

Зарегистрировано  
« \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2018 г.  
\_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_  
подпись (расшифровка подписи)

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

ИНСТИТУТ ИНЖЕНЕРНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ И ЕСТЕСТВЕННЫХ НАУК

**Кафедра биотехнологии и микробиологии**

**ВЛИЯНИЕ ПОСЕВНОЙ ДОЗЫ КУЛЬТУРЫ CORYNEBACTERIUM  
GLUTAMICUM НА КОНЦЕНТРАЦИЮ КЛЕТОК В ПРЕФЕРМЕНТЕРЕ И  
БИОСИНТЕЗ ЛИЗИНА**

Выпускная квалификационная работа  
Магистранта биолого-химического факультета  
очной формы обучения  
направления подготовки 19.03.01 Биотехнология  
2 курса группы 07001644  
Балановского Алексея Георгиевича

Научный руководитель:

Профессор, зав. каф. Биотехнологии и  
микробиологии Батлуцкая И.В.

БЕЛГОРОД 2018

## Содержание

Введение.....	3
1. Обзор литературы .....	6
1.1. Основные этапы развития биотехнологии .....	6
1.2. О необходимости развития промышленной технологии получения синтетических аминокислот .....	12
1.3. О применении кормовых аминокислот в животноводстве.....	17
1.4. Методы получения синтетических аминокислот .....	18
1.5. Краткое описание технологии .....	21
1.6. Состав и форма выпуска готового продукта.....	31
2. Методы исследований, условия и объект.....	32
2.1. Объект исследования. Описание бактерии <i>Corynebacterium glutamicum</i>	32
2.2. Закономерности роста чистых культур при периодическом культивировании. ....	36
2.3. Методы исследования.....	42
2.4. Условия исследований (приготовление питательных сред, подготовка оборудования к работе, методики испытаний и пр.).....	45
2.4.1. Получение воды очищенной.....	45
2.4.2. Санитарная обработка производства .....	46
2.4.3. Приготовление питательных сред LB с биотином и глюкозой.....	49
2.4.4. Методика определения содержания лизина в КЖ методом ТСХ с хроматоденситометрией. ....	50
2.4.5. Определение оптической плотности культуральной жидкости (OD) .....	54
3. Результаты исследований.....	57
3.1. Методика серийных разведений и определения КОЕ (колонеобразующих единиц) .....	61
Заключение .....	82
Список использованной литературы.....	84

## Введение

Биотехнология (биоинженерия) – это наука о генно-инженерных и клеточных методах и технологиях создания и использования генетически модифицированных растений, животных и микроорганизмов в целях интенсификации производства и получения новых продуктов различного назначения.

Основная цель и задачи биотехнологии направлены на разработку методов и приемов, позволяющих получить биологически активные соединения (ферменты, гормоны, аминокислоты, вакцины, лекарственные препараты), а также конструирование молекулы новых веществ и создание форм организмов, отсутствующих в природе (химерные гибридные молекулы, химерные животные и растительные ткани и организмы).

Другими словами, биотехнология – это наука об использовании биологических процессов в технике и промышленном производстве.

Название ее происходит от греческих слов «bios» – жизнь, «teken» – искусство, «logos» – слово, учение.

Биотехнология создает возможность получения разнообразных веществ и соединений из сравнительно дешевых, доступных и возобновляемых материалов. Сегодня биотехнология – это наука, промышленность и многомиллионный бизнес.

Фундаментом современной биотехнологии являются молекулярная биология, микробиология, генетика, биохимия, биофизика, технология, приборостроение. За последние 40-50 лет произошло скачкообразное развитие этих наук, что привело к форменной революции в производстве ветеринарных и медицинских биопрепаратов, созданию трансгенных растений и животных с заданными уникальными свойствами. Подобные исследования являются приоритетными направлениями научно-технического прогресса и в XXI веке займут ведущее место среди всех наук.

Тема данной работы направлена на поиск технологических решений для повышения рентабельности производственных процессов получения кормового L-лизина.

Цель исследования: изучение влияния засевной дозы на скорость нарастания биомассы *Corynebacterium glutamicum-11404* в преферментёре и уровень продуктивности биосинтеза лизина в основном ферментере.

Для достижения поставленной цели сформулированы следующие задачи:

- проанализировать литературные данные по наработке посевного материала для биосинтеза лизина;
- изучить производственную технологию получения L-лизина;
- провести анализ скорости накопления клеток культуры в преферментере при разных дозах посева: 10%, 1%, 0,01%;
- проверить состояние культуры путем определения КОЕ/г (см<sup>3</sup>), при разных дозах посева 10%, 1%, 0,01%;
- проанализировать динамику роста культуры и скорость накопления лизина в рабочем ферментере инокулированного преферментером с разными дозами посева 10%, 1%, 0,01%;
- сделать выводы о влиянии засевной дозы на скорость нарастания биомассы *Corynebacterium glutamicum-11404* в преферментёре и уровень продуктивности биосинтеза лизина в основном ферментере.

Предмет исследовательской работы – скорость роста популяции продуцента – *Corynebacterium glutamicum-11404* в преферментере.

Объектом исследования является технологический процесс синтеза лизина штаммом *C. glutamicum-11404*.

Метод исследования – биологический эксперимент проведенный в условиях промышленного производства.

Принятая производственная технологическая схема наработки посевного материала имеет следующую «инокуляционную цепь»: 50мл – 500 мл – 10 л –

30м<sup>3</sup> – 300 м<sup>3</sup>, что позволяет получать необходимый объем конечного продукта за 86 часов.

Поставленные задачи по увеличению засевной дозы преферментера должны показать насколько изменится его продолжительность роста и как повлияет инокулят на уровень продуктивности в основном ферментере. Решение данной проблемы имеет большое значение для изучения возможности изменения продолжительности технологического цикла в сторону уменьшения. Укороченный технологический цикл позволит уменьшить расход энергоносителей (пар, электроэнергия и пр.) и повысить коэффициент использования оборудования. Если при увеличении засевной дозы уровень продуктивности культуры повысится, то будет получен больший объем готовой продукции. Следствием проведенных исследований станет уменьшение себестоимости готовой продукции и повышение рентабельности производства лизина.

## 1. Обзор литературы

### 1.1. Основные этапы развития биотехнологии

По мере формирования и развития человеческого общества формировалась и эволюционировала наука об использовании живых объектов и систем. Ее возникновение, становление и развитие условно можно подразделить на 4 периода.

I. Эмпирический (греч. «эмперикос» – опытный), или доисторический, который охватывает примерно 8000 лет. Интуитивно используемые людьми приемы и способы изготовления хлеба, пива, уксуса, вина, получение кисломолочных продуктов, квашение капусты, силосование, которые теперь относят к разряду биотехнологических.

II. Этиологический (греч. «аитиа» – причина) период в развитии биотехнологии охватывает вторую половину XIX века и первую треть XX века (1856-1933 гг.). Основоположником научной микробиологии считают выдающегося исследователя – великого французского ученого Луи Пастера (1822-1895). Пастер установил микробную природу брожений, доказал возможность жизни в бескислородных условиях, предложил метод пастеризации как способ стерилизации, который уничтожал вредоносные микробы во всех жидкостях, создал научные основы вакцинопрофилактики и вакцинотерапии. Изучая страшное заболевание – сибирскую язву ему удалось разработать вакцину, которая представляла собой ослабленную бациллу, позволяющую подготовить организм к тяжелой форме болезни.

Ему мы обязаны, существованием прививок, которые помогают нам научить организм сопротивляться различным болезням. Открытие Пастера помогло увеличить продолжительность жизни.

Его выдающиеся ученики, сотрудники и коллеги – Э. Дюкло, Э. Ру, И.И. Мечников, Р. Кох, Д. Листер, Ш. Китагато, Д.И. Ивановский и др.

И. И. Мечников является создателем фагоцитарной теории иммунитета. Он показал, что одним из важнейших механизмов, помогающим человеку бороться с проникшими в его организм болезнетворными микробами, является клеточная защита. За создание фагоцитарной теории иммунитета он посвятил 25 лет жизни и был удостоен первой Нобелевской премии.

Важным этапом в биотехнологии явился этап создания питательных сред для культивирования микроорганизмов и культур клеток. Уже в 1859 г. Л. Пастер приготовил жидкую питательную среду, Р. Коху в 1876 г. удалось вырастить бациллы сибирской язвы в капле водянистой влаги, извлеченной из глаза погибшей коровы. Р. Кох предложил метод культивирования бактерий на стерильных ломтиках картофеля, а позднее – на агаризованных питательных средах. В результате чего удалось доказать индивидуальность микроорганизмов по способу питания и получить их в чистых культурах. Доказано, что каждый вид может быть размножен на селективных питательных средах и использован в целях воспроизведения соответствующих процессов (броидильных, окислительных и др.).

