средах, делают вывод о том, на какой из микроорганизмов использованный антибиотик оказывает наибольшее ингибирующее действие.

Блок 7. Отчет о работе должен включать:

- титульный лист;
- цель работы и алгоритм выполнения;
- краткое теоретическое обоснование;
- методики проводимых экспериментов;
- результаты исследований и графические зависимости;
- выводы.

Блок 8. Контрольные вопросы:

- физико-химические факторы внешней среды, влияющие на рост микроорганизмов;

- классификация микроорганизмов по отношению к температуре развития;
- механизм влияния температуры культивирования на рост и развитие микробной клетки;

- влияние рН среды на рост и развитие культуры, использование рН-зависимости микроорганизмов в биотехнологических процессах;

- закономерности лимитирования роста микроорганизмов субстратом;
- причины, вызывающие ингибирование роста избытком субстрата;

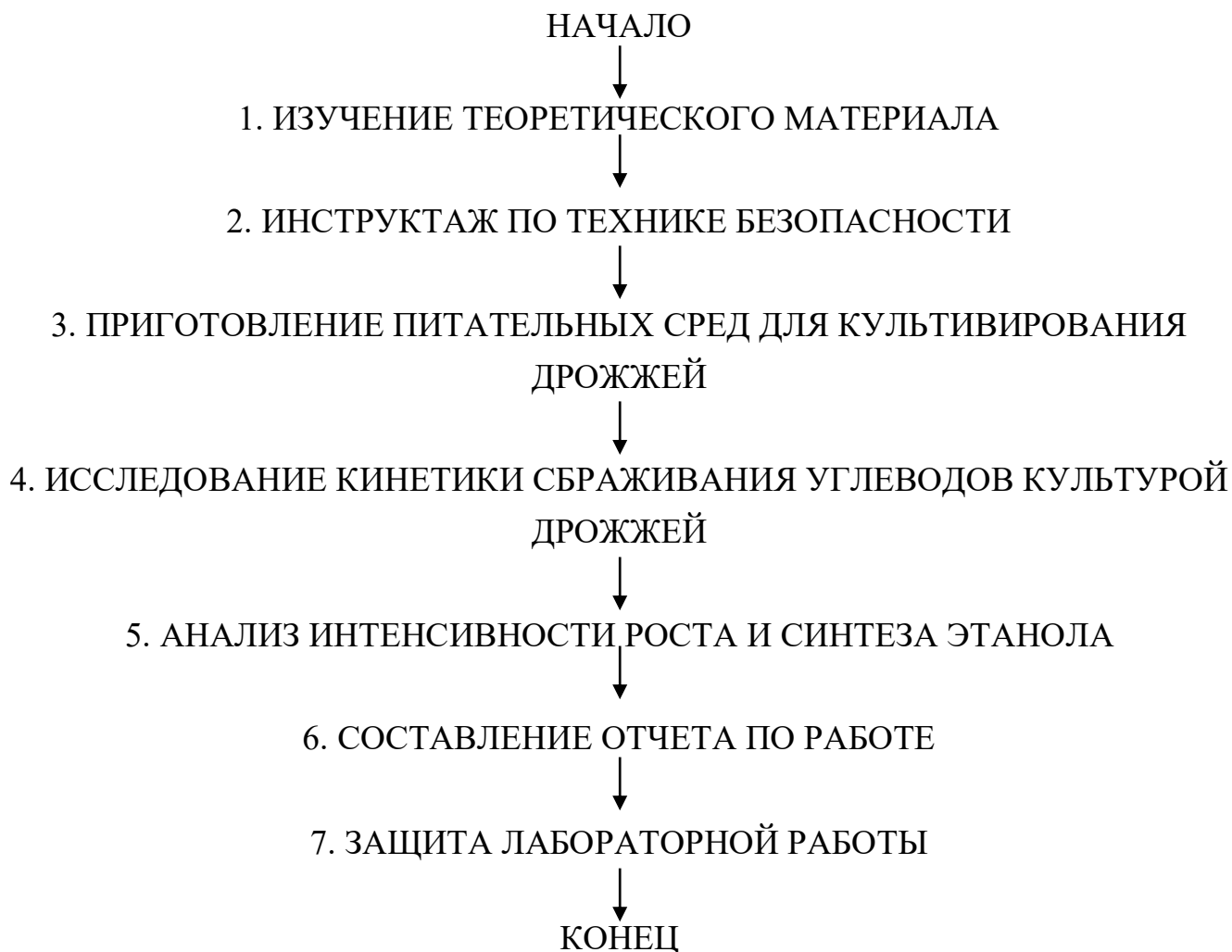
- влияние осмотического давления на жизнедеятельность микроорганизмов, явление плазмолиза;
- значение минеральных источников питания, влияние концентрации минеральных веществ на осмотическое давление и активность воды;
- виды антимикробных агентов, механизмы их действия;
- общие принципы действия антибиотиков, их отличие от антимикробных агентов;
- методика исследования лимитирования и ингибирования роста дрожжей субстратом;
- методика определения влияния концентрации растворенных солей на интенсивность роста дрожжей;
- сущность методов изучения антимикробного и антибиотического воздействия на культуры микроорганизмов.
- качественные и количественные методы определения интенсивности роста микроорганизмов;
- сущность методик определения термоустойчивости микроорганизмов, исследования влияния на их рост температуры и pH среды.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 4

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ АССИМИЛЯЦИИ РАЗЛИЧНЫХ УГЛЕВОДОВ КУЛЬТУРОЙ ДРОЖЖЕЙ *Saccharomyces cerevisiae*

Цель работы: изучить катаболические пути ассимиляции углеводов микроорганизмами; исследовать кинетику сбраживания различных сахаров культурой дрожжей; оценить интенсивность роста и образования продуктов метаболизма дрожжами при культивировании на различных углеводных субстратах; овладеть методами количественного определения АСБ дрожжей и продуктов метаболизма в культуральной жидкости.

АЛГОРИТМ ПРОВЕДЕНИЯ РАБОТЫ



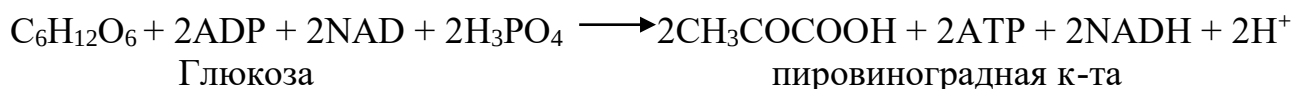
Блок 1. Углеводы являются наиболее доступными углеродсодержащими субстратами для большинства микроорганизмов. Катаболические реакции расщепления углеводов в микробной клетке сопряжены с реакциями образования АТФ и других макроэргических соединений; восстановленных молекул никотинамидадениндинуклеотида (НАДН), никотинамидадениндинуклеотидфосфата (НАДФН), флавинадениндинуклеотида (ФАДН), являющихся донорами электронов для ключевых окислительно-восстановительных процессов биосинтеза компонентов клетки и целевых метаболитов. Промежуточные продукты распада сахаров, в первую очередь, пировиноградная кислота, являются исходными субстратами анаболических процессов.

Различные микроорганизмы способны ассимилировать широкий спектр углеводов: моносахариды глюкозу, галактозу, фруктозу, маннозу (гексозы), арабинозу, ксилозу (пентозы); дисахариды сахарозу, лактозу, мальтозу, лактулозу, раффинозу; многоатомные спирты ксилит, сорбит, маннит; уроновые кислоты, входящие в состав пектиновых веществ. Углеводы вводят в состав сред для культивирования микроорганизмов в виде чистых препаратов, например, сахарозу, глюкозу, фруктозу, лактозу, или в составе углеводсодержащих продуктов – мелассы свекловичного сахара, молочной сыворотки, отходов крахмало-паточного производства, свекловичного жома.

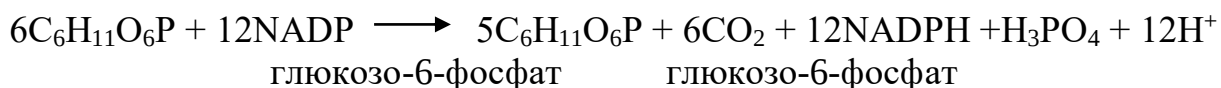
С биохимической точки зрения наиболее рациональным является использование глюкозы, непосредственно вступающей в катаболические реакции. Другие сахара для включения в тот или иной путь обмена должны быть трансформированы в фосфорилированные производные глюкозы или другие промежуточные соединения.

Применительно к метаболизму микроорганизмов представляет интерес рассмотрение трех катаболических процессов распада глюкозы: гликолиза (путь Эмбдена-Мейергоффа-Парнаса), пентозофосфатного цикла (гексозомонофосфатный, апотомический путь), путь Энтнера-Дудорова (КДФГ-путь).

Гликолиз является наиболее распространенным способом ассимиляции углеводов микроорганизмами, суммарная реакция процесса может быть записана следующим образом:



Не менее распространенным механизмом ассимиляции углеводов микроорганизмами является гексозомонофосфатный путь. Особенностью процесса является образование фосфорилированных пентоз, в связи с чем данный путь получил название пентозофосфатного цикла. Наряду с высокой энергетической эффективностью биологическое значение этого катаболического процесса обусловлено образованием промежуточных продуктов (триоз, тетроз, пентоз, гексоз, гептоз), используемых микробной клеткой для синтеза многих жизненно необходимых соединений и практически важных метаболитов; а также свободного неорганического фосфата, который может быть использован для пополнения фонда АТФ в клетке. Суммарная реакция гексозомонофосфатного пути:



Путь Энтнера-Дудорова, часто называемый по основному промежуточному метаболиту (2-кето-3-дезоксиглюконовая кислота) КДФГ-путь, наименее распространен из рассмотренных выше катаболических процессов у микроорганизмов. Его биологическое значение связано с образованием пировиноградной кислоты и 3-фосфоглицеринового альдегида (3-ФГА), который может включаться в гликолиз или пентозофосфатный цикл, с наименьшими энергетическими затратами. Его суммарная реакция представлена ниже:



Многие виды микроорганизмов обладают набором ферментов, позволяющим «переключать» метаболизм с одного пути распада сахаров на другой. Тот или иной процесс может быть реализован у одного вида при различных условиях

культивирования, в зависимости от физиологических особенностей клеток. Например, культуры *Aspergillus niger* в период спорообразования ассимилируют глюкозу по пентозофосфатному пути, а во время интенсивного роста мицелия – по гликолитическому.

Наличие в среде свободного фосфата оказывает регулирующее действие на метаболизм глюкозы. Избыток фосфата подавляет активность глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы, ключевого фермента пентозофосфатного цикла, и активирует ферменты гликолитического пути.

Блок 3. Приготовление питательной среды для культивирования дрожжей осуществляют по рецептуре, приведенной в таблице 4.1.

Таблица 4.1 – Состав питательной среды

Компонент	Масса на 100 мл среды, г, по вариантам			
	1	2	3	4
Сахароза	15	-	-	-
Глюкоза	-	15	-	-
Лактоза	-	-	15	-
Фруктоза	-	-	-	15
Пептон	0,5	0,5	0,5	0,5
KH ₂ PO ₄	0,3	0,3	0,3	0,3
MgSO ₄	0,1	0,1	0,1	0,1

В стерильную воду в асептических условиях вносят компоненты среды и посевной материал из расчета 0,5 г сухих дрожжей на 100 см³ среды.

После тщательного перемешивания в исходной культуральной жидкости определяют массовую долю сухих веществ рефрактометрическим методом, титруемую кислотность (приложение А), рН среды.

Блок 4. Дрожжи культивируют при температуре 25 °С. Через каждые 30 минут определяют массовую долю сухих веществ в культуральной жидкости рефрактометрическим методом. По полученным данным строят график зависимости концентрации сухих веществ в культуральной жидкости от времени культивирования.

Блок 5. По завершении процесса культивирования определяют концентрацию АСБ дрожжей методом высушивания до постоянной массы (приложение Б),

титруемую кислотность, рН среды, концентрацию диоксида углерода в культуральной жидкости (приложение В).

Полученные результаты заносят в таблицу 4.2, анализируют эффективность ассимиляции исследованных углеводов культурой дрожжей.

Таблица 4.2 – Результаты исследований эффективности ассимиляции сахаров.

Углевод	Массовая доля, %		Массовая доля СВ, %		Титруемая кислотность, °Т		рН среды	
	АСБ дрожжей	СО ₂	начальная	конечная	начальная	конечная	начальный	конечный
Сахароза								
Глюкоза								
Лактоза								
Фруктоза								

Блок 6. Отчет о работе должен включать:

- титульный лист;
- цель работы и алгоритм выполнения;
- краткое теоретическое обоснование проводимых исследований;
- методику приготовления питательных сред и культивирования дрожжей;
- результаты исследований кинетики сбраживания углеводов и графические зависимости;
- методику определения массовой доли этанола в культуральной жидкости,
- результаты анализа эффективности сбраживания сахаров культурой дрожжей;
- выводы.

Блок 7. Контрольные вопросы:

- основные закономерности ассимиляции глюкозы микроорганизмами;
- биологическое значение гликолитического пути распада углеводов в микробной клетке;
- биологическая роль пентозофосатного цикла в метаболизме микроорганизмов;
- путь Энтнера-Дудорова: общая схема, биологическое значение процесса;
- основные принципы стехиометрии процессов ферментации;
- взаимосвязь стехиометрии с кинетическими закономерностями роста микроорганизмов;

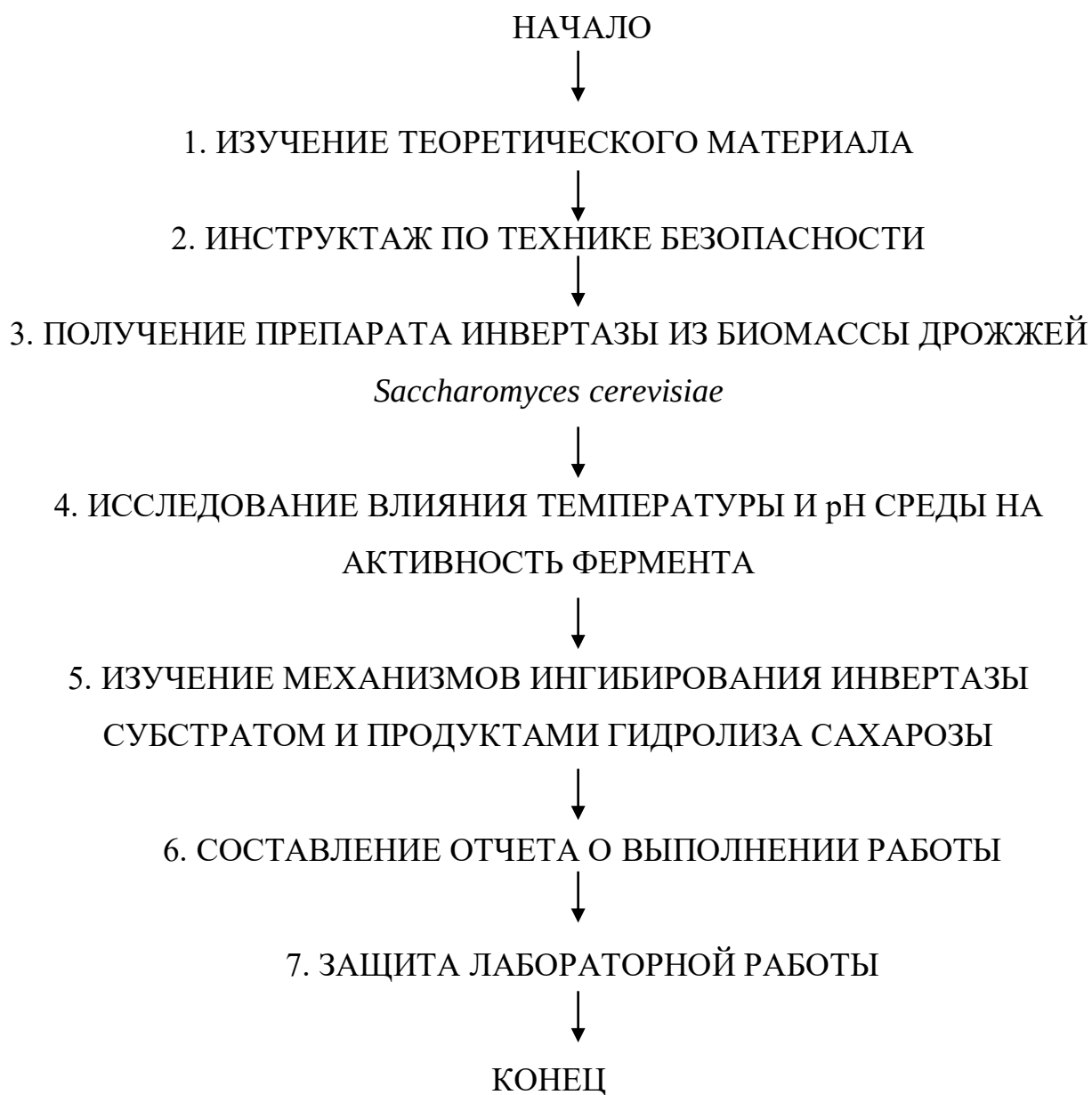
- общая схема расчета выхода биомассы из углеродного субстрата;
- способы расчета тепла, выделяющегося в процессе культивирования микроорганизмов
- сущность метода определения концентрации АСБ в культуральной жидкости;
- схема определения продуктов метаболизма в культуральной жидкости.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 5

ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ ДРОЖЖЕВОЙ ИНВЕРТАЗЫ

Цель работы: исследовать влияние физико-химических факторов на активность инвертазы; изучить эффекты ингибирования фермента субстратом и продуктами реакции.

АЛГОРИТМ ПРОВЕДЕНИЯ РАБОТЫ



Блок 1. В соответствии с современной номенклатурой фермент, катализирующий гидролитическое расщепление молекулы сахарозы до моносахаров, называют β -фруктофуранозидазой (β -D-фруктофуранозид-фруктогидролазой). Он специфичен к β -фруктофуранозной части молекулы сахарозы. При гидролизе правое вращение нередуцирующей сахарозы меняется на левое вращение смеси редуцирующих моносахаров (глюкозы и фруктозы), в связи с чем процесс название инверсии, а катализирующий его фермент – инвертазы. Инвертаза действует также и на другие β -фруктофуранозидные связи, например, отщепление фруктозного остатка от молекулы дисахарида рафинозы.

Специфичность фермента к β -фруктофуранозному фрагменту молекулы и присутствие в очищенных препаратах инвертазы некоторого количества углеводов позволяет предположить наличие в активном центре фермента молекулы альдозы. Данное положение также подтверждается эффектом ингибирования активности β -фруктофуранозидазы реагентами, взаимодействующими с альдегидным радикалом. Например, активность инвертазы подавляется первичными алифатическими и ароматическими аминами, образующими при реакции с карбоксильными группами Шиффовы основания. Ингибирование обратимо, так как активность фермента восстанавливается при добавлении сахаров и альдегидов, вытесняющих аминокгруппу из активного центра инвертазы.

Препараты инвертазы получают из растительных объектов, клеток дрожжей. При выделении инвертазы из биомассы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* получаемый препарат наряду с β -фруктофуранозидазой содержит некоторое количество α -глюкозидазы, выполняющей аналогичные функции, но специфичной к α -глюкозидной части молекулы сахарозы. Оптимум pH β -фруктофуранозидазы лежит в пределах 3,5-5,5; α -глюкозидаза имеет оптимум активности при pH 7,0. При получении чистых препаратов инвертазы проводят разделение этих ферментов, например методом аффинной хроматографии.

Скорость расщепления сахарозы под действием инвертазы существенно зависит от концентрации субстрата. Оптимальная скорость достигается при 5-8 %-ной концентрации сахарозы. При массовой доле сахарозы в растворе около 70 % скорость гидролиза снижается по сравнению с максимальной в 3,5-4 раза. Проблема повышения активности инвертазы в высококонцентрированных растворах сахарозы является особенно актуальной в пищевой промышленности. Для ее решения предлагается введение в раствор водосвязывающих агентов, например этилового спирта.

Методы определения активности инвертазы основаны на различном оптическом вращении сахарозы и смеси моносахаров (поляризметрический метод), а также на редуцирующих свойствах продуктов гидролиза.

Блок 3. Для приготовления препарата инвертазы в ступку помещают 15 г сухого концентрата дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, примерно равный объем кварцевого песка и 15-20 мл воды, смесь тщательно растирают до получения однородной массы. Затем добавляют 15-20 мл воды, нагретой до 60 °С и выдерживают при периодическом перемешивании в течение 15-20 минут. Полученную суспензию фильтруют через бумажный фильтр, фильтрат используют в качестве препарата инвертазы.

Блок 4. Для оценки влияния температуры и pH среды на активность инвертазы в ряд пробирок вносят по 0,5 мл фильтрата, 2 мл воды и устанавливают требуемые значения температуры и pH по схеме, приведенной в таблице 3.

Таблица 3 – Условия проведения эксперимента.

№ пробы	Температура, °С	pH среды, ед.
1	0	7,0
2	20	7,0
3	40	7,0
4	100	7,0
5	20	3,0
6	20	5,0
7	20	9,0

Для достижения заданных значений pH в пробирку 5 вносят 2 мл 0,1 н раствора HCl, в пробирку 6 – 0,2 мл 0,1 н раствора HCl и 1,8 мл воды, в

пробирку 7 – 2 мл 0,1 н раствора NaOH. После установления требуемых значений температуры и pH среды в каждую из пробирок вносят по 2 мл 10 %-го раствора сахарозы. Через 15 минут проводят пробу на редуцирующие сахара, для чего в исследуемые образцы по 2 мл реактивов «Фелинг-1» и «Фелинг-11», помещают пробирки на 5 минут на кипящую водяную баню.

Степень гидролиза сахарозы оценивают по количеству образовавшегося осадка оксида меди: - гидролиз не прошел (осадок отсутствует), + низкая степень гидролиза (малое количество осадка), ++ средняя степень гидролиза (значительное количество осадка), +++ высокая степень гидролиза (обильный осадок). Результаты исследований заносят в таблицу, устанавливают оптимальные условия действия препарата инвертазы.

Блок 5. Для установления интервалов концентраций сахарозы, в которых наблюдаются эффекты ингибирования фермента недостатком субстрата и субстратного насыщения, проводят следующий опыт. В четыре пробирки вносят по 0,5 мл препарата инвертазы, 2 мл воды, доводят значения температуры и pH до оптимальных, после чего добавляют следующие количества 10%-ного раствора сахарозы: в пробирку 1 – 0,1 мл; в пробирку 2 – 1 мл; в пробирку 3 – 5 мл; в пробирку 4 – 10 мл. Термостатируют в течение 15 минут при оптимальной температуре, затем проводят Фелингову пробу на редуцирующие сахара, по результатам которой оценивают степень гидролиза сахарозы.

Влияние концентрации продуктов гидролиза на активность инвертазы исследуют по следующей методике. В три пробирки вносят по 0,5 мл препарата инвертазы, 2 мл воды и следующие количества 10 %-го раствора глюкозы: пробирка 1 – 0,1 мл; пробирка 2 – 1 мл; пробирка 3 – 5 мл. Далее устанавливают оптимальные значения pH и температуры, вносят в пробирки по 2 мл 10%-го раствора сахарозы и термостатируют образцы при оптимальной температуре действия инвертазы в течение 15 минут. Степень гидролиза сахарозы оценивают по результатам Фелинговой пробы.

Блок 6. Отчет о работе должен включать:

- титульный лист;

- цель работы и краткое теоретическое обоснование проводимых исследований;
- описание методики получения препарата дрожжевой инвертазы;
- результаты исследований влияния температуры, pH среды, концентрации субстрата и продуктов реакции на активность инвертазы;
- выводы.

Блок 7. Контрольные вопросы:

- влияние физико-химических факторов среды на активность ферментов микробной клетки;
- классификация механизмов регуляции метаболизма микроорганизмов;
- механизмы регуляции на ферментном уровне;
- механизмы регуляции на уровне генома клетки;
- биологические функции и свойства инвертазы;
- сущность методик изучения влияния различных факторов на активность дрожжевой инвертазы.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 6

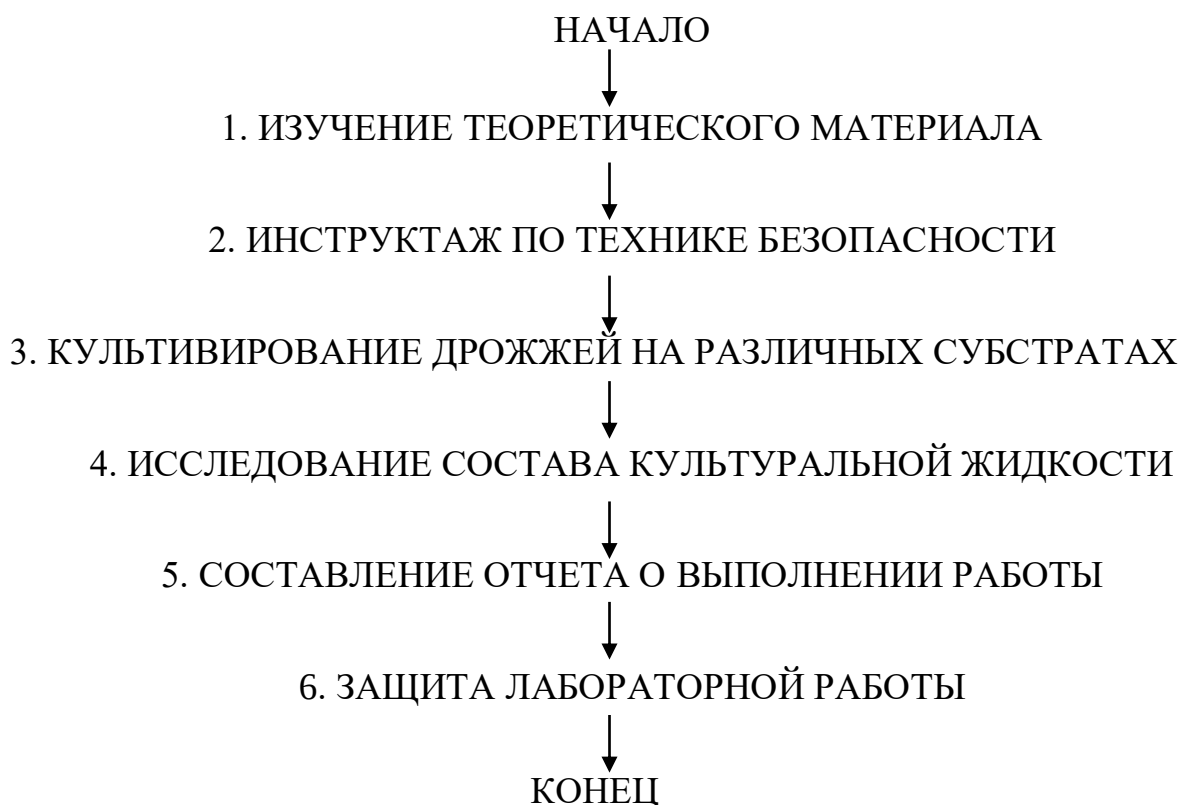
ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССА КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ДРОЖЖЕЙ

Saccharomyces cerevisiae и *Saccharomyces vini* НА РАЗЛИЧНЫХ

УГЛЕРОДСОДЕРЖАЩИХ СРЕДАХ

Цель работы: исследовать закономерности культивирования дрожжей на углеводах и этаноле, овладеть методиками определения общей кислотности, глутатиона, белка, глутатиона в культуральной жидкости.

АЛГОРИТМ ПРОВЕДЕНИЯ РАБОТЫ



Блок 1. Брожение – одна из разновидностей биологического окисления субстрата у гетеротрофных микробов в целях получения энергии, когда акцептором электронов или атомов водорода является органическое вещество.

Возбудителями брожения могут быть дрожжи – сахаромицеты, некоторые мицелиальные грибы (*Aspergillus oryzae*) и бактерии (*Erwinia amylovora*, *Sarcina ventricular*, *Zygomonas mobilis*, *Z. anaerobia*). Дрожжи лучше развиваются в кислой среде (рН 4-6) и выдерживают до (15-17) % спирта в растворе.

Дрожжи верхового брожения (*Saccharomyces cerevisiae*) находятся в верхних слоях суслу, куда они поднимаются образующимся углеродом диоксида

и пеной. Брожение идет с незначительным повышением температуры (20-28) °С. Незадолго до конца брожения дрожжи образуют хлопья и оседают на дно бродильных емкостей. Через 5-7 дней верховое брожение заканчивается.

Дрожжи низового брожения (*Saccharomyces vini*) развиваются в анаэробных условиях и при более низкой температуре (6-12) °С, поэтому процесс протекает медленно (8-10 дней). Дрожжи вскоре оседают на дно и образуют хлопьевидный осадок.

Одним из наиболее широко распространенных внутриклеточных пептидов, принимающих участие в окислительно-восстановительных процессах в клетках и переносе аминокислот через биологические мембраны, является глутатион, который является коферментом оксидоредуктаз.

Глутатион может быть в двух формах: окисленной и восстановленной, активатором является восстановленная форма. Активирующее действие этих соединений основано на том, что они восстанавливают дисульфидные связи фермента в сульфгидрильные, необходимые для проявления ферментом своей каталитической активности, а сами при этом окисляются за счет превращения сульфгидрильных связей в дисульфидные.

Восстановленный глутатион (HS-глутатион) может окисляться в дисульфидную форму мягкими окислителями (например: йодом, бромом), молекулярным кислородом в присутствии катализаторов, а также дегидроаскорбиновой кислотой в присутствии фермента.

Окисленная форма глутатиона превращается в восстановленную под действием сильных восстановителей или ферментов. Благодаря своей способности подвергаться ферментативному окислению и восстановлению глутатион служит биологическим переносчиком водорода.

Содержание глутатиона в дрожжах достигает до 1 % на сухой вес (влажность прессованных дрожжей составляет около 75 %). Живые неповрежденные дрожжевые клетки при суспендировании в воде практически не выделяют глутатион. Активно бродящие дрожжевые клетки (при суспендировании дрожжей

в растворе сахара) выделяют в окружающую среду значительное количество глутатиона.

Блок 2. Инструктаж по технике безопасности проводится преподавателем перед началом выполнения практической части работы, о чем в лабораторном журнале по технике безопасности делается соответствующая отметка.

Блок 3. Исследования производят в трех вариантах: «голодающие» дрожжи – контроль, «бродящие» дрожжи – опыт (2 варианта).

Для проведения работы студенты разбиваются на группы, каждая из которых выполняет один из вариантов опыта (таблица 4). В 1-м варианте к суспензии дрожжей добавляется сахароза – источник углеводного питания; в 2-м варианте – сахароза и этиловый спирт в такой концентрации, которая вызывает нарушение физиологических процессов в дрожжевых клетках.

Таблица 4 – Состав питательных сред для культивирования дрожжей

Вариант опытов	Состав инкубационной смеси			
	Дрожжи прес-сованные, г	Вода, мл	10 % р-р сахарозы, мл	Этиловый спирт, мл
контроль	15	200	-	-
1	15	100	100	-
2	15	70	100	30

Навеску дрожжей вносят в стакан на 400-500 см³ и добавляют туда заданное количество воды, подогретой до 30°C. Стеклой палочкой осторожно разминают комочки дрожжей и стакан ставят в водяной термостат с температурой 30°C, оборудованный мешалкой. Включают мешалку и вносят в стакан остальные компоненты инкубационной смеси, предварительно термостатированные при 30°C. Через одну минуту, не останавливая мешалки, отбирают из стакана пробу дрожжевой суспензии объемом 40 см³ для проведения исследований.

Во время отбора пробы интенсивность перемешивания должна быть достаточной для того, чтобы поддерживать однородность суспензии во всем объеме жидкости. После отбора пробы мешалку выключают, а дрожжевую суспензию оставляют в термостате. В дальнейшем из каждой колбы отбирают по 40 см³ однородной суспензии через 1, 2, и 3 часа после начала термостатирования.

Пробы центрифугируют и в центрифугате определяют перечисленные выше показатели. Работа организуется таким образом, чтобы каждая проба дрожжевой воды была проанализирована по всем показателям до отбора следующей пробы.

Блок 4. Надосадочную жидкость после центрифугирования исследуют по следующим показателям:

- определение белка по Лоури (приложение Д);
- определение глутатиона (приложение Е);
- определение кислотности (титрование 10 мл фугата 0,1 н NaOH),
- определение pH.

По завершении эксперимента полученные данные сводят в таблицу 5 и строят графики, сравнивая поведение дрожжей в условиях брожения и голодания.

Таблица 5 – Результаты исследований фугата.

Варианты Опыта	Время инкубации, часов	Белок по Лоури, мг/ см ³	Глутатион, мг	Общая кислотность, см ³ 0,1 н NaOH	pH
«голодающие» Дрожжи (контроль)	0				
	1				
	2				
	3				
«бродящие» дрожжи (опыт, варианты 1 и 2)	0				
	1				
	2				
	3				

Блок 5. Отчет о работе должен включать:

- титульный лист;
- цель работы и алгоритм выполнения;
- краткое теоретическое обоснование проводимых исследований;
- методику приготовления питательных сред и культивирования дрожжей;
- методики определения глутатиона и белка в культуральной жидкости;
- результаты исследований состава культуральной жидкости;
- выводы.

Блок 6. Контрольные вопросы:

- типы брожения, микроорганизмы-возбудители различных видов брожения;
- классификация дрожжей по видам брожения;
- спиртовое брожение, способы получения этанола,
- особенности биосинтеза глицерина;
- закономерности ацетоно-бутилового брожения;
- активирующее действие глутатиона, окислители и восстановители глутатиона.

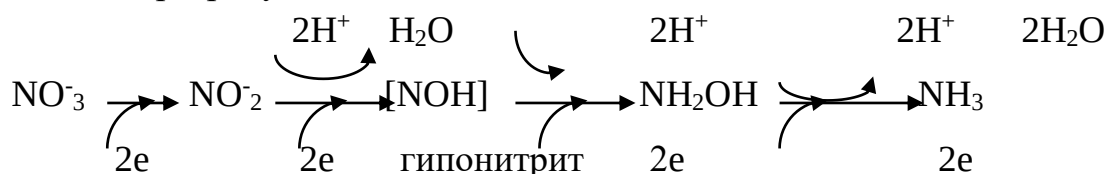
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 7

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ИСТОЧНИКА АЗОТНОГО ПИТАНИЯ НА РОСТ МОЛОЧНОКИСЛЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

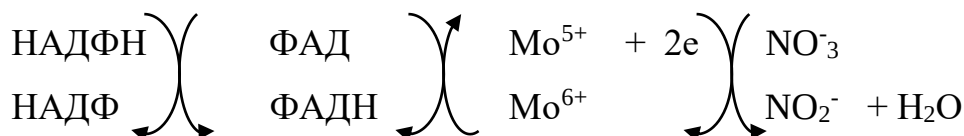
Цель и содержание работы: изучить закономерности ассимиляции азотсодержащих соединений микроорганизмами, исследовать влияние источника азотного питания на процесс молочнокислого брожения.

Теоретическое обоснование.

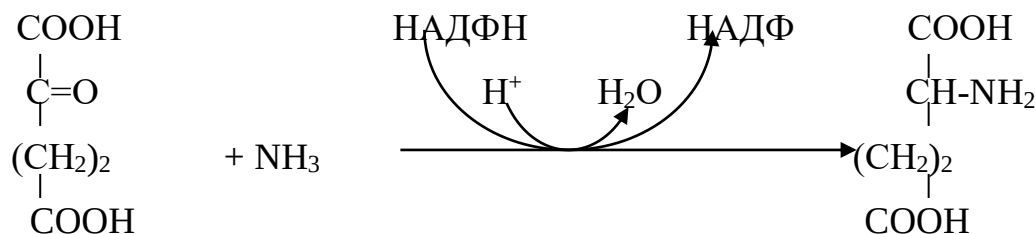
Азот в питательных средах представлен, как правило, солями, содержащими ион аммония или нитрат-ион. Непосредственно в метаболизм клетки включается ион аммония. Восстановление нитрат-иона до NH_3 осуществляется под действием фермента нитратредуктазы по схеме:



Нитратредуктаза – высокомолекулярный комплекс из двух белков, один из которых – ФАД-зависимый – акцептирует электроны восстановленных молекул НАДН и НАДФН и переносит их на второй белок, содержащий Мо-порфириновое кольцо:

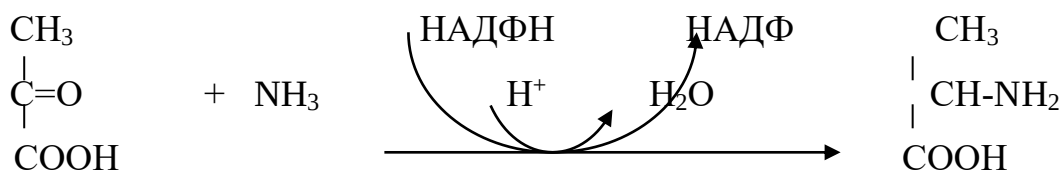


Аммонийный азот, попадая в клетку, включается путем аминирования в органические соединения, образуя соответствующую аминокислоту. Чаще всего аминированию подвергаются ПВК, α -кетоглутаровая, щавелевоуксусная кислоты. Очень важной является реакция аминирования α -КГК под действием аллостерического НАД- или НАДФ-зависимого фермента глутаматдегидрогеназы (НАД- в катаболических процессах; НАДФ – при синтезе аминокислоты).

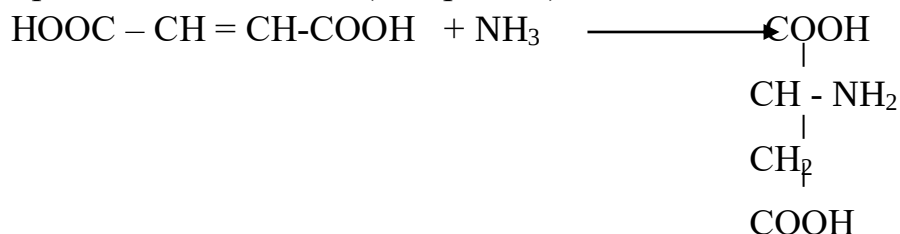


Глутаминовая кислота – промежуточный метаболит при синтезе ряда аминокислот (пролин, аргинин и др.). У ряда микроорганизмов глутаматдегидрогеназа является единственной ферментной системой, осуществляющей включение аммонийного азота в метаболические процессы.

Синтез аланина осуществляется под действием аланиндегидрогеназы:



Аспарагиновая кислота образуется из фумаровой, реакция катализируется аспарат-аммиак-лиазой (аспартазой):



Аспарагиновая кислота – предшественник метионина, пролина, изолейцина.

Аминокислоты, поступившие в клетку благодаря активности пермеаз, могут включаться в реакции переаминирования с органическими кислотами (α -КГК, ПВК, ЩУК), катализируемые соответствующими трансаминазами (кофермент – пиродоксальфосфат). Следует учитывать, что диамино-, ароматические и гетероциклические аминокислоты при переаминировании могут давать токсичные для клетки продукты (лизин и орнитин – соответственно путресцин и кадаверин; гистидин – гистамин).

В тех случаях, когда аминокислоты не способны транспортироваться в клетку в виду отсутствия необходимых пермеаз, осуществляется их расщепление внеклеточными дегидрогеназами до NH_3 и органических кислот и отдельный транспорт. Этот механизм позволяет создавать микроорганизмам необходимую буферную систему в среде.

Питательные среды для выращивания молочнокислых бактерий готовят на основе обезжиренного молока или молочной сыворотки с добавлением кукурузного экстракта (или аминокислотно-микроэлементно-витаминного комплекса), буферных солей и стимуляторов роста. В качестве буферных солей используют цитрат натрия или ацетат натрия. Стимуляторами роста молочнокислых бактерий являются сульфат марганца, аскорбиновая кислота. В качестве дополнительного источника азотного питания при получении производственных питательных сред для культивирования молочнокислых микроорганизмов на основе молочной сыворотки используют гидролизаты казеина и других белков животного или растительного происхождения.

Аппаратура и материалы: термостат, рефрактометр, рН-метр, колбы термостойкие емкостью 200 – 250 см³, пипетки стерильные на 1 см³ и 10 см³, молочная сыворотка, компоненты питательных сред, закваски молочнокислых микроорганизмов, 0,1 Н раствор гидроксида натрия, 0,1%-й спиртовой раствор фенолфталеина, 2,5 %-й раствор сульфата кобальта.

Указания по технике безопасности

Студенты могут быть допущены к работе только после ознакомления с правилами техники безопасности. Знание студентами правил техники безопасности преподаватель проверяет и фиксирует в журнале. При выполнении анализов нужно быть внимательным, соблюдать осторожность, все операции проводить аккуратно, без спешки, в рабочем халате. Категорически запрещается принимать пищу за лабораторным столом и пробовать на вкус химические вещества. При работе с термостатами, сушильными шкафами, магнитными мешалками следует соблюдать общие правила электробезопасности, категорически запрещается отбор проб из термостатов и сушильных шкафов во включенном состоянии.

Методика и порядок проведения работы.

Порядок проведения работы представлен в виде блок-схемы алгоритма на рисунке 6. 1.

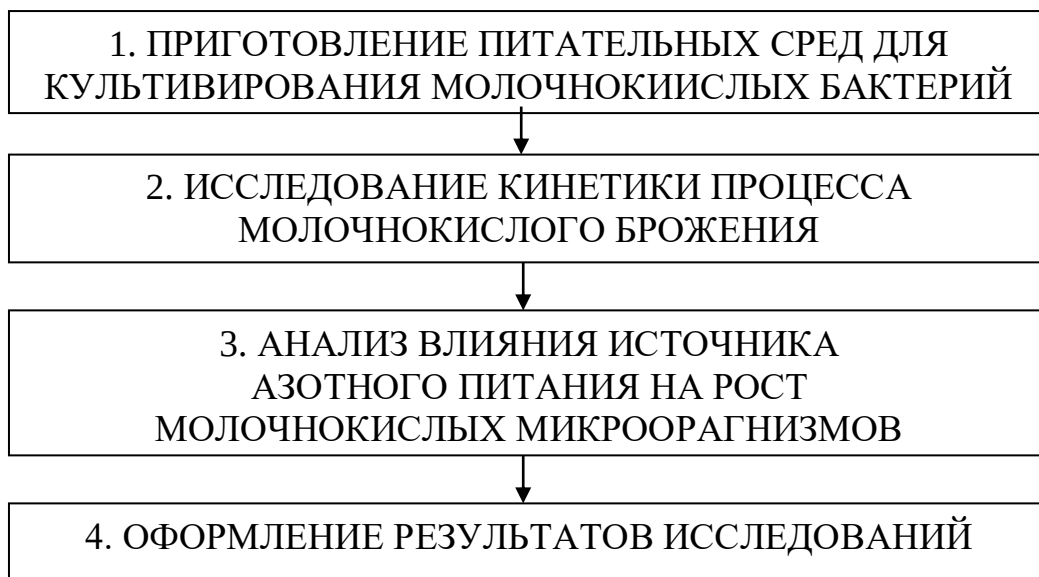


Рисунок 6.1 – Блок-схема алгоритма проведения лабораторной работы «Изучение влияния источника азотного питания на рост молочнокислых микроорганизмов»

Пояснения к блокам.

БЛОК 1. Приготовление питательной среды для культивирования дрожжей осуществляют по рецептуре, приведенной в таблице 7. 1.

Компоненты питательных сред (за исключением аскорбиновой кислоты) вносят в молочную сыворотку, предварительно нагретую до температуры (40 – 45) °С. Аскорбиновую кислоту вносят в охлажденные пастеризованные питательные среды.