В этот период было начато изготовление прессованных пищевых дрожжей, а также продуктов метаболизма бактерий – ацетона, бутанола, лимонной и молочной кислот. Во Франции приступили к созданию биоустановок для микробиологической очистки сточных вод с помощью консорциумов микроорганизмов, утилизирующих все группы загрязнителей.

Были разработаны проекты по конструированию, созданию и внедрению в практику необходимого оборудования для биосинтеза, в том числе главного из них – биореактора (ферментера, аппарата-культиватора). Это оборудование, претерпевшее значительное совершенствование, используют и в настоящее время.

Отмечены следующие научные достижения:

1868 г. – Ф. Мишер получил «нуклеин» (ДНК) из лейкоцитов;

1902 г. – Г. Хаберланд показал возможность культивирования клеток различных тканей растений в простых питательных растворах;

1912 г. – Ц. Нейберг раскрыл механизм процессов брожения;

1913 г. – Л. Михаэлис и М.Л. Ментен разработали кинетику ферментативных реакций.

III. Биотехнический период (1933-1972 гг.).

В 1933 г. А. Клюйвер и А.Х. Перкин опубликовали работу «Методы изучения обмена веществ у плесневых грибов». Началось внедрение в биотехнологию крупномасштабного герметизированного оборудования, а также систем и способов его стерилизации, обеспечивающего проведение процессов в стерильных условиях. После открытия Александром Флемингом пенициллина разрабатываются процессы и аппараты для глубинного культивирования продуцентов, что резко удешевило производство данного антибиотика, и он стал доступным для широкого использования в клинической практике во время второй мировой войны. После войны быстрыми темпами развивались процессы ферментации для производства антибиотиков, стероидных гормонов. В развитии промышленного биотехнологического оборудования был период становления и развития производства антибиотиков, когда возникла острая необходимость в противомикробных препаратах для лечения больных с инфицированными ранами во время Второй мировой войны 1939-1945 гг.

Все прогрессивные идеи в области технических разработок и биотехнологических дисциплин, достигнутое к тому времени, быстро воплощались в жизнь.

1937 г. – Кребс открыл цикл трикарбоновых кислот.

1953 г. – Ф. Крик и Дж. Уотсон расшифровали структуру ДНК.

Данные факты стали толчком для разработки способов крупномасштабного культивирования клеток для получения разнообразных продуктов клеточного метаболизма – пенициллина, стрептомицина, тетрациклинов, декстрана, ряда аминокислот и подобных веществ.



К 1950 г. Ж. Моно разработал теоретические основы непрерывного управляемого культивирования микробов, продолженные в своих исследованиях М. Стефенсон, И. Малек, М.Д. Иерусалимский.

Французский ученый Р. Горте предложил способ в работе по культуре ткани -долгого культивирования растительных тканей *in vitro* (в стекле) за счет периодического пересаживания их на свежую питательную среду.

В 1955 г. с открытием нового класса фитогормонов-цитокининов (например, кинетин) была получена возможность стимулировать деление клеток, поддерживать рост каллусной ткани, индуцировать морфогенез.

В нашей стране в институте физиологии растений А.А. Курсановым и Р.Г. Бутенко достигнут большой успех в биотехнологии растений. Р.Г. Бутенко сконцентрировала свое внимание на изучении физиологии изолированных верхушечных почек при переходе из вегетативного в генеративное состояние. В 1960-х годах в лаборатории культуры тканей и морфогенеза, возглавляемой Р.Г. Бутенко, начаты работы по оздоровлению меристем растений и последующему их клональному размножению. В данном аспекте были изучены условия микроразмножения целого ряда ценных сельскохозяйственных и промышленных культур.

В процессе воспроизводства животных есть вклад биотехнологических знаний. И.И. Ивановым был предложен метод искусственного осеменения животных. В 1890 г. английский биолог У. Вальтер провел успешную трансплантацию зиготы у кроликов и получил потомство. Начиная с 1930 г. проводились многочисленные опыты по трансплантации эмбрионов у лабораторных и сельскохозяйственных животных. Наиболее успешные опыты по трансплантации эмбрионов овец проводил А.И. Лопырин, а свиней – А.В. Квасницкий.

IV. Период биотехнологии – геннотехнический (греч. «гинесис» – происхождение, возникновение, рождение) – начался с 1972 г. В этом году в США П. Берг создал первую рекомбинантную молекулу ДНК. Так появилась возможность осуществлять манипуляции с генетическим материалом бактерий.

Фундаментальные работы Ф. Крика и Дж. Уотсона (1953 г.) по установлению структуры ДНК и расшифровки генетического кода (М. Ниренберг, С. Очао, Г. Корана, 1962-1966 гг.) – фундаментальные результаты в области биотехнологии. Выяснение механизмов функционирования и репликации ДНК, выделение и изучение специфических ферментов привело к формированию строго научного подхода к разработке биотехнических процессов на основе генно-инженерных манипуляций.

В 1977 г. К. Итакура и Г. Бойера синтезировали ген гормона соматотропина человека, а в 1979 г. – ген инсулина человека.

Наряду с инсулином разработаны следующие генно-инженерные препараты: интерфероны, фактор некротизации опухоли (TNF), интерлейкин-2, соматотропный гормон человека и аналог его соматодомин Ц,  $\alpha$ -антитрипсин, гемопоэтин и др.

В 1982 г. американские ученые Р. Пальмитер, Р. Бринстер получили первых трансгенных мышей.

Изобретение в 1985 г. К. Мулисом полимеразной цепной реакции, позволившей сделать рутинным процесс синтеза генов дало большие возможности генной инженерии. Келлером и Милстайном (1975 г.) разработаны методики получения моноклональных антител.

В 1962 г. впервые осуществлено клонирование (копирование) на основе наследственности одного из родителей животных Гердоном (на лягушках и Вилмутом (1997 г.) – на овцах. В настоящее время численность клонированных животных более сотни, некоторые – в 3-4 поколениях.

Разработанная С. Вилладсен микрохирургическая методика деления эмбриона и получения искусственных близнецов, позволила получать большое количество однородных животных, что способствует производству высококачественного мясного скота.

Медицина – антибиотики, ферменты, аминокислоты, кровезаменители, иммунорегуляторные препараты и противовирусные препараты, новые вакци-

ны, гормональные препараты (инсулин, гормон роста), моноклональные антитела для диагностики и лечения, продукты для диетического питания;

– Растениеводство – биорациональные пестициды, бактериальные удобрения, производство безвирусного посадочного материала, создание высокопродуктивных сортов и гибридов, устойчивых к болезням, засухе, заморозкам, засоленности почв;

– Пищевая промышленность – белок, пищевые аминокислоты, заменители сахара (аспартам, глюкозофруктозные сиропы с различным уровнем ДЕ), переработка пищевых продуктов;

– Энергетика и добыча полезных ископаемых – спирты, биогаз, жирные кислоты, алифатические углеводороды, водород, уран, а также интенсификация добычи нефти, газа, угля, биометаллургия;

– Тяжелая промышленность – улучшение технических характеристик каучука, бетонных, цементных, гипсовых растворов, моторных топлив;

– Легкая промышленность – улучшение технологий переработки кож, парфюмерно-косметических изделий, получение биополимеров, искусственных кожи и шерсти.

– Биоэлектроника – биосенсоры, биочипы;

– Космонавтика – создание замкнутых систем жизнеобеспечения в космосе;

– Экология – утилизация сельскохозяйственных, промышленных и бытовых отходов, биодegradация трудноразлагаемых токсических веществ (пестицидов, гербицидов и пр.), создание замкнутых технологических циклов, производство безвредных пестицидов, легкоразрушаемых полимеров.

– Животноводство – создание высокопродуктивных пород, пересадка оплодотворенных яйцеклеток и эмбрионов, разработка ветеринарных препаратов (антибиотики, вакцины и т.д.), гормонов роста, усовершенствование кормовых рационов (производство белка, аминокислот, витаминов, кормовых антибиотиков, ферментов, заквасок для силосования).

Данное направление является одним из важнейших условий интенсивного развития животноводства – укрепление кормовой базы путем увеличения производства кормов, в том числе кормового белка и кормовых добавок.

## **1.2. О необходимости развития промышленной технологии получения синтетических аминокислот**

На современном этапе развития науки проблема белкового питания практически переросла в проблему обеспечения продуктивных животных определенным набором аминокислот. Если жвачные животные могут благодаря интенсивной деятельности микрофлоры рубца использовать для удовлетворения потребностей в белке простейшие соединения азота (типа мочевины), то моногастричным животным необходим белок со строго определенным набором аминокислот.

Как известно, любой живой организм – в первую очередь белковый организм. Белок является составной частью клеточных структур (микротрубочки, микрофиламенты, фибриллы и др.), гормонов (инсулин, кортикотропин, глюкагон), иммуноглобулинов, входит в состав многих ферментов (миозин, протеинкиназы). Всё это многообразие достигается лишь при различной комбинации 20 аминокислот. Некоторые из них могут синтезироваться организмом самостоятельно в ходе метаболических реакций из белка пищи. Для полноценного развития любого млекопитающего организма в первую очередь необходимо непрерывное поступление в процессе питания восьми незаменимых аминокислот. Не всегда существует доступ к продуктам, богатым этими соединениями. Этот вопрос решается путём искусственного их получения и создание на полученных соединениях биологически активных препаратов (БАД) и пищевых добавок для человека. В случае обеспечения питанием продуктивных животных – сельскохозяйственная отрасль занимается пептидным обогащением кормов.

Животные могут полностью использовать корма только при содержании в кормовом белке необходимых аминокислот. Однако в зерне злаковых расте-

ний белка недостаточно, и он дефицитен по таким жизненно необходимым аминокислотам, как лизин, метионин и триптофан. При недостатке даже одной из этих незаменимых аминокислот белок зерна не используется животными. Перерасход комбикормовых концентратов из-за недостатка высококачественного белка – причина больших потерь кормов. Если добавить к растительному рациону, содержащему 13 процентов протеина, недостающие аминокислоты, то продуктивность животных резко повышается и одновременно достигается значительная экономия основного корма. Например, при добавлении лизина, метионина и триптофана прирост массы свиней повышается на 30 % при одновременной экономии корма на 20 %.

Качество белков корма напрямую зависит от его аминокислотного состава. На сегодняшний день известно более 100 аминокислот, но в кормлении сельскохозяйственных животных и птицы особое значение имеют только 20 из них.

В образовании тканей организма животного участвуют не менее 22 аминокислот. Синтез белка происходит согласно генетическому коду и зависит от обеспеченности организма животного необходимым количеством отдельных аминокислот. Если недостаток заменимых аминокислот может быть устранен за счет процессов синтеза или трансаминирования (переноса аминогрупп), то дефицит незаменимых аминокислот приведет к нарушению синтеза белка.

Немецкий химик Юстус Либих в 1840 году сформулировал следующий принцип: «Рост организма ограничивается тем ресурсом, которого недостает в наибольшей мере (лимитирующий ресурс)». Этот принцип получил название закона Либиха, или «бочки Либиха» (по аналогии с бочкой, уровень воды в которой не может быть выше, чем высота самой низкой доски). Закон Либиха помогает рассчитать оптимальное количество удобрений или кормов, которые нужно вносить под ту или иную сельскохозяйственную культуру или в рацион животных.

---

Та аминокислота, которая в этом случае первой остановит синтез белка, носит название первой лимитирующей аминокислоты рациона. Наглядно это определение демонстрирует так называемая Бочка Либиха как показано на рис.1.1. Каждая доска в ней соответствует незаменимой аминокислоте. Самая короткая доска (первая лимитирующая аминокислота) определяет емкость бочки, или тот уровень, на котором животное может использовать протеин рациона для синтеза белка. При удлинении короткой доски (или уровня соответствующей аминокислоты в рационе) синтез белка может быть повышен до уровня второй лимитирующей аминокислоты и т.д. Таким образом, добавление даже небольшого количества лимитирующей аминокислоты будет способствовать значительному улучшению качества корма. В зерновых рационах для свиней первой лимитирующей аминокислотой обычно является лизин, в то время как для птицы – метионин.

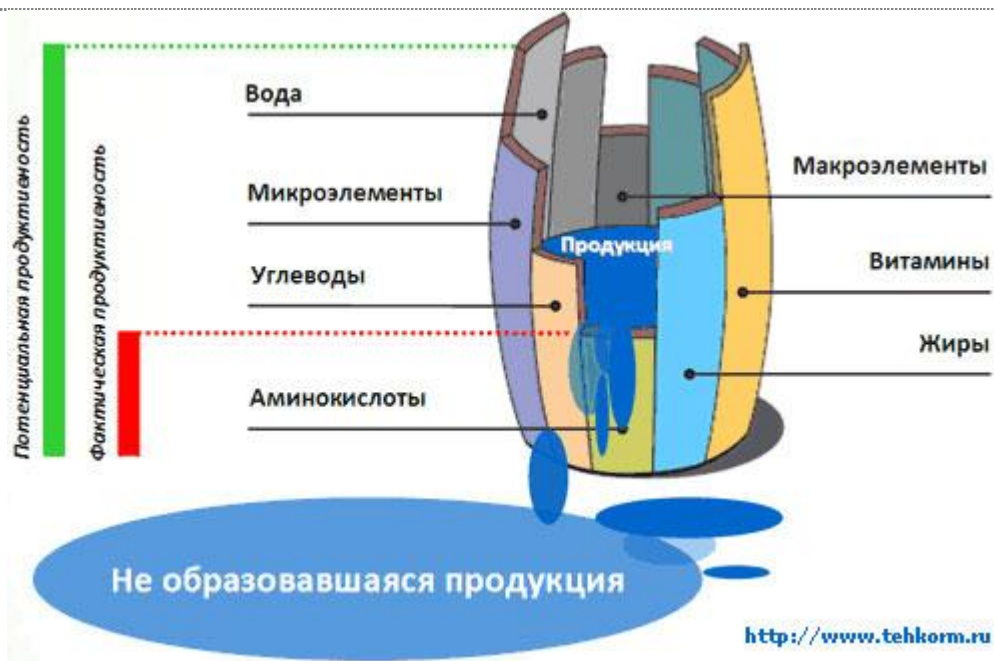


Рис. 1.1. Бочка Либиха.

Промышленное производство аминокислот началось в 1948 году, когда с помощью химического синтеза из акролеина, метилмеркаптана и синильной кислоты был получен первый килограмм DL-метионина. В 1958 году была осуществлена успешная попытка получить *invitro* L-глутаминовую кислоту, после чего с помощью ферментативной технологии началось интенсивное промышленное производство и других аминокислот.

Для ферментативного производства аминокислот с помощью классических методов биотехнологии был отобран и усовершенствован ряд штаммов микроорганизмов. В настоящее время этим способом в больших количествах производятся L-лизин и L-треонин, и в несколько меньших объемах – L-триптофан.

Современная биотехнология открывает новые возможности для дальнейшего совершенствования существующих и разработки новых технологий производства широкого спектра аминокислот, необходимых для оптимизации рационов.

В связи с этим большое значение приобретает тщательное изучение потребности сельскохозяйственных животных в незаменимых аминокислотах.

Промышленное производство чистых синтетических аминокислот превратило их в привычные для рутинного применения привлекательные кормовые добавки. При введении кристаллических аминокислот в рационы значительно улучшается качество протеина, а обеспеченность животного белком более точно соответствует потребностям, что в результате приводит к более эффективному использованию кормов. Применение синтетических аминокислот связано с целым рядом преимуществ.

Кристаллические аминокислоты позволяют специалистам по кормлению более гибко подходить к выбору кормового сырья и успешно использовать при расчете рационов местные виды сырья, которые зачастую дефицитны по содержанию отдельных аминокислот. Например, в Европе введение в рационы синтетических аминокислот расширило использование гороха и бобов.

---

Жмыхи и шроты – отходы масложивотной промышленности – являются ценным кормом, богатым протеином (от 20 до 59%). переваримость белка в этих продуктах составляет 75-90%. По биологической ценности протеины шротов масличных культур значительно превосходят белки зерна злаковых. Некоторые из них по качеству приближаются к белкам животного происхождения. Но они плохо сбалансированы по аминокислотному составу и имеют дефицит по незаменимым аминокислотам. Содержание лизина в них варьируется, но обычно бывает низким. Поэтому, только шроты не могут обеспечить достаточного балансирования белков злаковых, их следует дополнять животным белком. В результате чего, поиск путей повышения эффективности использования кормовых добавок, а в частности аминокислот, является актуальным в наши дни.

Стоимость подсолнечника значительно ниже по сравнению с соей, подсолнечные жмыхи и шроты являются самыми дешевыми источниками протеина. Цена подсолнечного шрота в зависимости от качества и сезона года в 2,5-3,5 раза ниже, чем соевого. Однако содержание лизина и его доступность из продуктов переработки подсолнечника уступает соевым кормам и поэтому, в комбикорма, содержащие подсолнечные шроты и жмыхи необходимо добавлять синтетический лизин в большем количестве.