Таблица 7. 1 – Состав питательных сред для культивирования молочнокислых бактерий

Компонент	Единица измерения	Количество компонентов по вариантам			
		1	2	3	4
Молочная сыворотка	см ³	250	200	250	200
Обезжиренное молоко	см ³	-	50	-	50
MgSO ₄	мг	165	165	165	165
Аскорбиновая кислота	мг	5	5	5	5
Гидролизат белков	см ³	-	-	0,15	0,15

Питательные среды нагревают до температуры пастеризации (72 – 74) °С, выдерживают в течение (15 – 20) с, после чего охлаждают до температуры инокуляции закваски молочнокислых бактерий, приготовленной на стерильном обезжиренном молоке: для мезофильных молочнокислых стрептококков – (28 – 30) °С, ацидофильной палочки – (38 – 40) °С, термофильных молочнокислых стрептококков и болгарской палочки – (41 – 43) °С. Доза внесения закваски составляет для мезофильных и термофильных молочнокислых стрептококков, болгарской палочки – 5 % от объема питательной среды, для ацидофильной палочки – 3 % от объема питательной среды.

БЛОК 2. В исходных питательных средах до внесения закваски молочнокислых микроорганизмов определяют следующие физико-химические показатели:

- массовую долю сухих веществ рефрактометрическим методом;
- рН среды и титруемую кислотность.

Культивирование молочнокислых микроорганизмов в зависимости от видового состава закваски проводят при указанных выше температурных режимах. Через каждые (30 – 40) минут отбирают пробы культуральной жидкости и определяют массовую долю сухих веществ, рН среды и титруемую кислотность. По результатам исследований строят графики зависимостей массовой доли сухих веществ, рН среды и титруемой кислотности от продолжительности ферментации.

БЛОК 3. По завершении процесса культивирования полученные образцы помещают в холодильник и на второй день исследований определяют конечные значения массовой доли сухих веществ, рН среды и титруемой кислотности.

БЛОК 4. Обобщить результаты опытов по определению влияния углеводного состава питательных сред на выход биомассы дрожжей и состав продуктов аэробного метаболизма дрожжей. Данные свести в таблицу 7.2.

Таблица 7.2 – Сводные данные по определению влияния источника азотного питания на рост молочнокислых микроорганизмов

Контролируемые показатели	№ варианта			
Массовая доля сухих веществ, % контроль опыт				
Титруемая кислотность, °T контроль опыт				
рН среды контроль опыт				

Содержание отчета и его форма. Отчет о выполнении работы должен включать:

- титульный лист;
- цель работы и краткое теоретическое обоснование проводимых исследований;
- алгоритм и методики проведения исследований;
- результаты исследований и расчетов, графические зависимости;
- выводы.

Контрольные вопросы и защита работы:

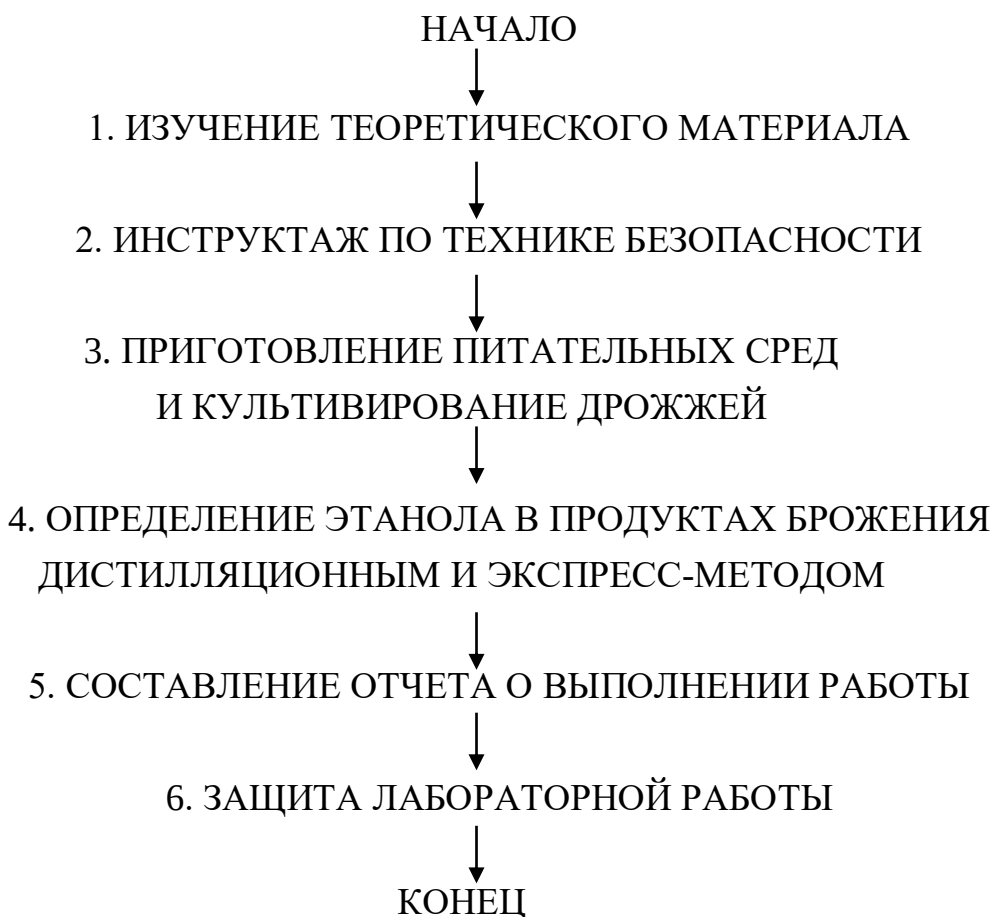
- ассимиляция углеводов микроорганизмами. Особенности метаболизма метилотрофных микроорганизмов;
- схема включения этанола и ацетата в метаболические процессы;
- схема β - и α -окисления жирных кислот;
- механизмы ассимиляции азотсодержащих соединений;
- взаимосвязь обмена белков, липидов и углеводов в клетках микроорганизмов;
- классификация микроорганизмов по механизму функционирования электронотранспортной цепи (ЭТЦ);
- аэробный тип метаболизма, биологическая роль дыхательной цепи;
- особенности фотосинтетического метаболизма микроорганизмов;
- анаэробные окислительно-восстановительные процессы, эффект Пастера;
- особенности метаболизма метаногенных микроорганизмов;
- методы контроля процесса молочнокислого брожения.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 8

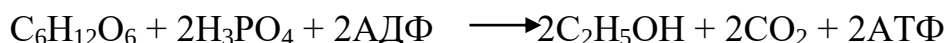
ИЗУЧЕНИЕ МЕТОДОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭТАНОЛА В КУЛЬТУРАЛЬНЫХ ЖИДКОСТЯХ И ПРОДУКТАХ БРОЖЕНИЯ

Цель работы: освоить экспериментальные методики определения этилового спирта в культуральных жидкостях и продуктах брожения.

АЛГОРИТМ ПРОВЕДЕНИЯ РАБОТЫ



Блок 1. Процесс спиртового брожения используется в биотехнологии для получения этанола и, в меньших масштабах, глицерина. Суммарное уравнение процесса имеет вид:



Помимо основных продуктов брожения – этанола и CO_2 , всегда образуется некоторое количество побочных продуктов: глицерина, уксусной кислоты и др. Субстраты, ассимилируемые различными возбудителями спиртового брожения, весьма разнообразны. Дрожжи рода *Saccharomyces* сбраживают глюкозу, фруктозу, маннозу, мальтозу; дрожжи рода *Kluyveromyces* – лактозу и галактозу;

отдельные виды *Candida* и *Pichia* способны ассимилировать пентозы, в первую очередь, D-ксилозу; мицелиальные грибы утилизируют широкий спектр гексоз и пентоз.

1-ая группа. Микроорганизмы, расщепляющие сахара по пути гликолиза до ПВК с последующим восстановлением до этанола. Ключевыми реакциями процесса являются декарбоксилирование ПВК и восстановление ацетальдегида до этанола.

2-ая группа. Микроорганизмы, способные расщеплять углеводы до ПВК по пути Энтнера-Дудорова. К этой группе относятся *Zygomonas mobilis*, некоторые виды *Pseudomonas*. Дальнейшие превращения ПВК протекают по описанной выше схеме.

3-я группа. Микроорганизмы, расщепляющие углеводы по гексозомонофосфатному пути до ксилулозо-5-фосфата. Это гетероферментативные молочнокислые микроорганизмы.

Блок 2. Инструктаж по технике безопасности проводится преподавателем перед началом выполнения практической части работы, о чем в лабораторном журнале по технике безопасности делается соответствующая отметка.

Блок 3. Приготовление питательных сред и культивирование дрожжей осуществляют по методике, описанной в методических указаниях к выполнению лабораторной работы № 4.

Блок 4. По завершении культивирования культуральную жидкость центрифугируют, в надосадочной жидкости определяют содержание этанола дистилляционным методом (приложение Ж) и экспресс-методом на анализаторе «Колос» (приложение З).

Блок 5. Отчет о работе должен включать:

- титульный лист;
- цель работы и алгоритм выполнения;
- краткое теоретическое обоснование проводимых исследований;
- методику приготовления питательных сред и культивирования дрожжей;
- методики определения этанола в культуральной жидкости;

- результаты определения этанола в культуральной жидкости;
- выводы.

Блок 6. Контрольные вопросы:

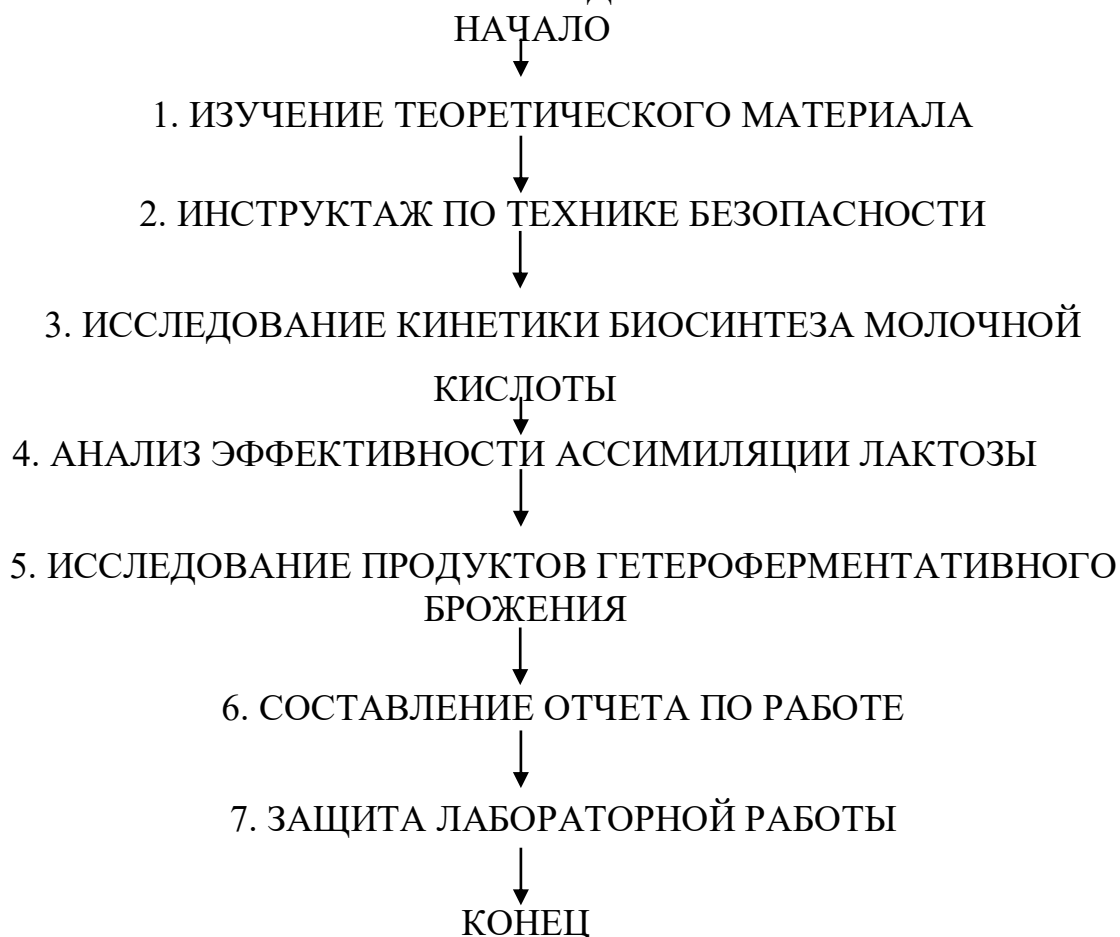
- классификация микроорганизмов по механизму функционирования электронотранспортной цепи (ЭТЦ);
- аэробные окислительно-восстановительные процессы, биологическая роль транспорта электронов;
- фотосинтетический тип метаболизма у микроорганизмов;
- анаэробные окислительно-восстановительные процессы;
- особенности метаболизма метаногенных микроорганизмов;
- сущность методов определения спирта в культуральных жидкостях и продуктах брожения.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 9

ИЗУЧЕНИЕ КИНЕТИКИ ГОМОФЕРМЕНТАТИВНОГО МОЛОЧНОКИСЛОГО БРОЖЕНИЯ

Цель работы: изучить биохимические закономерности гомоферментативного и гетероферментативного молочнокислого брожения; исследовать кинетику биосинтеза молочной кислоты молочнокислыми микроорганизмами; оценить эффективность ассимиляции лактозы различными микроорганизмами; овладеть методами определения титруемой кислотности молока, концентрации лактозы, наличия продуктов гетероферментативного брожения в культуральной жидкости.

АЛГОРИТМ ПРОВЕДЕНИЯ РАБОТЫ



Блок 1. Получение молочной кислоты является одним из старейших и наиболее крупномасштабных микробиологических производств. Ее промышленный выпуск был освоен в 1881 году. Молочная кислота широко используется в пищевой промышленности в качестве вкусовой добавки и

консерванта, в химической технологии как исходный продукт для синтезов, осуществляемых через лактонитрилы; лактат кальция применяется в фармацевтике как источник кальция.

Процесс молочнокислого брожения с древнейших времен был реализован человечеством при получении кисломолочных напитков, творога и сыра, консервировании овощей и фруктов, кормов для сельскохозяйственных животных. В настоящее время закваски (стартовые культуры) на основе чистых культур молочнокислых микроорганизмов применяются в молочной и мясной промышленности, в хлебопечении, при силосовании кормов.

Характерными особенностями молочнокислых микроорганизмов являются:

- способность усваивать лактозу в качестве основного источника углерода и энергии;
- образование молочной кислоты с выходом более 90 % от исходной концентрации лактозы в среде;
- высокая кислотоустойчивость (сохраняют жизнеспособность при pH 3,0-3,5);
- спиртоустойчивость (выдерживают до 16 % этанола);
- использование флавиновых оснований и коэнзима B₁₂ в окислительно-восстановительных ферментах;
- отсутствие ЦТК и окислительного фосфорилирования.

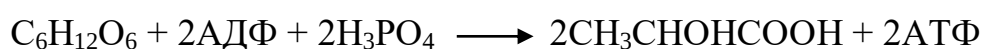
По морфологии молочнокислые микроорганизмы относятся к кокковым (роды *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*) и палочковидным (род *Lactobacillus*). По биохимическим закономерностям и составу конечных продуктов метаболизма молочнокислые бактерии и палочки подразделяют на гомоферментативные и гетероферментативные. В первом случае образуется преимущественно молочная кислота (обнаруживаются лишь следовые количества летучих кислот, этанола, других побочных продуктов); во втором – наряду с молочной кислотой образуются значительные количества CO₂, этанола, летучих ароматических веществ.

Гомоферментативные молочнокислые бактерии используют для промышленного получения молочной кислоты, силосования кормов; гетероферментативные культуры наиболее широкое применение нашли в производстве кисломолочных продуктов.

Промежуточные реакции *гомоферментативного молочнокислого брожения* протекают по схеме гликолиза до стадии образования пировиноградной кислоты. Ключевой реакцией процесса является восстановление пировиноградной кислоты до молочной кислоты, катализируемое у микроорганизмов двумя НАД-зависимыми стереоспецифичными лактатдегидрогеназами (соответственно L- и D-лактатдегидрогеназа).

При молочнокислом брожении чаще всего образуется рацемическая LD-форма. В то же время ряд микроорганизмов образует исключительно один оптический изомер. Например, некоторые виды *Streptococcus* образуют лишь L-форму кислоты, а *Lactobacillus* - только D-форму. Рацемическая форма возникает вследствие того, что микроорганизм содержит обе стереоспецифические лактатдегидрогеназы, либо одну лактатдегидрогеназу и специфическую лактатрацемазу.

Суммарное уравнение гомоферментативного молочнокислого брожения:



Лактоза

Молочная кислота

При *гетероферментативном молочнокислом брожении* наряду с молочной кислотой могут образовываться CO_2 , этанол, уксусная и пропионовая кислоты, ароматические вещества (диацетил, ацетоин), многоатомный спирт маннит. Гетероферментативное брожение в свою очередь подразделяют на идущее без выделения CO_2 и сопровождающееся газовыделением.

В первом случае сбраживание глюкозы осуществляется по гексозомонофосфатному пути до стадии образования ксилулозо-5-фосфата, который под действием фермента фосфокетолазы расщепляется на 3-фосфоглицериновый альдегид и макроэргический ацетилфосфат. Фосфоглицериновый альдегид по механизму гликолиза трансформируется в

пировиноградную кислоту. Ацетилфосфат является исходным продуктом для синтеза органических кислот (в первую очередь, уксусной и пропионовой), ацетоина, диацетила и других метаболитов. Например, под действием ацетаткиназы он превращается в уксусную кислоту. Суммарное уравнение процесса в данном случае имеет вид:



Лактоза

Молочная кислота Уксусная кислота

В случае, когда имеет место газообразование, расщепление глюкозы происходит по аналогичной схеме. Отличие состоит в том, что образовавшийся при расщеплении ксилулозо-5-фосфата ацетилфосфат расщепляется с образованием одной молекулы АТФ и восстанавливается до этанола. Суммарное уравнение процесса:



Лактоза

Молочная кислота Этанол

Наряду с этанолом некоторые виды гетероферментативных молочнокислых бактерий способны образовывать уксусную кислоту или другие продукты трансформации ацетилфосфата.

Важнейшей биохимической характеристикой молочнокислых микроорганизмов является предельная кислотность – максимальное значение титруемой кислотности молока или другого вида лактозосодержащего сырья, достигаемое при развитии культуры микроорганизмов. Титруемую кислотность выражают в градусах Тернера (°Т). Один градус Тернера соответствует количеству 0,1 Н раствора гидроксида натрия или кальция, необходимому для нейтрализации 100 см³ молока или продукта (приложение А). Значение титруемой кислотности позволяет приблизительно определить концентрацию молочной кислоты в продукте. Для этого можно использовать следующую расчетную формулу.

$$C_{\text{м.к.}} = (K_{\text{Т}} * M_{\text{к}} * C_{\text{осн}}) / (V_{\text{ал}} * 10), \%, \quad (1)$$

где $K_{\text{Т}}$ – титруемая кислотность продукта, °Т;

$M_{\text{к}} = 90$ г/моль – молярная масса молочной кислоты;

$C_{\text{осн}} = 0,1 \text{ моль} \cdot \text{экв/л}$ – концентрация щелочи;

$V_{\text{ал}} = 100 \text{ мл}$ - объем аликвоты продукта, эквивалентный значению титруемой кислотности;

10 – коэффициент пересчета молярной концентрации кислоты в процентную.

Таким образом, формула (1) может быть приведена к виду:

$$C_{\text{м.к.}} = K_{\text{т}} \cdot 0,009 \text{ , \%} , \quad (2)$$

Блок 2. Инструктаж по технике безопасности проводится преподавателем перед началом выполнения практической части работы, о чем в лабораторном журнале по технике безопасности делается соответствующая отметка.

Блок 3. Для исследования закономерностей молочнокислого брожения используют лактозосодержащее молочное сырье, например, обезжиренное молоко. Опыт проводят по следующей схеме:

- образец обезжиренного молока объемом 250 см^3 пастеризуют в термостойкой колбе на водяной бане при температуре $85-87^\circ\text{C}$ с выдержкой 5 минут;

- охлаждают молоко до температуры, оптимальной для развития используемой в опыте культуры молочнокислых микроорганизмов;

- в асептических условиях вносят закваску молочнокислых микроорганизмов, приготовленную на стерильном или пастеризованном молоке, в количестве 5 % от объема молока;

- определяют титруемую кислотность молока (приложение А) в начальный момент и затем с интервалом 40-60 минут до достижения постоянного значения, термостатируя образец при температуре, оптимальной для развития культуры.

Результаты исследований заносят в таблицу 9.1.

Таблица 9.1 – Результаты исследований кинетики молочнокислого брожения

Видовой состав закваски	Температура культивирования, $^\circ\text{C}$	Продолжительность термостатирования, мин.	Титруемая кислотность, $^\circ\text{T}$

Строят график зависимости титруемой кислотности от продолжительности культивирования.

Блок 4. Концентрацию лактозы определяют в исходном молоке до внесения закваски и в культуральной жидкости по завершении процесса брожения по методике, приведенной в приложении 3. Рассчитывают конечную концентрацию молочной кислоты в культуральной жидкости по формуле (6. 2) и определяют экономический коэффициент по молочной кислоте:

$$Y_{P/S} = C_K / (C_{Л.н.} - C_{Л.к.}), \quad (3)$$

где $C_{Л.н.}$ и $C_{Л.к.}$ – начальная и конечная концентрация лактозы в молоке, %.

Блок 5. Продукты гетероферментативного брожения в культуральной жидкости открывают по методикам, приведенным в приложении И.

Результаты исследований продуктов брожения сводят в таблицу 9.2.

Таблица 9.2 – Результаты исследований состава культуральной жидкости

Видовой состав закваски	Концентрация молочной кислоты, %	$Y_{P/S}$	Наличие продуктов гетероферментативного брожения		Тип брожения (*)
			CO ₂	диацетила и ацетоина	

(*) Указать тип брожения: гомоферментативное, гетероферментативное с выделением CO₂, гетероферментативное без выделения CO₂.

По данным таблицы 2 проводят сравнительный анализ биохимических свойств различных видов молочнокислых микроорганизмов.

Блок 6. Отчет о работе должен включать:

- титульный лист;
- цель работы и алгоритм выполнения;
- описание биохимических закономерностей гомоферментативного и гетероферментативного молочнокислого брожения;
- методики проведения исследований кинетики молочнокислого брожения, определения титруемой кислотности, концентрации лактозы, открытия продуктов гетероферментативного брожения;
- результаты исследований и расчетов, графические зависимости;

- Выводы.

Блок 7. Контрольные вопросы:

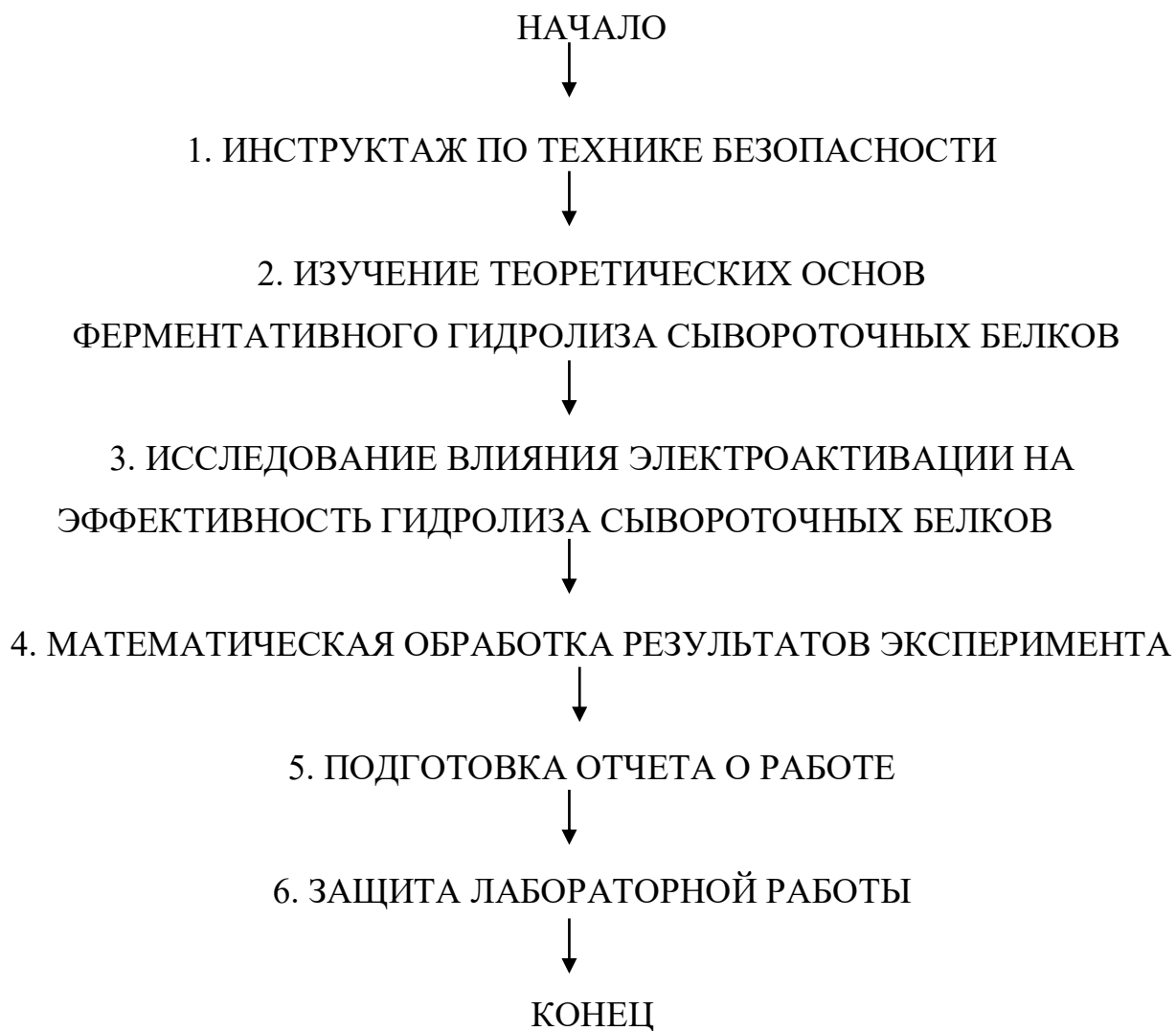
- классификация молочнокислых микроорганизмов по морфологическим и биохимическим свойствам;
- биохимические закономерности гомоферментативного и гетероферментативного молочнокислого брожения;
- закономерности направленного синтеза уксусной и пропионовой кислот;
- биохимизм ацетоно-бутилового брожения;
- закономерности реализации направленных синтезов через цикл Кребса на примере лимонной кислоты;
- методика исследования кинетики молочнокислого брожения;
- сущность методов определения концентрации лактозы, открытия продуктов гетероферментативного молочнокислого брожения.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 10

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССА ФЕРМЕНТАТИВНОГО ГИДРОЛИЗА БЕЛКОВ МОЛОЧНОЙ СЫВОРОТКИ

Цель работы: изучить теоретические основы ферментативного гидролиза сывороточных белков препаратами протеолитических ферментов; рассмотреть технологию получения и направления использования гидролизатов белков молока при производстве функциональных продуктов; исследовать влияние процесса электроактивации на активность препаратов панкреатина и выход продуктов гидролиза сывороточных белков.

АЛГОРИТМ ПРОВЕДЕНИЯ РАБОТЫ



Блок 1. Студенты могут быть допущены к работе только после ознакомления с правилами техники безопасности. Знание студентами правил техники безопасности преподаватель проверяет и фиксирует в журнале. При

выполнении анализов нужно быть внимательным, соблюдать осторожность, все операции проводить аккуратно, без спешки, в рабочем халате. Категорически запрещается принимать пищу за лабораторным столом и пробовать на вкус химические вещества.

Блок 2. Актуальность получения гидролизатов казеина и сывороточных белков молока обусловлена перспективой создания продуктов функционального питания, в том числе молочных, обогащенных незаменимыми нутриентами – аминокислотами. Белки молока являются биологически полноценными, так как содержат незаменимые аминокислоты в соотношениях, близких к шкале «идеального белка» ФАО-ВОЗ.

Проведение направленного гидролиза белков молока с использованием препаратов протеолитических ферментов или биотрансформирующих культур микроорганизмов способствует повышению растворимости молочно-белковых концентратов, а также их усвояемости организмом человека и нормальной кишечной микрофлорой. Значительный интерес представляет разработка технологий молочных продуктов с регулируемым аминокислотным составом за счет введения в рецептуры гидролизатов казеина и сывороточных белков.

Отечественными и зарубежными специалистами исследован процесс гидролиза казеина и белков молочной сыворотки с использованием широкого спектра ферментных препаратов микробного (протоальбин, проторизин, протолецентрин, протофрадин) и животного (панкреатин медицинский и технический, пепсин куриный, трипсин), а также биотрансформирующие культуры микроорганизмов *Thermoactinomyces vulgaris* и *Actinomyces thermovulgaris*. Наиболее высокие значения степени гидролиза сывороточных белков были получены при использовании культур *Thermoactinomyces vulgaris* (88,9 %) и *Actinomyces thermovulgaris* (88,3 %), препаратов трипсина (76,5 %), протофрадина (67,8 %), панкреатина медицинского (67 %).

В зависимости от применяемых ферментных препаратов или различных их комбинаций, а также за счет регулирования температурных режимов гидролиза и

его продолжительности можно получить ферментативные препараты казеина и сывороточных белков различного функционального назначения.

Сухие гидролизаты молочных белков (ТУ 92-11371113-02-92) вырабатываются из обезжиренного молока, подсырной сыворотки или их смеси 50:50 путем ферментативного гидролиза с помощью панкреатина и выделения пептидной фракции методом ультрафильтрации или нанофильтрации с последующим сгущением в вакуум-выпарной установке и сушкой в распылительной сушилке.

Сухие гидролизаты молочных белков используются в качестве белковой основы для получения продуктов лечебного и профилактического питания детей и взрослых.

Разработаны гидролизаты следующих видов:

1. ГМБ – 1/1, ГМБ -1/2 и ГМБ – 1/3 – с массовой долей аминного азота не более 10% общего азота;
2. ГМБ - 2/1, ГМБ – 2/2 и ГМБ – 2/3 – с массовой долей аминного азота не более 15% общего азота;
3. ГМБ – 3/1, ГМБ – 3/2 и ГМБ – 3/3 – с массовой долей аминного азота не менее 20% общего азота.

В СКФУ разработана технология сухого гидролизата сывороточных белков молока, получаемого методом ультрафильтрации (ГСБ-УФ). Технологический процесс производства сухого гидролизата сывороточных белков из молочной сыворотки включает следующие операции:

- сбор молочной сыворотки;
- отделение жира и казеиновой пыли;
- электродиализная обработка до уровня деминерализации (80-90) %;
- пастеризация;
- сгущение молочной сыворотки методом ультрафильтрации или диафильтрации до массовой доли СВ 20-24%;
- гидролиз препаратом панкреатина;
- вакуум выпаривание до 40 % СВ;

- распылительная сушка;
- расфасовка и упаковка.

Блок 3. Методика проведения экспериментальных исследований.

В качестве объектов исследований могут быть использованы подсырная сыворотка, жидкий концентрат сывороточных белков с массовой долей сухих веществ (10-15) %, растворы сухого концентрата сывороточных белков с массовой долей сухих веществ (5-10) %. Процесс гидролиза концентрата сывороточных белков молока осуществляется по аналогии с гидролизом молока и проходит по следующей схеме.

Пастеризация концентрата сывороточных белков проводится для удаления посторонней микрофлоры и осуществляется при щадящих режимах, во избежание денатурации белков, т.е. при температуре 63-65 °С, без выдержки. При использовании молочной сыворотки пастеризацию проводят при температуре 70-72 °С, без выдержки. Затем концентрат охлаждается до оптимальной температуры действия фермента, т.е. до 45-50 °С.

Внесение оптимальной дозы фермента. Для препарата панкреатина квалификации «медицинский» активностью 45 ед./г рекомендовано вносить 0,1 % от объема сырья. Хлороформ вносится в объеме 0,5%.

Выставление оптимального значения pH (8,0-8,5). Для изучения влияния электроактивационной обработки сырья и ферментного препарата предложено несколько вариантов регулирования значения pH:

1. Раствором 1н NaOH.

2. Нейтрализация 1 н раствором NaOH до значений pH 6,5-7,0 для преодоления буферности концентрата по щелочи и далее – щелочной фракцией ЭХА-воды до оптимальных значений pH (8,0-8,5). Доза активированной воды для достижения требуемых значений pH составляет (10-15) % от объема смеси, что необходимо учитывать при приготовлении раствора сухого концентрата сывороточных белков.

3. Обработка раствора концентрата сывороточных белков или подсырной сыворотки и раствора препарата панкреатина в анодной камере

электроактивационной установки до значений рН (8,0-8,5) с последующим их смешением.

Проведение гидролиза. Процесс гидролиза проводят при температуре 45-50 °С, в течении 14-16 часов. В исходном сырье, в инкубационной смеси в первые 3 – 4 часа и по завершении опыта определяют концентрацию аминного азота по методике, описанной в приложении К.

Результаты исследований заносят в таблицу 7. 1.

Таблица 7. 1 – Результаты исследований процесса ферментативного гидролиза белков молочной сыворотки.

№ варианта обработки	Продолжительность, часов	Концентрация аминного азота, мг/100 г
1		
2		
3		

Блок 4. Результаты исследований обрабатывают на ПЭВМ и получают уравнение регрессии, описывающее зависимость концентрации аминного азота от продолжительности термостатирования образцов для каждого из вариантов обработки концентрата сывороточных белков или молочной сыворотки. По полученным зависимостям проводят анализ эффективности использования электроактивационной обработки в процессе гидролиза белков молочной сыворотки.

Блок 5. Отчет о работе должен включать:

- титульный лист;
- цель работы и схему ее проведения;
- теоретическое обоснование применения протеолитических ферментных препаратов для гидролиза белков молочного сырья;
- результаты экспериментальных исследований, графические и аналитические зависимости;
- выводы.

Блок 6. Контрольные вопросы:

- общие закономерности биосинтеза аминокислот;

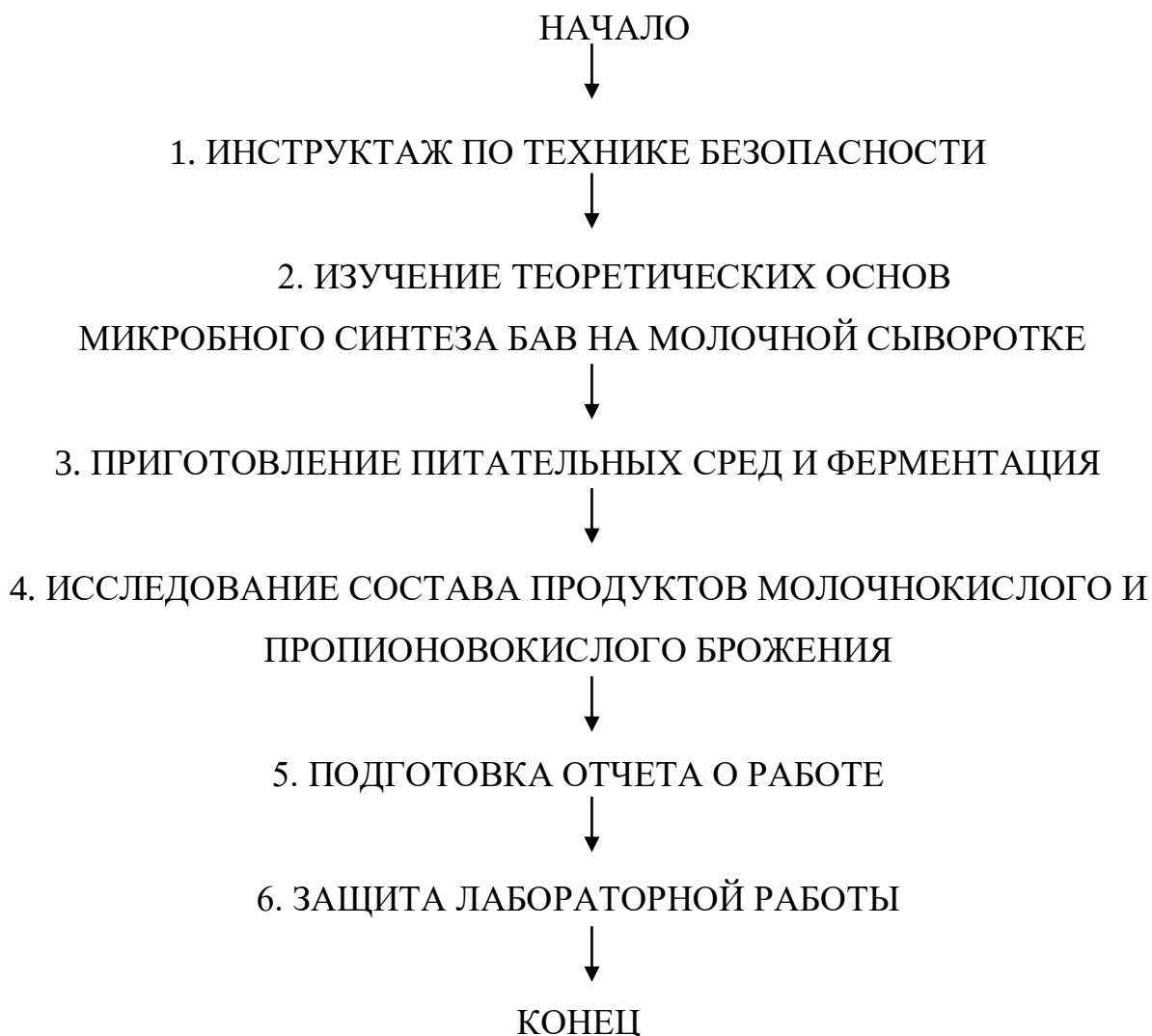
- метаболические пути биосинтеза лизина;
- биохимические закономерности направленного синтеза глутаминовой кислоты;
- механизмы направленного синтеза ароматических аминокислот на примере триптофана;
- ферментативное разделение оптических изомеров аминокислот;
- классификация протеолитических ферментов;
- характеристика ферментных препаратов, используемых для гидролиза пищевых белков;
- технологии получения гидролизатов белков молока, области их применения.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 11

ИССЛЕДОВАНИЕ МИКРОБНОГО СИНТЕЗА ПРОДУКТОВ ГЕТЕРОФЕРМЕНТАТИВНОГО МОЛОЧНОКИСЛОГО И ПРОПИОНОВОКИСЛОГО БРОЖЕНИЯ НА МОЛОЧНОЙ СЫВОРОТКЕ

Цель работы: изучить требования к молочной сыворотке, как сырью для промышленного культивирования микроорганизмов; рассмотреть современные способы биотехнологической переработки молочной сыворотки; исследовать влияние состава питательной среды на процессы биосинтеза биологически активных веществ молочнокислыми и пропионовокислыми микроорганизмами; освоить методики определения продуктов молочнокислого и пропионовокислого брожения в ферментированной сыворотке.

АЛГОРИТМ ПРОВЕДЕНИЯ РАБОТЫ



Блок 1. Студенты могут быть допущены к работе только после ознакомления с правилами техники безопасности. Знание студентами правил техники безопасности преподаватель проверяет и фиксирует в журнале. При выполнении анализов нужно быть внимательным, соблюдать осторожность, все операции проводить аккуратно, без спешки, в рабочем халате. Категорически запрещается принимать пищу за лабораторным столом и пробовать на вкус химические вещества.

Блок 2. Молочная сыворотка является перспективным видом сырья промышленной биотехнологии. Актуальность использования молочной сыворотки в качестве основы питательных сред для культивирования промышленных продуцентов этанола, органических кислот, белковых и биологически активных веществ и других целевых продуктов биотехнологии обусловлена следующими факторами:

- высокое содержание лактозы (4,2-4,7 % при массовой доле сухих веществ 6,0-6,5 %), ассимилируемой многими микроорганизмами в качестве одного из основных источников углерода;
- наличие в составе молочной сыворотки органических соединений азота, водорастворимых витаминов, макро- и микроэлементов;
- дешевизна и доступность по сравнению препаратами углеводов, используемых при приготовлении синтетических питательных сред;
- необходимость разработки технологий рациональной переработки молочной сыворотки на продукты пищевого и кормового назначения;
- исключение сброса молочной сыворотки в канализацию, на поля орошения и фильтрации.

Результаты исследований отечественных и зарубежных ученых подтвердили возможность и целесообразность биотехнологической переработки молочной сыворотки для получения следующих групп целевых продуктов:

- органических кислот (молочной, уксусной, пропионовой, лимонной);
- этилового спирта и глицерина;
- концентратов витаминов группы В;

- белково-витаминных и каротинсодержащих концентратов;
- ферментных препаратов.

Микроорганизмы, которые могут быть использованы в биотехнологических процессах переработки молочной сыворотки, в зависимости от способности усваивать источники углеродного и азотного питания можно разделить на три группы.

1) Микроорганизмы, усваивающие лактозу и белки молочной сыворотки, для которых в качестве основы питательной среды используется натуральная или сгущенная до массовой доли сухих веществ (18 – 20)% молочная сыворотка. К этой группе относятся молочнокислые бактерии и палочки, дрожжи родов *Kluyveromyces* и *Torulopsis*.

2) Микроорганизмы, ассимилирующие лактозу, для которых сывороточные белки являются недоступным или труднодоступным источником азота. Для процессов культивирования данной группы продуцентов используются среды на основе депротеинизированной молочной сыворотки, скорректированные по азоту, фосфору и другим элементам, или на основе молочной сыворотки, обработанной препаратами протеолитических ферментов. Примерами подобных микроорганизмов являются бактерии рода *Clostridium*, грибы *Aspergillus niger*.

3) Микроорганизмы, не усваивающие лактозу или для которых предпочтительными являются другие источники углерода. В данном случае возможно совместное (пропионовокислые бактерии) или постадийное (уксуснокислые бактерии) культивирование с молочнокислыми микроорганизмами, а также предварительная обработка молочной сыворотки препаратами лактазы (дрожжи-сахаромицеты). Основные направления применения культур микроорганизмов при переработке молочной сыворотки представлены в таблице 11. 1.

Перспективным направлением переработки молочной сыворотки является получение белково-витаминных концентратов на основе биомассы молочнокислых и пропионовокислых бактерий, обогащенных витаминами группы

В, а также концентратов и препаратов водорастворимых витаминов пищевого назначения.

Таблица 11. 1 – Направления биотехнологической переработки молочной сыворотки

Микроорганизмы-продуценты	Целевые продукты
Гомоферментативные молочно-кислые бактерии	Молочная кислота, бакконцентраты, белково-витаминные концентраты, низин.
Гетероферментативные молочно-кислые бактерии	Напитки из молочной сыворотки, белковые пасты, бакконцентраты.
Пропионовокислые бактерии	Белково-витаминные концентраты, уксусная и пропионовая кислоты, витамин В ₁₂ .
Уксуснокислые бактерии	Уксусная кислота, столовый уксус.
Клостридии	Ацетон и бутанол, масляная кислота, рибофлавин.
Дрожжи	Этиловый спирт и глицерин, белково-витаминные концентраты, био жир, каротиноиды, рибофлавин.
Микроскопические грибы	Лимонная кислота, антибиотики, ферментные препараты, белково-витаминные концентраты, био жир, каротиноиды, рибофлавин.

Блок 3. Молочную сыворотку пастеризуют при температуре 70-75°C в течение 1 часа и охлаждают до температуры заквашивания. Контролируют массовую долю лактозы в исходной сыворотке йодометрическим методом (приложение А), содержание молочной кислоты фотоколориметрическим методом (приложение Б), аскорбиновой кислоты (приложение В) и витаминов группы В (приложение Г). В сыворотку вносят добавки минеральных солей (г/л): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 3; K_2HPO_4 - 2,0; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 0,002; рН среды 6,8 - 7,0 устанавливают с помощью 10%-ного раствора NaHCO_3 и 10%-го раствора H_2SO_4 . Среду разливают по 250 см³ в конические колбы.

В качестве посевного материала по заданию преподавателя используют закваску на чистых культурах молочнокислых микроорганизмов (болгарской или ацидофильной палочки, термофильного стрептококка), симбиотическую закваску микроорганизмов кефирного грибка, симбиотическую закваску на чистых культурах молочнокислых и пропионовокислых бактерий. Закваски готовят на

пастеризованном или стерилизованном обезжиренном молоке. Чистоту культуры контролируют методом непосредственного микроскопирования окрашенных препаратов. При микроскопии препарата просматривают до 10 полей зрения, при этом не должно быть скопления клеток микроорганизмов. Количество посевного материала - 10% от объема питательной среды. Определяют массовую долю сухих веществ среды рефрактометрическим методом, титруемую кислотность.

Ферментацию осуществляют при температуре, оптимальной для развития исследуемой культуры микроорганизмов (для симбиотической закваски – 30°C), в течение 96 часов по четырем вариантам.

- 1) Контрольная среда без внесения добавок.
- 2) Модифицированная среда с добавлением 5% обезжиренного молока.
- 3) Модифицированная среда с внесением 5% гидролизата обезжиренного молока.
- 4) Модифицированная среда с внесением 5% дрожжевого автолизата.

Через каждые 24 часа контролируют титруемую кислотность, массовую долю сухих веществ. Результаты исследований представить в виде графических зависимостей титруемой кислотности и массовой доли сухих веществ сред от времени культивирования.

Блок 4. В средах до внесения закваски и по завершении ферментации определяют титруемую кислотность, массовую долю сухих веществ, лактозы (приложение 3), концентрации аскорбиновой кислоты (приложение Л) и молочной кислоты – по формулам (1), (2).

Результаты исследований сводят в таблицу 11. 2.

Таблица 11. 2 – Результаты исследований продуктов ферментации.

№ вари- анта	Массовая доля СВ, %		Массовая доля лактозы, %		Титруемая кислотность, °Т		Концентрация молочной кислоты, мг%	Концентрация аскорбиновой кислоты, мкг/мл
	исх.	кон.	исх.	кон.	исх.	кон.		

Блок 5. Отчет о работе должен включать:

- титульный лист;
- цель работы и теоретическое обоснование проводимых исследований;
- алгоритм выполнения работы;
- направления биотехнологической переработки молочной сыворотки;
- - методику проведения исследований;
- результаты исследований;
- выводы.

Блок 6. Контрольные вопросы:

- общие закономерности микробного синтеза рибофлавина;
- пути биосинтеза витамина В₁₂;
- биосинтез аскорбиновой кислоты с использованием ферментных систем микроорганизмов;
- пути биосинтеза жирорастворимых витаминов на примере β-каротина;
- направления биотехнологической переработки молочной сыворотки;
- характеристика микроорганизмов, используемых при получении целевых продуктов на молочной сыворотке;
- методы исследования продуктов ферментации молочной сыворотки культурами молочнокислых и пропионовокислых бактерий.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 12

МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА АНТИБИОТИКОВ

Цель работы: изучение классификации и количественных показателей антибиотиков, исследование содержания антибиотиков.

Теоретические положения

Антибиотики – органические соединения, образуемые микроорганизмами и обладающие способностью в незначительных концентрациях избирательно тормозить рост других микроорганизмов или убивать их.

Применение антибиотиков в настоящее время не ограничивается лишь областью медицины. Антибиотики с огромным успехом используют как добавки в корма сельскохозяйственных животных, для лечения заболеваний растений, как средства, предотвращающие инфицирование в бродильной, консервной и других отраслях промышленности.

Качественное определение антибиотиков

Задача качественно определить неизвестный антибиотик встаёт как при изучении новых антибиотиков, так и в практике, если нужно показать присутствие антибиотика в фармацевтических препаратах. Обе задачи требуют совершенно различных методов.

Самым надёжным методом идентификации антибиотика является определение его инфракрасного спектра. Результаты здесь абсолютно однозначны. Только после измерения инфракрасного спектра можно с полной уверенностью судить об отличии или идентичности двух антибиотиков различного происхождения.

Поскольку инфракрасным спектрофотометром оснащена не каждая лаборатория, то для идентификации антибиотиков были разработаны системы простых химических реакций, довольно надёжных для идентификации известных антибиотиков.

Для быстрого качественного определения антибиотиков в фармацевтических препаратах очень удобна осциллографическая полярография. При хорошо подготовленной аппаратуре можно за несколько минут идентифицировать большинство ныне применяемых антибиотиков. Практически

наиболее важным являются разграничение тетрациклиновых антибиотиков от хлорамфеникола, а также проверка состояния и чистоты пенициллиновых препаратов, причём важно быстро установить, до какой степени препарат разложился. Другим быстрым физическим методом идентификации антибиотиков является определение показателя преломления твёрдого вещества.

Очень специфическими являются микробиологические методы идентификации антибиотиков. Для этого применяются штаммы, специфически резистентные к данному антибиотику, или же так называемые зависимые штаммы, т.е. такие, рост которых обусловлен присутствием определяемого антибиотика. Этот метод особенно надёжен, однако изыскание или выведение таких штаммов является обычно очень трудоёмким делом.

Количественное определение антибиотиков

Количественное определение антибиотиков можно проводить как химическими, так и микробиологическими методами. Главными преимуществами химических методов являются их быстрота и сравнительно высокая точность. Преимуществом же микробиологических методов является их намного большая специфичность: посторонние примеси, содержащиеся в испытуемых образцах, не влияют в такой степени на результаты, как это бывает при химических методах.

Микробиологически можно определить и содержание таких антибиотиков, химические и физико-химические свойства которых ещё подробно неизвестны.

Основным принципом микробиологических методов количественного определения активности антибиотика является определение степени задержки роста микроба, чувствительного к данному антибиотику. Культуры или микробы, используемые для этой цели, называются тест-культурами, или тест-микробами. Задержка роста, вызванная определённым количеством используемого материала с неизвестным содержанием антибиотика (например, культуральной жидкости, промежуточного продукта на стадии выделения лекарственной формы препарата и т. п.), сравнивается с задержкой роста тест-культуры, вызванной определённым, известным количеством данного антибиотика (стандартом).

Микробиологические методы определения активности антибиотиков можно

в основном разделить на методы, при которых воздействие на тест-культуру исследуется на жидкой среде, и методы, при которых воздействие антибиотика на тест-культуру оценивается с применением твёрдой питательной среды. К первой группе относятся методы серийных разведений и турбидиметрические методы; ко второй группе – методы диффузии в агар на чашках и методы диффузии в агар в капиллярах или пробирках. Основными требованиями, которые необходимо предъявлять к микробиологическим методам количественного определения антибиотиков, являются следующие.

1. Точность.
2. Чувствительность.
3. Простота техники эксперимента.
4. Наиболее короткое время инкубации.

Более или менее совершенное выполнение всех этих требований зависит, прежде всего, от применяемого метода. Для достижения максимальной чувствительности, кроме того, немалую роль играет культура, используемая для определения. Важным критерием метода является также хорошая воспроизводимость результатов в условиях различных лабораторий.

Методы разведений. Принципом методов разведений является определение количества антибиотика, которое полностью подавляет рост тест-культуры. При этом раствор анализируемого образца с неизвестным содержанием антибиотика и раствор стандарта с известным содержанием антибиотика разводят в геометрической прогрессии питательной средой, предварительно засеянной тест-культурой. По истечении необходимого времени инкубации определяют максимальное разведение образца и стандарта, которое ещё подавляет рост тест-культуры. Путём сравнения этих разведений вычисляют активность исследуемого образца. Вследствие того что оценку проводят по качественному признаку («растёт»-«не растёт»), этот метод не удовлетворяет первому из перечисленных выше требований. Вместе с тем главным преимуществом методов разведений является их высокая чувствительность, возможность определять очень малые количества антибиотиков, а в некоторых случаях – и короткое время (около 3

часов), необходимое для получения результатов.

Турбидиметрические методы. Турбидиметрические методы, как и методы разведений, обычно удовлетворяют требованиям, но при этом их точность по сравнению с методами разведений значительно выше ввиду возможности непрерывного проведения количественных измерений.

Принципом, на котором основаны эти методы, является измерение задержки роста тест-организма, проявляющейся в большем или меньшем помутнении питательной среды. Для измерения помутнения используют фотоэлектрические нефелометры. Путём сравнения интенсивности задержки роста, вызванной действием неизвестного количества антибиотика со стандартной кривой, выражающей степень задержки, вызываемой известными количествами антибиотика, производят вычисление активности анализируемого образца. Турбидиметрические методы по сравнению с методами диффузии обычно являются сравнительно менее точными, так как микроорганизм, растущий на жидких питательных средах, при рабочих условиях проведения анализа более чувствителен к изменчивым факторам внешней среды.

На результат могут повлиять и некоторые сопутствующие вещества, содержащиеся в испытуемом образце; при методах диффузии влияние этих веществ вследствие их меньшего проникновения в агар устраняется. Этими веществами являются, например, жирные кислоты или глюкозодегидрогеназа. Эти методы нельзя применять для определения активности антибиотиков в образцах, которые являются либо окрашенными, либо дают мутный раствор, если только это явление нельзя устранить путём соответствующей обработки стандарта.

Аппаратура, оборудование и материалы: – водяная баня, калориметр, прокаленное сверло, термостат, антибиотики, фосфатный буфер (рН 6,0), 1 н NaOH, 1,2 н HCl, 0,01 н раствор йода, 0,01 н раствор гипосульфита натрия, 1 % раствора крахмала, 0,25 % раствор хлористого железа, дистиллированная вода, 10 % растворы нитропрусида натрия, железистосинеродистого калия и едкого натра, 0,01 н HCl, 0,05 % раствор хлорного железа, культура молочнокислых

микроорганизмов, пипетки, 125, 50 – миллилитровые колбы Эрленмейера, мерные колбы на 25 см³, чашки Петри с агаргидролизированным молоком и средой Блаурока.

Порядок выполнения работы

1. Ознакомится с целью, содержанием и порядком выполнения работы.
2. Изучить теоретические положения работы.
3. Ознакомиться с методами исследования антибиотиков.

1. Количественное определение пеницилина.

Сущность метода. Под влиянием щелочей или пенициллиназы происходит раскрытие бета-лактамного кольца в структуре антибиотика с образованием пенициллоиновой кислоты. Последняя и реагирует с йодом. По разности йода, израсходованного на взаимодействие с пенициллином до и после гидролиза молекулы антибиотика, судят о количестве препарата в исследуемых образцах.

Этот метод даёт хорошо совпадающие результаты с данными биологических методов определения активности, и он применим для большинства лекарственных форм пенициллина.

Ход работы. Йодометрический метод

Взвешивают 25 – 30 мг исследуемого образца антибиотика и растворяют в фосфатном буфере (рН 6,0) до получения концентрации примерно 2000 ЕД/мл. По 2 мл полученного раствора вносят в две 125 – миллилитровые колбы Эрленмейера. В первую из них добавляют 2 мл 1 н раствора едкого натра и оставляют на 15 мин при комнатной температуре. После этого в данную колбу вносят 2 мл 1,2 н раствора соляной кислоты и 10 мл 0,01 н йода. Через 15 мин избыток йода оттитровывают 0,01 н раствором гипосульфита натрия. В конце титрования добавляют 1 каплю раствора крахмала и продолжают титрование при энергичном встряхивании до обесцвечивания синей окраски крахмала.

Во вторую колбу добавляют 10 мл 0,01 н раствора йода и титруют сразу 0,01 н раствором гипосульфита натрия (контроль).

Активность пенициллина определяют по нижеприведённой формуле:

$$\Sigma = \frac{a \cdot b}{c \cdot F}, \quad (1)$$

где Σ – количество ЕД пенициллина в 1 мг; а – разность в титрах; b – активность рабочего стандарта в ЕД/мг; с – вес образца, мг; F – количество мл 0,01 н раствора йода, поглощённого 1 мл рабочего стандарта натриевой соли бензилпенициллина.

2. Определение стрептомицина.

Сущность метода. Мальтольный метод. Этим методом возможно определение не только стрептомицина, но и маннозидстрептомицина. Он основан на том, что оба названных антибиотика при нагревании с раствором разбавленной щёлочи образуют мальтол, который определяется затем колориметрически или спектрофотометрически по окраске, образуемой им с солями железа или реактивом фолина.

Ход работы. В мерную колбу на 25 мл наливают 10 мл испытуемого образца стрептомицина-основания, содержащего 0,5 мл антибиотика и 1 мг раствора. В эту же колбу добавляют 2 мл 1 н NaOH и ставят её на кипящую водяную баню на 10 мин. Затем охлаждают колбу в ледяной или проточной водопроводной воде и приливают 2 мл 1,2 н HCl; добавляют 5 мл 0,25 % хлористого железа и доводят общий объём смеси дистиллированной водой до метки.

Полученный окрашенный раствор калориметрируют при 550 нм в соответствующем фотоэлектрокалориметре против раствора стандартного образца антибиотика и дистиллированной воды в контролях.

Результаты выражают графически на полулогарифмической сетке, где по оси ординат откладывают значения для степени прохождения света, а по оси абсцисс – концентрацию стрептомицина. Активность испытуемого образца вычисляют по стандартной кривой.

Сущность метода. Нитропруссидный метод. Этим методом можно определять различные стрептомицины, так как известно, что нитропруссид натрия в щелочной среде даёт окрашивание с гуанидином.

Ход работы. Определение выполняется следующим образом: смешивают равные объёмы 10 % растворов нитропруссид натрия, железистосинеродистого калия и едкого натра. К смеси приливают 3 объёма воды. Через 30 мин раствор готов к употреблению (он имеет ярко-жёлтую окраску). При появлении мути в растворе его заменяют свежим. Обычно реактив пригоден для работы лишь в течение нескольких часов.

К 5 мл раствора стрептомицина (концентрация 20 – 25 Ед/мл) приливают 1 мл реактива. При этом возникает устойчивая оранжевая окраска. Раствор колориметрируют против раствора стандартного образца стрептомицина (контроль). Последний должен быть прозрачным, поскольку мутные растворы могут исказить результаты определения.

3. Определение тетрациклинов.

Сущность метода. Колориметрический метод

Фенольно-гидроксильные группы в структуре хлортетрациклина, окситетрациклина и тетрациклина позволяют использовать цветную реакцию их с хлорным железом для количественного определения названных антибиотиков.

Ход работы. В колбу Эйленмейера (объёмом 50 мл) вносят 10 мл раствора испытуемого препарата – основания, приготовленного путём растворения последнего в 0,01 н HCl и содержащего 0,1 мг антибиотика в 1 мл. В эту же колбу наливают 10 мл 0,05 % раствора хлорного железа, перемешивают и оставляют при 16 – 18 °С на 10 мин, после чего определяют прохождение света для стандарта и испытуемого препарата при 490 нм на ФЭК против 0,01 н раствора соляной кислоты (контроль).

По данным анализа для растворов стандарта строят стандартную кривую на полулогарифмической сетке (по оси ординат откладывают показатели колориметра, а по оси абсцисс – концентрацию антибиотика-основания). По этой кривой определяют количество антибиотика в испытуемом образце.

4. Определение активности антибиотиков луночным методом.

Чашки Петри с агаргидролизованным молоком засевают культурой молочнокислых микроорганизмов. При помощи прокаленного сверла в агаре

вырезают несколько лунок, в которые наливают одну-две капли расплавленного и остуженного агара для образования дна. Затем в получившееся углубление помещают растворы антибиотиков. Чашки ставят в термостат на 24 часа. Степень чувствительности к антибиотику определяют по ширине зоны задержки роста микроорганизмов.

Чашки Петри с агаром и средой Блаурока оставляют открытыми на 5 минут. При помощи прокаленного сверла в агаре вырезают несколько лунок, в которые наливают одну-две капли расплавленного и остуженного агара для образования дна. Затем в получившееся углубление помещают растворы антибиотиков. Чашки ставят в термостат на 24 часа. Степень чувствительности к антибиотику определяют по ширине зоны задержки роста микроорганизмов.

Содержание отчета и его форма

Отчет по работе должен содержать наименование работы, ее цель и содержание, краткое изложение теоретической части, порядок проведения работы, таблицы и диаграммы с результатами, выводы.

Контрольные вопросы и защита работы

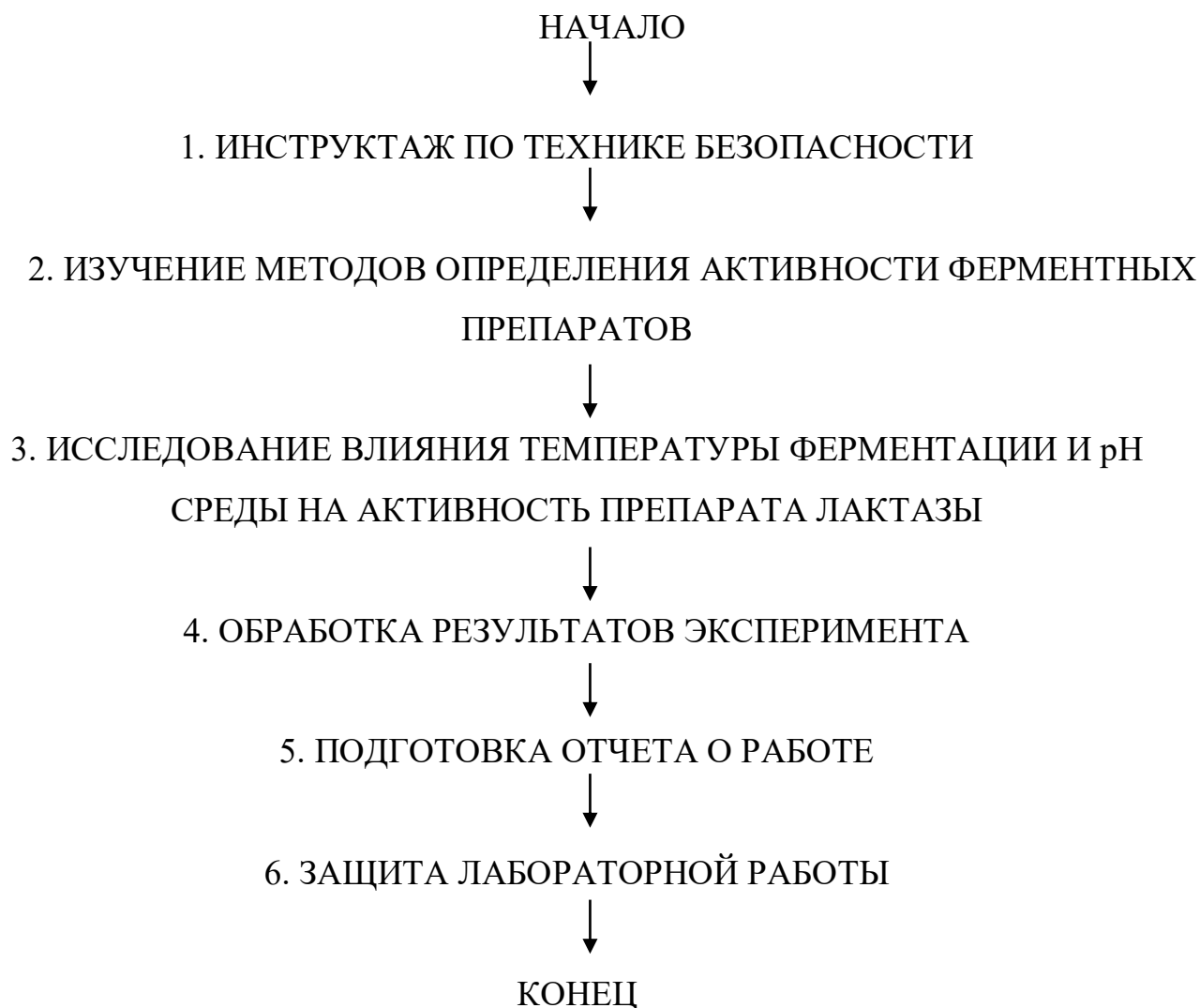
1. Классификация антибиотиков.
2. Методы определения качества антибиотиков.

Микробиологические методы определения качества антибиотиков.

Ек56 **ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 13**
ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА АКТИВНОСТЬ
ПРЕПАРАТОВ ЛАКТАЗЫ

Цель работы: изучить методы определения активности ферментных препаратов, исследовать влияние технологических факторов на активность препаратов лактазы (β -галактозидазы).

АЛГОРИТМ ПРОВЕДЕНИЯ РАБОТЫ



Блок 1. Студенты могут быть допущены к работе только после ознакомления с правилами техники безопасности. Знание студентами правил техники безопасности преподаватель проверяет и фиксирует в журнале. При выполнении анализов нужно быть внимательным, соблюдать осторожность, все операции проводить аккуратно, без спешки, в рабочем халате. Категорически запрещается принимать пищу за лабораторным столом и пробовать на вкус химические вещества.

Блок 2. Комиссия по ферментам Международного биохимического союза рекомендовала использовать следующие единицы активности ферментных препаратов.

Стандартная единица активности – количество фермента, которое катализирует превращение 1 микромоля данного субстрата за одну минуту при заданных условиях (при температуре 30°C, оптимальных значениях концентраций субстрата и фермента, pH среды). Обозначается буквами Е или U.

Удельная активность – это число единиц Е, отнесенное к одному миллиграмму белка в ферментном препарате.

Молекулярная активность – число молекул данного субстрата или эквивалентов прореагировавших групп, превращаемых за 1 минуту одной молекулой фермента при оптимальной концентрации субстрата.

Катал – каталитическая активность, способная осуществлять реакцию со скоростью равной 1 моль/с в заданной системе измерения активности.

Активность условного препарата. В технологии ферментных препаратов принято использовать понятие активности условного ферментного препарата, характеризующееся как активность, измеренная по основному ферменту в стандартных единицах в препарате на единицу массы препарата. Активность основного фермента в стандартном условном препарате устанавливается нормативной документацией на данный препарат. Для пересчета фактически выработанной продукции в условные тонны используют формулу:

$$Q_{\text{усл.}} = Q_{\text{тов}} * A_{\text{ф}} / A_{\text{усл.}}$$

β -галактозидаза (лактаза) катализирует гидролиз терминальных β -D-гликозидных связей, отщепляя остатки галактозы с нередуцирующего конца субстратов с сохранением их конфигурации. Субстратом для β -галактозидазы являются β -D-галактозиды, включая лактозу и ее производные. Расщепление идет между С-атомом моносахаридного остатка и гликозидным атомом кислорода. Формально гидролиз может быть представлен как нуклеофильное замещение при аномерном центре гликоновой (отщепляемой) части субстрата. Естественным субстратом для β -галактозидазы является лактоза. Механизм каталитической реакции гидролиза лактозы приведен на рисунке 12.1.

Активный центр фермента β -галактозидазы состоит из двух участков, которые отвечают за соединение с гликоном и агликоном. Остаток галактозы, связываясь, изменяет и конформацию активного центра, что облегчает связывание глюкозы на втором участке. Считают, что галактозный остаток располагается между витками белковой спирали фермента, а свободные гидроксильные группы остатка фиксируют углевод между двумя витками белка с помощью водородных связей. Агликон связывается с ферментом неспецифическими гидрофобными

связями. Катализ происходит в большей степени за счет нековалентных взаимодействий.

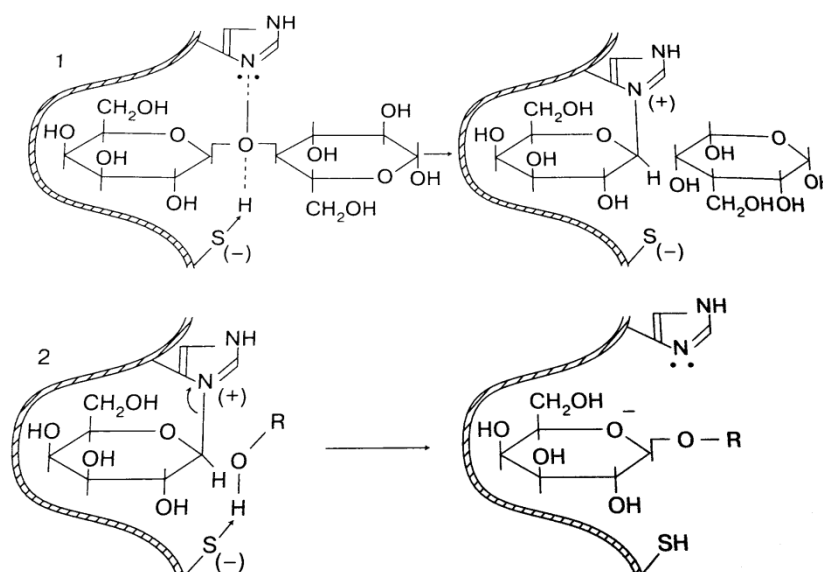


Рисунок 12.1 – Механизм ферментативного гидролиза лактозы

Источниками получения лактазы могут служить растения и животные (эмульсин розоцветных, миндальные орехи, люцерна, кофе, пшеничные отруби, слизистая собак, овец, коз, крыс, баранов и быков). Однако применение β-галактозидазы растительного и животного происхождения затруднено вследствие ее незначительного содержания в данных источниках, а также сложности извлечения [63].

Мировая практика показывает, что наиболее целесообразно использовать лактазу, продуцируемую микроорганизмами. Активными продуцентами β-галактозидазы являются спороносные бактерии *B. subtilis*, *B. megaterium* и другие виды. Среди неспороносных бактерий *E. coli*; молочнокислые бактерии, такие, как *Str. lactis*, *Str. cremoris* и др. Высокая активность β-галактозидазы обнаружена во многих дрожжевых культурах, среди которых *Sacch. fragilis*, *Sacch. lactis*. Среди дрожжей наибольшая лактазная активность отмечена у *Kluyveromyces fragilis*.

Блок 3. Методика определения активности фермента β-галактозидазы (лактазы).

Для проведения исследований готовят образцы 5 %-го раствора лактозы объемом 50 см³ на буферном растворе с pH 4,2 или 7,0 и 1 %-й раствор фермента. В исходных образцах определяют активность фермента криоскопическим методом. Для этого в 1 см³ приготовленного раствора фермента вносят 4 см³ субстрата, перемешивают и отбирают 0,1 см³ для определения точки замерзания раствора (контрольной пробы). Оставшийся раствор инкубируют при температурах 30, 35, 40, 45 °С в течение 30 мин. Отбирают 0,1 см³ опытной пробы и измеряют температуру ее замерзания.

Блок 4. Активность фермента рассчитывают по формуле:

$$A = \frac{2655,2 \cdot (T_0 - T_k)}{t \cdot a} \quad (12.1)$$

где А – активность фермента, ед/г;

2655,2 – константа для 5%-го раствора лактозы;

T_0 – температура замерзания опытной пробы, °С

T_k – температура замерзания контрольной пробы, °С

t – продолжительность инкубации, мин;

a – количество фермента взятого для реакции.

Результаты исследований заносят в таблицу 12.1.

Таблица 12.1 – Результаты исследований активности препарата лактазы

№ варианта	рН среды	Температура ферментации, °С	Активность фермента, ед/г
1	4,2	30	
2		35	
3		40	
4		45	
5	7,0	30	
6		35	
7		40	
8		45	

По результатам исследований делают вывод о влиянии температуры и рН среды на активность исследованного препарата лактазы.

Блок 5. Отчет о работе должен включать:

- титульный лист;
- цель работы и теоретическое обоснование проводимых исследований;
- алгоритм выполнения работы;
- методику проведения исследований;
- результаты исследований;
- выводы.

Блок 6. Контрольные вопросы:

- классификация и номенклатура ферментных препаратов,
- методы определения активности ферментных препаратов;
- факторы, влияющие на синтез ферментов микроорганизмами;
- механизм действия и общие закономерности синтеза гликолитических ферментов;
- механизм действия β -галактозидазы (лактазы);
- источники получения β -галактозидазы;
- методика определения активности лактазы.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТИТРУЕМОЙ КИСЛОТНОСТИ КУЛЬТУРАЛЬНЫХ ЖИДКОСТЕЙ

В коническую колбу емкостью 150-200 см³ вносят 10 см³ исследуемой культуральной жидкости, 20 см³ дистиллированной воды и 5-6 капель 1 %-го спиртового раствора фенолфталеина. Пробу титруют 0,1 Н раствором гидроксида натрия до появления слабо-розового окрашивания, соответствующего эталону и не исчезающего не менее чем в течение 30 секунд.

Титруемую кислотность культуральной жидкости рассчитывают, умножая количество щелочи, пошедшее на нейтрализацию аликвотного объема (10 см³), на 10.

Для приготовления эталона в коническую колбу вносят 10 см³ молока, 20 см³ дистиллированной воды и 1 см³ 2,5 %-го раствора сульфата кобальта.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА АСБ ДРОЖЖЕЙ МЕТОДОМ
ВЫСУШИВАНИЯ ДО ПОСТОЯННОЙ МАССЫ

Культуральную жидкость помещают в пробирки для центрифугирования. Центрифугируют в течение 5 минут при частоте 2000-2500 об/мин. Фугат сливают через предварительно взвешенный сухой фильтр, затем на тот же фильтр количественно переносят концентрированную дрожжевую суспензию. Фильтр с дрожжевой суспензией высушивают до постоянной массы при 105-110 °С в сушильном шкафу, охлаждают в эксикаторе и взвешивают. Количество АСБ определяют по формуле:

$$M_{асб} = M_1 - M_0, \quad (15)$$

где M_1 – масса фильтра с биомассой после высушивания, г;

M_0 – масса сухого фильтра до высушивания, г.

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ CO₂ В КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ

В пробирку вносят 20 см³ исследуемой жидкости, отмечают его уровень и помещают в водяную баню с холодной водой. Температуру воды в бане поднимают до 90 °С и, не вынимая пробирки из бани, отмечают уровень поднятия жидкости.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА АСБ ДРОЖЖЕЙ
ТУРБИДИМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

Культуральную жидкость с известной концентрацией АСБ дрожжей помещают в кювету фотоэлектроколориметра и определяют оптическую плотность при $\lambda = 400 - 450$ нм (D_0) относительно раствора сравнения – раствора сахарозы соответствующей концентрации. Рассчитывают коэффициент пересчета оптической плотности на концентрацию биомассы:

$$K_D = [X] / D_0, \quad (16)$$

По аналогичной методике определяют оптическую плотность дрожжевой суспензии по завершении культивирования, по известным значениям коэффициента K_D рассчитывают концентрацию АСБ дрожжей.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКА ПО МЕТОДУ ЛОУРИ

Определение белка по методу Лоури основано на комбинации биуретового метода (образование окрашенного комплекса пептидных связей с медью) и метода Фолина (образование окрашенного комплекса реактива Фолина с ароматическими аминокислотами). Метод Лоури имеет ряд преимуществ в сравнении с двумя вышеназванными методами. Биуретовый метод малочувствителен; окраска, развивающаяся при определении белка по методу Фолина, сильно зависит от аминокислотного состава белка. Комбинированный метод Лоури в 100 раз чувствительнее биуретовой реакции, и точность определения мало зависит от состава белка. Метод прост и удобен для серийных анализов.

Реактивы

А. 2 %-й раствор Na_2CO_3 в 0,1 н NaOH.

В. 0,5 %-й $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ в 1 %-м растворе виннокислого натрия.

С. $50 \text{ см}^3 \text{ А} + 1 \text{ мл В}$ (годен в течение одного дня).

Д. Разбавленный реактив Фолина (1:2).

Проведение анализа

$0,4 \text{ см}^3$ испытуемого раствора белка (50-500 мг) и 2 см^3 реактива С перемешивают и оставляют на 10 минут при комнатной температуре. Затем добавляют $0,2 \text{ см}^3$ реактива Д, очень быстро перемешивают (в течение 1-2 секунд) и оставляют на 30-40 минут при комнатной температуре для развития окраски. По истечении указанного времени интенсивность окраски образовавшегося комплекса измеряют на ФЭКе при красном светофильтре или на спектрофотометре при 760 нм. Содержание белка определяют по калибровочной кривой.

Построение калибровочной кривой для определения белка по методу Лоури**Реактивы**

1. Гемоглобин, альбумин или препарат другого стандартного белка.

2. Реактивы, необходимые для определения белка по методу Лоури.
3. Реактивы, необходимые для определения белка по методу Къельдаля.

Приготовление исходного раствора белка

Для построения калибровочной кривой необходимо использовать по возможности наиболее чистые и однородные препараты белка, например, кристаллические препараты гемоглобина, бычьего сывороточного альбумина и др. Желательно также, чтобы по своей природе этот белок был бы достаточно близким к исследуемому белку.

Для приготовления исходного раствора белка отвешивают на технических весах 0,1 г стандартного белка и растворяют в 100 см³ дистиллированной воды. При необходимости раствор фильтруют.

Определение концентрации белка в исходном растворе

Точную концентрацию приготовленного раствора устанавливают по методу Къельдаля. Для этого берут на сжигание в колбы Къельдаля три пробы исходного белка по 0,1 г (дальнейшие операции определения белка по Къельдалю см. в практикуме по биохимии). При пересчете содержания азота на белок используют универсальный белковый коэффициент – 6,25. Установлено, что большинство растительных белков содержит примерно 16 масс. % азота, поэтому коэффициент пересчета общего азота на белок равен $100:16 = 6,25$. Этот же коэффициент принят и для пересчета и определения сырого протеина в микробиологическом производстве.

Содержание белка в исходном растворе рассчитывают как среднее арифметическое из трех параллельных определений. При значительных отклонениях полученных данных расчет ведут по данным двух наиболее близких результатов.

Приготовление растворов с меньшей концентрацией белка

Из исходного раствора методом разведения готовят растворы с меньшим содержанием белка по приведенной схеме. Для этого условно принимают концентрацию исходного раствора белка за 100 единиц.

- | | |
|---------------------|------------------|
| 1. Исходный раствор | 100 единиц белка |
|---------------------|------------------|

2. 8 мл раствора 1 + 2 мл воды	80 единиц белка
3. 7 мл раствора 1 + 3 мл воды	70 единиц белка
4. 6 мл раствора 1 + 4 мл воды	60 единиц белка
5. 5 мл раствора 1 + 5 мл воды	50 единиц белка
6. 5 мл раствора 2 + 5 мл воды	40 единиц белка
7. 5 мл раствора 3 + 5 мл воды	35 единиц белка
8. 5 мл раствора 4 + 5 мл воды	30 единиц белка
9. 5 мл раствора 5 + 5 мл воды	25 единиц белка
10. 5 мл раствора 6 + 5 мл воды	20 единиц белка
11. 5 мл раствора 8 + 5 мл воды	15 единиц белка
12. 5 мл раствора 10 + 5 мл воды	10 единиц белка
13. 5 мл раствора 12 + 5 мл воды	5 единиц белка

Определение белка по методу Лоури

Во всех приготовленных растворах проводят определение по методу Лоури. В качестве контроля используют пробу, в которой вместо раствора белка берется дистиллированная вода. По контрольной пробе настраивают прибор. Все результаты заносят в таблицу Д1.

Таблица Д1 – Результаты определения белка методом Лоури

Номер пробирки	Белок, усл. ед.	Белок, мг/мл	Оптическая плотность (А)	Примечание

Для получения надежных результатов работу дублируют несколько раз, поручая группе из 2-3 студентов построение калибровочной кривой. При этом должны использоваться одни и те же растворы белка, приготовленные для всей группы.

Построение калибровочной кривой

По полученным данным строят калибровочную кривую в координатах: «оптическая плотность — концентрация белка». При построении графика учитывают все полученные в работе результаты. Калибровочная кривая используется для определения белка при выполнении последующих работ.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЛУТАТИОНА ЙОДОМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

Реактивы

5 % раствор метафосфорной кислоты;

1,5 % раствор йодистого калия;

0,001 н KJO_3

1% раствор крахмала

Проведение анализа

Берут 10 см³ центрифугата, добавляют 2 см³ 5 %-го метафосфорной кислоты, 2 см³ 1,5 %-го раствора йодистого калия и несколько капель раствора крахмала. Титруют 0,001 н KJO_3 из микробюретки до появления синего окрашивания. При расчетах 1 см³ 0,001 н KJO_3 считают эквивалентным 0,307 мг восстановленного глутатиона.

Метод йодометрического титрования не является специфичным, так как йодоватокислый калий окисляет не только глутатион, но и сульфидные группы других соединений, в том числе сульфгидрильные группы белков. В данном случае подавляющее количество оттитрованных сульфгидрильных групп будет принадлежать глутатиону.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МАССОВОЙ ДОЛИ ЭТАНОЛА ДИСТИЛЛЯЦИОННЫМ МЕТОДОМ

Дистилляционный метод основан на перегонке определенного количества продукта; В полученном дистилляте после перегонки определяют плотность пикнометром; пользуясь таблицей 1 по относительной плотности дистиллята находят содержание спирта. Подготовку образца проводят следующим образом. 250-400 см³ продукта наливают в толстостенную колбу или склянку вместимостью 1 л при комнатной температуре, встряхивают, закрывают горло сосуда ладонью и, время от времени приоткрывая его, пока не прекратится ощущение давления изнутри.

Определение относительной плотности пикнометром. Пикнометр представляет собой стеклянный тонкостенный сосуд определенной вместимости и различной формы. С помощью пикнометра определяют плотность, а затем, пользуясь таблицей 1, по плотности находят содержание сухих веществ. Для определения плотности взвешивают в объеме пикнометра исследуемый раствор и дважды дистиллированную воду, разделив массу раствора на массу воды, получают плотность раствора.

Техника работы с пикнометром следующая. Пустой пикнометр моют хромовой смесью и хорошо промывают водопроводной, а затем дистиллированной водой. После этого воду удаляют, ополаскивая пикнометр спиртом, а затем эфиром. Снаружи пикнометр обтирают сухим полотенцем, изнутри продувают теплым воздухом и высушивают в сушильном шкафу при температуре 80°C. Высушенный пикнометр охлаждают в эксикаторе и взвешивают на аналитических весах. Затем пикнометр заполняют дважды перегнанной дистиллированной водой несколько выше метки и ставят на 15-20 минут при температуре 20°C. После этого объем воды в пикнометре доводят точно до метки жгутиком из фильтровальной бумаги, не вынимая пикнометр из термостата. После доведения до метки пикнометр выдерживают в термостате 5 минут, затем вынимают его, тщательно вытирают внутреннюю поверхность

шейки, не касаясь мениска жгутиком из фильтровальной бумаги, а снаружи мягким льняным полотенцем и взвешивают. Далее воду выливают, пикнометр высушивают горячим воздухом, ополаскивают несколько раз исследуемым раствором, а затем наполняют им пикнометр несколько выше метки. Все дальнейшие операции производят так же, как и при определении массы воды. Обозначим массу пикнометра **A**, массу пикнометра с водой **B**, массу пикнометра с исследуемым раствором **C**, плотность раствора d . Тогда: $d=(C-A)/(B-A)$.

Дистилляционный метод. Собирают прибор для перегонки. В качестве перегонной колбы используют плоскодонную колбу вместимостью 750-800 см³, в качестве приемной- коническую на 300 мл или мерную колбу на 200- 250 см³. Приемную колбу погружают в чашку со льдом или охлажденной водой и закрывают резиновой пробкой с двумя отверстиями: через одно пропускают трубку от холодильника, а через другое согнутую под углом стеклянную трубку. Обе колбы предварительно взвешивают с точностью до 0,1 г.

В перегонную колбу отвешивают 200,0 г продукта, в приемную – 10-15 см³ воды. Перегонную колбу при помощи резиновой трубки через каплеуловитель соединяют с холодильником и начинают перегонку вначале на слабом огне, а затем, после достижения равномерного кипения, огонь увеличивают, отгоняя 2/3-3/4 взятого продукта. После этого прибор разбирают и массу содержимого приемной колбы доводят водой до 200,0 г, перемешивают и определяют в нем относительную плотность при 20°С пикнометром. Зная относительную плотность дистиллята, по таблице 1 находят содержание спирта в % мас.

Таблица 1. - Соотношение между относительной плотностью жидкости и содержанием спирта.

Относи- тельная плот- ность, d^{20}	Спирт, % мас. (г/100 г)	Относи- тельная плот- ность, d^{20}	Спирт, % мас. (г/100 г)	Относи- тельная плот- ность, d^{20}	Спирт, % мас. (г/100 г)	Относи- тельная плот- ность, D^{20}	Спирт, % мас. (г/100 г)
1,0000	0,000	6	1,840	2	3,785	8	5,890
0,9999	0,055	5	1,890	1	3,845	7	5,950
8	0,110	4	1,950	0	3,905	6	6,015

7	0,165	3	2,005	0,9929	3,965	5	6,080
6	0,220	2	2,060	8	4,030	4	6,150
5	0,270	1	2,120	7	4,090	3	6,205
4	0,325	0	2,170	6	4,150	2	6,270,
3	0,380	0,9959	2,225	5	4,215	1	6,330
2	0,435	8	2,280	4	4,275	0	6,395
1	,0,485	7	2,335	3	4,335	0,9889	6,455
0	0,540	6	2,390	2	4,400	8	6,520
0,9989	0,590	5	2,450	1	4,460	7	6,580
8	0,545	4	2,505	0	4,520	6	6,545
7	0,700	3	2,560	0,9919	4,580	5	6,710
6	0,750	2	2,620	8	4,640	4	6,780
5	0,805	1	2,675	7	4,700	3	6,840
4	0,855	0	2,730	6	4,760	2	6,910
3	0,910	0,9949	2,790	5	4,825	1	6,980
2	0,960	8	2,850	4	4,885	0	7,050
1	1,015	7	2,910	3	4,945	0,9879	7,115
0	1,070	6	2,970	2	5,005	8	7,180
0,9979	1,125	5	3,030	1	5,070	7	7,250
8	1,180	4	3,090	0	5,130	6	7,310
7	1,235	3	3,150	0,9909	5,190	5	7,380
6	1,285	2	3,205	8	5,255	4	7,445
5	1,345	1	3,265	7	5,315	3	7,510
4	1,400	0	3,320	6	5,375	2	7,580
3	1,455	0,9939	3,375	5	5,445	1	7,650
2	1,510	8	3,435	4	5,510	0	
1	1,565	7	3,490	3	5,570	0,9869	7,780
0	1,620	6	3,550	2	5,635	8	7,850
0,9969	1,675	5	3,610	1	5,700	7	7,915
8	1,730	4	3,670	0	5,760	6	7,980
7	1,785	3	3,730	0,9899	5,820		

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МАССОВОЙ ДОЛИ ЛАКТОЗЫ В МОЛОКЕ ЙОДОМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

В мерную колбу на 250 см³ отвешивают 10 г молока с точностью до 0,01 г, прибавляют до половины объема дистиллированной воды, вносят 10 см³ раствора медного купороса и 4 см³ 1 Н раствора едкого натра, перемешивая жидкость после внесения каждого реактива.

Содержимое колбы доливают до метки дистиллированной водой и оставляют для отстаивания на 30 минут. Отстоявшуюся жидкость профильтровывают в сухую колбу через складчатый фильтр, удаляя первые 20-30 см³ фильтрата.

50 см³ фильтрата (2 г молока) переносят пипеткой в коническую колбу на 250-300 см³ с притертой или резиновой пробкой, добавляют 25 см³ 0,1 Н раствора йода и сейчас же при непрерывном перемешивании добавляют из бюретки 37,5 см³ 0,1 Н раствора гидроксида натрия. Закрывают колбу пробкой и оставляют в темноте на 20 минут при температуре 20 °С.

Прибавляют в колбу 8 см³ 0,5 Н раствора соляной кислоты, оттитровывают выделившийся йод 0,1 Н раствором гипосульфита натрия в присутствии 1 %-го раствора крахмала. Титрование ведут медленно, сначала без прибавления индикатора (до получения светло-желтой окраски), затем прибавляют 1 см³ 1 %-го раствора крахмала и продолжают титрование до того момента, когда от 1 капли раствора гипосульфита натрия исчезнет синяя окраска.