В зарубежной практике продукты переработки подсолнечника меньше используются в кормлении птицы, так как высокое содержание клетчатки, количество которой даже в очищенном шроте обычно не менее 11-12%, низкое содержание энергии приводит к объёмистым рационам, которые могут вызвать проблемы, особенно у молодняка птицы, имеющего ограниченные возможности пищеварительной системы. Однако применение ферментных препаратов, гранулирование кормов, использование жиров, балансирование по аминокислотам дает возможность эффективно применить эти продукты в птицеводстве.

Для реализации генетического потенциала современных пород животных, необходимо их обеспечивать кормами, которые наиболее точно соответствует



их потребности в питательных веществах. Приготовить такие, высококонцентрированные корма можно только используя кристаллические аминокислоты.

Аминокислоты делают современное производство продуктов животноводства более безопасным, по той причине, что в районах с интенсивным животноводством возникает проблема загрязнения подземных вод азотом. Чтобы снизить выделение азота в окружающую среду не снижая численность поголовья животных очевидно использование кристаллических аминокислот. Снижение уровня протеина в финишных рационах свиней на 2% при одновременном добавлении синтетических аминокислот снижает выделение азота на 20-30% при поддержании уровня продуктивности.

Подобное уменьшение уровня протеина в рационах кур-несушек приводит к снижению выделения азота на 20%.

Если бы дефицит метионина в промышленных кормах должен был быть компенсирован только за счет использования рыбной муки, потребовалось бы выловить около 90 миллионов тонн рыбы, или более 50% всего мирового улова.

Аминокислоты снижают стоимость кормов, поэтому вопрос удешевления их производства является важнейшей экономической составляющей.

---

### **1.3.0 применении кормовых аминокислот в животноводстве**

Лизин и метионин широко используются в птицеводческой и свиноводческой отраслях. Сравнительно недавно стали использовать L-треонин и в меньшей степени L-триптофан. Более широкое использование этих аминокислот будет зависеть от стоимости их производства и стоимости соответствующего сырья для производства кормов.

У жвачных животных бактерии и другие микроорганизмы рубца превращают в летучие жирные кислоты, клетчатку и легкоусвояемые полисахариды, синтезируют витамины, а также белок из простых азотистых соединений. Поэтому вопрос о снабжении жвачных животных протеином, в том числе

и аминокислотами, в основном решается за счет поступления в организм любого протеина и даже небелковых азотистых веществ. Совсем другое наблюдается у многих моногастричных животных.

В процессе длительного филогенетического развития у животных вырабатывалась различная способность синтезировать аминокислоты. Так, например, свиньи могут синтезировать аланин, аргинин, аспарагиновую кислоту, глицин, гистидин, глутаминовую кислоту, пролин, оксипролин, серин, тирозин, цистеин и оксализин. Таким образом, для свиней, безусловно, незаменимыми аминокислотами являются лизин, метионин, треонин, триптофан, фенилаланин, лейцин, изолейцин и валин. А для птиц к этому перечню еще необходимо прибавить глицин.

При полном отсутствии или недостатке в корме одной или нескольких незаменимых аминокислот, синтез полноценных белков в организме становится невозможным, нарушается обмен, снижаются продуктивность и плодовитость животных, замедляется рост молодняка.

Наиболее часто отмечается нехватка таких незаменимых аминокислот, как лизин, метионин, треонин и триптофан. Именно на эти четыре аминокислоты приходится 99% объема производства всех незаменимых аминокислот в странах Европейского Союза, Швейцарии и Норвегии.

---

#### **1.4. Методы получения синтетических аминокислот**

Аминокислоты являются составными элементами белков. Все 20 аминокислот являются мономерами, существующие в виде оптических изомеров, для построения природных полипептидов и их синтез хорошо изучен.

Современные методы органического синтеза позволяют синтезировать L- и D-формы аминокислот, но только как рацематы, дальнейшее разделение которых представляет трудную задачу и экономически не эффективно.

---

Другой способ получения аминокислот – это микробиологический синтез, когда используют штаммы-продуценты, осуществляющие сверхсинтез аминокислот.

Избыточные количества аминокислот, например, L-лизина, L-глутаминовой кислоты, L-треонина, L-трептофана экскретируются (выходят) в культуральную (внешнюю) среду. В данном случае, то есть при биосинтезе аминокислот с помощью ферментных систем микроорганизмов, получаются только L-формы аминокислот. По этой причине в промышленных масштабах аминокислоты получают биотехнологическими методами.

Используя природные микроорганизмы регуляция биосинтеза осуществляется по принципу обратной связи (ретроингибирование) за счет ингибирования активности одного из начальных ферментов собственного синтеза избыточным продуктом, то есть самой аминокислотой, либо репрессируется весь комплекс ферментов всей биохимической цепочки метаболизма клетки. Чтобы получить целевой продукт в необходимых количествах, необходимо нарушить эти механизмы.

На примере продуцентов лизина (*Corynebacterium glutamicum*) возможно рассмотреть принцип согласованного ингибирования ферментативной активности, что является особенностью биосинтеза предшественника лизина. Ингибирование синтеза лизина в клетке возможно только при повышенной концентрации обоих конечных продуктов – лизина и треонина. Самостоятельно ни лизин, ни треонин не ингибируют активности ключевого фермента – аспартакиназы. Они ингибируют этот синтез только вместе. Таким образом, вызвать сверхсинтез лизина можно лишь нарушив синтез треонина или его предшественника – гомосерина. Метаболическая схема синтеза лизина из глюкозы в клетках *Corynebacterium glutamicum* показана на рис. 1.2.

---

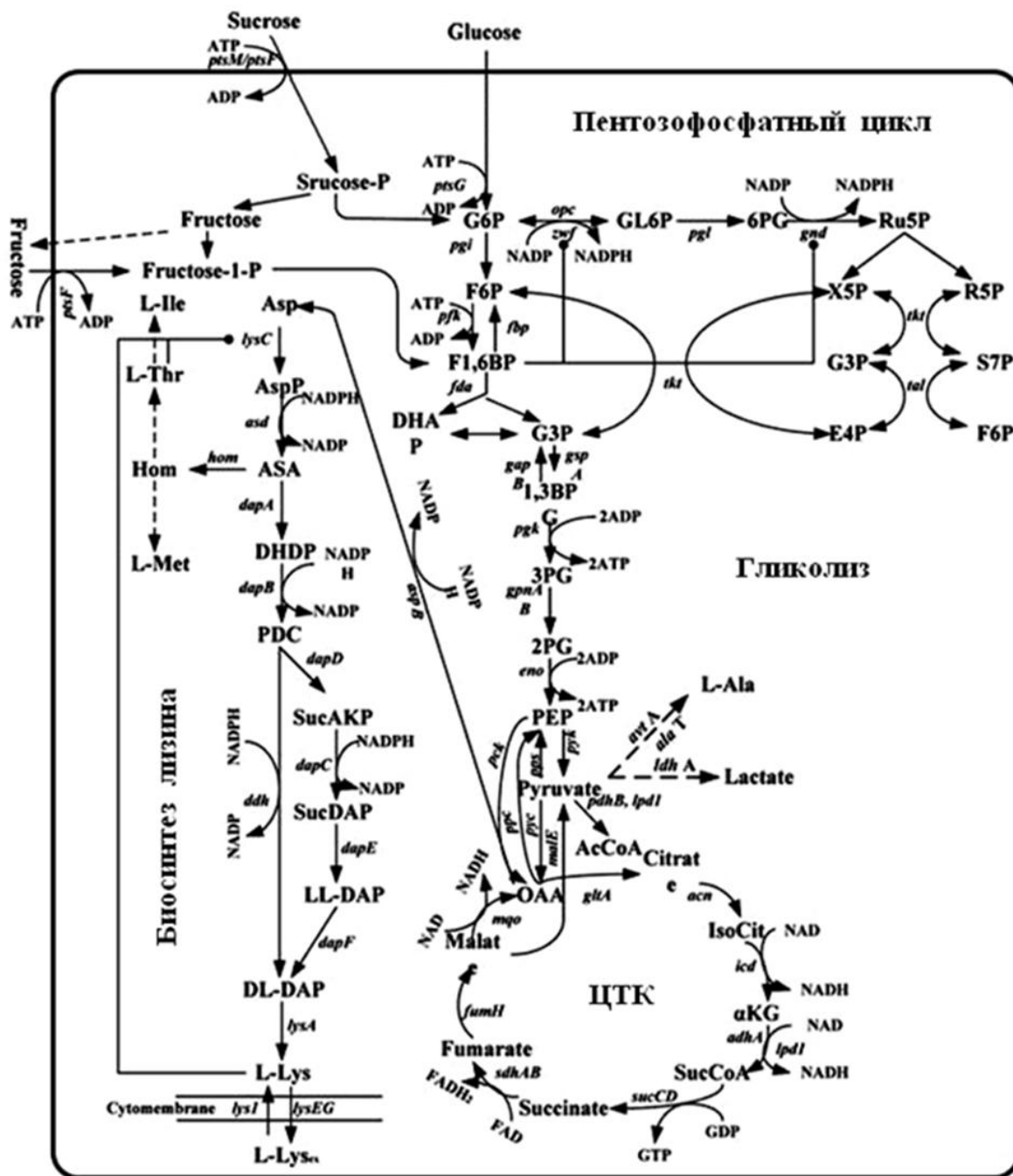


Рис. 1.2. Метаболическая схема синтеза лизина из глюкозы в клетках *Corynebacterium*

Продолжительность синтеза составляет 2-3 суток. Уровень накопления продукта составляет примерно 150 граммов на литр питательной среды.

Разработки по поиску метаболических путей усиливающих синтез целевых аминокислот с использованием более выгодных в плане продуцирования штаммов микроорганизмов начались с середины XX века в Японии и США.

История получения отечественных штаммов начинается с Института биохимии им. А.Н. Баха АН СССР, где были получены первые сверхпродуценты. В дальнейшем поисками и разработками технологий занялись сразу два института – Институт атомной энергии им. И.В. Курчатова и

Институт микробиологии им. А. Кирхенштейна. В первом заведении велись разработки синтеза кристаллического препарата L-лизина, а во втором – кормового концентрата лизина (ККЛ).

В настоящий момент исследования в этой области продолжает НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика. Наиболее перспективными являются методы генетической инженерии – введение в клетку продуцента многокопийных плазмид, содержащих гены, контролирующие биосинтез аминокислот в ущерб синтезу биомассы и других клеточных компонентов. Институт одним из первых в России стал разрабатывать и использовать для создания промышленных штаммов микроорганизмов методологию генной инженерии. Еще в 1974 г. в Институте созданы первые в СССР рекомбинантные плазмидные ДНК. Разработаны оригинальные векторные системы и эффективные системы экспрессии. Создана коллекция микроорганизмов – продуцентов.

Накопленные знания о структуре и функционировании геномов микроорганизмов и опыт в исследованиях по генной инженерии позволили сформировать принципы современного конструирования штаммов и создания на их основе биопроцессов мирового уровня, которые используются крупнейшими биотехнологическими компаниями мира и заводами.

### **1.5. Краткое описание технологии**

L-Лизин является незаменимой лимитирующей аминокислотой, необходимой для построения белков живого организма, используемой в ряде физиологических процессов в иммунной, мышечной и нервной системах человека и животных.

Нейтральное основание лизина (чистый лизин) имеет молекулярную массу 146 г/моль, его химическая формула –  $C_6H_{14}N_2O_2$ .

В товарном продукте L-Лизин содержится в форме L-Лизин сульфата (химическое название: 2,6-диамино-гексановой кислоты сульфат).

Эмпирическая формула  $[C_6H_{14}N_2O_2]_2 \cdot H_2SO_4$ ,

Тривиальное название – L-лизин сульфат

Структурная формула показана на рисунке 1.3.

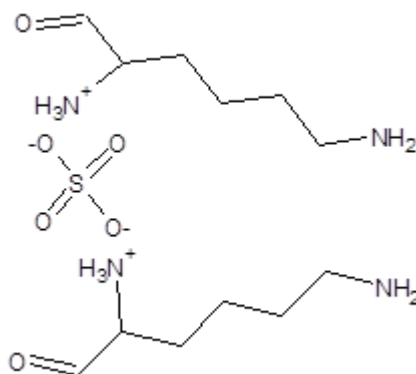


Рис. 1.3 Структурная формула L-лизин сульфата

Молекулярная масса – 390,4

Лизин получают путем микробиологического синтеза, в результате процесса периодической ферментации с использованием бактерии *Corynebacterium glutamicum*.

Ферментация осуществляется в асептических условиях. Для достижения необходимой концентрации клеток в главном ферментёре, популяция выращивается в лабораторном биореакторе и преферментере, после чего загружается в главный ферментёр посредством «инокуляционной цепи». «Инокуляционная цепь» это цепь ферментеров, установленных последовательно от меньшего к большему, таким образом, что время производства лизина в главном ферментере является максимально продуктивным. В процессе ферментации молекулы получают азот, главным образом, из аммиака, сульфата аммония, а также орга-

нических молекул. Эти компоненты необходимы для установления ионного баланса химической реакции синтеза молекулы данной аминокислоты.

Наиболее важным компонентом сырья является углевод. Используемым на предприятии источником углевода является глюкозный сироп, поступающий от крахмало-паточного производства.

Также, в небольших количествах, добавляются другие микроэлементы и витамины, они, добавляются в исходную питательную среду.

Ниже, на рисунке 1.4. представлена схема технологического процесса:



Рис. 1.4. Схема технологического процесса производства L-лизин сульфата

Штамм *Corynebacterium glutamicum* депонирован во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ) и имеет регистрационный номер ВКПМ В-11969.

Культурально-морфологические признаки:

- клетки овальные, неподвижные, грамположительные, спор не образуют;
- на МПА образует желтовато-кремовые колонии с однородной структурой, гладкой поверхностью и ровным краем.

Физиолого-биохимические признаки:

- аэроб;
- растет при температуре + 24-40°C, оптимальная температура +30-32°C;
- растет на средах с рН от 6 до 8,5, оптимальное значение рН 6,8-7,2;
- хорошо растет на глюкозе, сахарозе, мальтозе, фруктозе, этаноле;
- усваивает азот в форме солей аммония и мочевины.

Сведения о безопасности использования штамма:

- штамм не является генетически модифицированным и не содержит генов других организмов;
- штамм является: не зоопатогенным, не фитопатогенным и не представляет опасность по каким-либо другим причинам.

На предприятии предусмотрены склады для всех сырьевых компонентов, используемых для процесса ферментации.

Резервуары для сырья находятся вне помещения.

Резервуары для солей, аминокислот и приготовления витаминов располагаются в помещении цеха.

Список сырья используемого на производстве:

- кукурузный экстракт;
- глюкозный сироп;
- сульфат аммония;
- пеногаситель;
- соли, витамины;
- фосфорная кислота;
- серная кислота;



– безводный аммиак.

Питательная среда представляет собой водный раствор питательных веществ. В зависимости от рецептуры стерильная среда состоит из технологической воды, кукурузного экстракта, глюкозного сиропа, аминокислот и солей (Mg, Mn, и т.д.). Также в первоначальную загрузку добавляется небольшое количество пеногасителя, для предотвращения пенообразования вовремя загрузки ферментеров.

Питательная среда стерилизуется в потоке жидкости при помощи инжекторов острого пара. Процесс стерилизации осуществляется при температуре до  $+137^{\circ}\text{C}$  при минимальном времени выдерживания – 1,5 минуты, после чего питательная среда поступает в регенератор, где она используется для подогрева нестерильной подаваемой среды.

Для приготовления питательной среды в качестве технологической воды используется вода из артезианских скважин. Температура воды составляет от  $+5^{\circ}\text{C}$  до  $+10^{\circ}\text{C}$ . Температура стерильной среды на выходе из регенератора составляет примерно  $+35-40^{\circ}\text{C}$ , эта среда подается непосредственно в стерильный резервуар.

Периодически и перед приготовлением объема питательной среды для начальной загрузки стерилизатор должен подвергаться СІР-мойке и стерилизации.

Стерилизация технологического воздуха.

Технологический воздух – это воздух, подающийся в ферментер для обогащения культуральной жидкости кислородом. В ферментер подается объем воздуха равный  $1 \text{ м}^3/\text{час}$  на  $1 \text{ м}^3$  питательной среды.

Обычный воздух содержит в  $1 \text{ м}^3$  от 1 тысячи до 100 тысяч клеток микроорганизмов. Воздух стерилизуют только фильтрацией, пропуская его через систему фильтров.

Технологическая схема получения стерильного воздуха:

Воздух с улицы поступает на → Фильтр предварительной очистки от пыли и влаги, затем поступает на → Компрессор (происходит сжатие воздуха, при этом воздух нагревается), затем на → Холодильник (для охлаждения воздуха, поступившего от компрессора, затем) → Воздух под давлением проходит через головной фильтр и подается на → Индивидуальный фильтр (у каждого ферментера).