Проводят холостую пробу, для чего в другую колбу отмеривают 25 см³ 0,1 Н раствора йода, добавляют при непрерывном перемешивании 37,5 см³ 0,1 Н раствора гидроксида натрия и, закрыв колбу, оставляют в темноте на 20 минут, а затем проводят определение, как в первой колбе.

Содержание лактозы в процентах определяют по формуле:

$$Л = [0,01801 * (a - б) * 0,97 * 100] / в,$$

где а – количество 0,1 Н раствора гипосульфита натрия, пошедшего на титрование йода в холостой пробе, см³;

Б – количество 0,1 Н раствора гипосульфита натрия, пошедшего на титрование йода в фильтрате, см³;

В – количество молока в 50 см³ фильтрата (равное 2 г).

ПРИЛОЖЕНИЕ И

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРОДУКТОВ ГЕТЕРОФЕРМЕНТАТИВНОГО
МОЛОЧНОКИСЛОГО БРОЖЕНИЯ

Определение CO₂.

В пробирку вносят 20 см³ сквашенного молока, отмечают его уровень и помещают в водяную баню с холодной водой. Температуру воды в бане поднимают до 90 °С и, не вынимая пробирки из бани, отмечают уровень поднятия сгустка.

Если в молоке присутствует CO₂, сгусток становится губчатым и поднимается на 0,6-3 см и больше относительно начального уровня.

Определение ацетона и диацетила.

Три капли фильтрата сквашенного молока смешивают в фарфоровой чашке с тремя каплями 40 %-го раствора гидроксида калия. Если в молоке присутствуют ацетон и диацетил, через 10-15 минут появляется розовое окрашивание. Окрашивание через 30 минут и более не учитывается.

ПРИЛОЖЕНИЕ К МОДИФИЦИРОВАННЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ АМИННОГО АЗОТА

При гидролизе происходит расщепление сывороточных белков на полипептиды и аминокислоты и в гидролизате увеличивается количество свободных аминных групп. Полипептиды и аминокислоты являются амфотерными веществами. В водном растворе они способны диссоциировать как кислоты и как основания, поэтому определить количество кислотных и основных групп методом титрования можно только в том случае, если одна из них блокирована. Принцип метода формольного титрования основан на том, что прибавлением избытка формальдегида блокируются аминогруппы, а количество свободных карбоксильных групп определяют титрованием щелочью.

Определяя количество щелочи, пошедшее при формоловом титровании на нейтрализацию свободных карбоксильных групп до начала гидролиза и по окончании его, вычисляют какое количество щелочи связалось с карбоксильными группами вновь образовавшихся полипептидов и аминокислот.

Поскольку при разрыве пептидной связи освобождаются амминные и карбоксильные группы в эквивалентных количествах, то по количеству щелочи, пошедшей на нейтрализацию карбоксильных групп, можно определить количество свободных аминогрупп.

При расчетах количества аминокислота свободных аминогрупп учитывают, что 1 мл 0,01 н раствора щелочи эквивалентен 0,14 мг азота.

Ход анализа:

Приготовление формольной смеси. В коническую колбу наливают 60 мл формалина (40-45 %) к нему добавляют 30 мл этилового спирта (96 %) и 2 мл фенолфталеина. Затем к приготовленной смеси прибавляют (1-2 капли) 1 н раствора NaOH до бледно-розового окрашивания.

Приготовление контрольной пробы. В коническую колбу наливают 5 мл дистиллированной воды, 2,5 мл формоловой смеси и 3 мл 0,01 н раствора щелочи.

Жидкость приобретает ярко-красное окрашивание (рН смеси больше 10). Содержимое контрольной пробы титруют 0,01 н раствором соляной и серной

кислоты до бледно-розовой окраски (рН 8,3) и прибавляют 0,2 мл (4-5 капель) 0,01 н раствора щелочи. Жидкость принимает розово-красный цвет (рН 9,1).

Опытная проба. В коническую колбу отмеривают пипеткой 5 мл концентрата сывороточных белков (до гидролиза) добавляют 2,5 мл формоловой смеси и титруют 0,01 н раствором щелочи до розово-красного цвета, т.е. до тех пор, пока окраска жидкости в опытной пробе не станет одинаковой с окраской контрольной пробы. Записывают количество щелочи, пошедшей на титрование опытной пробы.

Далее проводят гидролиз и после термостатирования гидролизат используют для титрования, вновь заготавливая две пробы: контрольную и опытную. По разности результатов титрования двух опытных проб, взятых до начала гидролиза и по окончании его, определяют количество щелочи, пошедшей на титрование полипептидов и аминокислот, образовавшихся в процессе гидролиза.

Прирост свободных карбоксильных, а, следовательно, и аминных групп выражают в миллиграммах азота, для чего полученную разность, выраженную в миллилитрах 0,01 н раствора щелочи, умножают на грамм-эквивалент азота (0,14). Вычисляют прирост аминокислот в процентах к сухому веществу, подвергнутому гидролизу.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ

К 50 см³ молочной сыворотки приливают 4 см³ насыщенного раствора щавелевой кислоты, взбалтывают и добавляют 10 см³ насыщенного раствора хлорида натрия, перемешивают и фильтруют. 25 см³ фильтрата переносят в коническую колбу, титруют из микробюретки 0,001 н. раствором 2,6 дихлорфенолиндофенола до розового окрашивания, не исчезающего в течение 30 секунд. Если результаты титрования параллельных проб не совпадают, производят титрование еще двух проб.

1 см³ 0,001 н. раствором 2,6 дихлорфенолиндофенола эквивалентен 0,088 мг аскорбиновой кислоты, следовательно содержание аскорбиновой кислоты (в мг %) в сыворотке можно рассчитать по формуле:

$$C = V_{\text{титр}} * 0,088 * 100 / V_{\text{ал}}$$

где $V_{\text{титр}}$ – объем раствора 2,6 дихлорфенолиндофенола, пошедший на титрование;

$V_{\text{ал}}$ – объем аликвоты (25 см³).

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«СЕВЕРО-КАВКАЗСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

по организации самостоятельной работы обучающихся
по дисциплине **«Основы промышленной биотехнологии»**

для студентов направления подготовки

19.03.01 Биотехнология

Направленность (профиль): «Промышленная биотехнология»

Ставрополь, 2026

ВВЕДЕНИЕ

Освоение программы дисциплины предполагает освоение теоретических знаний и формирование навыков их практического применения.

Самостоятельная работа студентов – важнейшая составная часть занятий, необходимая для полного усвоения программы курса.

Целью самостоятельной работы является закрепление и углубление знаний, полученных студентами на лекциях, подготовке к текущим лабораторным работам, промежуточным формам контроля знаний и к итоговому контролю.

Дидактические цели самостоятельных занятий:

- формирование профессиональных умений;
- формирование умений и навыков самостоятельного умственного труда;
- мотивирование регулярной целенаправленной работы по освоению дисциплины;
- развитие самостоятельности мышления;
- формирование убежденности, волевых черт характера, способности к самоорганизации.

Методическое обеспечение самостоятельной работы дисциплине состоит из:

- определения учебных вопросов, которые студенты должны изучить самостоятельно;
- подбора необходимой учебной литературы, обязательной для проработки и изучения;
- поиска дополнительной научной литературы, к которой студенты могут обращаться по желанию, если у них возникает интерес в данной теме;
- определения контрольных вопросов, позволяющих студентам самостоятельно проверить качество полученных знаний;
- организации консультаций преподавателя со студентами для разъяснения вопросов, вызвавших у студентов затруднения при самостоятельном освоении учебного материала.

Самостоятельная работа студента – это особым образом организованная деятельность, включающая в свою структуру такие компоненты, как: уяснение цели и поставленной учебной задачи; четкое и системное планирование самостоятельной работы; поиск необходимой учебной и научной информации; освоение собственной информации и ее логическая переработка; проведение самоанализа и самоконтроля.

Основные виды самостоятельных работ по учебной дисциплине:

работа с понятийным аппаратом; поисковая работа с различными источниками; составление аннотированного списка литературы по проблеме.

Контроль знаний студентов включает формы текущего и итогового контроля.

Текущий контроль осуществляется в процессе изучения курса и включает в себя оценку работы студентов на лабораторных работах.

1 Общая характеристика самостоятельной работы

Целью изучения дисциплины «Основы промышленной биотехнологии» является формирование профессиональных компетенций будущего бакалавра в соответствии с требованиями ФГОС ВО по направлению подготовки 19.03.01 - Биотехнология, направленность (профиль) – Промышленная биотехнология.

Задачи дисциплины состоят в изучении на базе фундаментальных законов физики и химии общих процессов, протекающих в различных пищевых производствах, изучении современных аппаратов, общих методов их расчёта, путей рационализации процессов, выбора оптимальных конструкций аппаратов в конкретных производствах, в освещении основных технических проблем, научных достижений и современных тенденций использования новых физических методов обработки пищевых продуктов в тесной взаимосвязи с вопросами технологии.

Цели и задачи самостоятельной работы. Самостоятельная работа направлена на решения ряда задач, к которым относятся:

- систематизация и закрепление полученных теоретических знаний и лабораторных умений студентов;

- углубление и расширение теоретических знаний;
- формирование умения использовать справочную литературу;
- развитие познавательных способностей и активности студентов:
- творческой инициативы, самостоятельности, ответственности и организованности;
- формирование самостоятельности мышления, способностей к саморазвитию, самосовершенствованию и самореализации;
- развитие исследовательских умений.

Актуальность: Работа выпускника в современных условиях обуславливает необходимость изучения принципиальных подходов к изучению дисциплины. Знания, полученные в рамках изучения дисциплины необходимы на протяжении всей профессиональной деятельности.

Виды самостоятельной работы

Рабочей программой по дисциплине предусмотрено самостоятельное изучение материалов в т. ч. по темам лабораторных работ. Для успешного выполнения данного вида работ, необходимо самостоятельно детально изучить материалы представленных тем по рекомендуемым источникам информации:

№ п/п	Виды самостоятельной работы	Рекомендуемые источники информации (№ источника)			
		Основная	Дополнительная	Методическая	Интернет-ресурсы
1	Подготовка к лекции	1 2	1 2	1 2	1
2	Подготовка к лабораторному занятию	1 2	1 2	1 2	1
3	Подготовка к практическому занятию	1 2	1 2	1 2	1
4	Самостоятельное изучение литературы	1 2	1 2	1 2	1

При изучении материалов по каждой теме необходимо составить краткий конспект наиболее важной информации.

Работа с конспектом лекций.

Просмотрите конспект сразу после занятий. Отметьте материал конспекта лекций, который вызывает затруднения для понимания. Попытайтесь найти ответы на затруднительные вопросы, используя предлагаемую литературу. Если самостоятельно не удалось разобраться в материале, сформулируйте вопросы и обратитесь на текущей консультации или на ближайшей лекции за помощью к преподавателю.

Каждую неделю отводите время для повторения пройденного материала, проверяя свои знания, умения и навыки по контрольным вопросам и тестам.

Помимо самостоятельного изучения материалов по темам к самостоятельной работе студентов относится подготовка к лабораторным работам по результатам которой студент представляет отчет преподавателю и проходит собеседование.

При самостоятельной подготовке к лабораторной работе студент:

- организует свою деятельность в соответствии с методическим руководством по выполнению лабораторных работ;
- изучает информационные материалы;
- подготавливает и оформляет материалы лабораторных работ в соответствии с требованиями.

В результате выполнения указанных видов самостоятельной работы происходит **формирование компетенций** представленных ниже:

Код	Формулировка
ПК-1	Способен участвовать в разработке и проектировании технологических процессов согласно принятой в организации технологии производства пищевой и биотехнологической продукции с использованием современных систем автоматизированного проектирования
ПК-2	Способен к реализации биотехнологических процессов в соответствии с технологическим регламентом и использованием средств измерения основных параметров, методов контроля свойств сырья, полуфабрикатов и готовой продукции

2 План-график выполнения самостоятельной работы

Правильная организация самостоятельной работы и ее систематичность, позволяет развивать умения и навыки; проводить систематизацию полученных знаний, обеспечивать высокий уровень успеваемости в период обучения, получить навыки повышения профессионального уровня.

3. Методические рекомендации по изучению теоретического материала

При изучении дисциплины у студентов должен вырабатываться рационально-критический подход к изучаемым проблемам и явлениям. Это включает понимание того, что со временем ряд информационных и теоретических материалов устаревает, требуя критического отношения. С другой стороны, каждый текущий вопрос имеет свою историю, которую тоже полезно знать.

Чтобы понять содержание теоретического материала, нужно уметь его прочитывать. Начинать следует с предварительного просмотра, в ходе которого ознакомиться с названием работы, с аннотацией, оглавлением, предисловием. Часто замысел работы ясен уже при ознакомлении с ее названием. Но особенно интересен просмотр оглавления, в результате которого становится ясным развитие мысли автора. Неплохо было бы появившиеся при этом мысли зафиксировать на бумаге.

Просматривая текст оглавления, нужно остановиться на тех главах, которые представляют для вас особенный интерес, бегло ознакомиться с ними, составляя в общих чертах свое представление о них. Цель этого действия – найти места, относящиеся к искомой теме, определив при этом, что ценного в каждом из них.

Следующий этап – прочтение выделенных мест с фиксацией самых главных сведений. При этом надо четко и ясно осознавать цель чтения, постоянно держа ее перед собой: по какому вопросу нужна информация, для чего нужна, ее характер и т.д. необходимо менять режим чтения – от беглого вдумчивого – в зависимости от ценности информации, останавливаясь там, где это требуется для глубокого понимания текста.

Следует научиться определять структуру текста по соподчиненности его частей, учитывая взаимосвязь текста с рисунками, сносками, примечаниями и таблицами. Все это поможет пониманию текста при беглом ознакомлении с ним. Так вырабатывается способность при прочтении сразу понимать смысл и значение новой информации.

Многие книги и статьи имеют в своем аппарате списки литературы, которые дают возможность пополнить информационную осведомленность о дополнительной литературе по данному вопросу.

Отдельный этап прочтения – ведение записей прочитанного. Существует несколько видов записей: план, выписки, тезисы, аннотация, резюме, конспект.

Планом удобно пользоваться при подготовке к устному выступлению по выбранной теме. Каждый пункт плана должен раскрывать одну из сторон избранной темы, а весь план должен охватывать ее целиком.

Тезисы предполагают сжатое изложение основных положений текста в форме утверждения или отрицания. Они являются более совершенной формой записей и представляют основу для дискуссии. К тому же их легко запомнить.

Аннотация – краткое изложение содержания – дает общее представление о работе.

Резюме кратко характеризует выводы, главные итоги произведения.

Конспект является наиболее распространенной формой ведения записей. Основную ткань конспекта составляют тезисы, дополненные доказательствами и рассуждениями. Конспект может быть текстуальным, свободным или тематическим. Текстуальный представляет собой цитатник с сохранением логики работы и структуры текста. Свободный конспект основан на изложении материала в том порядке, который более удобен автору. В этом смысле конспект представляет собирание воедино мыслей, разбросанных по всей книге. Тематический конспект может быть составлен по нескольким источникам, где за основу берется тема, интерпретируемая по-разному.

Экономия времени дает использование при записях различного рода сокращений, аббревиатуры и т.д. многие используют для регистрации исследуемых тем систему карточек. Преимущество карточек в том, что тема там излагается очень сжато, и они очень удобны в использовании, т.к. их можно разложить на столе, перегруппировать и без труда найти искомую тему.

4. Методические указания по видам работ, предусмотренных рабочей программой

Работа на лекции является очень важным видом студенческой деятельности для изучения дисциплины «Основы промышленной биотехнологии», т.к. на лекции происходит не только сообщение новых знаний, но и систематизация и обобщение накопленных знаний, формирование на их основе идейных взглядов, убеждений, мировоззрения, развитие познавательных и профессиональных интересов. Лектор ориентирует студентов в действующем законодательстве Российской Федерации и соответственно в учебном материале.

Краткие записи лекций (конспектирование) помогает усвоить материал. Написание конспекта лекций: кратко, схематично, последовательно фиксировать основные положения, выводы, формулировки, обобщения; пометить важные мысли, выделять ключевые слова, термины. Конспект лучше подразделять на пункты, параграфы, соблюдая красную строку. Принципиальные места, определения, формулы следует сопровождать замечаниями: «важно», «особо важно», «хорошо запомнить» и т.п. или подчеркивать красной ручкой. Целесообразно разработать собственную символику, сокращения слов, что позволит сконцентрировать внимание студента на важных сведениях. Прослушивание и запись лекции можно производить при помощи современных устройств (диктофон, ноутбук, нетбук и т.п.).

Работая над конспектом лекций, всегда следует использовать не только учебник, но и ту литературу, которую дополнительно рекомендовал лектор, в том числе нормативно-правовые акты соответствующей направленности. По результатам работы с конспектом лекции следует обозначить вопросы, термины, материал, который вызывают трудности, пометить и попытаться найти ответ в рекомендуемой литературе. Если самостоятельно не удастся разобраться в материале, необходимо сформулировать вопрос и задать преподавателю на консультации, на лабораторной работе.

Лекционный материал является базовым, с которого необходимо начать освоение соответствующего раздела или темы.

В процессе подготовки к лабораторной работе студент знакомится с рабочей программой дисциплины, темами и планами лабораторных работ, уделяя особое внимание целям и задачам, структуре и содержанию дисциплины, проводит анализ основной нормативно-правовой и учебной литературы, после чего работает с рекомендованной дополнительной литературой.

Формы организации лабораторных работ определяются в соответствии со специфическими особенностями учебной дисциплины и целями обучения. При устном выступлении по контрольным вопросам студент должен излагать (не читать) материал выступления свободно. Необходимо концентрировать свое внимание на том, что выступление должно быть обращено к аудитории, а не к преподавателю, т.к. это значимый аспект профессиональных компетенций выпускника.

По окончании занятия студенту следует повторить выводы, проследив логику их построения, отметив положения, лежащие в их основе. Для этого студенту в течение лабораторной работы следует делать пометки. Более того, в случае неточностей и (или) непонимания какого-либо вопроса пройденного материала студенту следует обратиться к преподавателю для получения необходимой консультации и разъяснения возникшей ситуации.

Для подготовки к зачету необходимо выполнить цикл лабораторных работ, тщательно изучить и проанализировать теоретические сведения по каждому виду работ. При подготовке к ответу студенту предоставляется право пользования основной и дополнительной литературой, научными статьями, а также ресурсами сети интернет.

Список рекомендуемой литературы

Основная литература

1. Основы биотехнологии Электронный ресурс : учебное пособие / Р.М. Турпанова / М.С. Исабекова / Ж.Б. Махатаева / Г.К. Жайлибаева. - Алматы : Нур-Принт, 2017. - 57 с. - Книга находится в базовой версии ЭБС IPRbooks. - ISBN 978-601-263-304-7
2. Микробиология с основами биотехнологии (теория и практика) Электронный ресурс : учебное пособие / О.Л. Мещерякова / Е.А. Мотина / О.Ю. Мальцева / Г.П. Шуваева / Т.В. Свиридова / О.С. Корнеева. - Микробиология с основами биотехнологии (теория и практика), 2020-09-27. - Воронеж : Воронежский государственный университет инженерных технологий, 2017. - 316 с. - Книга находится в базовой версии ЭБС IPRbooks. - ISBN 978-5-00032-239-0

Дополнительная литература:

1. Горленко, В. А. Научные основы биотехнологии / В.А. Горленко ; Н.М. Кутузова ; С.К. Пятунина, И. Нанотехнологии в биологии. - Москва : Прометей, 2013. - 262 с. - ISBN 978-5-7042-2445-7
2. Бирюков, В. В. Основы промышленной биотехнологии: учебное пособие/ В. В. Бирюков. - М.:КолосС:Химия, 2004. - 296 с. (Для высшей школы). - Библиогр.: с. 295.
3. Егорова, Т. А. Основы биотехнологии : учеб. пособие для студ. вузов*. - 3-е изд., стереотип. - М. : ACADEMIA, 2006. - 208 с. - (Высшее профессиональное образование). - Библиогр.: с. 205-206. - ISBN 5-7695-2808-7
4. Сироткин, А. С. Теоретические основы биотехнологии / А.С. Сироткин ; В.Б. Жукова. - Казань : КГТУ, 2010. - 87 с. - ISBN 978-5-7882-0906-7
5. Общая и фармацевтическая биотехнология : Учебное пособие / сост.: В. А. Махмуткин, Н. И. Танаева. - Самара : РЕАВИЗ, 2009. - 118 с. - Книга находится в базовой версии ЭБС IPRbooks
6. Клунова, С. М. Биотехнология : учебник для вузов / С. М. Клунова, Т. А. Егорова, Е. А. Живухина. - Москва : Академия, 2010. - 255, [1] с.
7. Биотехнология : учебник / [И. В. Тихонов и др.] ; под ред. Е. С. Воронина. - СПб. : ГИОРД, 2008. - 704 с.
8. Иванова, Л. А. Пищевая биотехнология : учеб. пособие / Л. А. Иванова, Л. И. Войно, И. С. Иванова ; под ред. И. М. Грачевой, Кн. 2, Переработка растительного сырья. - М. : КолосС, 2008. - 472 с.
9. Сазыкин, Ю. О. Биотехнология : учеб. пособие / Ю. О. Сазыкин, С. Н. Орехов, И. И. Чакалева. - 3-е изд., стер. - Москва : Академия, 2008. - 253 с.

10. Основы биотехнологии : учеб. пособие для студентов вузов, обучающихся по специальности "Биология" / Егорова Т. А., Клунова С. М., Живухина Е. А. – 3-е изд., стер. – М. : ACADEMIA, 2006. – 208 с.
11. Основы фармацевтической биотехнологии : учеб. пособие / Т. П. Прищеп [и др.] ; [ред. Т. Портнова, А. Михайленко]. – Ростов н/Д : Феникс ; Томск : Изд-во НТЛ, 2006. – 256 с.
12. Егорова, Т. А. Основы биотехнологии : учеб. пособие для студ. вузов. - 3-е изд., стереотип. - М. : ACADEMIA, 2006. - 208 с.
13. Сельскохозяйственная биотехнология : Учебник для студентов вузов / [В.С. Шевелуха, Е.А. Калашникова, Е.С. Воронин и др.]. – 2-е изд., перераб. и доп. – М. : Высш. шк., 2003. – 469 с.

Перечень учебно-методического обеспечения самостоятельной работы обучающихся по дисциплине

1. Методические рекомендации по выполнению лабораторных и практических работ по дисциплине Основы промышленной биотехнологии. Направление подготовки 19.03.01 - Биотехнология, направленность (профиль) – Промышленная биотехнология. Квалификация выпускника - бакалавр. Ставрополь, СКФУ, 2026.
2. Методические рекомендации по организации самостоятельной работы студентов по дисциплине Основы промышленной биотехнологии. Направление подготовки 19.03.01 - Биотехнология, направленность (профиль) – Промышленная биотехнология. Квалификация выпускника - бакалавр. Ставрополь, СКФУ, 2026.

3. Перечень ресурсов информационно-телекоммуникационной сети «Интернет», необходимых для освоения дисциплины

- 1 www.shiphelp.ru – нормативные и законодательные документы в области строительства
- 2 www.biblioclub.ru – ЭБС «Университетская библиотека ОНЛАЙН», электронная библиотека, обеспечивающая доступ к наиболее востребованным материалам учебной и научной литературы по всем отраслям знаний от ведущих российских издательств
- 3 www.iprbookshop.ru – ЭБС «IPRbooks», мультидисциплинарная полнотекстовая база электронных изданий
www.elibrary.ru/ - сайт научной электронной библиотеки

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
ФГАОУ ВО «Северо-Кавказский федеральный университет»

**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ДЛЯ ВЫПОЛНЕНИЯ ПРАКТИЧЕСКИХ
РАБОТ ПО ДИСЦИПЛИНЕ ОСНОВЫ ПРОМЫШЛЕННОЙ
БИОТЕХНОЛОГИИ**

Направление подготовки
Профиль

19.03.01 – Биотехнология
Промышленная биотехнология

Ставрополь

2026

В методических указаниях к лабораторным занятиям по дисциплине «Основы промышленной биотехнологии» для студентов направления 19.03.01 Биотехнология приведены методы анализа ассимиляции различных углеводов культурами дрожжей, исследования влияния физико-химических факторов внешней среды на ростовые процессы микроорганизмов. Представлены способы лабораторного культивирования дрожжей и молочнокислых микроорганизмов, методики количественного учета биомассы микроорганизмов и определения целевых продуктов микробного синтеза и ферментативного катализа.

Методические указания соответствуют программе дисциплины «Основы промышленной биотехнологии».

Составители: заведующий кафедрой прикладной биотехнологии,
д-р техн. наук Лодыгин А. Д.
ассистент кафедры прикладной биотехнологии
Гарибян Л.В.

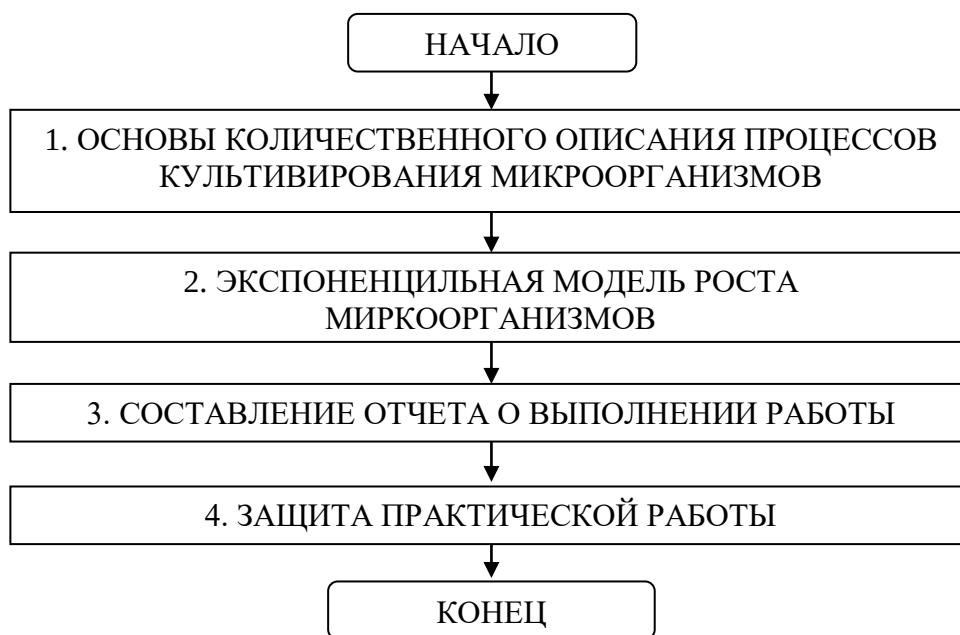
Рецензент – профессор, д-р техн. наук Рябцева С. А.

ПРАКТИЧЕСКАЯ РАБОТА № 1

ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ ОПИСАНИЯ КИНЕТИКИ ПРОЦЕССОВ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

Цель работы: изучить общие принципы описания кинетики процессов культивирования микроорганизмов.

АЛГОРИТМ ПРОВЕДЕНИЯ РАБОТЫ



В основе количественного описания процессов культивирования микроорганизмов лежат исследования по кинетике накопления биомассы или продуктов метаболизма. Зависимость концентрации биомассы от времени культивирования описывается сложной S-образной кривой.

Количественное описание всей кривой роста на практике не применяется. Наибольший практический интерес представляет выявление зависимости концентрации биомассы от продолжительности культивирования на 2-4 фазах (кинетика роста) и фазе отмирания (кинетика гибели).

Наиболее простой способ описания кинетики роста основан на получении аналитических зависимостей, отражающих внешний вид кривой роста на 2-4 участках. Такими зависимостями являются экспоненциальные функции различной степени сложности:

$$[X] = [X]_{\infty} / (1 + e^{K_1 + K_2 * \tau + K_3 * \tau^2 \dots + K_n * \tau^{n-1}}) \quad (1.1)$$

Однако данный принцип описания кинетики накопления биомассы не отражает закономерностей роста и развития популяций, является, по сути дела, статистическим.

Этот недостаток устранен при разработке так называемой экспоненциальной модели, основанной на следующих принципах:

1. Увеличение численности популяции микроорганизмов происходит в результате удвоения каждой особи, происходящего через определенные интервалы времени g (время генерации, время удвоения биомассы).

2. Рост, развитие и деление клеток происходит независимо от присутствия других микроорганизмов.

3. В некоторых пределах изменение концентрации компонентов питательной среды не влияет на время удвоения клеток g .

Математическое выражение экспоненциальной модели:

$$[X] = [X]_0 * 2^{\tau/g}; \quad (1.2)$$

$$\ln[X] = \ln[X_0] * \tau/g; \quad (1.3)$$

$$g = \ln 2 / \mu; \quad (1.4)$$

$$\ln[X]/[X_0] = \mu \tau. \quad (1.5)$$

Первый принцип соответствует в первую очередь процессу размножения бактерий. Однако если концентрация биомассы выражена через количество АСБ в единице объема, предложенная модель описывает увеличение биомассы при способах размножения, отличных от деления клеток.

Второй принцип справедлив для большинства промышленных процессов культивирования, реализуемых в условиях асептики.

Третий принцип является наименее обоснованным, поскольку именно в экспоненциальной фазе происходит наиболее интенсивное усвоение субстрата культурой. В связи с этим, ряд работ по кинетике роста был направлен на дополнение экспоненциальной модели роста зависимостями, позволяющими выразить зависимость скорости роста от концентрации питательных веществ.

Отчет о работе должен включать:

- титульный лист;

- цель работы и алгоритм выполнения;
- результаты изучения теоретического материала;
- выводы.

ПРАКТИЧЕСКАЯ РАБОТА № 2

СПОСОБЫ РАСЧЕТА ТЕПЛА, ВЫДЕЛЯЮЩЕГОСЯ В ПРОЦЕССЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

Цель работы: изучить способы расчета тепла, выделяющегося в процессе культивирования микроорганизмов.

АЛГОРИТМ ПРОВЕДЕНИЯ РАБОТЫ



В стехиометрическом соотношении:

$$\begin{aligned} \dot{\alpha}^C * [\text{Источник C}] + \dot{\alpha}^{O_2} * [O_2] + \dot{\alpha}^N * [\text{Источник N}] + \\ + \dot{\alpha}^P * [\text{Источник P}] = CH_lO_mN_nP_p + \dot{\alpha}^{H_2O}[H_2O] + \dot{\alpha}^{CO_2}[CO_2] + \\ + \dot{\alpha}^P[\text{Продукты метаболизма}] + \dot{\alpha}^{\Delta H}[\text{Тепловой эффект}]. \end{aligned} \quad (2. 1)$$

если произвести расчеты степени восстановленности субстратов и продуктов ферментации, в общем случае левая часть уравнения оказывается больше правой. Следовательно, энергия в субстрате больше энергии, заключенной в биомассе и продуктах метаболизма. Именно эта разность энергий и преобразуется в тепловыделения в процессе ферментации.

В биотехнологии определение величины тепловыделений является важной задачей, которая нужна для расчета биореакторов. Величина тепловыделений может быть определена с помощью сравнения суммарной степени

восстановленности субстратов, продуктов и образовавшейся биомассы с учетом соответствующих стехиометрических коэффициентов по формуле:

$$\Delta H = (\sum_{i=1}^m v_i * \gamma_{Si} - \gamma_X - \sum_{j=1}^n v_j * \gamma_{Pj}) * 115, \text{ кДж/С-моль биомассы} \quad (2. 2)$$

где ΔH – тепловыделение;

v_i – стехиометрический коэффициент для i-го субстрата;

v_j – стехиометрический коэффициент для j-го продукта;

m – общее количество субстратов;

n – общее количество продуктов;

γ_{Si} – степень восстановленности i -го субстрата;

γ_{Pi} – степень восстановленности j -го продукта;

γ_X – степень восстановленности биомассы.

Также определение тепловыделений в процессе культивирования микроорганизмов может быть проведено по аналогии с методикой расчета теплового эффекта химических реакций:

$$\Delta H = \sum_{i=1}^m v_i * (\Delta H_{Si}) - \Delta H_X - \sum_{j=1}^n v_j * (\Delta H_{Pj}) \quad (2. 3)$$

где ΔH_S , ΔH_X , ΔH_P – теплоты сгорания соответственно субстратов, биомассы и продуктов метаболизма.

Для ряда химических соединений (субстратов, продуктов метаболизма) данные по ΔH являются справочными, например для белков – 13,5 кДж/г, моносахаров – 15,7 кДж/г, дисахаров – 16,5 кДж/г, глицерина – 18,1 кДж/г, или их можно определить методом «калориметрической бомбы». Для биомассы проведены такие измерения: дрожжей 20,4 кДж/г биомассы, бактерии 21,0 кДж/г биомассы.

Для аэробных процессов может быть использован еще один способ расчета теплового эффекта. Если известно количество кислорода, израсходованное на окисление субстрата, то тепловыделение можно определить по формуле:

$$\Delta H = \Delta G_{O_2} * 460 \text{ кДж}, \quad (2. 4)$$

где ΔG_{O_2} – количество израсходованного кислорода, г * моль O_2 .

Расчет по приведенным формулам (2. 2), (2. 3) и (2. 4) дает сопоставимые результаты. Однако использование формулы (2. 4) более предпочтительно в случаях, когда легко определяется потребление кислорода культурой.

Отчет о работе должен включать:

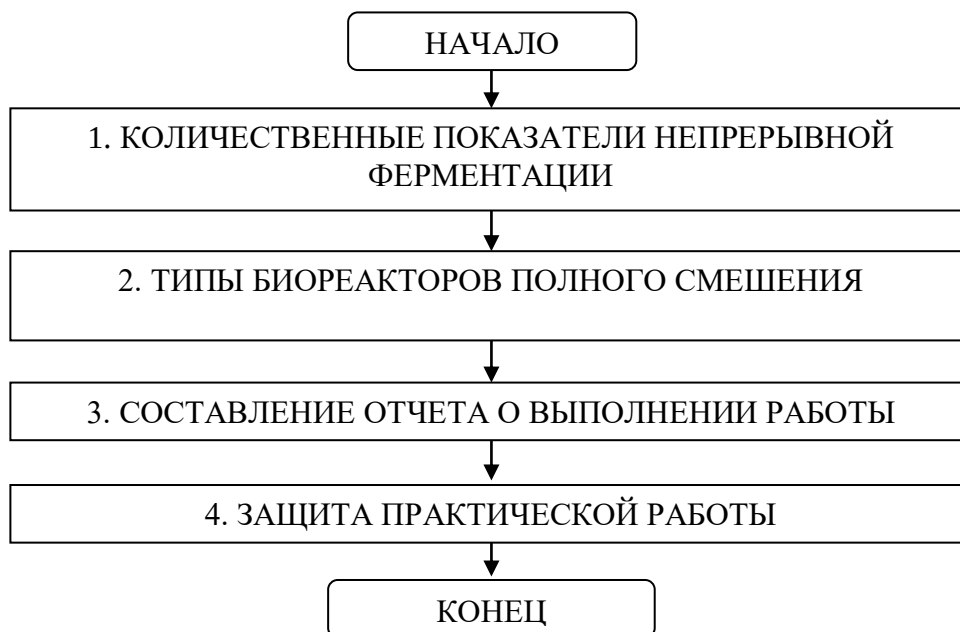
- титульный лист;
- цель работы и алгоритм выполнения;
- результаты изучения теоретического материала;
- выводы.

ПРАКТИЧЕСКАЯ РАБОТА № 3

ТИПЫ И ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ СПОСОБЫ НЕПРЕРЫВНОЙ ФЕРМЕНТАЦИИ В АППАРАТАХ ПОЛНОГО СМЕШЕНИЯ

Цель работы: изучить типы и технологические способы непрерывной ферментации в аппаратах полного смешения.

АЛГОРИТМ ПРОВЕДЕНИЯ РАБОТЫ



Использование непрерывно действующих (проточных) реакторов имеет ряд преимуществ перед периодическими процессами. Это открытые системы, которые при определенных условиях приходят в стационарное состояние, когда все параметры системы (концентрации всех компонентов среды и клеток) постоянны во времени. Это резко упрощает управление работой биореактора и автоматизацию процесса.

Количественные показатели процесса непрерывного культивирования:

- Скорость потока (коэффициент разбавления): $D = W/V$,
где: W – скорость потока среды, $\text{м}^3/\text{ч}$;
- Скорость образования биомассы и выноса биомассы из системы:
 $D[X]/d\tau = \mu[X] - D[X] = (\mu - D) [X]$
- Скорость поступления и потребления лимитирующего субстрата:

$$D[S]/d\tau = D([S]_0 - [S]_1) - \mu[X]/Y_{x/s};$$

- Скорость образования и выноса из системы продукта P:

$$D[P]/d\tau = q_p[X] - D[P] = 0.$$

Если $\mu = D$, то $d[X]/d\tau = 0$, т.е. система находится в состоянии динамического равновесия. В зависимости от метода, благодаря которому поддерживается данное состояние, различают хеостатный (поддержание постоянной концентрации лимитирующего субстрата) и турбидостатный (поддержание постоянной концентрации биомассы) принципы культивирования.

Также известны методы управления ростом непрерывной культуры при pH (pH-стат) и по кислороду (оксистат).

В промышленности из аппаратов полного смешения наиболее широко используют биореакторы, работающие по принципу хеостата. Их преимущества – простота конструкции, легкость поддержания заданного режима, возможность длительного непрерывного культивирования.

Стационарные концентрации клеток $\bar{[X]}$ и субстрата $\bar{[S]}$ связаны с соответствующими концентрациями во входном потоке уравнениями материального баланса.

$$V \cdot r_x + W \cdot [X]_0 - W \cdot [X] = 0;$$

$$W \cdot [S]_0 - W \cdot \bar{[S]} - V \cdot r_x \cdot 1/Y = 0.$$

Если выразить скорость прироста по уравнению Моно, получим основное кинетическое уравнение процесса ферментации в режиме хеостата:

$$\mu_{\max} \cdot \bar{[X]} \cdot \bar{[S]} / (K_s + \bar{[S]}) = \mu \cdot \bar{[X]} = D \cdot (\bar{[X]} - [X]_0).$$

Из этого уравнения следует, что подача клеток в аппарат в непрерывном режиме хеостата не обязательна; в этом случае работа биореактора начинается с периодического культивирования некоторой посевной дозы, а после перехода культуры в экспоненциальную фазу включают непрерывную подачу питательной среды. Для такого режима кинетическое уравнение принимает вид (при $[X]_0 = 0$):

$$\mu \cdot \bar{[X]} = D \cdot \bar{[X]};$$

$$\mu = D.$$

Последнее равенство называют законом хемостата, который заключается в том, что в стационарном режиме удельная скорость роста устанавливается равной скорости разбавления среды, которая задается подбором параметров V и W_0 . Согласно уравнению Моно:

$$D = \mu = \mu_{\max} * \bar{[S]} / (K_s + \bar{[S]});$$

$$\bar{[S]} = K_s * D / (\mu_{\max} - D);$$

где: $\bar{[S]}$ – концентрация субстрата в стационарном режиме работы хемостата.

Концентрация биомассы в стационарном режиме (при $[X]_0 = 0$):

$$\bar{[X]} = Y * ([S]_0 - K_s * D) / (\mu_{\max} - D)$$

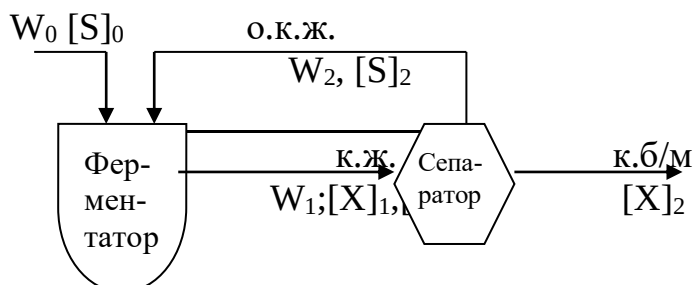
Концентрация субстрата $\bar{[S]}$ накладывает ограничение на скорость разбавления: $0 < D < D_{\text{кр}}$;

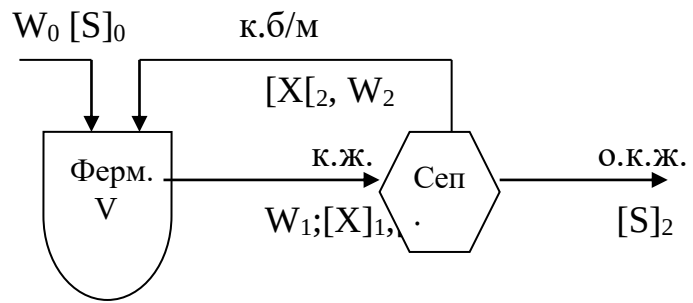
где: $D_{\text{кр}} = \mu_{\max} * [S]_0 / (K_s + [S]_0)$ – критическая скорость разбавления, превышение которой вызывает вымывание клеток из биореактора.

Производительность отдельно работающего хемостата по биомассе определяется как число клеток, образующихся в единицу времени в единице объема биореактора:

$$G_x = [\bar{X}] / \tau = D * \bar{[X]} = D * Y * ([S]_0 - (D * K_s / (\mu_{\max} - D))).$$

Хемостатный реактор с рециклом по биомассе и культуральной жидкости. В промышленных процессах используют при хемостатном культивировании блоки «биореактор-сепаратор».





Основные закономерности процесса:

- $W_1 = W_0 + W_2$;
- Кратность рециркуляции $a = W_2/W_0 > 0$;
- Степень сепарации $b = \overline{[X]}_2/\overline{[X]}_1 > 0$ (при рецикле по осветленной жидкости $b < 1$, по биомассе $b > 1$):

- Материальный баланс ферментатора с рециклом:

$$W_2 \cdot \overline{[X]}_2 + V \cdot \mu \cdot \overline{[X]}_1 - W_1 \cdot \overline{[X]}_1 = 0;$$

Исходя из этого, основной закон хемостата для аппаратов с рециклом примет вид:

$$\mu = u \cdot D;$$

где: $u = 1 + a - a \cdot b$ – фактор рециркуляции;

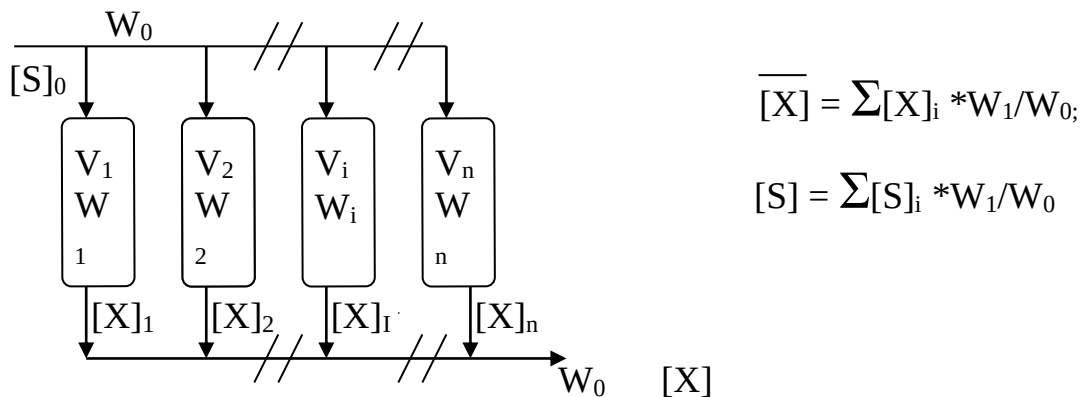
$$G_x^{opt} = Y \cdot \mu_{max} / u \cdot (\sqrt{K_s + [S]_0} - \sqrt{K_s})^2$$

При рецикле по биомассе $[X]_2 > [X]_1$, при этом $u < 1$ и производительность по сравнению с хемостатом без рецикла увеличивается. Недостаток: увеличение среднего возраста клеток и снижение их активности (падение μ_{max}), опасность заражения культуры посторонней микрофлорой.