Индивидуальные фильтры не пропускают частицы размером более 0,25 мкм.

Размеры микроорганизмов составляют: кокковые формы – 0,5-1,5 мкм, различные виды палочковидных бактерий – 0,4-0,8 мкм.

Фильтры стерилизуются острым паром при +120°C в течение 30 мин.

Стерилизация и герметизация оборудования.

Ферментер и все трубопроводы стерилизуют насыщенным паром при температуре +130°C в течение 1 часа. Для проверки эффективности стерилизации проводят пробную стерилизацию с использованием биологического теста.

Компоненты питательной среды и вода – стерилизуются термическим нагреванием, но при этом могут инактивироваться термолабильные соединения, витамины и др. Поэтому для каждой среды имеются свои условия и режимы стерилизации.

Для приготовления посевного материала используют культуру штамма-продуцента лизина *Corynebacterium glutamicum* из микробиологического криобанка клеток.

Прежде чем начать процесс ферментации, необходимо получить чистую высокопродуктивную культуру. Чистые культуры микроорганизмов хранят в очень небольших объемах и в условиях, обеспечивающих ее жизнеспособность и продуктивность; обычно это достигается хранением при низкой температуре. Ферментер может вмещать несколько сотен тысяч литров культуральной среды, и процесс начинают, вводя в нее культуру (инокулят), составляющей 1–10% объема, в котором будет идти ферментация. Таким образом, исходную культуру

ру следует поэтапно (с пересеваниями) растить до достижения уровня микробной биомассы, достаточного для протекания микробиологического процесса с требуемой продуктивностью.

Совершенно необходимо все это время поддерживать чистоту культуры, не допуская ее заражения посторонними микроорганизмами. Сохранение асептических условий возможно лишь при тщательном микробиологическом и химико-технологическом контроле.

Многоэтапное выращивание посевного материала – обязательный принцип биотехнологического производства. Среда для выращивания посевного материала обычно не совпадает по составу с ферментационной средой и может быть обогащена для быстрого роста биомассы.

Для выращивания инокулята используют колбы. Колбы засевают в ламинарном шкафу культурой из размороженной криопробирки.

Культивирование в колбах ведут в шейкер-инкубаторе при температуре воздуха  $+31^{\circ}\text{C}$ . Готовый посевной материал используют для засева инокулятора.

Перед засевом, пустой инокулятор стерилизуется острым паром. Температура стерилизации поддерживается на протяжении заданного времени. После охлаждения инокулятора до определённой температуры, питательная среда передается по стерильной линии в аппарат. Когда температура достигнет оптимального значения для проведения процесса ферментации, начинается регулировка рН с помощью аммиака до значения рН= 6,8-7,0 а витаминный раствор, предварительно профильтрованный через мембранные фильтры, загружается в инокулятор отдельно. Инокулят из колб перекачивается по стерильной линии при помощи перистальтического насоса.

В ходе процесса роста инокулята контролируются следующие параметры: температура, скорость подачи воздуха, давление, уровень рН и интенсивность перемешивания культуральной жидкости. Осуществляется периодический отбор проб с целью микроскопирования КЖ и определения содержания клеток

культуры и проверки процесса на моносеpticность (отсутствие посторонней микрофлоры).

После достижения необходимого количества и качества культуры в инокуляторе содержимое передается в преферментёр по стерильной линии подачи посевного материала. После опорожнения преферментёра он подлежит СІР-мойке.

В технологической схеме получения лизина используются четыре главных ферментера.

Последовательность работы главного ферментера, схема которого показана на рисунке 1.5:

- стерилизация;
- загрузка среды;
- регулировка температуры и рН;
- загрузка витаминов;
- инокуляция;
- ферментация;
- слив культуральной жидкости;
- СІР-мойка.

Стерильная среда для начальной загрузки главного ферментера партиями подается в ферментер из реактора приготовления стерильной среды, одновременно по отдельным линиям в процесс ферментации вводятся стерильная глюкоза и сульфат аммония. Как только культура клеток находящаяся в преферментера достигнет пика экспоненциального роста клеток, содержимое передается в главный ферментер.

Во время процесса ферментации оператор контролирует следующие параметры: рН культуральной жидкости, скорость вращения мешалки, давление в резервуаре, расход подаваемого стерильного воздуха, температура КЖ, уровень вспенивания в сосуде и качество выходящих газов ( $O_2$  и  $CO_2$ ), что позволяет анализировать состояние культуры в биореакторе.

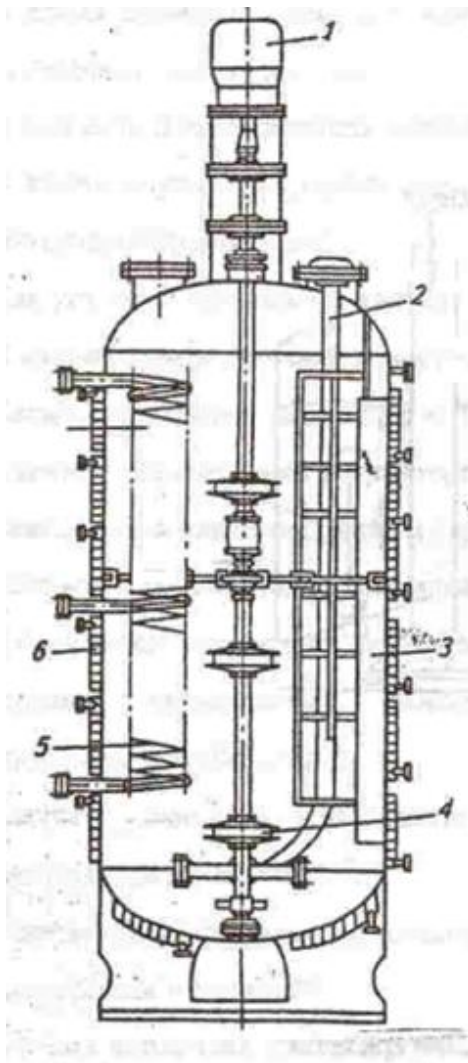


Рис. 1.5. Схема устройства ферментера (биореактора для глубинного культивирования микроорганизмов): 1—двигатель; 2—труба для подачи воздуха; 3—отражательные перегородки; 4—мешалка; 5—змеевик; 6—рубашка

Отбор проб осуществляется каждые четыре часа. Проводится следующий ряд лабораторных анализов: содержание лизина, редуцирующих сахаров, общего азота, оптическая плотность КЖ, физическая плотность КЖ, содержание сухих веществ. Анализ полученных данных позволяет разработать стратегию подачи дополнительных питательных компонентов среды (подпитки).

Аммиак (сжиженный газ) загружается в воздушный поток и поступает в ферментер через распределитель воздуха и служит для корректировки уровня кислотности КЖ.

Ферментационный цикл продолжается 48-50 часов, после его завершения в аппарат подается сжатый воздух, создается давление и культуральная жидкость (КЖ) под действием сжатого воздуха направляется в сливные емкости.

После опустошения ферментер подвергается безразборной мойке.

В сливные емкости производится подача серной кислоты 98% концентрации для снижения уровня рН=3-4.

Культуральная жидкость хранится в буферном резервуаре после чего направляется на вакуумно-выпарную установку, предназначенную для удаления излишней влаги и концентрирования продукта. Культуральная жидкость из сливных емкостей поступает с концентрацией СВ – 21%-25% в пересчете на сухое вещество, после выпаривания содержание сухого вещества повышается до 60-65%.

Вакуум-выпарная установка – пятикорпусная станция с использованием термокомпрессии пара. В установке реализованы 4 ступени выпаривания продукта по принципу «падающей пленки» жидкости и одна ступень с принудительной циркуляцией для уменьшения пригорания продукта с наибольшей концентрации сухих веществ и наибольшей вязкостью.

Концентрированная жидкость с выпарной установки отправляется в приёмные емкости для хранения упаренной культуральной жидкости (УКЖ). Далее УКЖ подаётся в цех грануляции и высушивания.

Грануляция и высушивание лизина сульфата происходит следующие производственные стадии:

- распылительная грануляция суспензии;
- финальная сушка;
- охлаждение гранул;
- стандартизация продукта.

Процесс распылительной грануляции осуществляется с помощью двух одинаковых распылительных грануляторов с псевдооживленным слоем одинаковой производительности и одной сушилки (охлаждителя) с псевдооживленным

слоем, достаточного для общей производительности обоих распылительных грануляторов.

Остаточная влажность конечного продукта составляет не более 5%.