При рецикле по культуральной жидкости снижается производительность аппаратуры, т.к. $u > 1$. Этот процесс может быть использован для более полной утилизации дорогостоящих субстратов. Его применение ограничивает торможение роста культуры повторно поступающим в реактор продуктом.

Каскад хемостатов. В производственных условиях в ряде случаев оказывается целесообразным культивирование в системе из нескольких последовательно или параллельно соединенных аппаратов. Батарея параллельно соединенных хемостатов имеет общую линию подачи сырья и отвода

культуральной жидкости. Концентрации и биомассы субстрата на выходе из установки связаны с концентрациями в отдельных аппаратах соотношениями:



Производительность каждого аппарата определяется соотношениями:

$$G_x = D_i * Y * ([S]_0 - [S]_i);$$

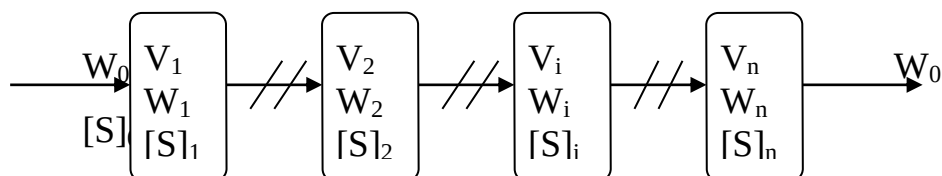
всего каскада:

$$G_x = Y * \sum W_i * ([S]_0 - [S]_i) / V$$

Если параметры роста культуры $\mu_{\max}$ и K_s в аппаратах одинаковы, то максимальная производительность батареи G_x достигается при равномерном распределении потоков по аппаратам так, чтобы скорости разбавления в каждом ферментаторе совпадали с общей скоростью разбавления:

$$D_i^{\text{opt}} = \sum W_i / \sum V_i$$

При последовательном соединении реакторов скорость потока через всю систему остается постоянной, т.к. во входном потоке каждого из аппаратов каскада содержатся клетки из предыдущего аппарата.



Производительность каскада последовательно соединенных хемостатов определяется приростом клеток за время пребывания $D = 1/\tau$:

$$G_{xi} = ([X]_i - [X]_{i-1}) / \tau = D ([X]_i - [X]_{i-1}).$$

Минимальный объем каскада достигается при постоянной степени превращения субстрата на каждой ступени превращения:

$$[S]_1/[S]_0 = \dots [S]_2/[S]_1 = \dots [S]_n/[S]_{n-1}.$$

Отчет о работе должен включать:

- титульный лист;
- цель работы и алгоритм выполнения;
- результаты изучения теоретического материала;
- выводы.

ПРАКТИЧЕСКАЯ РАБОТА № 4

ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ ТРАНСПОРТА ПИТАТЕЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ В КЛЕТКИ МИКРООРГАНИЗМОВ

Цель работы: изучить общие механизмы транспорта питательных веществ в клетки микроорганизмов, особенности переноса компонентов питательных сред за счет активного транспорта и группового перемещения.

АЛГОРИТМ ПРОВЕДЕНИЯ РАБОТЫ



Блок 1. Эффекты проницаемости клеточных мембран являются наряду с метаболической регуляцией важным регуляторным механизмом микробной клетки. Цитоплазматическая мембрана позволяет клетке удерживать концентрированные растворы питательных веществ и селективно переносить внутрь клетки необходимые элементы питания.

Транспорт питательных компонентов из окружающей среды в микробную клетку осуществляется следующими механизмами:

1). **Пассивная диффузия** – ввод веществ в клетку путем молекулярной диффузии, не требующей затрат энергии и переноса против градиента концентрации;

2). **Облегченная диффузия** – транспорт веществ за счет образования комплекса с молекулой специфического переносчика, акцептирующего субстрат на внешней стороне мембраны и высвобождающийся от него на внутренней стороне мембраны; данный путь также не требует затрат энергии переноса против градиента концентраций. В качестве примера переноса за счет облегченной диффузии может служить поступление глицерина в клетки E.coli; глюкозы и галактозы у дрожжей рода *Saccharomyces*; моносахаров у дрожжей *Candida* и др.

3). **Активный транспорт** – перенос, характеризующийся накоплением веществ в цитоплазме против градиента концентраций без их химической модификации.

Активный транспорт требует затрат энергии и наличия специфического переносчика – **пермеазы**. Пермеазы имеют белковую природу, по механизму взаимодействия с субстратом сходны с ферментами. Как правило, пермеазы представляют собой простые белки с молекулярной массой 30-35 тыс. Да. Синтез пермеаз находится под контролем генома клетки, т.е. они являются индуцируемыми белками. Схема транспорта пермеазами включает 4 этапа:

1. рецепция – образование комплекса субстрата с активным центром переносчика;

2. транслокация – перемещение комплекса к внутренней поверхности мембраны;

3. диссоциация комплекса с высвобождением субстрата;

4. регенерация транспортной системы.

4). **Групповое перемещение** – перенос через мембрану, сопровождающийся реакциями обмена группами атомов и требующий затрат энергии. Переносимое вещество химически модифицируется при переносе через мембрану и поступает в цитоплазму в виде производного. Перенос осуществляется с участием

специфического белка, акцептирующего субстрат, и фермента, катализирующего его химическую модификацию.

Блок 2. Фосфоенолпируват- фосфотранспортная система является одним из наиболее распространенных механизмов транспорта компонентов питательной среды в клетку за счет группового перемещения. В результате ее функционирования осуществляется селективный транспорт глюкозы, фруктозы и др. углеводов в фосфорилированной форме и накопление в цитоплазме высоких концентраций сахарофосфатов.

Система состоит из нескольких белковых компонентов. В мембране локализован фермент 2, функции которого связаны с рецепцией и транслокацией специфического углеводного субстрата. В цитоплазме на внутренней стороне мембраны локализованы фермент 1 и гистидин-содержащий белок H-Pr, ответственные за реакцию фосфорилирования.

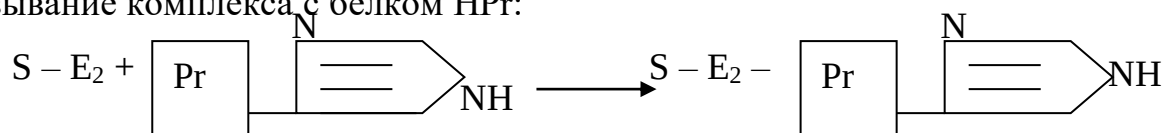
Механизм функционирования включает следующие стадии:

1). Взаимодействие субстрата с центром рецепции фермента 2 на внешней стороне мембраны: $S + E_2 = S - E_2$;

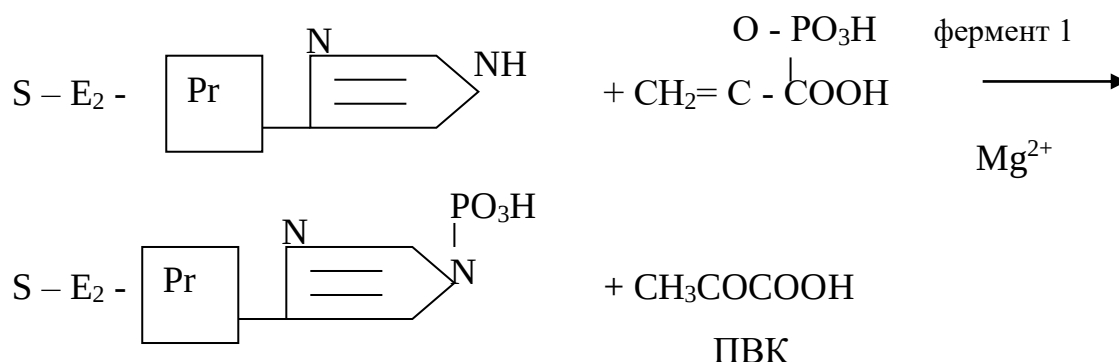
2). Конформационное изменение фермента 2, приводящее к переносу субстрата к внутренней стороне мембраны;

3). При определенных условиях транспорт углеводов осуществляется за счет облегченной диффузии, в этом случае процесс завершается диссоциацией фермент-субстратного комплекса;

4). При реализации механизма группового перемещения происходит связывание комплекса с белком HPr:



5). Под действием фермента 1 происходит фосфорилирование имидазольного остатка молекулы гистидина:



6). Внутримолекулярный перенос фосфата с имидазольного радикала на углеводный остаток и гидролитическое расщепление комплекса.

Функционирование данной системы у различных микроорганизмов позволяет осуществлять транспорт фосфорилированных форм D-глюкозы, D-галактозы, D-фруктозы, некоторых пентоз, глюкозидов и галактозидов.

Блок 3. Перенос азотсодержащих компонентов среды осуществляется главным образом за счет функционирования систем активного транспорта. Системы транспорта аминокислот подразделяют на 4 группы:

- 1). Специфические системы для нейтральных алифатических и ароматических аминокислот;
- 2). Системы для основных аминокислот;
- 3). Системы для кислых аминокислот;
- 4). Общие неспецифические системы.

Например, в клетках E.coli отдельно функционируют системы, осуществляющие транспорт: 1 – лейцина, изолейцина, валина; 2 – аланина, глицина, серина; 3 – фенилаланина, тирозина, триптофана; 4 – метионина.

Ряд аминокислот имеет несколько пермеаз, как специфичных, так и неспецифичных. Так, у E.coli для аспарагиновой кислоты помимо специфичной пермеазы функционирует транспортный белок, осуществляющий перенос через мембрану C₄ – дикарбоновых кислот. В этом случае возможно конкурентное ингибирование транспорта аминокислоты ее структурными аналогами.

На активность пермеаз оказывают влияние внешние факторы (температура, pH), наличие в среде специфических активаторов и ингибиторов. В частности,

универсальным активатором. Повышающим проницаемость мембран к транспорту аминокислот является биотин. Ионы аммония в общем случае ингибируют пермеазные белки, взаимодействуя с их активным центром.

Некоторые микроорганизмы способны к транспорту олигопептидов. Транспорт олигопептидов осуществляется двумя типами пермеаз:

- 1). Пермеазы, специфичные дипептидам;
- 2). Неспецифичные пермеазы, обеспечивающие транспорт ди-, три-, тетра- и пентапептидов. Данные пермеазы относятся к конститутивным белкам, однако их активность может регулироваться аминокислотами по принципу обратной связи.

В ряде случаев белки и нуклеиновые кислоты попадают в цитоплазму без предварительного гидролиза. Поглощение происходит при наличии на внешней поверхности мембраны специфического рецептора, способного изменять локальную проницаемость мембраны посредством деформации ее структуры.

Транспорт органических кислот. Ряд органических кислот транспортируется через мембрану по механизму группового перемещения. Например, для уксусной, масляной, валериановой кислоты у некоторых бактериальных культур существуют специфические системы транспорта, сопряженные с каталитическим ацилированием кислот. В результате кислоты поступают в цитоплазму в виде ацетил-КоА-производных. В роли ингибиторов транспорта органических кислот часто выступают глюкоза, сахароза и другие моно- и олигосахариды.

Блок 4. Механизм транспорта посредством пиноцитоза в редких случаях осуществляется для переноса через мембрану крупных молекул или коллоидных частиц. Транспорт веществ в данном случае включает следующие этапы:

1. Сорбция частицы в цитоплазматическую мембрану;
2. Деформация мембраны и образование пиноцитарного пузырька;
3. Миграция пузырька внутрь клетки;
4. Гидролиз оболочки пузырька под действием специфических протеаз и высвобождение транспортируемой частицы.

В клеточной мембране микроорганизмов локализованы ионофоры – специфические вещества, обеспечивающие транспорт ионов щелочных металлов. По химической природе они относятся к циклодепсипептидам, состоящим из остатков аминокислот. По механизму действия их подразделяют на два типа:

1. Вещества – переносчики;
2. Вещества, образующие ион-проницаемые поры.

Вещества-переносчики представлены в мембранах клеток микробов валиномицином, энниатинами А, В, С. Валиномицин состоит из трех идентичных фрагментов, составленных из остатков D- валина, L- валина, L- лактата, D-оксиизовалерата.

Валиномицин способен связывать из растворов широкий круг ионов щелочных и щелочноземельных металлов, однако обладает наиболее высокой селективностью по отношению к иону K^+ . Ион связывается с расположенной на поверхности мембраны молекулой валиномицина, затем переходит ко второй молекуле ионофора, расположенной внутри мембраны. Образовавшийся комплексный катион мигрирует ко внутренней поверхности мембраны, где зафиксирована третья молекула валиномицина. Связывающая транспортируемый ион и переносящая его в цитоплазму.

Молекулы энниатинов состоят из трех фрагментов, включающих остатки α -D –оксиизовалериановой кислоты и N – метил-L-изолейцина (энниатин А) или N-метил- L-валина (энниатин В). Молекулы энниатина и валиномицина связывают транспортируемый ион за счет ион-дипольных взаимодействий с шестью лигандными карбонильными группами.

К ионофорам относится грамицидин, представляющий собой пятнадцатичленный линейный пептид, построенный из остатков гидрофобных алифатических и ароматических аминокислот. Взаимодействуя между собой, молекулы грамицидина образуют спиралевидные каналы, соединяющие растворы на обеих сторонах мембраны и проницаемые для ионов металлов.

Блок 5. Отчет о работе должен включать:

- титульный лист;
- цель работы и алгоритм выполнения;
- результаты изучения теоретического материала;
- выводы.

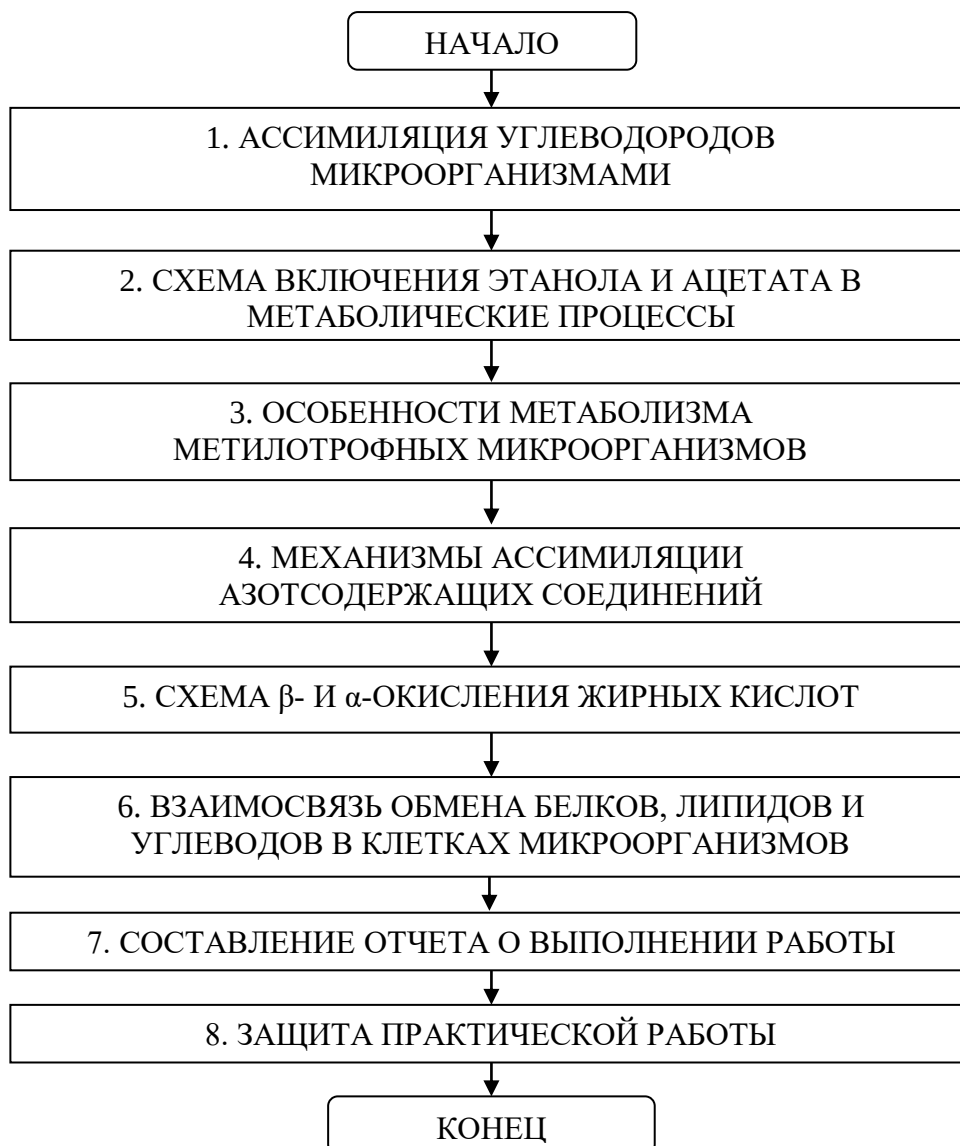
Блок 6. Контрольные вопросы:

- закономерности транспорта питательных веществ в клетки микроорганизмов по механизмам пассивной и облегченной диффузии, активного транспорта и группового перемещения;
- принципы переноса питательных веществ через цитоплазматическую мембрану по механизму группового перемещения на примере фосфоенолпируват-фосфотрансферазной системы транспорта углеводов;
- особенности активного транспорта веществ на примере азотсодержащих компонентов среды и органических кислот;
- пиноцитоз и мембранные ионофоры, их роль в транспорте питательных веществ.

ПРАКТИЧЕСКАЯ РАБОТА № 5
ИЗУЧЕНИЕ ЗАКОНОМЕРНОСТЕЙ АССИМИЛЯЦИИ
УГЛЕРОДСОДЕРЖАЩИХ, АЗОТСОДЕРЖАЩИХ ВЕЩЕСТВ И ЛИПИДОВ
МИКРООРГАНИЗМАМИ

Цель работы: изучить закономерности ассимиляции углеводов; рассмотреть схемы включения этанола и уксусной кислоты микроорганизмами; особенности метаболизма метилотрофных микроорганизмов; проанализировать закономерности ассимиляции азотсодержащих компонентов питательных сред и жирных кислот; рассмотреть схему взаимосвязи метаболизма углеводов, липидов и белков.

АЛГОРИТМ ПРОВЕДЕНИЯ РАБОТЫ



Блок 1. Углеводы широко используются в качестве углеродных субстратов при культивировании микроорганизмов, в первую очередь, дрожжей. Целевые продукты, синтезируемые микроорганизмами при культивировании на углеводородных средах, делят на три группы:

1). Метаболиты, не отличающиеся от продуктов микробного синтеза, получаемых на углеводных средах (аминокислоты, органические кислоты, углеводы, водорастворимые витамины, антибиотики, ферменты);

2). Жирорастворимые вещества, продуцирование которых значительно усиливается при ассимиляции клетками углеводов (липопротеины, гликолипиды, коэнзим А, жирорастворимые витамины и их предшественники);

3). Метаболиты, строение которых связано со структурой углеводородных субстратов; синтезируются только при наличии в среде последних (ω -аминокислоты; спирты; жирные кислоты).

Способностью к ассимиляции углеводов обладают дрожжи, в первую очередь, рода *Candida*; некоторые культуры грибов; отдельные виды бактерий *Actinomyces*, *Streptomyces*, *Bacillus*.

При исследовании ассимиляции дрожжами углеводов были выявлены следующие общие закономерности:

- алифатические углеводы ассимилируются значительно быстрее и эффективнее, чем ароматические и С1-содержащие углеводы (и вообще все галогенопроизводные), ароматические соединения даже в низких концентрациях токсичны для алканутилизирующих дрожжей;

- многие виды дрожжей способны утилизировать 1-алкены, однако, выход биомассы в данном случае ниже, чем при ассимиляции культурой соответствующих алканов;

- наиболее доступными для клеток дрожжей являются алканы с длиной цепи C_9-C_{18} ; расщепление более длинных цепей затруднено, а жидкие алканы C_5-C_8 проявляют способность к растворению компонентов цитоплазматической мембраны;

- изоалканы доступны для микроорганизмов только тогда, когда содержат в своем составе достаточно длинные линейные участки.

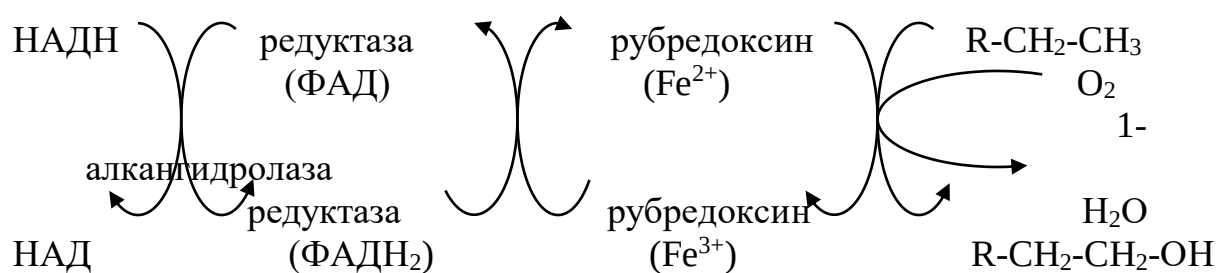
В соответствии с современными представлениями, механизм ассимиляции алканов включает следующие стадии:

1. Образование макроэмульсий (1-100 мкм) в результате перемешивания частиц и микроэмульсий (0,01-0,5 мкм) под действием ПАВ-эмульгаторов, продуцируемых клетками микроорганизмов (определяющая характеристика ассимиляции углеводов!!!).

2. Сорбция эмульгированных частиц н-алканов (простая диффузия) и перемещение через клеточную мембрану по механизму активного транспорта за счет образования комплексов с липополисахаридами клеточной мембраны по специальным каналам;

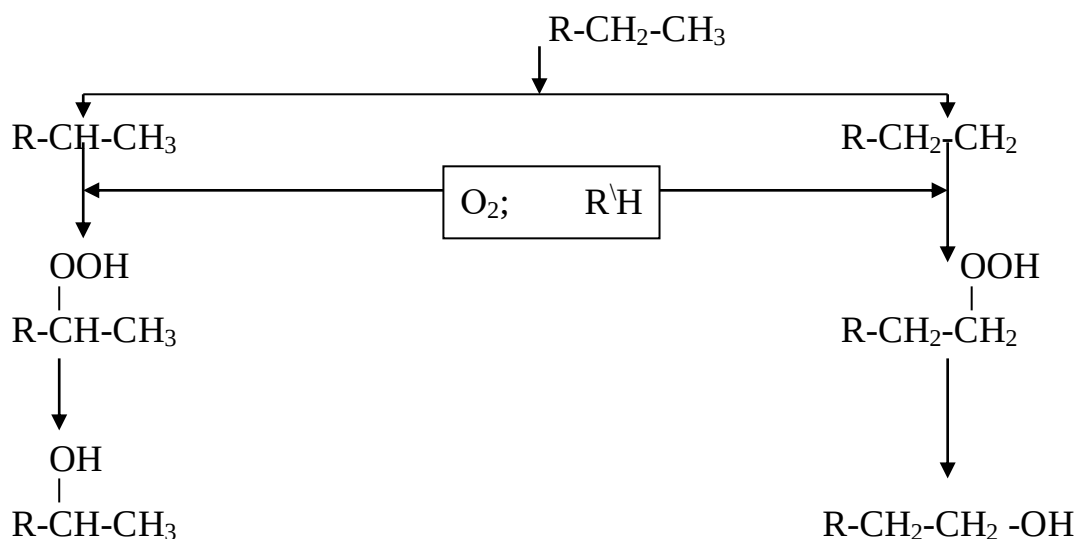
3. Окисление н-алканов в соответствующие жирные кислоты, может осуществляться по трем направлениям:

- **окисление н-алканов моноксигеназной системой переноса электронов**, включающей ФАД-зависимую редуктазу, железосодержащий белок рубредоксин и алкан-1-гидролазу, имеющую активный центр, специфичный к CH_3 -радикалам линейных алканов:

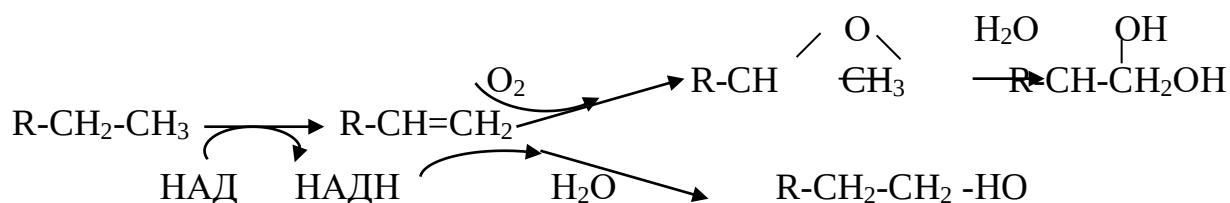


Образовавшийся спирт подвергается окислению до альдегида и далее до соответствующей жирной кислоты;

- **гидропероксидация н-алканов**, включает образование алкилгидроперекисей из свободных радикалов и их восстановление в первичные и вторичные спирты:

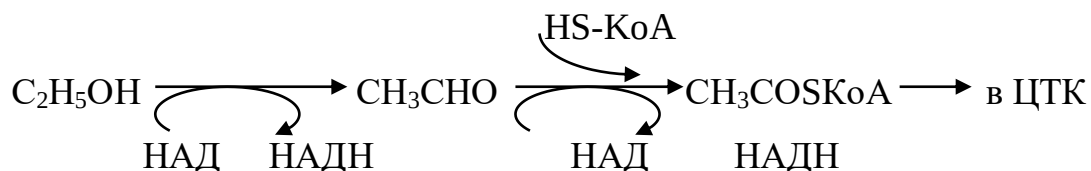


- *дегидрирование алканов в соответствующие алкены:*

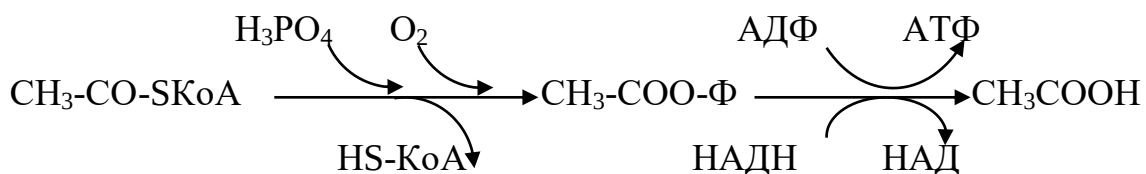


- *каталитическое превращение образовавшихся жирных кислот до ацетил-КоА по механизму β-окисления.*

Блок 2. Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis*, *Hansenula anomala*; уксуснокислые бактерии *Acetobacter oxydans*; *A. aceti* и др. способны ассимилировать этанол. Важной метаболической особенностью микроорганизмов, способных ассимилировать этанол, является наличие специфической митохондриальной алкогольдегидрогеназы, катализирующей окисление этанола в ацетальдегид. Последний под действием альдегиддегидрогеназы трансформируется в ацетил-КоА:



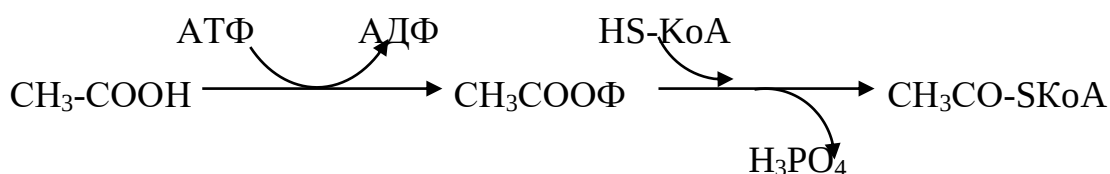
Ацетил-КоА может трансформироваться под действием фосфоацилтрансферазы и ацетилкиназы в уксусную кислоту:



Активность алкогольдегидрогеназы регулируется CH_3CHO и CH_3COOH по механизму «обратной связи».

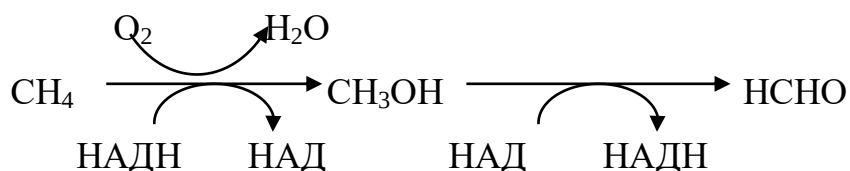
Биохимическое значение данных реакций заключается в том, что в условиях дефицита кислорода клетки могут снизить потребность в молекулярном кислороде за счет экскреции ацетата в питательную среду. При этом, затрачивая 1 моль O_2 на 1 моль этанола, клетка продуцирует 5 моль АТФ.

Данная ферментная система участвует в биохимических реакциях ассимиляции уксусной кислоты:



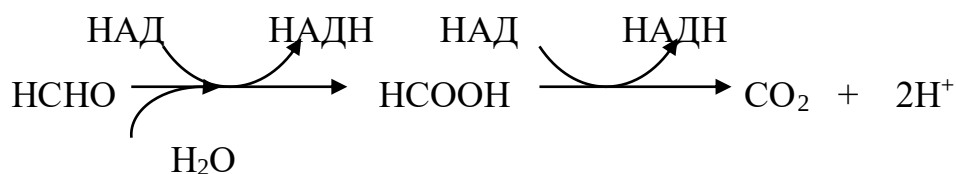
Блок 3. К метилотрофным относят микроорганизмы, использующие в качестве углеродных субстратов метан и метанол.

Окисление метана в метанол осуществляется бактериями *Methylomonas*; *Methylococcus*; *Methylosinus* и катализируется ферментом метанмоно-оксидазой, специфичной к одноуглеродным субстратам, и локализованным в клеточной мембране:



Окисление метанола в формальдегид, помимо вышеперечисленных, осуществляют бактерии *Methylophilus*, некоторые виды *Pseudomonas*. Процесс катализируется ферментом метанолдегидрогеназой, для проявления активности которого необходимо присутствие кофермента – феназинметилсульфата. У метанолутилизирующих дрожжей *Candida boidinii* и *Pichia pinus*, данная реакция катализируется ФАД-зависимой метанол-оксидазой. Оба фермента индуцибельны

в отношении метанола. Завершающей стадией включения метана и метанола в метаболические процессы клетки является окисление формальдегида:

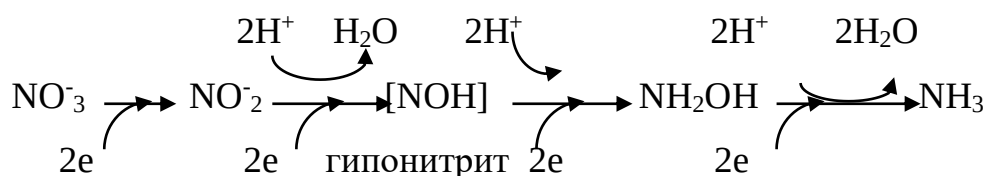


Данный процесс, помимо феназинметасульфатсвязанной метанол-дегидрогеназы, способны катализировать ряд формальдегиддегидрогеназ. Выявлены два основных пути утилизации формальдегида, приводящие к синтезу C₃- и C₄- соединений.

1) Сериновый путь. Предусматривает последовательность реакций конденсации формальдегида, глицина и CO₂ в яблочную кислоту. У метилотрофных микроорганизмов выявлены два варианта данного метаболического пути: с участием изоцитратлиазы («+» - вариант) и без участия данного фермента («-» - вариант). В первом случае цепь превращений катализируется цитратсинтетазой, аконитатгидратазой и изоцитратлиазой; «-» - вариант предусматривает аналогичную последовательность реакций, но без вовлечения ферментов изоцитратлиазы.

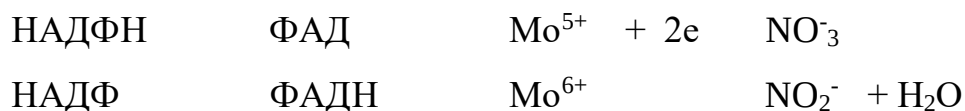
2) Рибулозомонофосфатный путь. Он представляет собой модифицированный вариант пентозофосфатного цикла. Ключевой реакцией является конденсация формальдегида с молекулой рибулозо-5-фосфата.

Блок 4. Азот в питательных средах представлен, как правило, солями, содержащими ион аммония или нитрат-ион. Непосредственно в метаболизм клетки включается ион аммония. Восстановление нитрат-иона до NH₃ осуществляется под действием фермента нитратредуктазы по схеме:

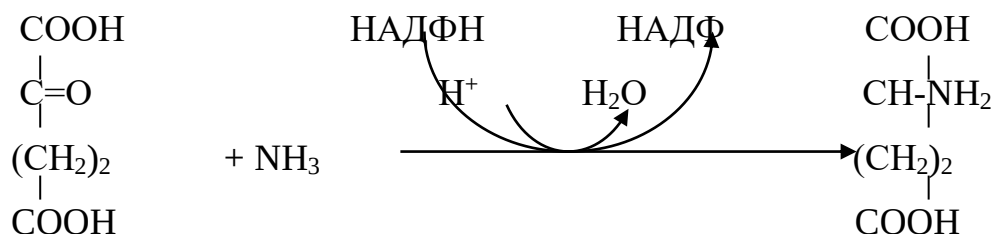


Нитратредуктаза – высокомолекулярный комплекс из двух белков, один из которых – ФАД-зависимый – акцептирует электроны восстановленных молекул

НАДН и НАДФН и переносит их на второй белок, содержащий Мо-порфириновое кольцо:

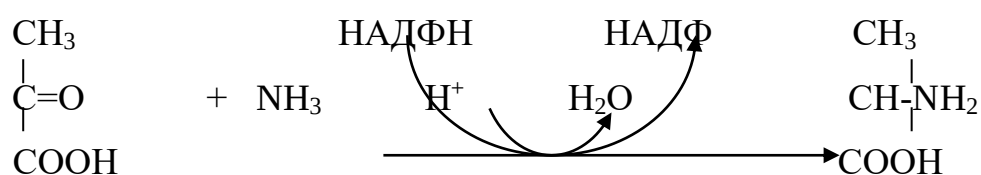


Аммонийный азот, попадая в клетку, включается путем аминирования в органические соединения, образуя соответствующую аминокислоту. Чаще всего аминированию подвергаются ПВК, α -кетоглутаровая, щавелевоуксусная кислоты. Очень важной является реакция аминирования α -КГК под действием аллостерического НАД- или НАДФ-зависимого фермента глутаматдегидрогеназы (НАД- в катаболических процессах; НАДФ – при синтезе аминокислоты).

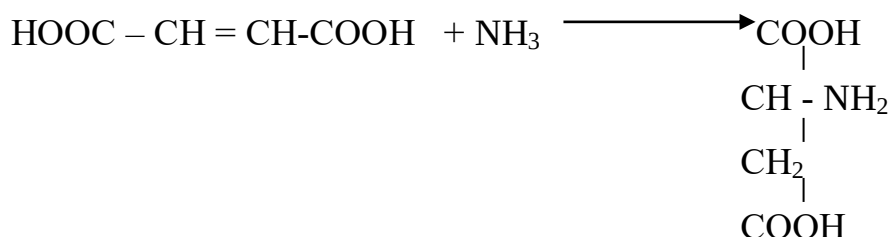


Глутаминовая кислота – промежуточный метаболит при синтезе ряда аминокислот (пролин, аргинин и др.). У ряда микроорганизмов глутаматдегидрогеназа является единственной ферментной системой, осуществляющей включение аммонийного азота в метаболические процессы.

Синтез аланина осуществляется под действием аланиндегидрогеназы:



Аспарагиновая кислота образуется из фумаровой, реакция катализируется аспартат-аммиак-лиазой (аспартазой):



Аспарагиновая кислота – предшественник метионина, пролина, изолейцина.

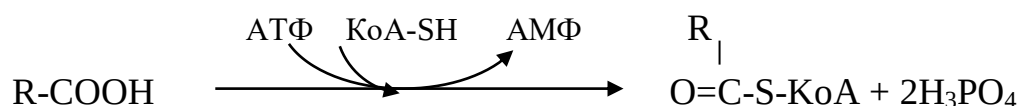
Аминокислоты, поступившие в клетку благодаря активности пермеаз, могут включаться в реакции переаминирования с органическими кислотами (α -КГК, ПВК, ЩУК), катализируемые соответствующими трансаминазами (кофермент – пиродоксальфосфат). Следует учитывать, что диамино-, ароматические и гетероциклические аминокислоты при переаминировании могут давать токсичные для клетки продукты (путресцин и кадаверин).

В тех случаях, когда аминокислоты не способны транспортироваться в клетку в виду отсутствия необходимых пермеаз, осуществляется их расщепление внеклеточными дегидрогеназами до NH_3 и органических кислот и отдельный транспорт. Этот механизм позволяет создавать микроорганизмам необходимую буферную систему в среде.

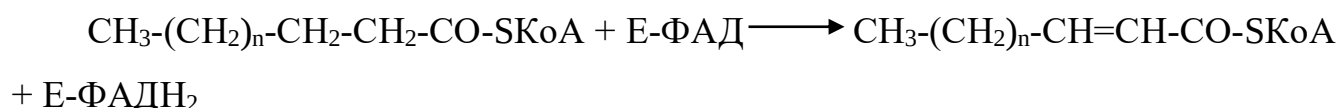
Блок 5. Наиболее распространенным механизмом ассимиляции жирных кислот микроорганизмами является β -окисление, заключающееся в последовательном отщеплении двух углеродных атомов.

На первой стадии осуществляется образование ацетилКоА-производных жирных кислот, катализируемое тиокиназами жирных кислот. Выделены три группы специфичных тиокиназ, активирующих ацилирование:

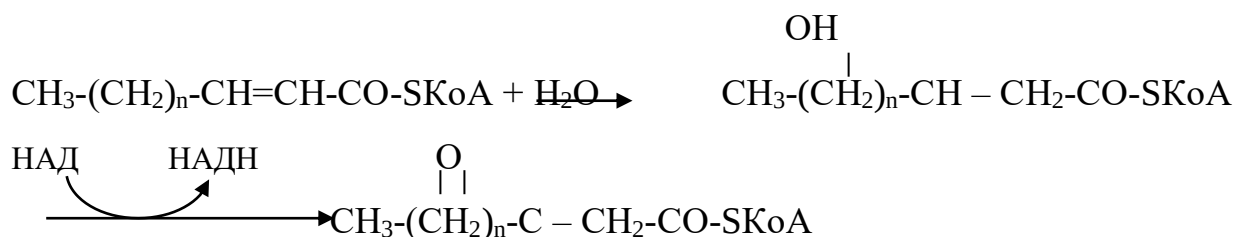
- короткоцепочных кислот (уксусной, пропионовой, акриловой);
- среднецепочных кислот $\text{C}_4 - \text{C}_{12}$;
- длинноцепочных $\text{C}_{12} - \text{C}_{22}$, в отдельных случаях и более 22 углеродных атомов.



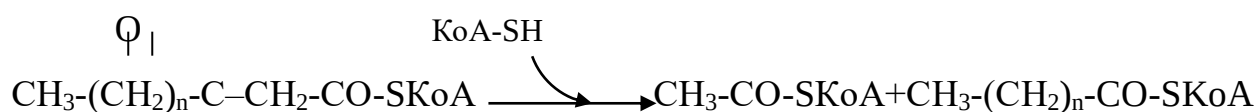
Следующим этапом является дегидрирование с образованием КоА-эфира ненасыщенной кислоты, протекающее под действием ФАД-содержащих ацил-КоА-дегидрогеназ (выделено 4 дегидрогеназы, специфичные к жирным кислотам с различной длиной углеродной цепи):



Флавопротеин передает электроны в дыхательную цепь. Далее происходит гидратация под действием еноил-гидратазы и дегидрирование, катализируемое НАД-зависимой 3-оксиацил-КоА-дегидрогеназы:



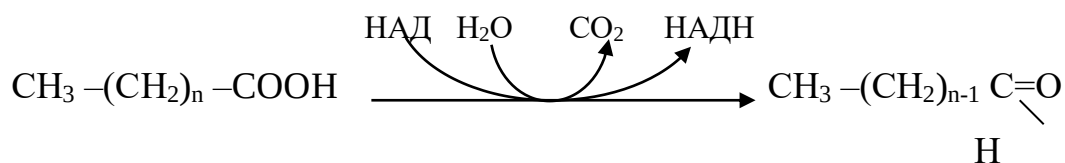
Последняя стадия катализируется 3-кетоацил тиолазой:



После включения ацетильного радикала в ЦТК КоА освобождается и может выполнять каталитические функции.

Механизм окисления жирных ненасыщенных кислот аналогичен. Проблема заключается в том, что двойные связи природных ненасыщенных кислот имеют цис-конфигурацию, в отличие от промежуточных продуктов β -окисления, имеющих транс-конфигурацию. Кроме того, последовательное укорачивание цепи часто приводит к образованию двойной связи в положении 3-4, гидратацию которой еноил-гидратаза не может осуществлять. В этом случае осуществляется реакция перемещения двойной связи от 3-го ко 2-му атому углерода, сопряженная с изменением конфигурации двойной связи. Реакцию катализирует 3,4-цис-2,3-транс-еноил-КоА-изомераза. Полиненасыщенные жирные кислоты одновременно подвергаются гидрированию под действием данного фермента.

Высокомолекулярные жирные кислоты (C_{14} - C_{18}) у некоторых микроорганизмов могут подвергаться α -окислению, заключающемуся в последовательном декарбоксилировании кислоты с образованием альдегида:



Альдегид под действием НАД-зависимой дегидрогеназы окисляется с образованием соответствующей кислоты.

Биологическая роль процесса заключается в образовании жирных кислот с нечетным числом углеродных атомов, являющихся исходными продуктами многих анаболических реакций.

Блок 6. Взаимосвязь обмена белков, липидов и углеводов обусловлена образованием следующих ключевых продуктов катаболизма: фосфоглицериновая кислота; ПВК; ацетил-КоА; ЦУК; α -КГК; шикимовая кислота (рисунок 1).

Блок 7. Отчет о работе должен включать:

- титульный лист;
- цель работы и алгоритм выполнения;
- результаты изучения теоретического материала;
- выводы.

Блок 8. Контрольные вопросы:

- ассимиляция углеводов микроорганизмами;
- схема включения этанола и ацетата в метаболические процессы;
- особенности метаболизма метилотрофных микроорганизмов
- механизмы ассимиляции азотсодержащих соединений;
- схема β - и α -окисления жирных кислот;
- взаимосвязь обмена белков, липидов и углеводов в клетках микроорганизмов.

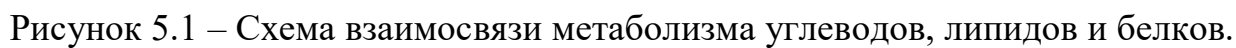


Рисунок 5.1 – Схема взаимосвязи метаболизма углеводов, липидов и белков.

ПРАКТИЧЕСКАЯ РАБОТА № 6

МАТЕРИАЛЬНЫЕ РАСЧЕТЫ НАПРАВЛЕННОГО СИНТЕЗА ЭТАНОЛА

Цель работы: изучить принципы проведения материальных расчетов целевых продуктов бродильных производств; по индивидуальным заданиям разработать принципиальные схемы и произвести материальные расчеты целевых продуктов; проанализировать полученные результаты.

АЛГОРИТМ ПРОВЕДЕНИЯ РАБОТЫ



Блок 1. Материальный расчет необходим для определения объема производства, интенсивности технологических процессов, потребного количества вспомогательных материалов, воды, электроэнергии. С помощью материального расчета по заданному количеству сырья рассчитывают количество полуфабрикатов, полученных на разных стадиях обработки, и отходов производства или, наоборот, по количеству планируемой готовой продукции - потребность в сырье, количество полуфабрикатов и отходов на разных стадиях производственного процесса.

Целевые продукты бродильных производств условно можно разделить на три группы:

- органические кислоты (молочная, уксусная, лимонная, пропионовая);
- этанол и глицерин;
- растворители (ацетон и бутанол).

Следует отметить, что к продукции бродильных производств, традиционно наряду с классическими продуктами анаэробного метаболизма микроорганизмов относят органические кислоты (уксусную и лимонную), синтезируемые продуцентами в аэробных условиях.

Общую схему материального расчета целевых продуктов бродильных производств можно разделить на три этапа. Задачей первого этапа является расчет расхода компонентов питательной среды и количества посевного материала продуцента, необходимого для производственной ферментации. На втором этапе рассчитывают фактический выход целевого продукта в процессе ферментации и его концентрацию в культуральной жидкости, а также, если необходимо, прирост биомассы продуцента. На третьем этапе, используя уравнения стехиометрических зависимостей и материального баланса, определяют выход целевого продукта в процессе его выделения, очистки, концентрирования.

Блок 2. Для выполнения задания студентам необходимо изучить типовую схему расчетов этилового спирта, приведенную в приложении Г.

Блок 3. В соответствии с индивидуальным заданием произвести материальные расчеты целевых продуктов по формулам, приведенным в приложении Д.

Блок 4. Правильность выполнения материальных расчетов проверить путем составления материального баланса. Материальный баланс расчета продуктов бродильных производств в общем виде можно выразить уравнением:

$$M_{\text{п.с.}} + M_{\text{п.м.}} + M_{\text{в.м.}} = M_{\text{ц.п.}} + M_{\text{п.п.}} + M_{\text{в.к.}} \quad (6.1)$$

где $M_{\text{п.с.}}$, $M_{\text{п.м.}}$, $M_{\text{в.м.}}$, $M_{\text{ц.п.}}$, $M_{\text{п.п.}}$, $M_{\text{в.к.}}$ – массы соответственно питательной среды; посевного материала продуцента; вспомогательных материалов; целевого продукта; побочных продуктов метаболизма, переработки сырья, выделения и очистки целевого продукта; влаги, испаренной при концентрировании целевого продукта.

Содержание отчета и его форма.

Отчет о работе должен включать:

- титульный лист;

- цель и порядок проведения работы;
- теоретическое обоснование;
- принципиальную схему получения целевого продукта;
- материальный расчет целевого продукта;
- анализ результатов материального расчета;
- выводы.

Контрольные вопросы и защита работы:

- принципы проведения материальных расчетов;
- характеристика и последовательность выполнения расчетов продуктов бродильных производств;
- схема расчетов этилового спирта;
- материальный баланс расчета целевых продуктов бродильных производств и критерии оценки их эффективности.

ПРАКТИЧЕСКАЯ РАБОТА № 7

МАТЕРИАЛЬНЫЕ РАСЧЕТЫ НАПРАВЛЕННОГО СИНТЕЗА ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ

Цель работы: изучить принципы проведения материальных расчетов органических кислот; по индивидуальным заданиям разработать принципиальные схемы и произвести материальные расчеты целевых продуктов; проанализировать полученные результаты.

АЛГОРИТМ ПРОВЕДЕНИЯ РАБОТЫ



Блок 1. В зависимости от конечных продуктов выделяют следующие типы бродильных процессов:

- гомоферментативное и гетероферментативное молочнокислое брожение (*Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Leuconostoc lactis*);
- спиртовое брожение (*Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces vini*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces fragilis*, *Candida utilis*, *Zymomonas mobilis*);
- уксусно-пропионовокислое брожение (*Propionibacterium shermanii*, *Propionibacterium pentosaceum*, *Propionibacterium freudenreichii*);
- ацетоно-бутиловое брожение (*Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium butylicum*);
- маслянокислое брожение (*Clostridium butyricum*);

- метановое брожение (*Methanobacterium*, *Methanococcus*).

Блок 2. Для выполнения задания студентам необходимо изучить типовые схемы расчетов молочной, уксусной и лимонной кислот, приведенные в приложении Е.

Блок 3. В соответствии с индивидуальным заданием произвести материальные расчеты целевых продуктов по формулам, приведенным в приложении Ж.

Блок 4. Правильность выполнения материальных расчетов проверить путем составления материального баланса. Для оценки эффективности производства целевых продуктов рассчитать следующие показатели:

- расход сырья на 1 тонну целевого продукта;
- выход целевого продукта из 1 тонны сырья;
- расход биомассы продуцента на 1 тонну целевого продукта.

Содержание отчета и его форма.

Отчет о работе должен включать:

- титульный лист;
- цель и порядок проведения работы;
- теоретическое обоснование;
- принципиальную схему получения целевого продукта;
- материальный расчет целевого продукта;
- анализ результатов материального расчета;
- выводы.

Контрольные вопросы и защита работы:

- принципы проведения материальных расчетов;
- схемы расчетов органических кислот;
- материальные балансы расчета органических кислот и критерии оценки их эффективности.

ПРАКТИЧЕСКАЯ РАБОТА № 8

МАТЕРИАЛЬНЫЕ РАСЧЕТЫ НАПРАВЛЕННОГО СИНТЕЗА ЛИЗИНА

Цель работы: изучить принципы проведения материальных расчетов целевых продуктов по нормативным рецептурам на примере концентратов лизина; по индивидуальным заданиям разработать принципиальные схемы и произвести материальные расчеты целевых продуктов; проанализировать полученные результаты.

АЛГОРИТМ ПРОВЕДЕНИЯ РАБОТЫ



Блок 1. При производстве бактериальных препаратов и ряда целевых продуктов метаболизма микроорганизмов (аминокислоты, витамины, антибиотики и др.) для производственного культивирования продуцентов используют многокомпонентные питательные среды. В этом случае материальный расчет целевого продукта предусматривает определение расхода компонентов питательной среды в соответствии с рецептурами, которые приводятся в нормативной документации. Рецептuru составляется, как правило, на 1 тонну питательной среды с учетом или без учета потерь.

При использовании многокомпонентных (синтетических) сред, в состав которых входят препараты углеводов или их заменители (свеклосахарная меласса, гидрол), растворы питательных солей, ростовые факторы и комплексные

обогащители, уравнение материального баланса процесса приготовления среды будет иметь вид:

$$M_{\text{ПС}} + M_{\text{П}} = M_{\text{УГ}} + M_{\text{С}} + M_{\text{РФ}} + M_{\text{В}} \quad (1)$$

где $M_{\text{ПС}}$ – масса производственной ферментационной среды;

$M_{\text{П}}$ – масса потерь;

$M_{\text{УГ}}$ – масса источников углерода;

$M_{\text{С}}$ – масса питательных солей;

$M_{\text{РФ}}$ – масса препаратов ростовых факторов и комплексных обогащителей;

$M_{\text{В}}$ – масса воды, используемой для приготовления питательной среды или растворов отдельных компонентов среды (углеводов, минеральных солей, аминокислот и др.).

В некоторых биотехнологических производствах нашли применение так называемые среды сложного состава на основе жидких видов сырья (молочной сыворотки, спиртовой барды, концентратов жидких парафинов, уксусной кислоты), обогащенных необходимыми для эффективного роста продуцента и биосинтеза целевых продуктов компонентами. В данном случае в рецептуре целесообразно учитывать не расход всех ингредиентов на единицу массы или объема готовой питательной среды, а количество компонентов вносимых на 1 тонну основного сырья. Уравнение материального баланса процесса приготовления среды будет иметь вид:

$$M_{\text{ПС}} + M_{\text{П}} = M_{\text{С}} + M_{\text{К}} \quad (2)$$

где $M_{\text{С}}$ – масса основного сырья;

$M_{\text{К}}$ – масса вносимых в основное сырье для приготовления питательной среды компонентов.

Технология производства ряда продуктов предусматривает использование на стадиях предварительной и главной ферментации питательных сред аналогичного состава. В этом случае необходимо провести расчет расхода компонентов среды на всех стадиях культивирования продуцента.

Блок 2. Расчет концентрата кормового лизина.

Масса свеклосахарной мелассы, поступающей на переработку: $M_{\text{мел.}}$

С учетом посевной дозы для производственной ферментации можно принять массу мелассы, используемой для приготовления питательной среды для размножения посевной культуры продуцента *Corynebacterium glutamicum*, равной 20 % от общей массы перерабатываемой мелассы. Зная расход мелассы на приготовление питательной среды для предварительной и производственной ферментации, можно провести расчет компонентов питательной среды по рецептуре (таблица 5.1).

Таблица 5.1 – Рецептура питательной среды для культивирования продуцента лизина.

Наименование компонентов	Обозначение	Доза внесения, %	Расход компонентов		
			на главную ферментацию, кг	на предферментацию, кг	общий расход, кг
Меласса	$M_{\text{мел.}}$	12,0			
Кукурузный экстракт	$M_{\text{к.эк.}}$	1,5			
Сульфат аммония	$M_{\text{с.ам.}}$	2,0			
Калия фосфат	$M_{\text{к.ф.}}$	0,1			
Мел	$M_{\text{мел}}$	1,0			
Пенегаситель	$M_{\text{пн.}}$	0,1			
Вода	$M_{\text{в.}}$	83,3			
ИТОГО	$M_{\text{п.с.}}$	100,0			

Масса культуральной жидкости:

$$M_{\text{к.ж.}} = M_{\text{п.с.}} + M_{\text{п.м.}} + M_{\text{п.б.}}$$

где $M_{\text{п.м.}}$ – масса посевного материала;

$M_{\text{п.б.}}$ – масса прироста биомассы коринебактерий (из расчета 5-7 г/л питательной среды).

Масса посевного материала:

$$M_{\text{п.м.}} = M_{\text{п.с.1}} + M_{\text{п.к.}} + M_{\text{п.б.1}}$$

где $M_{\text{п.с.1}}$ – масса питательной среды для предварительной ферментации;

$M_{\text{п.к.}}$ – масса посевной культуры для предварительной ферментации;

$M_{п.б.}$ - масса прироста биомассы коринебактерий на стадии предферментации (из расчета 5-7 г/л питательной среды).

Масса посевной культуры:

$$M_{п.к.} = 0,01 * K_{п.к.} * M_{п.с.1}$$

где $K_{п.к.}$ – посевная доза (20 % от массы питательной среды).

Массовая доля сухих веществ питательной среды:

$$CB_{п.с.} = (M_{мел} * CB_{мел} + M_{к.эк.} * CB_{к.эк.} + (M_{с.ам.} + M_{к.ф.} + M_{мел} + M_{пн.}) * 100 / M_{п.с.}$$

где $CB_{мел}$ – массовая доля сухих веществ мелассы (60 %);

$CB_{к.эк.}$ – массовая доля сухих веществ кукурузного экстракта (50 %).

Массовая доля сухих веществ посевного материала:

$$CB_{п.м.} = (M_{п.с.1} * CB_{п.с.} + M_{п.к.} * CB_{п.к.} + M_{п.б.1} * 100) / M_{п.м.}$$

где $CB_{п.к.}$ – массовая доля сухих веществ посевной культуры для предварительной ферментации (10 %).

Масса культуральной жидкости после стабилизации:

$$M_{к.ж.1} = M_{к.ж} + M_{г.ам.}$$

где $M_{г.ам.}$ – масса гидросульфита аммония (25 %-й раствор).

Масса гидросульфита аммония:

$$M_{г.ам.} = 0,01 * K_{г.ам.} * M_{к.ж}$$

где $K_{г.ам.}$ – доза внесения гидросульфита аммония (0,4 % от массы культуральной жидкости).

Массовая доля сухих веществ культуральной жидкости перед сгущением:

$$CB_{к.ж.} = (M_{п.с.} * CB_{п.с.} + M_{п.м.} * CB_{п.м.} + M_{п.б.} * 100 + M_{г.ам.} * 25) / M_{к.ж.1}$$

Масса культуральной жидкости с учетом потерь при сгущении ($P_{сг} = 4,5$ %):

$$M_{к.ж.теор.} = M_{к.ж.1} * (100 - P_{сг.}) / 100.$$

Масса потерь культуральной жидкости при сгущении:

$$M_{п.сг.} = M_{к.ж.1} - M_{к.ж.теор.}$$

Масса жидкого концентрата лизина:

$$M_{\text{ж.к.л.}} = M_{\text{к.ж.теор.}} * \text{СВ}_{\text{к.ж.}} / \text{СВ}_{\text{ж.к.л.}}$$

где $\text{СВ}_{\text{ж.к.л.}}$ – массовая доля сухих веществ сгущенной культуральной жидкости (40 %).

Масса влаги, испаренной при сгущении:

$$V_{\text{сг.}} = M_{\text{к.ж.теор.}} - M_{\text{ж.к.л.}}$$

Масса жидкого концентрата лизина с учетом потерь при сушке ($P_c = 5,0\%$):

$$M_{\text{ж.к.л.1}} = M_{\text{ж.к.л.}} * (100 - P_c) / 100.$$

Потери концентрата при сушке:

$$M_{\text{п.с.}} = M_{\text{ж.к.л.}} - M_{\text{ж.к.л.1}}$$

Масса концентрата кормового лизина:

$$M_{\text{к.к.л.}} = M_{\text{ж.к.л.1}} * \text{СВ}_{\text{ж.к.л.}} / \text{СВ}_{\text{к.к.л.}}$$

где $\text{СВ}_{\text{к.к.л.}}$ – массовая доля сухих веществ концентрата кормового лизина (96 %).

Блок 3. В соответствии с индивидуальным заданием произвести материальные расчеты целевых продуктов по формулам, приведенным в приложении 3.

Блок 4. Правильность выполнения материальных расчетов проверить путем составления материального баланса. Для оценки эффективности производства целевых продуктов рассчитать следующие показатели:

- расход сырья на 1 тонну целевого продукта;
- выход целевого продукта из 1 тонну сырья;
- расход биомассы продуцента на 1 тонну целевого продукта.

Содержание отчета и его форма.

Отчет о работе должен включать:

- титульный лист;
- цель и порядок проведения работы;
- теоретическое обоснование;
- принципиальную схему получения целевого продукта;

- материальный расчет целевого продукта;
- анализ результатов материального расчета;
- выводы.

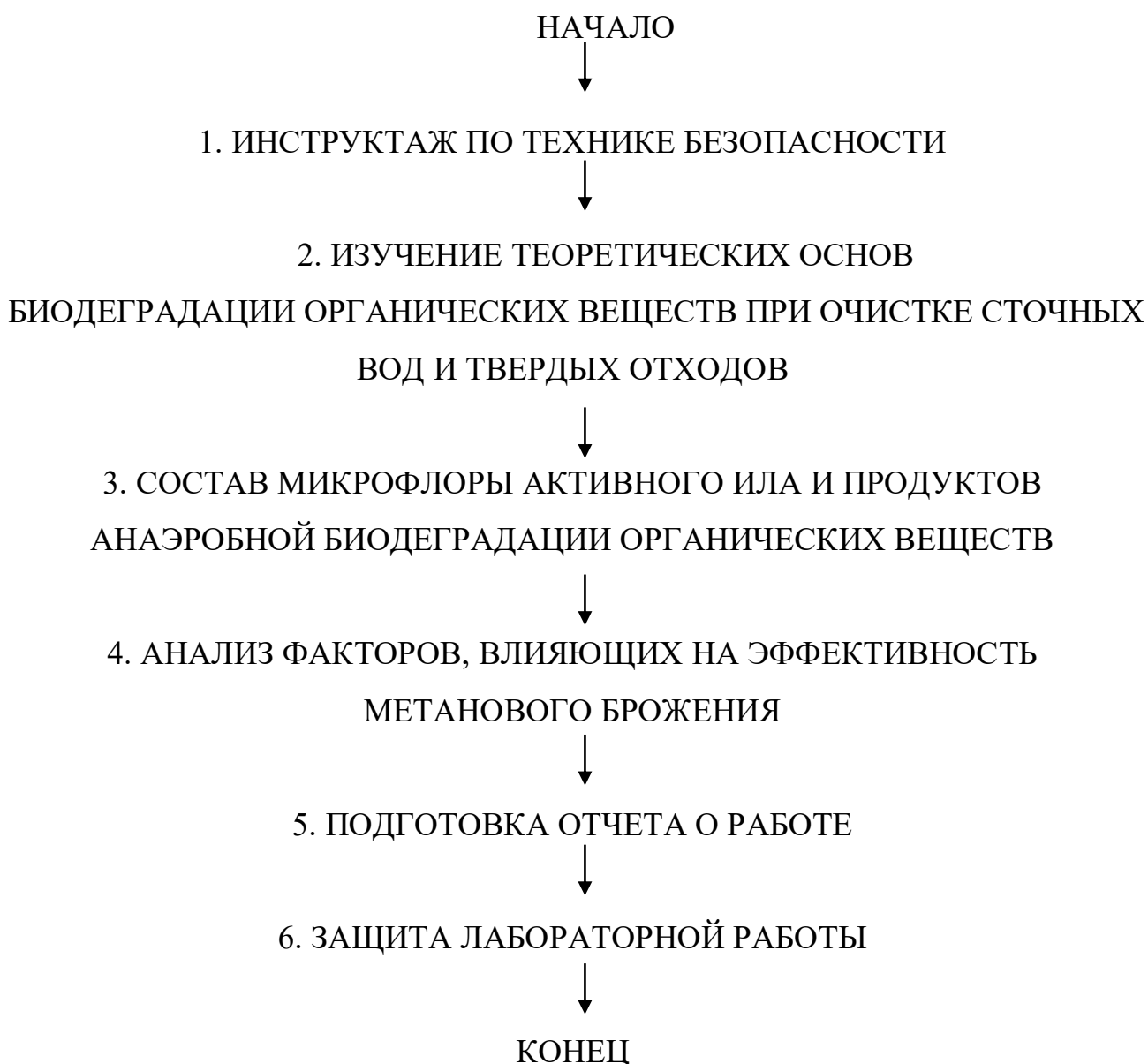
Контрольные вопросы и защита работы:

- принципы проведения материальных расчетов целевых продуктов по рецептурам;
- материальные балансы при составлении синтетических питательных сред и сред сложного состава;
- схема материального расчета концентрата кормового лизина.

ПРАКТИЧЕСКАЯ РАБОТА № 9
ИЗУЧЕНИЕ ЗАКОНОМЕРНОСТЕЙ СИНТЕЗА
ПРОДУКТОВ МЕТАНОВОГО БРОЖЕНИЯ

Цель работы: изучить теоретические основы биodeградации органических веществ при очистке сточных вод и твердых отходов; рассмотреть состав микрофлоры активного ила и продуктов анаэробной биodeградации органических веществ; проанализировать факторы, влияющие на эффективность метанового брожения.

АЛГОРИТМ ПРОВЕДЕНИЯ РАБОТЫ



Блок 1. Студенты могут быть допущены к работе только после ознакомления с правилами техники безопасности. Знание студентами правил техники безопасности преподаватель проверяет и фиксирует в журнале. При выполнении анализов нужно быть внимательным, соблюдать осторожность, все

операции проводить аккуратно, без спешки, в рабочем халате. Категорически запрещается принимать пищу за лабораторным столом и пробовать на вкус химические вещества.

Блок 2. Процессы биodeградации органических веществ под действием микрофлоры составляют основу биотехнологической очистки сточных вод и утилизации твердых отходов. Для этих целей нашли применение две группы процессов: анаэробные и аэробные. При выборе между аэробными и анаэробными процессами в ряде случаев предпочтение отдают первым, так как они характеризуются большей скоростью утилизации органических субстратов и компактностью промышленных установок. В то же время, анаэробные системы очистки сточных вод и твердых отходов имеют ряд преимуществ:

- в анаэробных процессах используется меньшее количество активного ила (0,1-0,2 кг АСБ/ кг субстрата), чем в аэробных (1,0-1,5 кг АСБ/ кг субстрата);
- одним из основных продуктов анаэробной биodeградации органических веществ является метан, который может быть использован в качестве топлива;
- потребность в энергии на аэрацию в промышленных системах аэробной очистки (окситенках) больше, чем потребность в энергию на перемешивание в анаэробных аппаратах (метантенках).

Биodeградация органических веществ в анаэробных системах очистки сточных вод протекает в три фазы.

1) Гидролитическая фаза – около 76 % органических веществ переходит в короткоцепочные жирные кислоты, до 20 % - в уксусную кислоту и 4 % в водород. Данная фаза включает гидролиз сложных органических веществ и синтез органических кислот (ацидогенез).

2) Фаза разложения жирных кислот до уксусной кислоты (52 %), водорода (24 %) и CO_2 (24 %).

3) Фаза метанового брожения – из уксусной кислоты образуется 72 % метана, из водорода и CO_2 - 28 %.

Микрофлора активного ила представляет собой симбиотическое сообщество, благодаря тому что оно может менять используемые им пути ферментации, функционирует как саморегулирующаяся система, поддерживающая значения pH, окислительно-восстановительного потенциала и термодинамическое равновесие оптимальным для роста всех культур образом. По своим пищевым потребностям эти бактерии могут быть разделены на три обширные группы.

Первая включает гидролитические бактерии, обычно называемые ацидогенными, так как они обеспечивают начальный гидролиз субстрата до низкомолекулярных органических кислот и других малых молекул. Вторая группа представляет собой гетероацетогенные бактерии, которые продуцируют уксусную

кислоту и водород, а третья – это метаногенные бактерии, которые продуцируют метан. Эта группа может быть подразделена на потребителей водорода (литотрофы) и уксусной кислоты (ацетотрофы).

Схема биodeградации органических веществ микрофлорой активного ила приведена на рисунке 11.1.

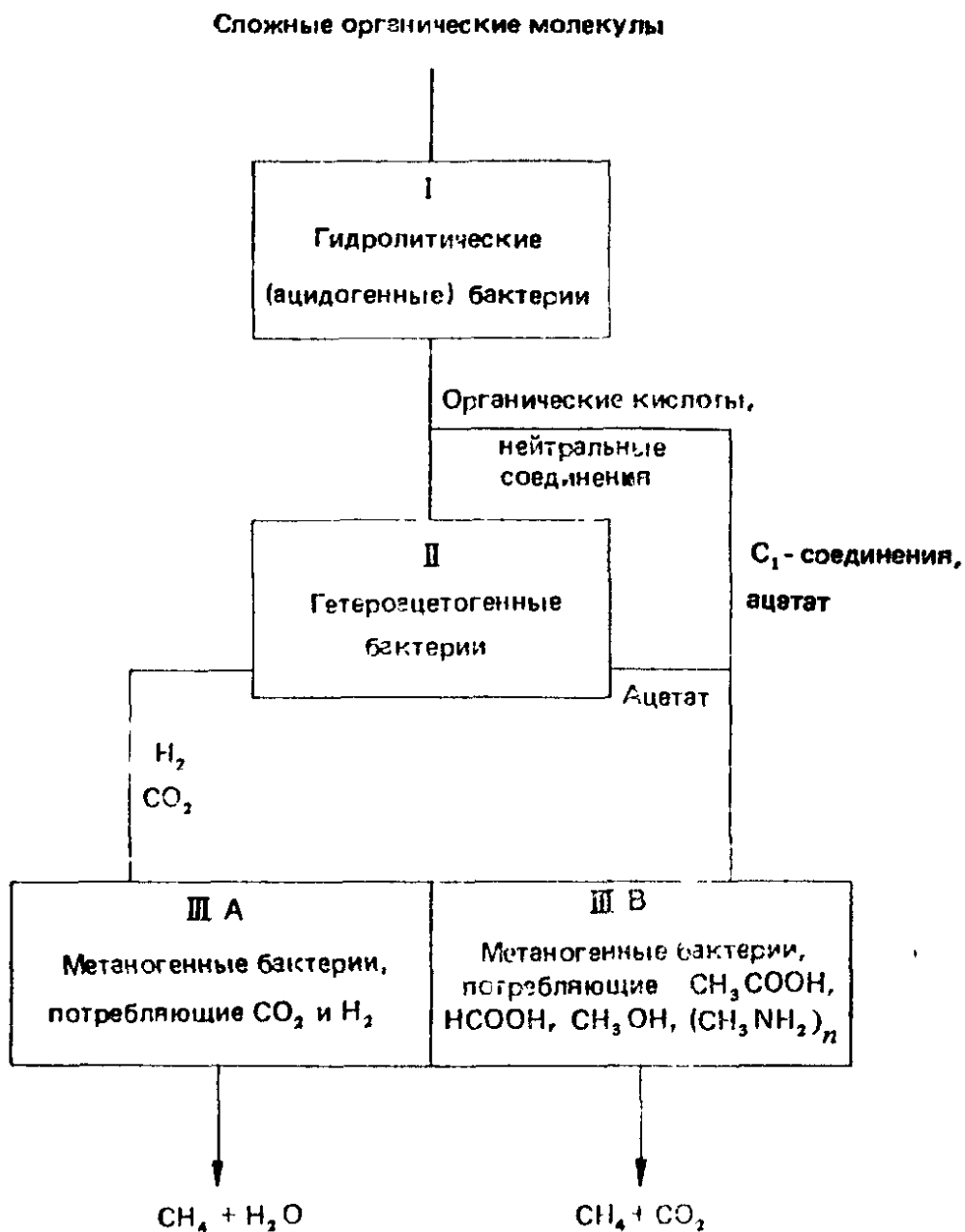


Рисунок 11. 1 – Схема биodeградации органических веществ при метановом брожении

Блок 3. *Первая функциональная группа* бактерий гидролизует макромолекулы до растворимых продуктов, которые могут быть в свою очередь превращены в низкомолекулярные органические соединения. Члены этой группы могут быть как облигатными, так и факультативными анаэробами. В составе

данной группы идентифицированы представители различных родов, включая спорулирующие и неспорулирующие грамположительные палочки, такие как протеолитические *Eubacterium*, целлюлолитические *Clostridium*, *Acetobacterium*, облигатные анаэробы, такие как *Bacteroides* и *Bifidobacteria* и факультативные анаэробы *Streptococcus* и *Enterobacteriaceae*, а также грамположительные кокки. Грамположительные кокки представлены микроорганизмами родов *Peptostreptococcus*, *Eubacterium*, *Bacteroides*, *Lactobacillus*, *Peptococcus*, *Clostridium*, *Streptococcus*.

Гидролитические бактерии используют ряд экзоферментов, таких как протеазы, липазы, амилазы, целлюлазы и пектиназы. Ниже приведены некоторые продукты анаэробного сбраживания органических соединений, синтезируемые перечисленными микроорганизмами:

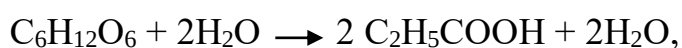
- органические кислоты — уксусная, пропионовая, масляная, капроновая, муравьиная, молочная, янтарная;
- спирты и кетоны — метанол, этанол, изопропанол, бутанол, глицерин, ацетон);
- газы — водород, метан, диоксид углерода;
- ферменты — целлюлаза, алкогольдегидрогеназа;
- витамины — рибофлавин, витамин В₁₂.

Продукты брожения могут меняться в зависимости от вида и штамма бактерий, состава и количества питательных веществ, параметров культивирования (рН, температура и редокс-потенциал).

Важным фактором при гетероацидогенном процессе является концентрация водородных ионов. В случае резкого возрастания концентрации водорода микроорганизмы выбирают альтернативный метаболический путь для того, чтобы, используя более восстановленные соединения, удалять водород и, следовательно, управлять его концентрацией. Например, при нормальном образовании уксусной кислоты из глюкозы получается 4 моль газообразного водорода и 2 моль уксусной кислоты на 1 моль субстрата:



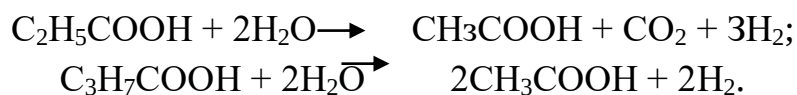
В случае резкого увеличения расхода или концентрации субстрата в сбраживателе микробная популяция немедленно на это реагирует, образуя избыточные количества водорода и уксусной кислоты, снижая уровень E_n и рН. Ацидогенные бактерии используют управляющие обратные связи и выбирают альтернативные метаболические пути, такие, как образование пропионовой и масляной кислот, что помогает восстанавливать стабильность работы метантенка:



Эти процессы объясняют накопление в среде длинноцепочных (длина цепи более 4 атомов углерода) жирных кислот, которые выполняют функции накопления и расходования водорода.

Вторая функциональная группа бактерий. Ацетогенные бактерии подразделяют на гомоацетогенные и гетероацетогенные, такие как *Acetobactenum woodi*, в отдельную четвертую группу, но в этой работе они включены в группу ацидогенных бактерий (I группа).

Гетероацетогенные бактерии представлены в составе активного ила в основном микроорганизмами родов *Synithrobacter* и *Synthrophomonas*. Именно эти бактерии разлагают жирные кислоты (пропионовую и масляную), некоторые спирты а также совместно с метаногенными бактериями ароматические соединения (бензойную кислоту). Конверсия пропионовой и масляной кислот протекает так:



Низкое парциальное давление водорода, необходимое для биоконверсии жирных кислот гетероацетогенными бактериями, объясняет, почему они успешно растут только при совместном культивировании с утилизирующими водород меганогенными бактериями. Таким образом, симбиоз и межвидовой перенос водорода усиливает рост обеих трофических групп.

Третья группа микроорганизмов. В нее входят представители родов *Methanobacterium*, *Methanospirillum*, *Methanococcus*, *Methanosarcina* и *Methanothrix*. Данная группа представлена хемолитотрофными бактериями (подгруппа IIIA) и хемоорганотрофными бактериями (подгруппа IIIB) относятся. Хемолитотрофы превращают водород и диоксид углерода в метан, используя газообразный водород как донор электронов, в том числе водород, полученный из воды:



В результате этой реакции также происходит превращение одной молекулы АДФ в АТФ.

Микроорганизмы подгруппы IIIB известны как перерабатывающие уксусную и муравьиную кислоту, метанол и метиламины в метан. Уравнение конверсии уксусной кислоты выглядит так:



Эта реакция дает только 0,25 моль АТФ и поэтому термодинамически относительно невыгодна.

Блок 4. Эффективность утилизации органических веществ и выход конечных продуктов метанового брожения зависят от полноты проявления синергических эффектов между различными функциональными группами

микрофлоры активного ила. Синергизм между ацидогенными, гетероацетогенными и метаногенными бактериями, а также их физиологическая активность связаны с физико-химическими факторами внешней среды, состава и концентрации утилизируемых органических субстратов, промежуточных и конечных продуктов брожения, наличия в среде активаторов или ингибиторов роста групп или отдельных видов бактерий.

Температура ферментации. Сбраживатели могут работать при психрофильных ($< 20^{\circ}\text{C}$), мезофильных ($20-45^{\circ}\text{C}$) или термофильных ($50-65^{\circ}\text{C}$) условиях. Термофильные сбраживатели имеют высокие скорости реакции, но увеличение скорости утилизации субстратов и выхода целевых продуктов в ряде случаев не сопоставимы с дополнительными затратами тепловой энергии. К тому же в этих условиях существует мало разновидностей, которые могут влиять на способность системы адаптироваться к различным субстратам или ингибирующим соединениям.

Поэтому большинство установок в настоящее время работает в температурном интервале $34-38^{\circ}\text{C}$, что экономически выгодно и к тому же допускает существование большего числа видов микроорганизмов.

pH среды. Кислотообразующие бактерии, как правило, ацидофильны. Метаногенные виды хорошо растут в нейтральной среде, хотя встречаются и экстремальные ацидофилы. Большинство мезофильных бактерий не растут при pH ниже 5,5. В связи с этим оптимальный интервал значений pH для роста микрофлоры активного ила составляет 5,5-8,0.

Значение pH оказывает влияние на состав продуктов метанового брожения. Теоретически, если весь диоксид углерода образуется при разложении уксусной кислоты, соотношение метан : CO_2 в биогазе составляет 2,5 : 1. Низкие значения pH в большей степени способствуют восстановлению протона до водорода, чем его восстановлению в метане, в связи с чем его выход снижается. Повышение в среде концентрации ионов щелочных металлов приводит к снижению выхода CO_2 . Повышение pH до значений более 8,0-8,5 неблагоприятно сказывается на выходе метана, так как из системы выводятся значительные количества диоксида углерода, идущего на синтез метана.

Состав микрофлоры активного ила и углеродных субстратов. Концентрация CO_2 в составе биогаза повышается при недостатке метаногенных бактерий, способных к его автотрофной фиксации, и увеличении популяции кислотообразующих бактерий продуцирующих пропионовую кислоту. К увеличению концентрации диоксида углерода приводит сбраживание ацидогенными бактериями крахмала, гексоз и пентоз. Например, при распаде жироподобных веществ образуется биогаз следующего среднего состава: CH_4 – 68 %, CO_2 – 32 %. При утилизации углеводоподобных субстратов соотношение

компонентов биогаза составляет: CH_4 – 50 %, CO_2 – 50 %. Различным является предел сбраживания: жироподобные вещества утилизируются на 70 %, углеводоподобные – на 62,5 %.

Состав и концентрация питательных веществ. Наиболее чувствительной к составу питательной среды является метаногенная микрофлора. Оптимальные для прироста биомассы соотношения составляют: $\text{C} : \text{N} = 5 : 1$, $\text{N} : \text{P} = 5 : 1$.

Факторы, ингибирующие рост бактерий и синтез биогаза. При проведении процессов анаэробной очистки концентрации многих компонентов среды не должны превышать критических значений (мг/дм^3): ацетон – 800, формальдегид – 400, бензол – 200, толуол – 200, амиловый спирт – 100, сульфид-ионы – 600, никель – 250, свинец – 50, медь – 25, хром (III) – 25, хром (VI) – 3.

Блок 5. Отчет о работе должен включать:

- титульный лист;
- цель работы и теоретическое обоснование проводимых исследований;
- алгоритм выполнения работы;
- теоретические основы биodeградации органических веществ при очистке сточных вод и твердых отходов;
- состав микрофлоры активного ила и продуктов анаэробной биodeградации органических веществ;
- факторы, влияющие на эффективность метанового брожения;
- выводы.

Блок 6. Контрольные вопросы:

- преимущества анаэробных систем очистки сточных вод;
- фазы анаэробной очистки сточных вод;
- классификация микроорганизмов, входящих в состав активного ила, и вызываемые ими биохимические процессы;
- физико-химические факторы, влияющие на эффективность утилизации органических веществ и выход конечных продуктов метанового брожения.

ПРАКТИЧЕСКАЯ РАБОТА № 10

ПРИНЦИПЫ МАСШТАБИРОВАНИЯ ПРОЦЕССОВ ФЕРМЕНТАЦИИ. ОСНОВЫ МОДЕЛИРОВАНИЯ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

Цель работы: изучить принципы масштабирования процессов ферментации.
основы моделирования биотехнологических процессов

Принципы масштабирования процессов ферментации.

Масштабирование – это воспроизведение результатов, полученных на оборудовании одного размера (конструкции) при проведении аналогичного процесса в аппаратах другого размера (конструкции). Применительно к биотехнологии масштабирование можно определить как перенесение лабораторных процессов культивирования биообъектов в условиях крупномасштабного биотехнологического производства. Главная задача масштабирования ферментационных процессов – сохранение высокого выхода биомассы или целевых метаболитов при минимальных затратах энергии, субстрата и продолжительности культивирования. Большая часть исследований в данной области связана с масштабированием аэробных ферментаций.

Основными параметрами, обуславливающими масштабные эффекты являются:

1) Число регенераций. Число регенераций, необходимых для достижения конечной концентрации биомассы является функцией объема ферментатора:

$$N_g = 1,44 (\ln V + \ln[X] - \ln[X_0]), \quad (10.1)$$

где V – рабочий объем производственного ферментатора, м³.

2). Режим стерилизации. При увеличении размеров емкостного аппарата для стерилизации площадь его поверхности резко снижается относительно объема, что затрудняет передачу тепла и контроль температуры в аппарате.

3). Режим перемешивания и аэрации среды. Для обеспечения постоянной скорости массопереноса O₂ при условии сохранения специфической скорости утилизации кислорода культурой при увеличении объема аппарата окружающую

скорость мешалки увеличивают на коэффициент, равный $\sqrt[3]{M}$, где M – масштаб диаметра биореактора.

4). Интенсивность переноса тепла в объеме аппарата.

Ферментационные процессы осуществляются при условии поддержания постоянства температуры, что требует поддержания теплового баланса:

$$Q_{\text{мет.}} + Q_{\text{перем.}} - Q_{\text{испар.}} - Q_{\text{теплообм.}} = 0, \quad (10. 2)$$

где: $Q_{\text{мет.}}$ - тепло, затрачиваемое на поддержание метаболизма;

$Q_{\text{перем.}}$ – тепло, затрачиваемое на перемешивание среды;

$Q_{\text{испар}}$ – тепло, отводимое с парами и газами;

$Q_{\text{теплообм.}}$ – тепло, отводимое с тепло- и хладоносителем.

Для удовлетворения этого равенства необходимо поддержание определенной величины $Q_{\text{теплообм.}}$. Поверхность теплообмена между средой и хладоносителем, доступная для удаления тепла из единицы объема жидкости, снижается при увеличении размеров масштабирования, что ограничивает увеличение объема биореактора:

$$A_c = Q_{\text{теплообм.}} / K \cdot \Delta T_{\text{ср}}, \quad (10. 3)$$

Величина коэффициента теплопередачи K при масштабировании снижается, в частности за счет увеличения толщины стенок теплообменных поверхностей.

Масштабирование биотехнологических процессов в общем случае основывается на двух принципах:

1) Масштабирование при обеспечении постоянства потребления энергии на единицу объема биореактора. Для обеспечения данного требования необходимо учитывать зависимость между потреблением энергии (P_g) и параметрами ферментатора:

$$P_g = K (P_i^2 \cdot N \cdot D_i^3 / Q^{0,56})^{0,45}, \quad (10. 4)$$

где: K – константа, зависящая от геометрических размеров аппарата;

P_i - энергия, потребляемая неаэрируемым ферментатором, Дж;

Q – скорость аэрации, $\text{м}^3/\text{м}^3 \cdot \text{мин}$;

D_i – диаметр мешалки, м;

N – скорость вращения мешалки, мин^{-1} .

2) Масштабирование при условии сохранения постоянной (по сравнению с лабораторными условиями) скорости переноса O_2 (только для аэробных ферментаций).

Реализация принципа основана на создании условий, обеспечивающих поддержание постоянного значения коэффициента диффузии кислорода K_{LO_2} .

Основы моделирования биотехнологических процессов.

Рост и развитие микроорганизмов в биореакторе происходят в результате взаимодействия разнообразных явлений биохимической, химической и физической природы. Обобщенно указанные процессы учитываются кинетическими и стехиометрическими зависимостями, отражающими скорость процессов утилизации субстрата, образования биомассы и количественные соотношения перехода компонентов субстрата в биомассу и метаболиты клеток. Однако данные процессы составляют только часть процессов, протекающих в биореакторе и относящихся к так называемому микроуровню описания его работы.

На рост клеток влияют факторы, связанные с эффективностью транспорта питательного субстрата к клеткам, условиями перемешивания, отводом и подводом тепла, газообменом в аппарате. Данные факторы относятся к макроуровню описания процессов культивирования и определяются конструктивными особенностями биореактора, характером и способом подвода внешней энергии, принципом аэрации и перемешивания среды.

В связи с этим, общую схему расчета процессов культивирования можно представить в виде многоуровневой системы (рисунок 10. 1). На каждом уровне системы исследуются и количественно описываются процессы одной физической природы. Количественные закономерности или математические модели каждого уровня формируют общую модель процессов культивирования.

Обобщенная схема расчета процессов культивирования в большинстве случаев основывается на применении численных методов и применении ЭВМ, поскольку в аналитическом виде практически невозможно получить выражение, включающее зависимости для всех рассмотренных блоков. В то же время, на

практике широко применяется расчет процесса культивирования, соответствующий одному или двум уровням.



Рисунок 10. 1 – Общая схема расчета процессов культивирования.

В качестве оценочных технологических расчетов возможно применение схем вида:

Кинетический + стехиометрический расчет $\longrightarrow$ технологические показатели;

Кинетический + массообменный расчет $\longrightarrow$ технологические и ТЭП;

Кинетический + теплообменный расчет $\longrightarrow$ технологические и теплоэнергетические показатели;

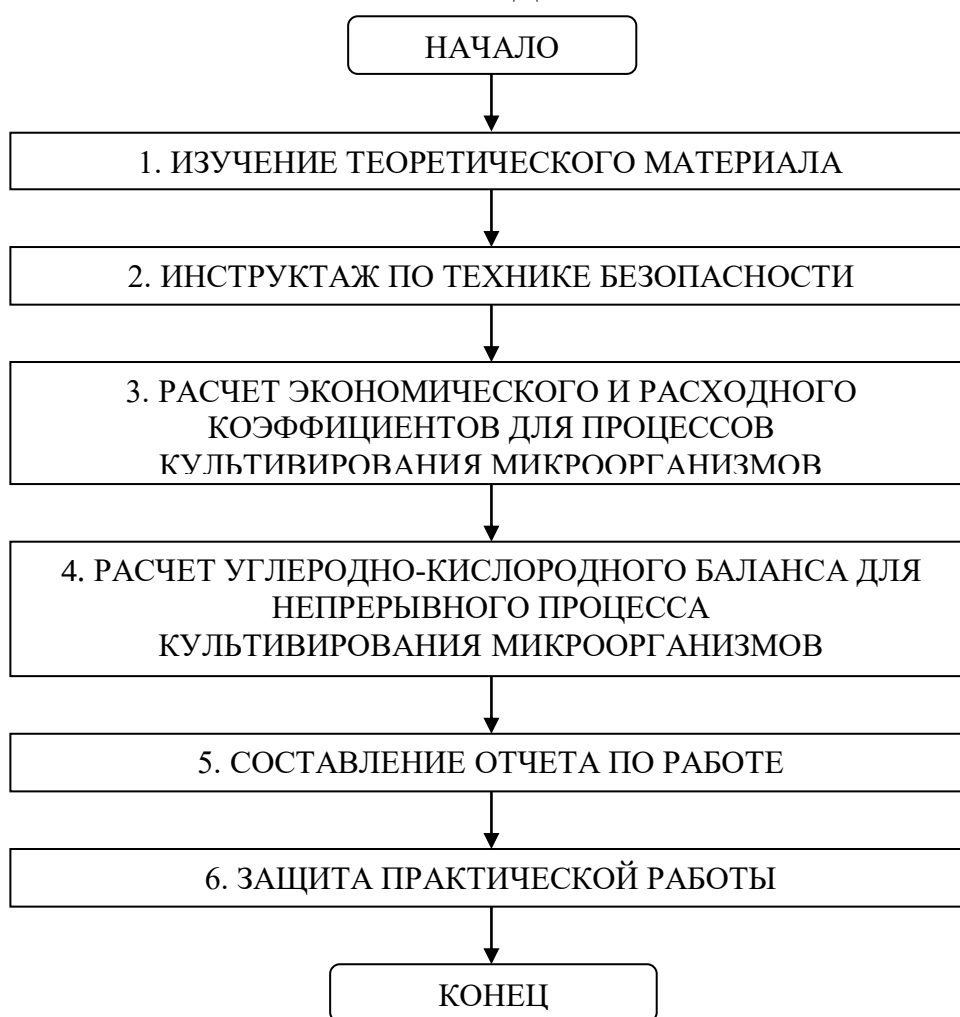
Кинетический + гидродинамический расчет $\longrightarrow$ технологические и конструктивные показатели.

ПРАКТИЧЕСКАЯ РАБОТА № 11

ИЗУЧЕНИЕ ПРИНЦИПОВ СОСТАВЛЕНИЯ И ОПТИМИЗАЦИИ РЕЦЕПТУР ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

Цель работы: изучить принципы составления и оптимизации рецептур питательных сред; определить затраты питательных веществ на построение биомассы и поддержание основного метаболизма микроорганизмов; рассчитать углеродно-кислородный баланс для непрерывного процесса культивирования микроорганизмов.