Товарный продукт после высушивания хранится в бункере и передается на линию расфасовывания в мешки массой нетто 25 кг или мягкие контейнеры массой нетто 1т.

### **1.6. Состав и форма выпуска готового продукта**

Представляет собой продукт микробиологического синтеза, основное действующее вещество – L-лизина сульфат, форма выпуска – гранулы светло-коричневого цвета, полученные путем высушивания ферментативной массы. Другие вещества, повышающие его питательную ценность: аминокислоты, углеводы (сахарозу, фруктозу, декстрозу и др.), минеральные соли (аммония, калия, натрия, кальция, магния), органические кислоты (уксусную, янтарную) представлены в доступной для усвоения форме. Процент азота – 19,16.

Выпускают в многослойных мешках по 25 кг из бумаги с полиэтиленовым вкладышем и мягкие специализированные контейнеры массой до 1000 кг из полипропилена.

Лизин необходим для регуляции обмена азота, углеводов, а также для синтеза нуклеотидов, хромопротеидов, способствует интенсивному росту молодняка, интенсивному использованию кормов, образованию меланинового пигмента в оперении птиц; влияет на формирование эритроцитов и отложение в костях кальция, участвует в окислительно-восстановительных реакциях, активизирует переаминирование и дезаминирование аминокислот, способствует усвоению фосфора и кальция у всех видов животных.

В свиноводстве лизин по важности опережает другие аминокислоты. Для птицы, лизин является второй по важности аминокислотой, так как первой аминокислотой для них является метионин (для образования перьевого протеи-

на). В настоящее время нормирование потребности птицы в лизине следует вести по доступному лизину до установленной нормы, особенно в кормах дефицит лизина достигает 15-20 %. При недостатке лизина в организме у животных снижается аппетит, резистентность организма, продуктивность взрослых особей, прочность скорлупы, рост молодняка, нарушается кальцификация костной ткани, развивается анемия вследствие нарушения гемопоэза и синтеза гемоглобина, мышцы истощаются, появляются параличи, наблюдается депигментация оперения у птиц. Дефицит лизина у кур родительского стада повышает эмбриональную смертность на 5-9 %. У мясных цыплят при недостатке лизина недостаточно формируются грудные и ножные мышцы, что снижает качественный состав мяса получаемых тушек.

Дефицит лизина возникает в рационах, состоящих преимущественно из злаковых, подсолнечного шрота и незначительного количества (1-2 %) животных кормов. Проблема избытка ионов хлора часто встречается в кормах, где присутствуют отруби (куры-несушки, свиньи). В этом случае целесообразно использовать вместо поваренной соли соду, а также L-лизин в форме сульфата.

## 2. Методы исследований, условия и объект

### 2.1. Объект исследования. Описание бактерии *Corynebacterium glutamicum*

В качестве первого объекта исследования использовали штамм *Corynebacterium glutamicum* В-11404.

Систематическое положение: царство *Bacteria*, тип *Actinobacteria*, класс *Actinomycetales*, порядок *Corynebacteriaceae*, семейство *Anaplasmataceae*, род *Corynebacterium*, вид *Corynebacterium glutamicum*.

Род *Corynebacterium* включает около 50 видов разных групп бактерий.

Вид *Corynebacterium glutamicum* – бактерия, средой обитания которой является почва. В ходе скрининга были выявлены свойства продуцирования глю-



таминовой кислоты и некоторых других, важных для человека (L-аминокислоты). Этот факт отвёл для этого микроорганизма особое место в области биотехнологии производства продуктов питания и кормов. Видовое название было дано именно из-за повышенного синтеза глутамата из этой бактерии на один литр культуральной жидкости (более 100 г/ л). *C. glutamicum* в настоящее время используется в коммерческих целях для получения глутамата, аминокислоты (L-лизин) и других соединений.

Штамм-продуцент на основании генетического анализа 16S-РНК определен как штамм *Corynebacterium glutamicum* В-11404.

Депонирование штамма: Штамм *Corynebacterium glutamicum* В-11404 депонирован во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ) и имеет регистрационный номер ВКПМ В-11404.

Генетические характеристики штамма *Corynebacterium glutamicum*:

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

- 1) В гене *lys C*-точечная замена в позиции нуклеотидов G835A и двойная замена в триplete TCC на GCT в позициях T949G и C951T, что ведёт к замене аминокислот A279T и S317A соответственно;
- 2) В гене *hom*-точечная замена в позиции нуклеотидов G443C, что ведёт к замене аминокислоты G148A;
- 3) В гене *pus*-точечная замена в позиции нуклеотидов C1364G, что ведёт к замене аминокислоты A455G.

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

Морфология *Corynebacterium glutamicum*.

Бациллы овальной формы, положительные по Граму, размером от 1-1,5 мкм в длину и до 0,6-0,8 мкм в ширину, неподвижные, неспорообразующие.

Культурально-морфологические признаки: клетки неподвижные, овальные, размером 1,0–1,5 x 0,6–0,6–0,8 мкм, грамположительное, спор не образуют; Через 2–4 дней роста при 30 °С на среде МПА, образует округлые колонии диаметром 2–4 мм, слегка выпуклые, окрашенные в слабо–желтый цвет; поверхность гладкая, структура однородная тестообразная, края ровные; при посеве штрихом через 2–4 суток рост умеренный, край гладкий, поверхность матовая.

Физиолого-биохимические признаки: аэроб; хорошо растет на глюкозе, сахарозе, мальтозе, фруктозе, маннозе; не растет на ксилозе, арабинозе, лактозе, раффинозе и ацетате; усваивает азот в форме солей аммония и мочевины; растет при температуре 24–37°С, оптимальная температура роста 30–32 °С; растет в средах с показателем рН 6,0–8,5, оптимальное значение рН 6,8–7,2; при росте в минимальной среде нуждается в биотине, тиамине, L-лейцине;

*Corynebacterium glutamicum* (штамм В–11404) признан безопасным и относится к группе GRAS (Generally recognized as safety).

Бактерия бесспорная, непатогенная, способна к быстрому разрастанию колонии, имеет относительно неизменный геном, сравнительно мало требует питательных веществ, но и требуемые источники азота и углерода предоставляются в широком выборе, что делает использование *Corynebacterium glutamicum* весьма востребованным.

Условия культивирования промышленных продуцентов.

Биотехнологический процесс осуществим при условии обеспечения:

- продуктивной культурой микроорганизмов;
- питательной средой;
- аппаратурой для выращивания и проведения вспомогательных операций;
- средствами контроля и управления процессом.

Основной стадией технологического процесса является культивирование.

На первой стадии культивирования осуществляется накопление биомассы, на второй – продуктов метаболизма микроорганизмов. При производстве

бактериальных препаратов целевым продуктом является биомасса клеток, в других случаях продукты, синтезируемые клеткой, антибиотики, ферменты, аминокислоты и др. При этом синтезируемый продукт может накапливаться как внутри клеток, так и выделяться в культуральную среду.

По способу культивирования различают поверхностное (культура растет на поверхности жидкой или плотной питательной среды) и глубинное, когда микроорганизмы распределяются по всему объему жидкой питательной среды. Последний способ наиболее широко применяется в настоящее время в производстве большинства препаратов, когда используются аэробные продуценты, которым необходимо поступление кислорода к клеткам в результате интенсивной операции перемешивания.

Данный способ культивирования позволяет получить большое количество бактериальной массы за короткое время, например, при культивировании микроорганизмов группы кишечной палочки в условиях состояния покоя количество микробов не превышает 1-2 млрд./см<sup>3</sup>, а при применении принудительной аэрации урожайность достигает 50-60.

Процесс легко управляется в течении длительного поддержания роста и размножения микроорганизмов в процессе их культивирования при условии дополнительного введения углеродных и азотистых соединений, а при необходимости и других стимуляторов роста. Данный способ также позволяет легко корректировать рН среды в процессе культивирования.

Процесс максимально технологичен. Технологический процесс глубинного выращивания микроорганизмов в реакторах (ферментерах) складывается из следующих этапов:

- отбор высокопродуктивных штаммов микроорганизмов и создание банков хранения и рабочих банков клеток;
- приготовление посевной микробной культуры (инокулят);
- приготовление и стерилизация посевных и рабочих питательных сред;

- подготовка биореакторов (посевного и рабочего) к посеву;
- выращивание микроорганизмов в посевном реакторе;
- засев рабочего биореактора и контроль над процессом культивирования.

Вспомогательные операции:

- стерилизация оборудования и коммуникаций;
- приготовление и стерилизацию пеногасителей, подпитывающих растворов и др.