АЛГОРИТМ ПРОВЕДЕНИЯ РАБОТЫ



Блок 1. В процессе роста микроорганизмы потребляют из окружающей их питательной среды целый ряд веществ, составляющих основу для энергетического обмена в клетках. К основным компонентам, формирующим клеточное вещество, относятся: углерод, азот, кислород, водород и фосфор. Содержание этих элементов в различных микроорганизмах практически постоянно (таблица 1).

Таблица 1 – Содержание основных компонентов в клетках, %

Микроорганизмы	Углерод	Азот	Кислород	Водород	Фосфор
Дрожжи	47,8	10,4	31,1	6,5	4,5
Бактерии	50,4	12,3	30,5	6,8	4,0
Грибы	47,9	5,2	40,2	6,7	3,5

Основной принцип составления рецептов питательных сред – удовлетворение физиологических потребностей микроорганизмов. Концентрация основного сырья определяется с учетом коэффициента его конверсии. При соблюдении оптимальных условий культивирования коэффициент конверсии в биомассу для метанола и глюкозы равен примерно 0,5; для этанола – $0,7 \div 0,75$; для гексадекана – $1,0 \div 1,1$; для жидких парафинов – $1,2 \div 1,3$. Это значит, что в условиях периодического культивирования для выращивания 30 г биомассы в 1 л среды в субстрат должны быть внесены 60 г метанола, 40 г этанола, 30 г гексадекана или 24 г жидких парафинов.

Концентрации метанола, превышающие 1,0%, или этанола, превышающие 1,5 – 2,0%, обычно токсичны для микроорганизмов. Глюкоза, сахароза, фруктоза и другие низкомолекулярные сахара в концентрациях более 7 – 8%, также тормозят рост большинства микроорганизмов, поэтому при необходимости эти вещества вводят в питательный субстрат постепенно, по мере ассимиляции.

Количество азотсодержащих веществ, для конструктивного метаболизма, определяют из содержания азота в биомассе и предполагаемого ее урожая, учитывая, что около 5% азота остается неиспользованным.

Таким образом, для составления рецептов все компоненты должны быть взяты в соотношениях, пропорциональных потребностям культивируемого

микроорганизма, и с учетом предполагаемого урожая биомассы. Рецептуры составляют, пользуясь следующей формулой:

$$S_0 = C_i/A_i = C_1/A_1 = C_2/A_2$$

где: C_i – концентрация компонента i в сбалансированной питательной среде ($i = 1, 2, \dots, n$); A_i – коэффициент конверсии компонента i для выбранной культуры; S_0 – заданный запас компонентов в среде, в единицах концентрации биомассы.

Соблюдение данного правила обеспечивает разработку состава сред, сбалансированных по всем компонентам, и более или менее полную ассимиляцию всех ингредиентов среды во время ферментации.

Особенностью процессов микробиологического синтеза является зависимость стехиометрических коэффициентов потребления основных питательных веществ от физиологической активности клеток. Так, затраты питательных веществ можно разделить на затраты, связанные с процессами построения биомассы, и на затраты, связанные с процессами поддержания жизнедеятельности микроорганизмов.

Например, для источника углерода:

$$dS/dt = (dS/dt)_p + (dS/dt)_n. \quad (1)$$

Затраты на прирост биомассы:

$$(dS/dt)_p = -\alpha_1^S(dx/dt). \quad (2)$$

Потребление субстрата на основной обмен:

$$(dS/dt)_n = -\alpha_2^S x, \quad (3)$$

где: S , x – концентрация субстрата и биомассы;

dS/dt , dx/dt – скорость потребления субстрата и роста биомассы.

Обозначим $\alpha_1^S = a$; $\alpha_2^S = b$, тогда

$$dS/dt = -[a(dx/dt) + bx], \quad (4)$$

откуда

$$\alpha^S = a + b/\mu, \quad (5)$$

где: μ – удельная скорость роста.

Блок 2. При проведении практических занятий по дисциплине «Основы биотехнологии» студентам следует соблюдать общие правила поведения в учебных аудиториях, правила электробезопасности.

Блок 3. Используя данные таблицы 2 и формулу (6) вычислить экономический коэффициент (Y_s^x) при культивировании различных видов микроорганизмов.

Таблица 2 – Количественные показатели процесса культивирования.

№ п/п	Вид микроорганизма	Субстрат	Данные по культивированию					
			№ точки	S, г/л	X, г/л	μ , ч ⁻¹	Y_x^s , г/г	α^s
1	<i>Aspergillus niger</i>	фруктоза	контроль	100	0,3	-	-	
			1	68,4	6,5	0,13		
			2	57,6	10,5	0,09		
			3	46,8	12,6	0,07		
2	<i>Penicillium chrysogenum</i>	глюкоза	контроль	32,5	0,5	-	-	
			1	28,8	1,8	0,14		
			2	23,4	4,0	0,09		
			3	10,4	5,0	0,04		
3	<i>Brevibacterium flavum</i>	глюкоза	контроль	45	0,3	-	-	
			1	41	0,8	0,22		
			2	37	1,3	0,13		
			3	34	2,5	0,03		
4	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	глюкоза	контроль	80	0,5	-	-	
			1	58	0,9	0,11		
			2	38	1,4	0,08		
			3	28	2,0	0,05		
5	<i>Bacillus megaterium</i>	сахароза	контроль	40	0,4	-	-	
			1	35	2,0	0,11		
			2	26	8,5	0,09		
			3	16	10,0	0,06		
6	<i>Bacillus subtilis</i>	крахмал	контроль	10,0	0,1	-	-	
			1	9,2	1,2	0,73		
			2	5,3	2,2	0,45		
			3	0,8	4,7	0,17		
7	<i>Streptomyces griseus</i>	сахароза	контроль	42,0	2,5	-	-	
			1	39,0	7,5	0,09		
			2	32,5	20,5	0,06		
			3	19,0	22,8	0,03		
8	<i>Candida utilis</i>	этанол	контроль	32,0	1,0	-	-	
			1	26,0	4,0	0,07		
			2	19,0	7,0	0,06		
			3	9,0	11,0	0,05		

Величину экономического коэффициента Y_x^s рассчитывают по формуле:

$$Y_x^s = (X - X_0)/(S_0 - S) \quad (6)$$

Зная величину экономического коэффициента Y_x^s , вычислить расходный коэффициент α_x^s по формуле (2.7):

$$\alpha_x^s = 1/Y_x^s \quad (7)$$

Используя данные таблицы 2.2 и уравнение $\alpha^s = a + b/\mu$, построить графическую зависимость $\alpha^s = f(\mu)$ и найти значения коэффициентов a и b .

Блок 4. По заданиям, выданным преподавателем, провести расчет углеродно-кислородного баланса для непрерывного процесса культивирования микроорганизмов на n -алканах.

Провести расчет углеродно-кислородного баланса для непрерывного процесса выращивания на n -алканах, углеводах и спиртах дрожжей, грибов и бактерий, если концентрация кислорода в подаваемом на аэрацию воздухе $y^{u_{O_2}} = 20,5 \%$; концентрация кислорода в отходящем газе $y_{O_2} = 14,6 \%$; концентрация CO_2 в отходящем газе $y^{u_{CO_2}} = 3,8 \%$

Наименование показателей процесса	Номер варианта							
	11	22	33	44	55	66	77	88
скорость протока среды, D , л/ч	1165	1160	1150	2220	2210	2200	1170	1180
подача парафина, $Q_{\text{п}}$, кг/ч	44,8	44,6	44,0	65,2	66,0	55,8	44,9	55,2
концентрация биомассы, X , г/л АСБ	118,5	119,2	118,1	226,5	226,2	226,0	220,8	222,5
остаточные углеводороды (УГВ) в среде S , г/л,	00,65	00,6	00,58	00,98	00,96	00,94	00,7	00,78
расход аэрирующего газа (воздуха), $Q_{\text{г}}$, м ³ /ч;	998	995	990	1130	1125	1120	1105	1115

Пример расчета.

Даны следующие исходные данные: проток $D = 188$ л/ч; подача парафина $Q_{\text{п}} = 6,6$ л/ч (5,02 кг/ч); концентрация биомассы $x = 22,5$ г/л АСБ; остаточные углеводороды (УГВ) в среде $S = 0,85$ г/л, расход аэрирующего газа (воздуха) $Q_{\text{г}} = 110$ м³/ч; концентрация кислорода в подаваемом на аэрацию воздухе $y^{u_{O_2}} = 20,5 \%$; концентрация кислорода в отходящем газе $y_{O_2} = 14,6 \%$; концентрация CO_2 в

отходящем газ $y^{H_{CO_2}} = 3,8 \%$; концентрация в среде продуктов метаболизма в пересчете на уксусную кислоту ПМ = 800 мг/л.

Количество сорбированного кислорода:

$$M_{O_2} = [Q_{грO_2} / 100] * [Y^{H_{O_2}} - Y_{O_2} - (Y^{H_{O_2}} * Y_{CO_2})/100] / [1 - (Y_{O_2} + Y_{CO_2})/100] \quad (8)$$

$$M_{O_2} = [110 * 1,43 / 100] * [20,5 - 14,6 - (20,5 * 3,8)/100] / [1 - (14,6 + 3,8)/100] = 9,85 \text{ кг/ч.}$$

Количество выделившегося CO_2 :

$$M_{CO_2} = [Q_{грCO_2} / 100] * [(1 - Y^{H_{O_2}}/100) * Y_{CO_2}] / [1 - (Y_{O_2} + Y_{CO_2})/100] \quad (9)$$

$$M_{CO_2} = [110 * 1,97 / 100] * [(1 - 20,5/100) * 3,8] / [1 - (14,6 + 3,8)/100] = 8,0 \text{ кг/ч.}$$

Количество полученной биомассы:

$$Q_6 = xD \quad (10)$$

$$Q_6 = 22,5 * 0,188 = 4,23 \text{ кг/ч.}$$

Удельное потребление кислорода:

$$\alpha^{O_2} = M_{O_2} / Q_6 \quad (11)$$

$$\alpha^{O_2} = 9,85 / 4,23 = 2,33 \text{ кг/ч.}$$

Удельное выделение CO_2 :

$$\alpha^{CO_2} = M_{CO_2} / Q_6 \quad (12)$$

$$\alpha^{CO_2} = 8,0 / 4,23 = 1,89 \text{ кг/ч.}$$

Баланс по углероду:

$$C_{п} = C_6 + C_{CO_2} + C_{угв} + C_{пм} \quad (13)$$

Вход Выход

$$Q_{п} * 0,82 = Q_6 * 0,475 + M_{CO_2} * 0,273 + D * S * 0,82 + ПМ * D * 0,4 = 4,23 * 0,475 + 8,0 * 0,273 + 0,188 * 0,85 * 0,82 + 0,8 * 0,188 * 0,4 = 4,27 \text{ кг/ч} = 4,40 \text{ кг/ч; разбаланс} + 0,13 \text{ кг/ч или } 3 \%$$

Баланс по кислороду:

$$M_{O_2} = Q_{26} + Q_{2CO_2} + G_{2H_2O} + Q_{2пм} \quad (14)$$

Вход Выход

$$M_{O_2} = Q_6 * 0,31 + M_{CO_2} * 0,727 + M_{CO_2} * 0,4 + ПМ * D * 0,53; \\ 9,85 = 4,23 * 0,31 + 8,0 * 0,727 + 8,0 * 0,4 + 0,8 * 0,188 * 0,53; \\ 9,85 \text{ кг/ч} = 10,32 \text{ кг/ч; разбаланс} + 0,47 \text{ кг/ч или } 4,8 \%$$

В расчетных соотношениях использованы следующие обозначения:

$C_{\text{п}}$ – количество углерода в парафине, поданном на выращивание;

C_6 – количество углерода в полученной биомассе;

C_{CO_2} – количество углерода, выделившегося с CO_2 ;

$C_{\text{угв}}$ – количество углерода в неутилизованном парафине;

$C_{\text{пм}}$ – количество углерода в продуктах метаболизма;

Q_{26} – количество кислорода в полученной биомассе;

$Q_{2\text{CO}_2}$ – количество кислорода, выделившегося с CO_2 ;

$Q_{2\text{H}_2\text{O}}$ – количество кислорода, выделившегося с водой при окислении субстрата;

$Q_{2\text{пм}}$ – количество кислорода в продуктах метаболизма.

Блок 5. Отчет о работе должен включать:

- титульный лист;
- цель работы и алгоритм выполнения;
- краткое теоретическое обоснование;
- результаты расчетов;
- выводы.

Блок 6. Контрольные вопросы:

- основные принципы стехиометрии процессов ферментации;
- взаимосвязь стехиометрии с кинетическими закономерностями роста микроорганизмов;
- общая схема расчета выхода биомассы из углеродного субстрата;
- способы расчета тепла, выделяющегося в процессе культивирования микроорганизмов;
- стехиометрический метод составления рецептур питательных сред;
- балансовый метод составления рецептур питательных сред.

ПРАКТИЧЕСКАЯ РАБОТА № 12

ИЗУЧЕНИЕ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ ПОЛУЧЕНИЯ ПРОМЫШЛЕННЫХ ШТАММОВ ПРОДУЦЕНТОВ МЕТОДАМИ СЕЛЕКЦИИ И ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ

Цель и содержание работы: проанализировать методы схемы селекции микроорганизмов с использованием принципов мутагенеза и рекомбиногенеза, изучить современные направления получения промышленных штаммов продуцентов методами генетической инженерии, изучить общие принципы метода полимеразной цепной реакции и основные стадии проведения ПЦР-анализа.

Теоретическое обоснование.

Селекция промышленных штаммов – направленный отбор из популяции микроорганизмов, выращиваемых на искусственных средах, мутантов, наследственность которых претерпела скачкообразные изменения вследствие структурной модификации в нуклеотидной последовательности ДНК.

В настоящее время отбор и совершенствование технологических свойств промышленных штаммов микроорганизмов на принципах селекции осуществляется методами мутагенеза и рекомбиногенеза.

Мутагенез предусматривает выявление спонтанных изменений генетической информации или индуцирование этих изменений под действием различных мутагенных факторов с целью получения промышленных штаммов с технологически важными свойствами. Методы, основанные на отборе спонтанных мутаций, сыграли важную роль в получении промышленных штаммов пивных, винных, пекарских дрожжей; уксуснокислых, молочнокислых, пропионовокислых бактерий. Однако они являются малоэффективными и длительными по времени.

К значительному ускорению селекции ведет индуцированный мутагенез – резкое увеличение частоты мутаций под действием мутагенных факторов, приводящих к искусственному повреждению генома клетки. Любое генетическое изменение клетки в первую очередь затрагивает деятельность ферментов клетки. Биосинтез первичных метаболитов контролирует относительно малое число генов. В связи с этим, мутагенная изменчивость наиболее достижима в данном случае. У штаммов-сверхпродуцентов метаболитов, как правило, нарушены механизмы регуляции определенных ферментов (ликвидирован принцип «обратной связи»). Так, у *Micrococcus glutamicus* сверхсинтез лизина осуществляется двумя типами мутантов: у первых блокирован синтез метионина и треонина - ингибиторов аспараткиназы; у вторых – сам фермент утратил чувствительность к ингибирующему действию метионина, треонина и лизина.

Сверхсинтеза также достигают путем направленной активации того или иного фермента. Мутант дрожжей *Candida lipolytica* имеет повышенную активность цитратсинтазы и пониженную активность аконитатгидратазы, что обеспечивает сверхсинтез лимонной кислоты. Если целью селекции является получение штамма, продуцирующего промежуточный продукт биосинтетического пути, то этого достигают путем блокирования у мутанта следующего за представляющим интерес продуктом этапом биосинтеза. Такой мутант способен расти только при добавлении в среду продукта блокированной реакции, т.е. в данном случае осуществляется переход от прототрофной (использующей исходный субстрат) к ауксотрофной форме микроорганизма.

В ряде случаев мутанты с измененными биохимическими свойствами способны синтезировать не характерные для прототрофа продукты метаболизма. Так, мутанты *Streptomyces griseus* (продуцент хлортетрациклина) синтезируют окситетрациклин.

Широко распространено применение универсальных физических и химических мутагенных факторов. К биологическим мутагенам относятся фаги.

Рекомбиногенез. До недавнего времени гибридизация как метод селекции в микробиологии применялся крайне редко. С 1953 г. стал применяться метод вегетативной гибридизации грибов, сущность которого заключается в том, что генетический материал двух клеток обменивается в результате их слияния. В результате образуется рекомбинантный гибрид, в геноме которого объединена наследственная информация двух индивидов.

Генетическая инженерия значительно расширяет возможности селекции микроорганизмов. Генетическую инженерию условно делят на три уровня:

- 1). **Генную** – прямое манипулирование рекомбинантными ДНК;
- 2). **Хромосомную** – манипуляции с большим числом генов или с целыми хромосомами;
- 3). **Геномную** – перенос всего или большей части генетического материала от одной клетки к другой.

Геномная инженерия по используемым методам и модифицируемым объектам соответствует тому, что в современном понимании принято обозначать как клеточная инженерия.

Трансплантация хромосом или их ферментов имеет пока второстепенное практическое значение. Кроме того, для прокариот понятие «хромосома» и «геном» часто совпадают.

В связи с этим, основным содержанием генетической инженерии является технология рекомбинантных ДНК. Работы в данной области включают четыре основных этапа:

- 1). Получение представляющего интерес гена;

- 2). Его встраивание в генетический элемент, способный к репликации генетической информации в клетке – вектор;
- 3). Введение гена, входящего в состав вектора, в организм-реципиент;
- 4). Идентификация и селекция клеток, которые приобрели желаемый ген.

Указания по технике безопасности

Студенты могут быть допущены к работе только после ознакомления с правилами техники безопасности, знание которых преподаватель проверяет и фиксирует в журнале. При выполнении анализов нужно быть внимательным, соблюдать осторожность, все операции проводить аккуратно, без спешки, в рабочем халате. Категорически запрещается принимать пищу за лабораторным столом и пробовать на вкус химические вещества.

Методика и порядок выполнения работы

Порядок выполнения работы приведен на рисунке 1.

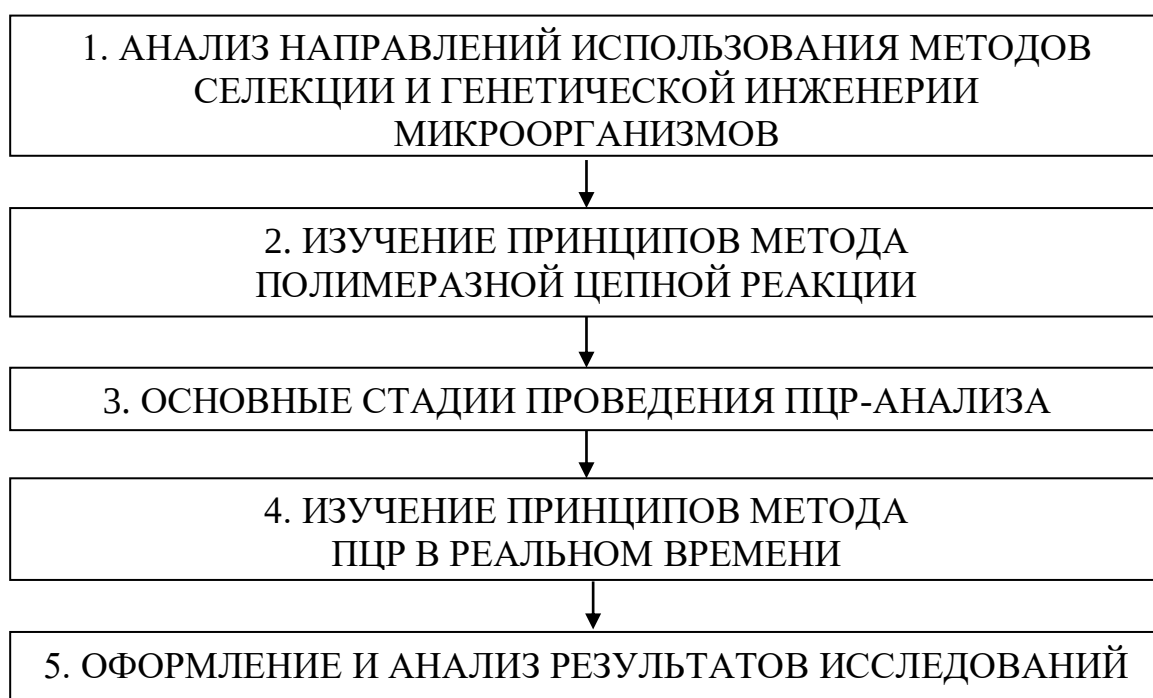


Рисунок 1 – Блок-схема алгоритма выполнения работы «Изучение технологических процессов получения промышленных штаммов продуцентов методами селекции и генетической инженерии».

Пояснения к блок-схеме

БЛОК 1. Провести анализ теоретической части методических указаний к выполнению лабораторной работы, лекционного материала. В отчете о выполнении лабораторной работы отразить следующие вопросы:

- общая схема получения промышленных штаммов микроорганизмов с использованием методов мутагенеза и рекомбиногенеза;

- примеры использования спонтанного и индуцированного мутагенеза для получения промышленных культур продуцентов;

-физические и химические методы индуцированного мутагенеза, их достоинства и недостатки;

- основные этапы получения промышленных штаммов продуцентов на основе технологии рекомбинантных ДНК, их содержание.

БЛОК 2. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) в настоящее время широко используется в исследовательских и клинических лабораториях всего мира. В основе метода ПЦР лежит процесс многократного увеличения копий (амплификации) определенных участков ДНК, осуществляемый с помощью фермента ДНК-полимеразы (рисунок 2).

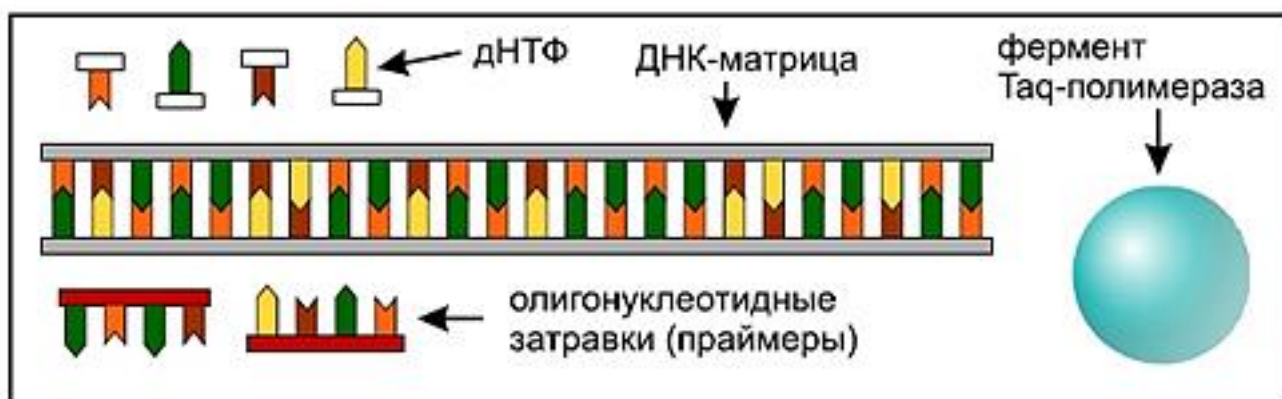


Рисунок 2 – Механизм действия ДНК-полимеразы

Основные компоненты реакционной среды. Для проведения полимеразной цепной реакции необходимо наличие в реакционной смеси следующих компонентов:

ДНК-матрица – выделенная ДНК анализируемого образца, содержащая искомый специфический фрагмент

Праймеры – синтетические олигонуклеотиды размером 15-30 пар нуклеотидов, комплементарные прямой и обратной цепям определяемого фрагмента и ограничивающие его; играют ключевую роль в образовании продуктов реакции и обеспечивают чувствительность и специфичность реакции.

Смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (дНТФ) – смесь четырех нуклеотидных оснований, «строительных блоков» для синтеза новых комплементарных цепей ДНК.

Taq-полимераза – термостабильный фермент, катализирующий удлинение новой цепи ДНК.

Буферный раствор – реакционная среда, содержащая различные ионы, в том числе ионы Mg^{2+} , необходимые для поддержания оптимальной активности и стабильности фермента.

БЛОК 3. Этапы проведения амплификации. Для получения достаточного для визуализации количества копий целевого фрагмента ДНК необходимо провести 20-40 циклов амплификации, каждый цикл включает в себя несколько стадий:

Инициация – необходима в случае, если активация ДНК-полимеразы происходит с помощью нагревания при высоких температурах, реакционную смесь выдерживают при 93-96°C в течение нескольких минут.

Этап 1. Денатурация – реакционную смесь нагревают при 93-95°C в течение 30-40 сек., происходит расплетение двойной спирали ДНК с образованием одноцепочечных молекул.

Этап 2. Отжиг праймеров – происходит комплементарное связывание праймеров с ДНК-матрицей, температура отжига специфична для каждой пары праймеров и ее значения располагаются в интервале 50-65° С, реакция протекает в течение 10-40 сек.

Этап 3. Элонгация цепи – происходит синтез новых цепей ДНК Taq-полимеразой путем удлинения праймеров в направлении от 5'-конца к 3'-концу. Как правило, реакция протекает при 68-72°C, время проведения элонгации зависит от размера амплифицируемого фрагмента.

Образовавшиеся в ходе первого цикла амплификации новые молекулы ДНК служат матрицей для второго цикла репликации ДНК, таким образом, происходит экспоненциальное накопление целевых фрагментов ДНК (ампликонов) в реакционной смеси. За 30-40 циклов амплификации в растворе накапливается около 108 молекул ампликона. Такого количества достаточно для визуального обнаружения ПЦР-продукта методом электрофореза в агарозном геле.

Стадии проведения ПЦР-анализа – реакция (ПЦР). Проведение анализа с использованием метода ПЦР включает три основных этапа:

1. Выделение генетического материала из клинического образца – на данном этапе образец подвергается специальной обработке, выбранная методика выделения нуклеиновых кислот зависит от характера анализируемого материала. Для проведения амплификации необходима ДНК (РНК), свободная от клеточных фракций и посторонних примесей, которые могут ингибировать реакцию ПЦР.

2. Амплификация специфического фрагмента ДНК – на данном этапе происходит накопление целевых фрагментов ДНК, процесс амплификации проводят в специальных программируемых термостатах, автоматически меняющих температуру реакционной смеси по заданной программе. Скорость «наработки» фрагмента зависит от эффективности ПЦР, при максимальной эффективности достаточно 38-40 циклов для получения 25-50 нг/мкл ампликонов из одной исходной молекулы ДНК.

3. Детекция продуктов амплификации – можно выделить два основных метода детекции продуктов амплификации: детекция в агарозном геле и флуоресцентная схема детекции. В первом случае происходит электрофоретическое разделение ПЦР-продуктов в агарозном геле согласно размеру фрагментов ДНК. Более короткие молекулы ДНК движутся быстрее, чем длинные. Визуализация ампликонов в геле проводится путем добавления к ним интеркалирующего агента – бромистого этидия, который встраивается в двуцепочечные цепи ДНК и флуоресцирует в оранжево-красном диапазоне видимого спектра при УФ -облучении. В зависимости от количества конечного продукта яркость свечения полос может быть различной, но дать количественную оценку ДНК-копий с помощью этого метода невозможно. Альтернативой электрофоретическому методу является использование флуоресцентных методов, где специальные флуоресцентные зонды гибридизуются со специфической последовательностью ДНК-матрицы. Уровень флуоресценции пропорционален количеству образовавшихся специфических продуктов ПЦР. Детекция может проводиться либо в процессе амплификации (ПЦР в режиме реального времени), либо после завершения реакции (ПЦР с детекцией по конечной точке).

БЛОК 4. ПЦР в реальном времени (Real-Time PCR). В настоящее время на смену визуальной оценке результатов ПЦР методом электрофореза уверенно приходят флуоресцентные методы детекции продуктов амплификации. Получать и интерпретировать результаты ПЦР становится проще, быстрее и надежнее.

Одним из флуоресцентных методов является метод ПЦР в режиме реального времени. В его основе лежит принцип флуоресцентной детекции продуктов ПЦР непосредственно в ходе амплификации. Детекция продуктов амплификации проводится прямо в реакционной среде через стенки или крышку закрытой пробирки.

1. В состав реакционной смеси наряду с праймерами и остальными компонентами реакции добавлены специальные флуоресцентные метки (зонды). Флуоресцентный зонд представляет собой олигонуклеотид, комплементарный внутренней последовательности амплифицируемого фрагмента ДНК возбудителя. На 3'-конце зонда находится флуоресцентная молекула – флуорофор, а на 5'-конце расположена молекула-“гаситель” флуоресценции. За счет близости флуорофора и “гасителя” вся энергия, поглощенная флуорофором, переходит на “гаситель” по принципу флуоресцентно-резонансного переноса энергии. При этом сигнал флуоресценции отсутствует.

2. В ходе ПЦР при повышении температуры происходит денатурация ДНК возбудителя, и зонд наряду с праймерами гибридизуется с комплементарным участком ДНК.

3. В процессе синтеза новой цепи ДНК, фермент ДНК-полимераза расщепляет этот зонд. При расщеплении зонда флуорофор отделяется от “гасителя”, расстояние между ними увеличивается, процесс тушения флуоресценции становится невозможным. В этот момент можно зарегистрировать флуоресцентный сигнал от флуорофора.

В результате такого принципа неспецифическая амплификация не обнаруживается.

ПЦР “в реальном времени” имеет ряд значительных преимуществ:

- Объединение этапов амплификации и детекции результатов. Появляется возможность оценить кинетику процесса, которая зависит от начального количества исследуемого материала

- Существенное снижение риска контаминации и ошибок при анализе результатов

- Высокая специфичность реакции за счет использования высокоспецифичных флуоресцентных зондов.

- Высокая производительность

- Упрощение требований к организации ПЦР-лаборатории

- Возможность количественной оценки исходной ДНК матрицы

- Регистрация и учет данных в электронном формате

ПЦР “в реальном времени” характеризуется возможностью проведения качественного и количественного анализа. Регистрируемое в процессе амплификации нарастание сигнала от отделенного флуорофора прямо пропорционально увеличению концентрации синтезированных специфических продуктов и отражает концентрацию ДНК в исходной матрице.

Для проведения анализа необходим специальный прибор – амплификатор для ПЦР в реальном времени, который совмещает в себе функции термоциклера и флуоресцентного детектора (iCycler iQ5, CFX96 (Bio-Rad); ДТ-322, ДТ-96 (ДНК-Технология); Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000, Rotor-Gene Q (Corbett Research/Qiagen); Cobas TagMan48 (Roche) и др.

БЛОК 5. Содержание отчета и его форма

Отчет о работе должен содержать:

- титульный лист;
- цель и алгоритм проведения работы;
- теоретическое обоснование;
- описание методик проведения экспериментов;
- результаты исследований;
- выводы.

Контрольные вопросы и защита работы

Контрольные вопросы:

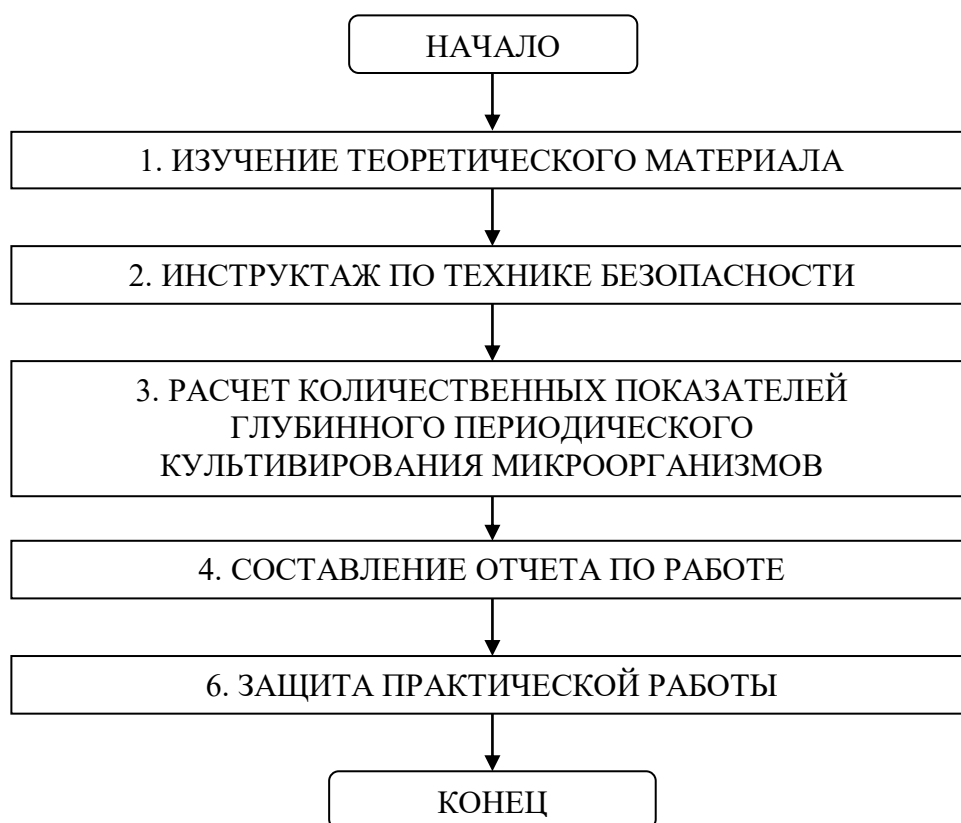
- общие требования к промышленным штаммам микроорганизмов;
- источники получения промышленных штаммов микроорганизмов;
- схема селекции микроорганизмов с использованием принципов мутагенеза и рекомбиногенеза;
- получение промышленных штаммов и улучшение свойств существующих продуцентов методами генетической инженерии;
- сохранение активности промышленных штаммов и их консервация;
- принцип метода полимеразной цепной реакции (ПЦР);
- основные компоненты реакционной среды для проведения полимеразной цепной реакции;
- этапы проведения амплификации;
- ПЦР в реальном времени (Real-Time PCR).

ПРАКТИЧЕСКАЯ РАБОТА № 13

РАСЧЕТ КОЛИЧЕСТВЕННЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПЕРИОДИЧЕСКОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

Цель работы: изучить классификацию процессов культивирования микроорганизмов; освоить методику расчета количественных показателей глубинного периодического культивирования микроорганизмов.

АЛГОРИТМ ПРОВЕДЕНИЯ РАБОТЫ



Блок 1. В основу количественного описания процессов глубинной ферментации положены кинетические закономерности, характеризующие влияние субстрата и продуктов на удельную скорость роста микроорганизмов и накопления метаболитов. При этом кинетика процессов периодического и непрерывного культивирования имеет существенные различия.

Периодический процесс относится к закрытым системам. Все компоненты среды вносятся в начале ферментации, продукты реакции в процессе культивирования не отводятся. Состав среды, концентрация биомассы и

метаболитов постоянно изменяются. В процессе культивирования популяция микроорганизмов проходит все стадии развития.

Периодическая ферментация позволяет поддерживать постоянную температуру, равномерное распределение растворенных веществ по всему объему биореактора. В то же время периодические процессы связаны с рядом проблем:

- большие затраты времени в связи с необходимостью загрузки и разгрузки биореактора;
- низкая продуктивность, связанная с малой концентрацией клеток в среде, ингибированием конечным продуктом и исчерпанием субстрата;
- длительность процесса ферментации.

Периодический процесс с подпиткой (полунепрерывный) используется для снижения эффекта ингибирования продуктами метаболизма и недостатком субстрата.

Непрерывные процессы. Различают два типа непрерывной (проточной) ферментации.

1. Биореакторы полного смешения – жидкая фаза в них интенсивно перемешивается, постоянно подается питательная среда и отводится культуральная жидкость. Данные реакторы могут работать по принципу хемостата или турбидостата. В первом случае в системе поддерживается постоянная концентрация одного из компонентов среды, причем постоянный подвод клеток не обязателен, поскольку в начальном периоде проводят периодическое культивирование, а затем включают подачу жидкости с клетками или без них. Во втором случае в биореакторе поддерживают постоянную концентрацию клеток, регулируя скорость протока среды. При достижении определенной максимальной концентрации клеток подача среды может быть автоматически прекращена и процесс протекает некоторое время в периодических условиях.

2. Биореакторы полного вытеснения (тубулярные). Среда протекает по турбулярному реактору без перемешивания, состав и концентрация питательных

веществ, продуктивность неодинаково распределены по объему реактора; вместе со средой в реактор подаются клетки.

Целью количественного описания процессов культивирования в биореакторах являются расчет и оптимизация производительности аппарата, определение рабочего объема. Основные количественные показатели процессов глубинного периодического культивирования представлены в таблице 3.1.

Таблица 3.1 – Количественные показатели процессов глубинного периодического культивирования

Показатель	Обозначение, размерность	Расчетная формула
Удельная скорость роста	$X, 1/\text{ч}$	$\mu = (X_1 - X_0) / (X_1 * \tau)$
Продуктивность по биомассе	$Q_x, \text{г}/(\text{л} * \text{ч})$	$Q_x = (X_1 - X_0) / \tau$
Продуктивность по продукту	$Q_p, \text{г}/(\text{л} * \text{ч})$	$Q_p = (P_1 - P_0) / \tau$
Удельная скорость потребления субстрата	$q_s, \text{г}/(\text{г} * \text{ч})$	$q_s = (S_0 - S_1) / (X_1 * \tau)$
Удельная скорость образования продукта	$q_p, \text{г}/(\text{г} * \text{ч})$	$q_p = (P_1 - P_0) / (X_1 * \tau)$
Выход биомассы из субстрата (экономический коэффициент)	$Y_{x/s}, \text{г}/\text{г}$	$Y_{x/s} = \mu / q_s = (X_1 - X_0) / (S_0 - S_1)$
Выход продукта из субстрата	$Y_{p/s}, \text{г}/\text{г}$	$Y_{p/s} = q_p / q_s = (P_1 - P_0) / (S_0 - S_1)$

Блок 2. При проведении практических занятий по дисциплине «Основы биотехнологии» студентам следует соблюдать общие правила поведения в учебных аудиториях, правила электробезопасности.

Блок 3. Используя данные таблицы 3.2, проводят расчет количественных показателей процессов глубинного периодического культивирования по формулам, представленным в таблице 3.1.

Блок 4. Отчет о работе должен включать:

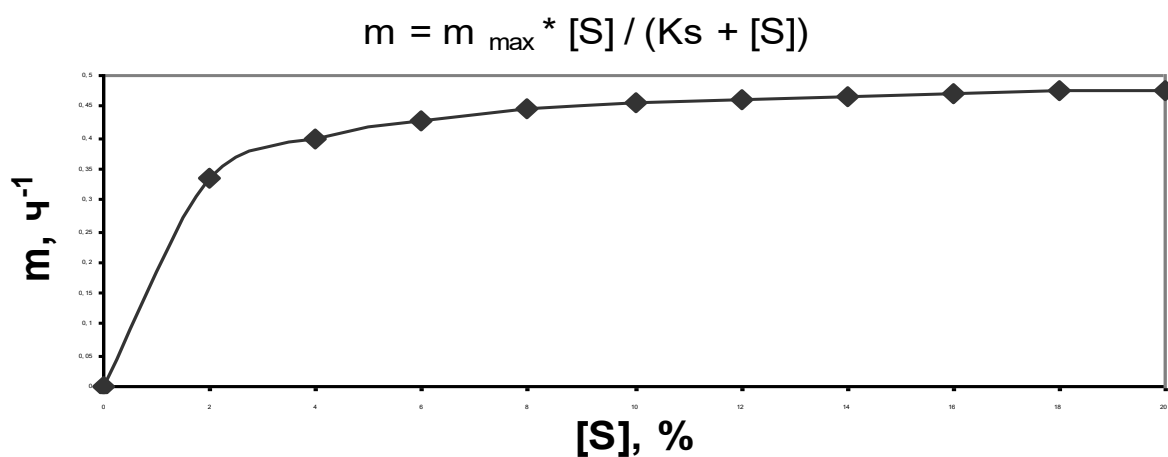
- титульный лист;
- цель работы и алгоритм выполнения;
- краткое теоретическое обоснование;
- результаты расчета показателей глубинного периодического культивирования микроорганизмов;
- выводы.

Таблица 3.2 – Исходные данные для расчета

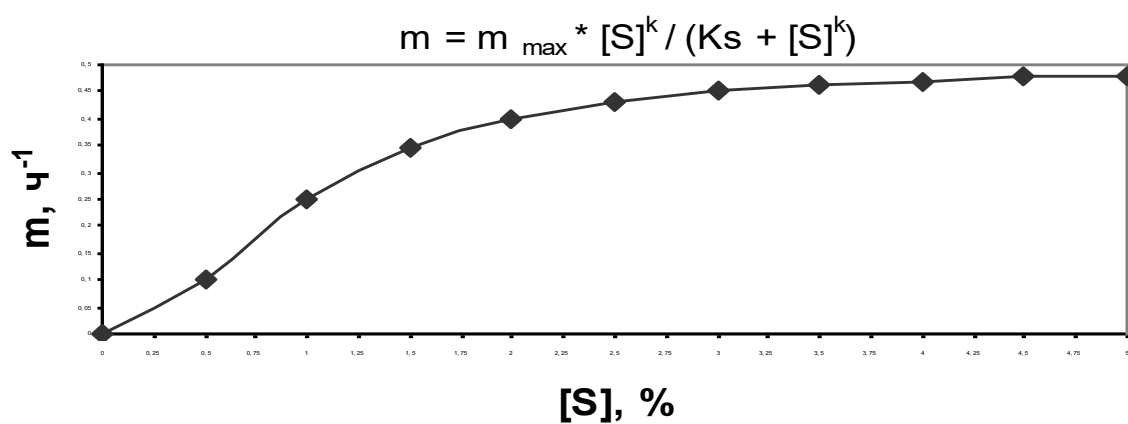
№ вариан- та	Концентрация, г/л					Продолжительно- сть культивировани- я, τ, ч
	биомассы		субстрата		продукта	
	X_0	X_1	S_0	S_1	P_1	
1	0,5	2,5	130,0	35,3	140,6	48
2	1,0	11,5	35,5	8,3	152,3	72
3	0,25	12,8	100,0	45,7	39,6	50
4	0,5	5,4	32,5	10,3	78,4	90
5	0,15	4,9	10,0	0,7	0,03	96
6	2,5	23,3	45,0	17,8	6,2	84
7	0,3	3,1	45,0	32,5	27,5	64
8	0,45	9,3	40,0	15,4	9,4	60
9	0,55	2,5	82,5	26,8	4,2	50
10	0,2	4,3	42,0	12,6	0,53	78

Блок 5. Контрольные вопросы:

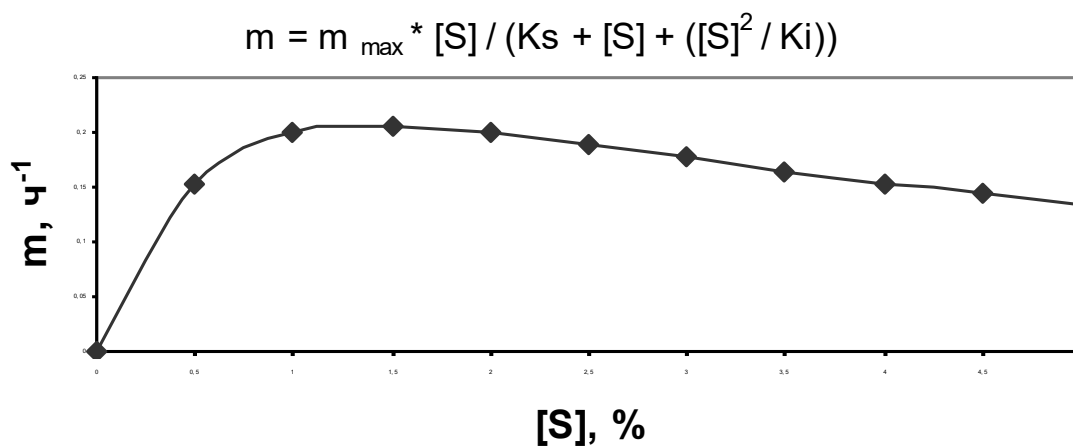
- классификация процессов культивирования микроорганизмов;
- количественные показатели глубинного периодического культивирования;
- виды и общие закономерности полунепрерывного культивирования;
- типы непрерывного культивирования микроорганизмов;
- количественные показатели непрерывного культивирования в хемостатных биореакторах;
- технологические способы непрерывной ферментации.



а)

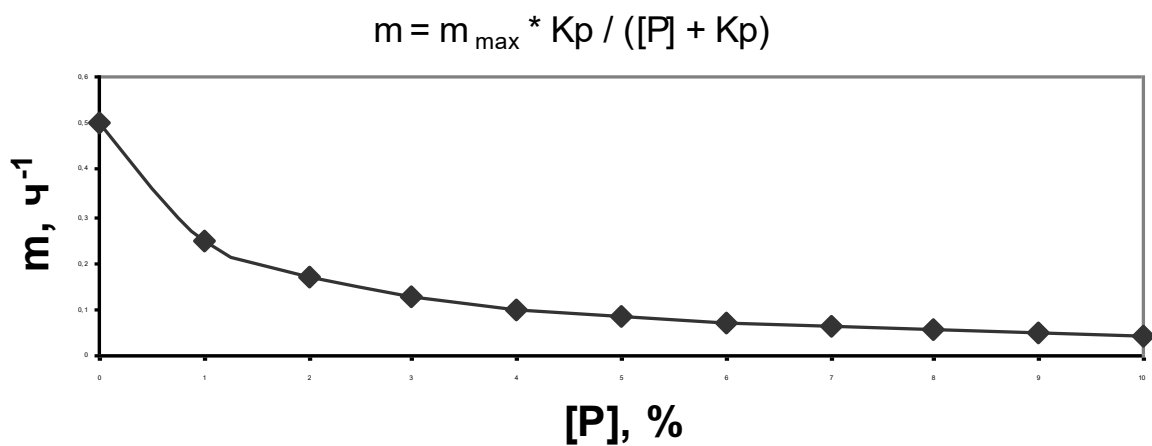


б)

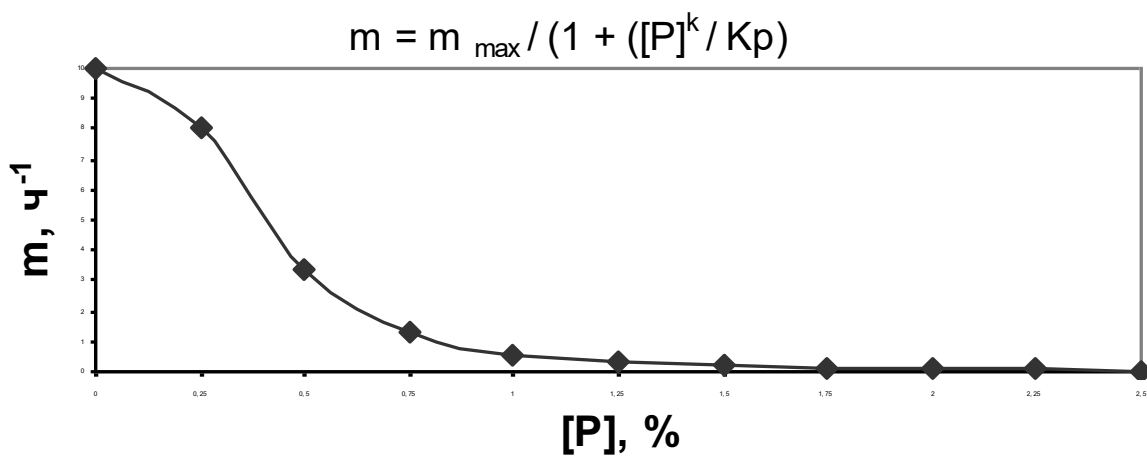


в)

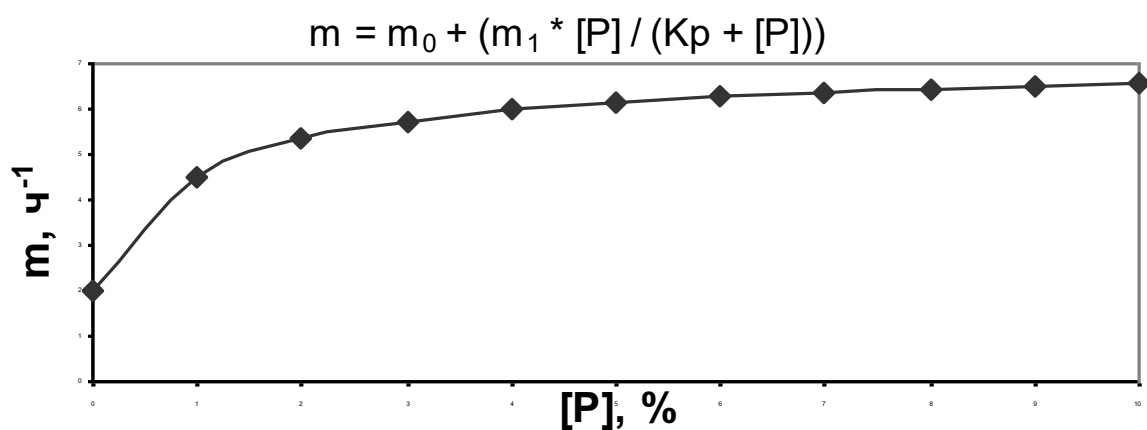
Рисунок 1 – Кинетические модели роста, учитывающие влияние концентрации питательного субстрата на удельную скорость роста: а) модель Моно, б) модель Мозера, в) модель Андрюса.



а)



б)



в)

Рисунок 2 – Кинетические модели роста, учитывающие влияние концентрации продуктов метаболизма на удельную скорость роста: а) модель Иерусалимского, б) модель Бергтера, в) стимулирующий продукт.

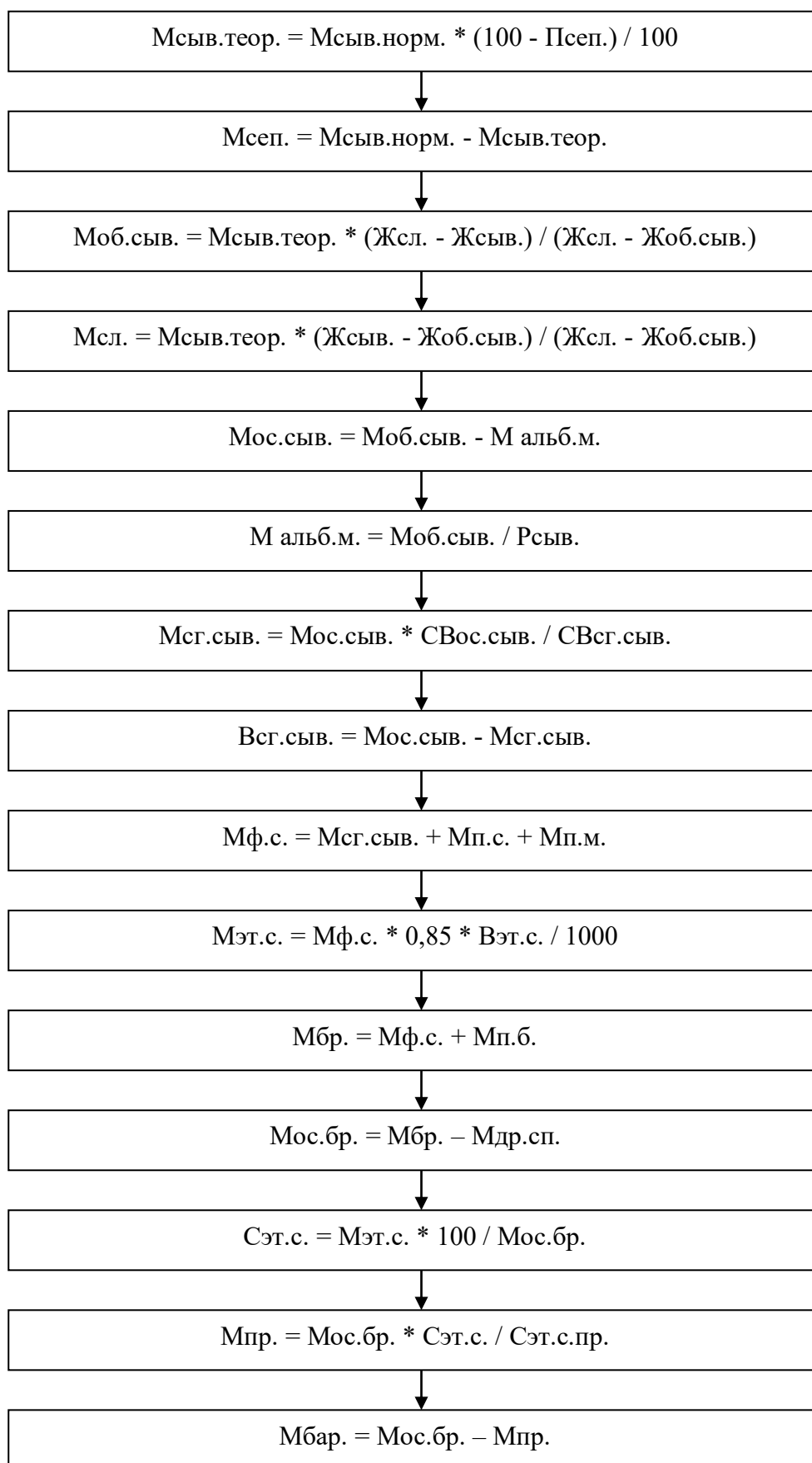
ПРИЛОЖЕНИЕ Б

№ вари анта	Микроорганизм	Субс трат	Проду кт	Данные кинетических экспериментов для уравнения			
				Моно		Иерусалимского	
				μ, 1/ч	S, г/л	μ, 1/ч	P, г/л
1	Saccharomyces cerevisiae	Глю коза	Этано л	0,2	40	0,15	130
				0,28	80	0,24	90
				0,35	120	0,32	65
2	Candida utilis	Этан ол	Уксус ная к-та	0,3	57,5	0,25	150
				0,5	92	0,45	120
				0,7	115	0,65	75
3	Aspergillus niger	Фру ктоза	Лимо нная к-та	0,07	46,8	0,06	39,2
				0,09	23,4	0,08	21,0
				0,14	28,8	0,11	9,6
4	Penicillium chrysogenum	Фру ктоза	Пениц иллин	0,04	10,4	0,03	73,5
				0,09	23,4	0,05	33,4
				0,14	28,8	0,09	6,7
5	Bacillus subtilis	Крах мал	Интер ферон	0,15	0,6	0,2	28*10 ⁻³
				0,45	5,3	0,4	3*10 ⁻³
				0,75	9,5	0,6	1,2*10 ⁻³
6	Streptomyces griseus	Глю коза	Пениц иллин	0,05	28	0,02	55
				0,09	38	0,06	1,2
				0,11	42	0,09	0,5
7	Brevibacterium flavum	Глю коза	Глюта мин. к-та	0,03	34	0,02	26
				0,13	37	0,07	7,5
				0,22	41	0,2	3,5
8	Bacillus megaterium	Саха роза	Алани н	0,06	16	0,03	8,5
				0,09	26	0,06	1,7
				0,11	35	0,11	0,5
9	Clostridium acetobutylicum	Глю коза	Бутан ол	0,05	10	0,04	3,8
				0,08	38	0,07	2,6
				0,11	58	0,09	0,8
10	Blakeslea trispora	Бело к	Карот ин	0,07	14	0,05	0,45
				0,12	32	0,08	0,21
				0,16	40	0,15	0,03

ПРИЛОЖЕНИЕ В

№ вариан- та	Концентрация, г/л					Продолжительно- сть культивировани- я, τ, ч
	биомассы		субстрата		продукта	
	X ₀	X ₁	S ₀	S ₁	P ₁	
1	0,5	2,5	130,0	35,3	140,6	48
2	1,0	11,5	35,5	8,3	152,3	72
3	0,25	12,8	100,0	45,7	39,6	50
4	0,5	5,4	32,5	10,3	78,4	90
5	0,15	4,9	10,0	0,7	0,03	96
6	2,5	23,3	45,0	17,8	6,2	84
7	0,3	3,1	45,0	32,5	27,5	64
8	0,45	9,3	40,0	15,4	9,4	60
9	0,55	2,5	82,5	26,8	4,2	50
10	0,2	4,3	42,0	12,6	0,53	78

СХЕМА МАТЕРИАЛЬНОГО РАСЧЕТА ЭТИЛОВОГО СПИРТА



Пояснения к схеме расчета: Мсыв.норм., Мсыв.теор. – масса сыворотки нормативная и с учетом потерь при сепарировании; Псеп. = 0,454% – нормативные потери сырья при сепарировании; Мсеп., Моб.сыв., Мсл. – массы потерь при сепарировании, обезжиренной сыворотки и подсырных сливок; Мос.сыв., Мальб.м. – массы осветленной сыворотки и альбуминного молока; Рсыв. – расход сыворотки на 1 тонну альбуминного молока (20 т/т); Мсг.сыв. – масса сгущенной сыворотки; СВос.сыв., СВсг.сыв. – массовые доли сухих веществ осветленной (5,0 %) и подсгущенной (18,0 %) сыворотки; Всг.сыв. – массовая доля влаги, испаренной при сгущении сыворотки; Мф.с., Мп.с., Мп.м. – массы ферментационной среды, питательных солей и посевного материала дрожжей; Мэт.с. – масса этилового спирта в составе культуральной жидкости по завершении ферментации; Вэт.с. – теоретический выход этилового спирта на 1 тонну ферментационной среды (72-73 кг/т); Мбр., Мос.бр – массы бражки и осветленной бражки; Мп.б. – прирост биомассы дрожжей (из расчета 2-3 г/ литр среды); Мдр.сп. – масса дрожжевой суспензии, отделяемой на сепараторе (из расчета 10% от массы бражки); Сэт.сп., Сэт.сп.пр. – концентрации этанола в осветленной бражке и спирте-сырце (96 %); Мпр., Мбар. – массы спирта-сырца и послеспиртовой барды.

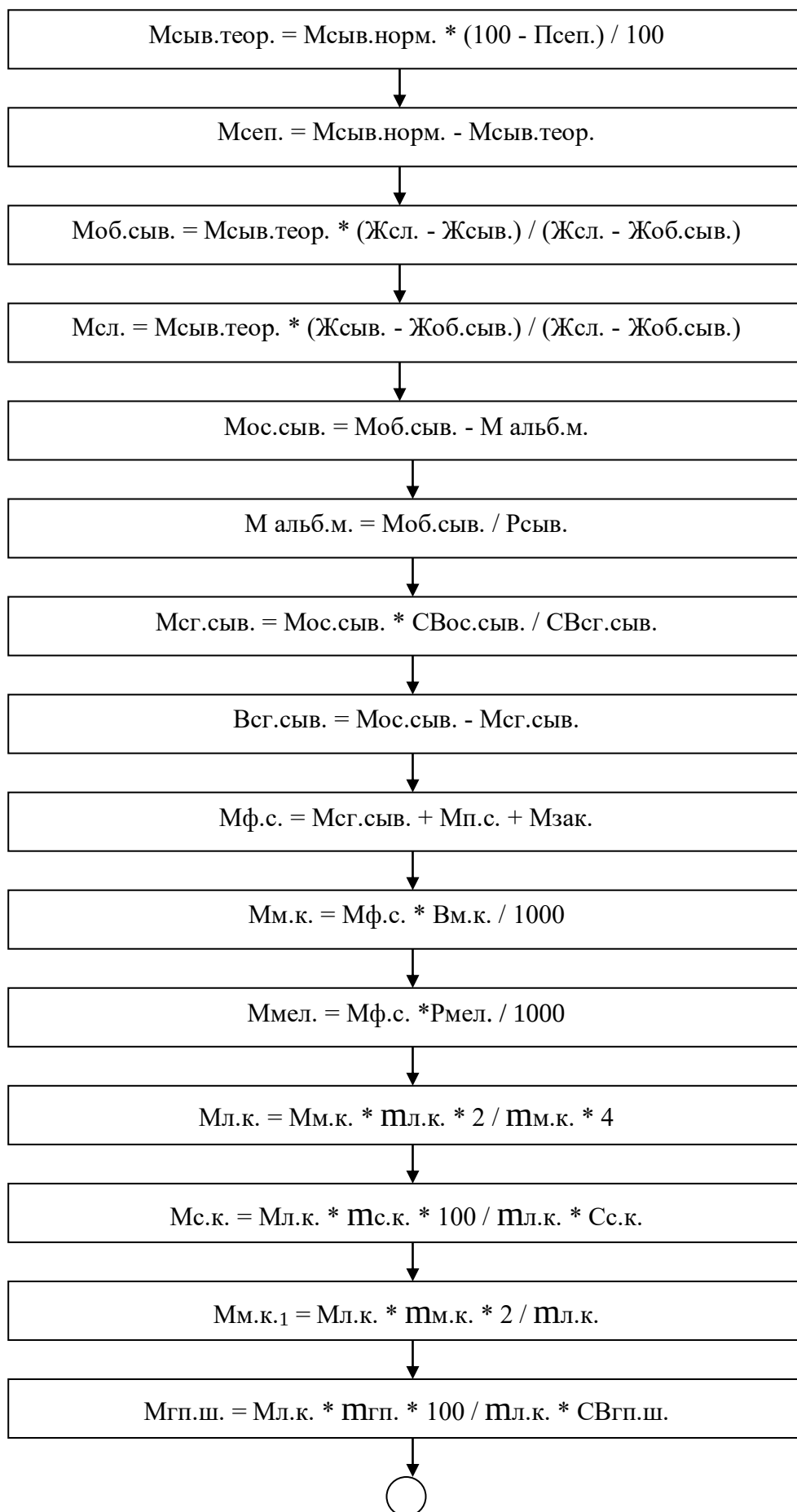
ПРИЛОЖЕНИЕ Д

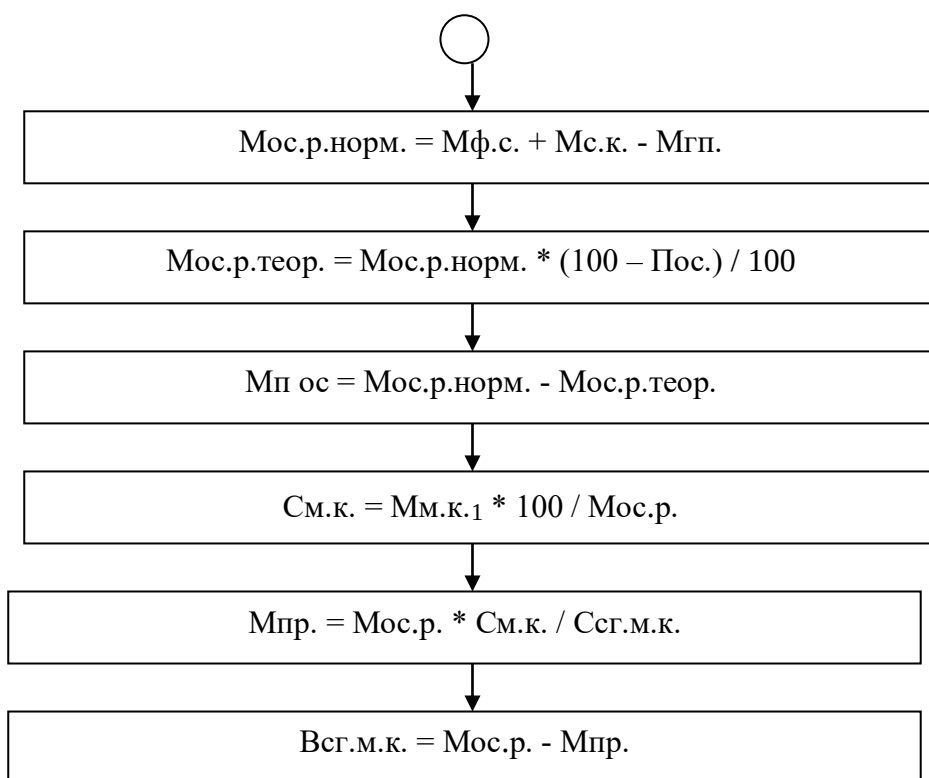
№ варианта	Целевой продукт	Производительность по перерабатываемой молочной сыворотке, кг
1	Этиловый спирт-сырец	75000
2	Этиловый спирт-сырец	80000
3	Этиловый спирт-сырец	85000
4	Этиловый спирт-сырец	90000
5	Этиловый спирт-сырец	95000
6	Этиловый спирт-сырец	100000
7	Этиловый спирт-сырец	105000
8	Этиловый спирт-сырец	110000
9	Этиловый спирт-сырец	115000
10	Этиловый спирт-сырец	120000
11	Этиловый спирт-сырец	125000
12	Этиловый спирт-сырец	130000

Примечание. Для всех вариантов принять:

- массовая доля сухих веществ обезжиренной молочной сыворотки 6,0 %;
- массовая доля лактозы в сыворотке 4,5 %;
- массовая доля жира сыворотки 0,4 %;
- массовая доля жира обезжиренной сыворотки 0,1 %;
- массовая доля жира подсырных сливок 35 %.

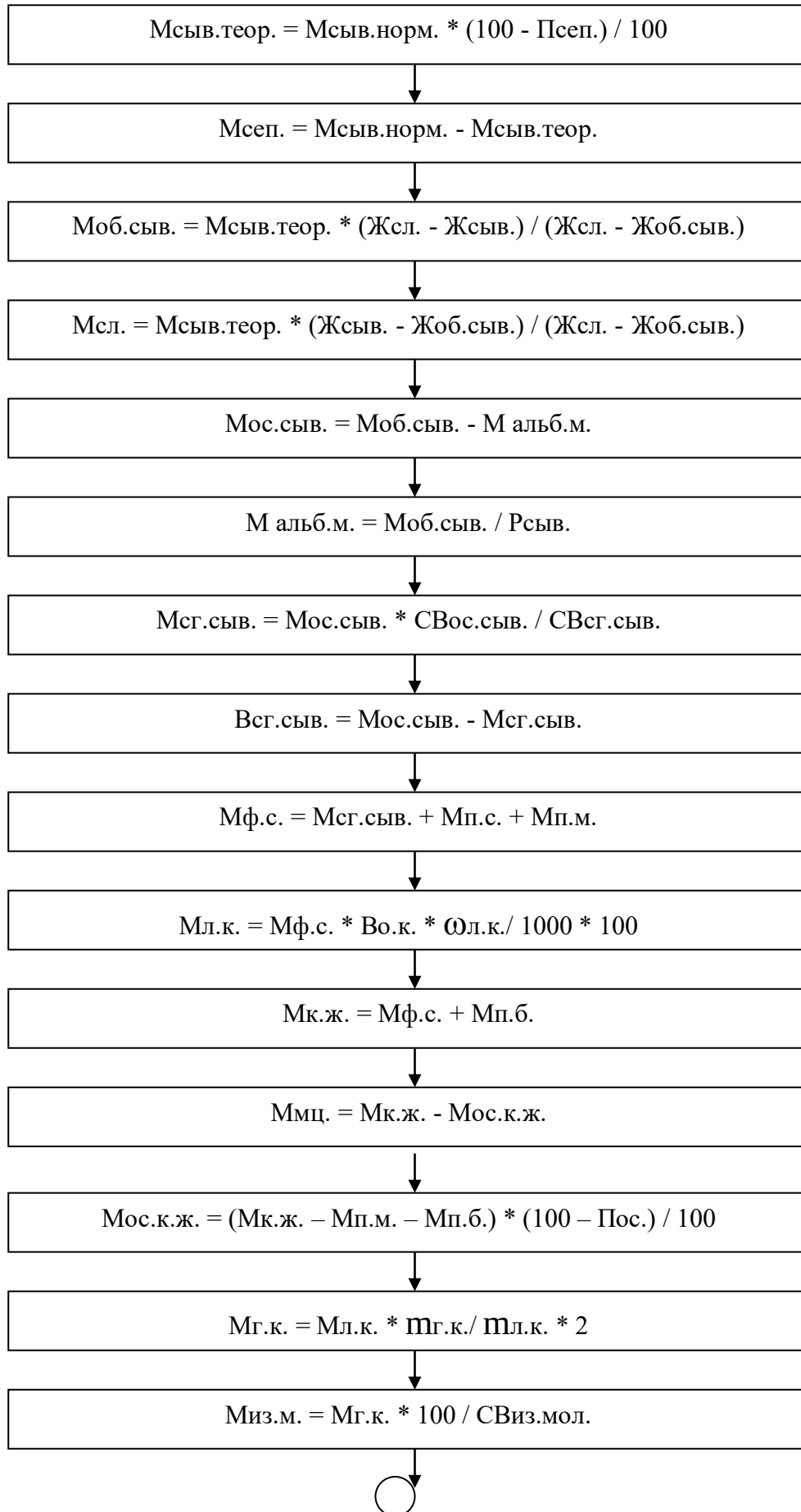
СХЕМА МАТЕРИАЛЬНОГО РАСЧЕТА МОЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ

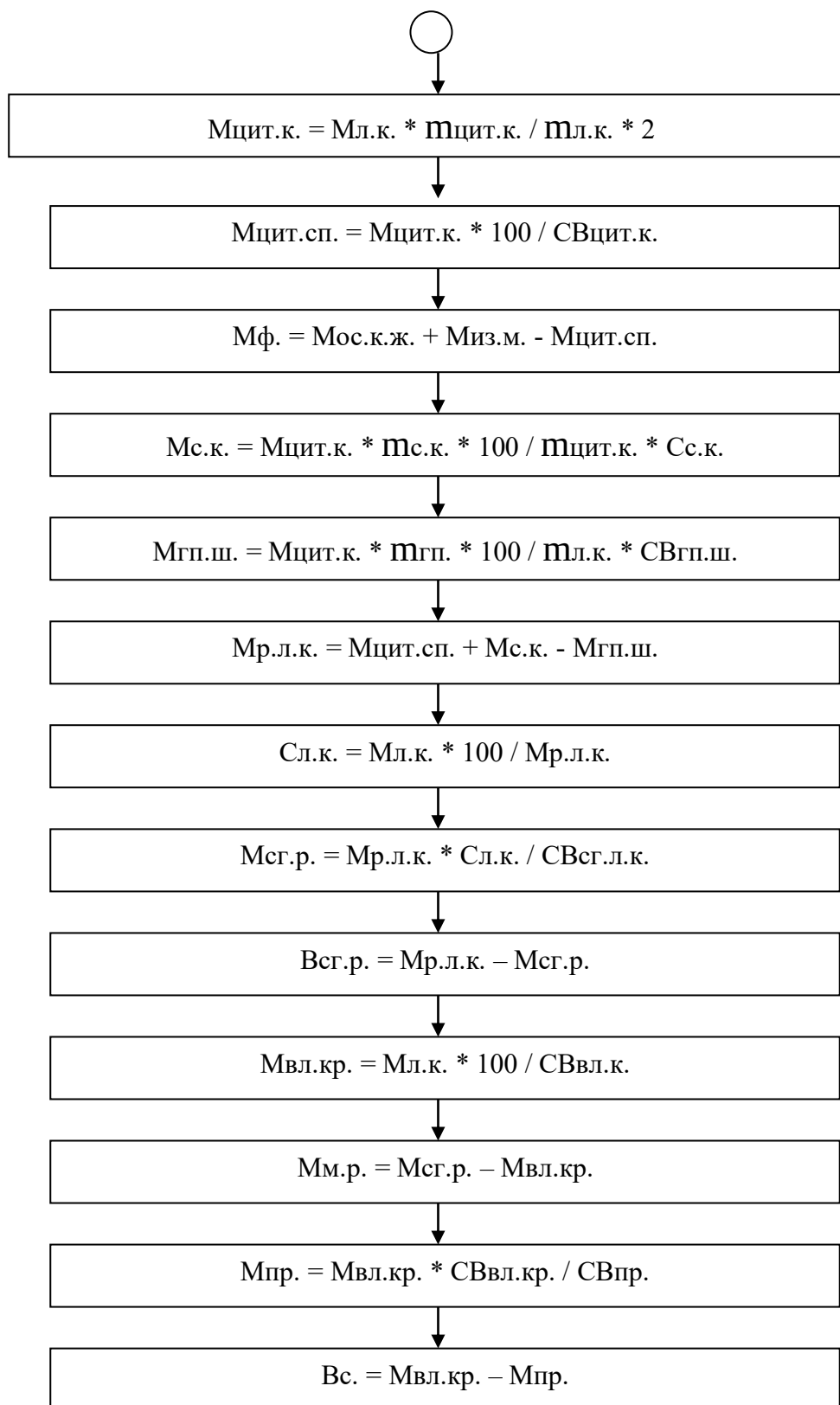




Пояснения к схеме расчета: $M_{сыв.норм.}$, $M_{сыв.теор.}$ – масса сыворотки нормативная и с учетом потерь при сепарировании; $P_{сеп.} = 0,454\%$ – нормативные потери сырья при сепарировании; $M_{сеп.}$, $M_{об.сыв.}$, $M_{сл.}$ – массы потерь при сепарировании, обезжиренной сыворотки и подсырных сливок; $M_{ос.сыв.}$, $M_{альб.м.}$ – массы осветленной сыворотки и альбуминного молока; $R_{сыв.}$ – расход сыворотки на 1 тонну альбуминного молока (20 т/т); $M_{сг.сыв.}$ – масса сгущенной сыворотки; $C_{вос.сыв.}$, $C_{сг.сыв.}$ – массовые доли сухих веществ осветленной (5,0 %) и подсгущенной (15,0 %) сыворотки; $V_{сг.сыв.}$ – массовая доля влаги, испаренной при сгущении сыворотки; $M_{ф.с.}$, $M_{п.с.}$, $M_{зак.}$ – массы ферментационной среды, питательных солей и закваски молочнокислых микроорганизмов; $M_{м.к.}$ – масса молочной кислоты в составе бражки по завершении ферментации; $V_{м.к.}$ – выход молочной кислоты из 1 тонны ферментационной среды (151,2 кг/т); $M_{мел.}$ – масса мела на нейтрализацию кислоты; $R_{мел.}$ – расход мела на 1 тонну ферментационной среды (84 кг/т); $M_{л.к.}$, $M_{с.к.}$, $M_{м.к.1}$, $M_{г.п.}$ – массы лактата кальция, раствора серной кислоты на обработку лактата кальция, восстановленной молочной кислоты и гипсового шлама; $C_{с.к.}$ – концентрация раствора серной кислоты (93 %); $C_{Вгп.ш.}$ – массовая доля сухих веществ гипсового шлама (60 %); $m_{л.к.}$, $m_{м.к.}$, $m_{с.к.}$, $m_{гп.}$ – молярные массы лактата кальция, молочной кислоты, серной кислоты, сульфата кальция; $M_{ос.р.норм.}$ – масса осветленного раствора молочной кислоты; $M_{ос.р.теор.}$ – масса осветленного раствора молочной кислоты с учетом потерь при осветлении; $M_{п.ос.}$ – масса потерь при осветлении; $P_{ос.}$ – потери сухих веществ с осадком (3 %); $M_{пр.}$ – масса готового продукта; $C_{м.к.}$, $C_{сг.м.к.}$ – концентрация молочной кислоты в осветленном растворе и готовом продукте (для технической молочной кислоты – 50 %).

СХЕМА МАТЕРИАЛЬНОГО РАСЧЕТА ЛИМОННОЙ КИСЛОТЫ

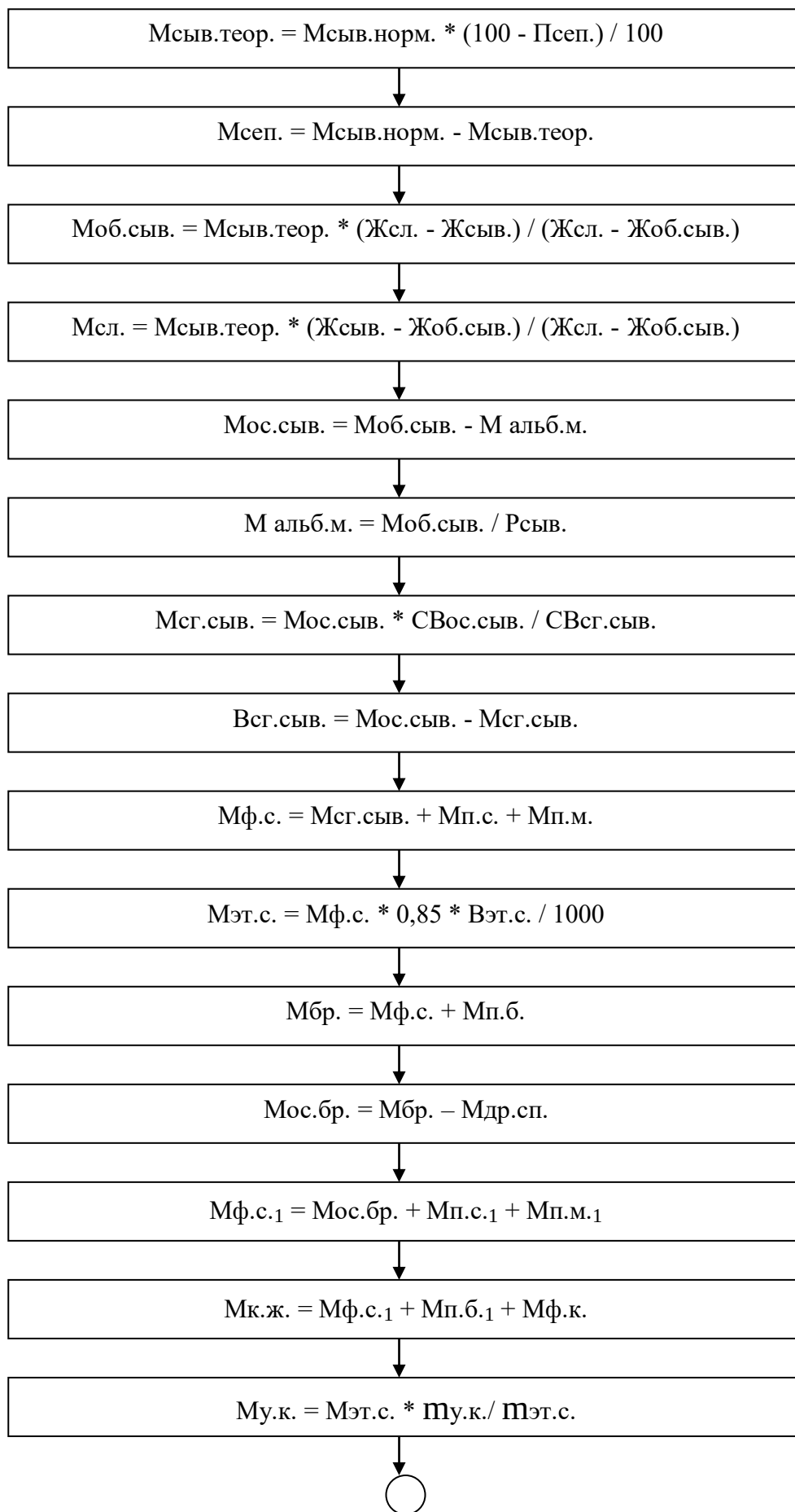


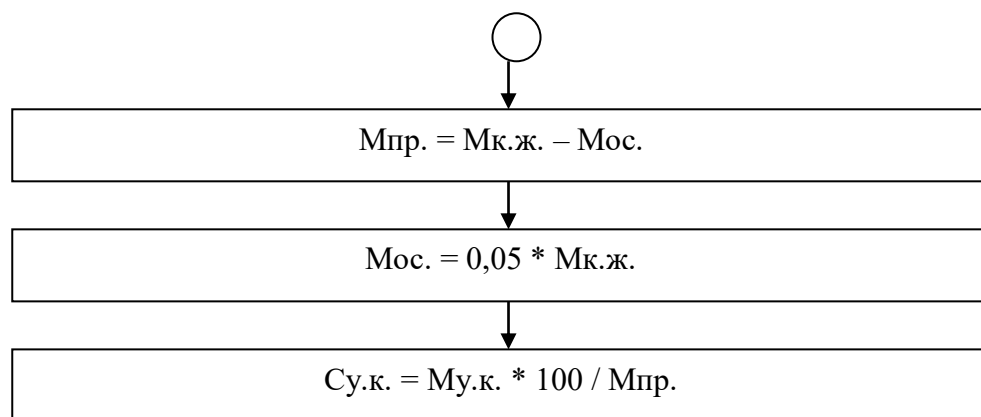


Пояснения к схеме расчета: Мсыв.норм., Мсыв.теор. – масса сыворотки нормативная и с учетом потерь при сепарировании; Псеп. = 0,454% - нормативные потери сырья при сепарировании; Мсеп., Моб.сыв., Мсл. – массы потерь при сепарировании, обезжиренной сыворотки и подсырных сливок; Мос.сыв., Мальб.м. – массы осветленной сыворотки и альбуминного молока;

Рсыв. – расход сыворотки на 1 тонну альбуминного молока (20 т/т); Мсг.сыв. – масса сгущенной сыворотки; СВос.сыв., СВсг.сыв. – массовые доли сухих веществ осветленной (5,0 %) и подсгущенной (20,0 %) сыворотки; Всг.сыв. – массовая доля влаги, испаренной при сгущении сыворотки; Мф.с., Мп.с., Мп.м. – массы ферментационной среды, питательных солей и посевного материала гриба; Мм.к. – масса лимонной кислоты в составе культуральной жидкости по завершении ферментации; Во.к. – выход органических кислот из 1 тонны ферментационной среды (120 кг/т); Ωл.к. – массовая доля лимонной кислоты от общей концентрации органических кислот (85 %); Ммц. – масса мицелия; Мк.ж., Мос.к.ж., Мп.б. – массы культуральной жидкости, осветленной культуральной жидкости и прироста биомассы гриба (из расчета 7-8 г/л ферментационной среды); Пос. – потери сухих веществ с осадком (5 %); Мг.к., Мцит.к., – массы гидроксида кальция, цитрата кальция, Миз.м. – масса известкового молока; СВизм. – массовая доля сухих веществ известкового молока; Мцит.сп. – масса цитратной суспензии; СВцит.сп. – массовая доля сухих веществ цитратной суспензии (20 %); Мф – масса фильтрата; Мс.к., Мгп.ш. – массы раствора серной кислоты на обработку цитрата кальция и гипсового шлама; Сс.к. – концентрация раствора серной кислоты (93 %); СВгп.ш.- массовая доля сухих веществ гипсового шлама (60 %); m_{г.к.}, m_{л.к.}, m_{цит.к.}, m_{с.к.}, m_{гп.} – молярные массы гидроксида кальция, лимонной кислоты, цитрата кальция, серной кислоты, сульфата кальция; Мр.л.к., Мсг.р. – массы осветленного и сгущенного растворов лимонной кислоты; Сл.к. – концентрация лимонной кислоты в осветленном растворе; Всг.р. – масса влаги, испаренной при сгущении раствора лимонной кислоты; СВсг.л.к., СВвл.кр. – массовая доля сухих веществ сгущенного раствора (70 %) и влажных кристаллов (85 %) лимонной кислоты; Мвл.кр., Мм.р., Мпр. – массы влажных кристаллов, маточного раствора (межкристалльной жидкости) и готового продукта; СВпр – массовая доля сухих веществ готового продукта (96 %); Вс – масса влаги, испаренной при сушке кристаллов лимонной кислоты.

СХЕМА МАТЕРИАЛЬНОГО РАСЧЕТА УКСУСНОЙ КИСЛОТЫ





Пояснения к схеме расчета: Мсыв.норм., Мсыв.теор. – масса сыворотки нормативная и с учетом потерь при сепарировании; Псеп. = 0,454% – нормативные потери сырья при сепарировании; Мсеп., Моб.сыв., Мсл. – массы потерь при сепарировании, обезжиренной сыворотки и подсырных сливок; Мос.сыв., Мальб.м. – массы осветленной сыворотки и альбуминного молока; Рсыв. – расход сыворотки на 1 тонну альбуминного молока (20 т/т); Мсг.сыв. – масса сгущенной сыворотки; СВос.сыв., СВсг.сыв. – массовые доли сухих веществ осветленной (5,0 %) и подсгущенной (18,0 %) сыворотки; Всг.сыв. – массовая доля влаги, испаренной при сгущении сыворотки; Мф.с., Мп.с., Мп.м. – массы ферментационной среды для спиртового брожения, питательных солей для культивирования дрожжей и посевного материала дрожжей; Мэт.с. – масса этилового спирта в составе культуральной жидкости по завершении ферментации; Вэт.с. – теоретический выход этилового спирта на 1 тонну ферментационной среды (72-73 кг/т); Мбр., Мос.бр – массы бражки и осветленной бражки; Мп.б. – прирост биомассы дрожжей (из расчета 2-3 г/ литр среды); Мдр.сп. – масса дрожжевой суспензии, отделяемой на сепараторе (из расчета 10% от массы бражки); Мф.с.1, Мп.с.1, Мп.м. – массы ферментационной среды для уксуснокислой ферментации, питательных солей для культивирования уксуснокислых бактерий и посевного материала уксуснокислых бактерий; Мк.ж., Мп.б.1, Мф.к. – массы культуральной жидкости, прироста биомассы уксуснокислых бактерий (из расчета 4-5 г / литр ферментационной среды), ферроцианида калия для осветления раствора уксуса (3 % от массы ферментационной среды); Му.к. – масса уксусной кислоты в составе культуральной жидкости; Му.к., Мэт.с. – молярные массы уксусной кислоты и этилового спирта; Мпр., Мос. – массы продукта (осветленный раствор уксуса) и осадка, образующегося при осветлении раствора уксуса (5 % от массы культуральной жидкости); Су.к. – концентрация уксусной кислоты в осветленном растворе.

ПРИЛОЖЕНИЕ Ж

№ варианта	Целевой продукт	Производительность по перерабатываемой молочной сыворотке, кг
1	Молочная кислота техническая	75000
2	Молочная кислота техническая	85000
3	Молочная кислота техническая	95000
4	Молочная кислота техническая	105000
5	Лимонная кислота (глубинная ферментация)	60000
6	Лимонная кислота (глубинная ферментация)	70000
7	Лимонная кислота (глубинная ферментация)	80000
8	Лимонная кислота (глубинная ферментация)	90000
9	Уксусная кислота	45000
10	Уксусная кислота	50000
11	Уксусная кислота	55000
12	Уксусная кислота	60000

Примечание. Для всех вариантов принять:

- массовая доля сухих веществ обезжиренной молочной сыворотки 6,0 %;
- массовая доля лактозы в сыворотке 4,5 %;
- массовая доля жира сыворотки 0,4 %;
- массовая доля жира обезжиренной сыворотки 0,1 %;
- массовая доля жира подсырных сливок 35 %.

ПРИЛОЖЕНИЕ 3

№ варианта	Целевой продукт	Производительность, кг перерабатываемого сырья (свеклосахарной мелассы)
1	Концентрат кормового лизина	3500
2	Концентрат кормового лизина	4000
3	Концентрат кормового лизина	4500
4	Концентрат кормового лизина	5000
5	Концентрат кормового лизина	5500
6	Концентрат кормового лизина	6000
7	Концентрат кормового лизина	6500
8	Концентрат кормового лизина	7000
9	Концентрат кормового лизина	7500
10	Концентрат кормового лизина	8000
11	Концентрат кормового лизина	8500
12	Концентрат кормового лизина	9000