## **2.2. Закономерности роста чистых культур при периодическом культивировании.**

В биотехнологическом процессе главную роль играет биологический агент, его физиологические и технологические свойства.

Для роста биологической популяции необходим исходный жизнеспособный посевной материал, источники энергии и углерода, питательные вещества для синтеза биомассы, отсутствие действия ингибиторов роста, соответствующие физико-химические условия ферментации (рН, температура, аэрация и др.).

Одним из основных показателей, характеризующих адекватность условий ферментации, служит скорость роста продуцента. Скорость роста (увеличение биомассы) организмов с бинарным делением в хорошо перемешиваемой среде в периодической культуре будет пропорционально концентрации микробной биомассы:

$$dX/dt = \mu X,$$

где  $dX/dt$  – скорость роста,

$X$  – биомасса,

$\mu$  – коэффициент пропорциональности, («удельная скорость роста»);

Продуктивность процесса характеризуется количеством продукта, получаемого на единицу объема биореактора в единицу времени. Продуктивность

процесса зависит от многих факторов: активности продуцента, значений коэффициента выхода продукта из потребленного субстрата, количества активной биомассы в ферментере:

$$P = q_s Y_p / s X [\text{г/л ч.}],$$

где  $q_s$  – скорость потребления субстрата (метаболический коэффициент),

$Y_p/s$  – выход продукта (экономический коэффициент),

$X$  – концентрация биомассы,

$P$  – продукт,

$S$  – субстрат.

На продуктивность процесса биосинтеза можно влиять путем изменения различных ее составляющих. Так, при повышении величины  $X$  могут возникнуть ограничения по массообменным характеристикам аппарата. Влиять на величину метаболического коэффициента культуры в современных условиях возможно только на уровне генетических манипуляций.

Выход продукта ( $Y$ ) (экономический коэффициент) определяется как количество продукта, получаемого из данного количества субстрата:

$$Y = X / (S_0 - S),$$

где  $S$  и  $S_0$  – конечная и исходная концентрация субстрата.

Данный коэффициент выражает эффективность использования субстрата для получения целевого продукта и позволяет непосредственно влиять на себестоимость конечного продукта. Экономический коэффициент имеет четкий физический смысл, характеризующей степень перехода энергии, заключенной в субстрате, в продукт.

Рост клеток – это согласованное увеличение количества всех химических компонентов, формирующих клеточные структуры. Рост обычно сопровождается увеличением их массы и размеров бактериальной клетки. В полностью адаптированной среде бактерии находятся в состоянии сбалансированного роста. Удвоение биомассы сопровождается удвоением количества белка, ДНК,

РНК и внутриклеточной воды, следовательно, культуры, растущие сбалансированно, сохраняют постоянный химический состав.

В отдельных случаях скорость роста популяции может снижаться из-за недостатка субстрата, вследствие высокой плотности бактериальной популяции, при низком парциальном давлении кислорода или по причине накопления токсичных продуктов обмена. Данные факторы обеспечивают переход к стационарной фазе. В культуре, растущей сбалансированно, скорость прироста вещества клеток в любой данный момент пропорциональна числу или массе имеющихся в это время бактерий. Коэффициент пропорциональности называют удельной скоростью роста ( $\mu$ ).

Данная величина отличается для разных культур и для одной культуры находящейся в других условиях выращивания. Удельную скорость роста можно рассчитать по следующим формулам:

$$\frac{dN}{dt} = \mu N \quad \text{и} \quad \frac{dX}{dt} = \mu X$$

где  $N$  – число клеток в единице объема;  $X$  – масса клеток в единице объема;  $t$  – время.

После интегрирования и перехода к десятичным логарифмам получим формулу для определения удельной скорости роста ( $\mu^{-1}$ ):

$$\lg N - \lg N_0 = \frac{\mu(t - t_0)}{2,303}$$

И

$$\mu = \frac{2,303(\lg N - \lg N_0)}{t - t_0}$$

Зная удельную скорость роста, можно определить время генерации ( $g$  – время, необходимое для удвоения числа клеток популяции в часах или минутах):

$$g = \frac{0,693}{\mu}$$

При условии ограничения питательного вещества в среде рост клеток в культуре находится в постоянной линейной зависимости. Масса клеток, обра-

зованная на единицу использованного компонента среды, представляет собой величину, которую называют экономическим коэффициентом (или выходом биомассы) –  $Y$ . Эту величину определяют по уравнению:

$$Y = \frac{X - X_0}{S_0 - S}$$

где  $X$  – масса сухого вещества клеток (г/мл культуры),  $X_0$  – масса сухого вещества клеток в 1 мл среды сразу после инокуляции среды;  $(X - X_0)$  – прирост бактериальной массы;  $(S_0 - S)$  – количество потребленного субстрата (питательной среды).

В промышленных условиях используют два основных способа культивирования микроорганизмов: периодическое и непрерывное.

Периодическая культура – это популяция клеток в ограниченном жизненном пространстве. В периодической культуре бактерии растут до тех пор, пока необходимые им компоненты питательной среды находятся в достаточном количестве.

Зависимость концентрации жизнеспособных клеток при периодическом культивировании от длительности инкубирования описывается характерной кривой, которая имеет S-образную форму, которая показана на рисунке 2.1.

На кривой можно различить несколько фаз роста, сменяющих друг друга в определенной последовательности: лаг-фазу; логарифмическую фазу; стационарную фазу; фазу отмирания.

1. Фаза адаптации микроорганизмов или лаг-фаза. В этой фазе идет увеличение количества белков, но нет деления и соответственно роста микроорганизмов. В клетках бактерий в этот период идут процессы, связанные с приспособлением их к условиям культивирования. Происходит быстрое увеличение количества РНК (в 8–12 раз).

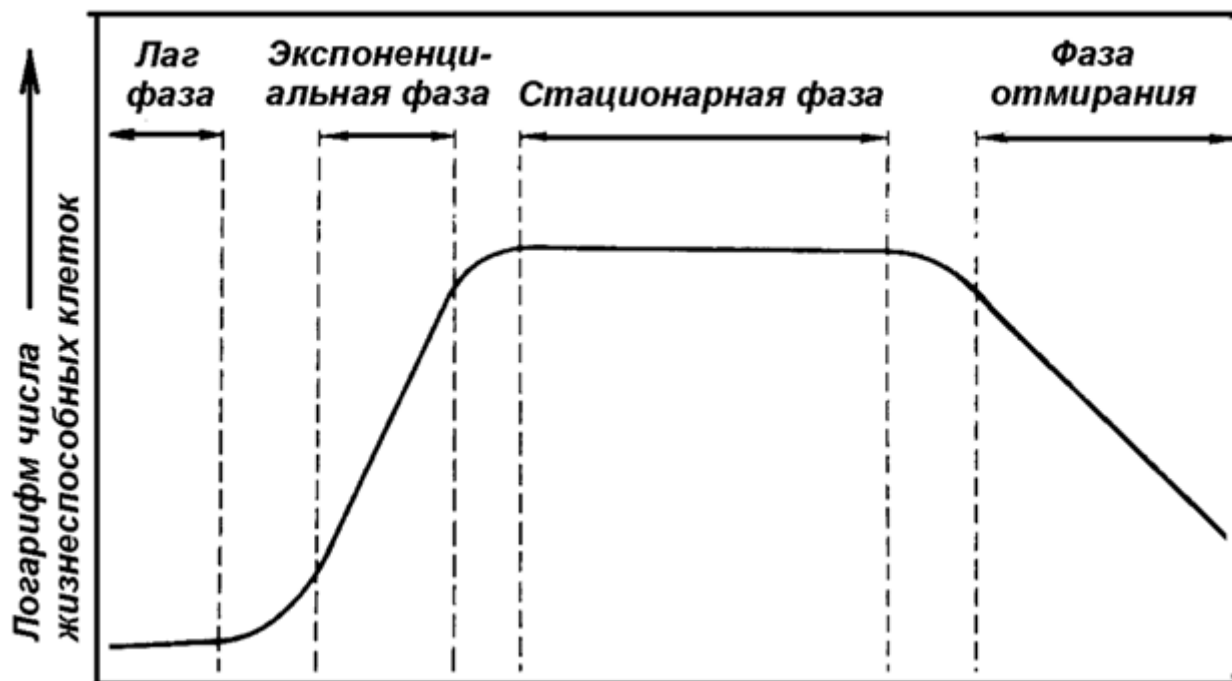


Рис. 2.1. Основные фазы кривой роста периодической культуры микроорганизмов

Деления клеток в этой фазе не происходит, идут процессы, подготавливающие клетку к размножению. Лаг-фаза переходит в начальную фазу размножения, когда клетки начинают делиться с постепенно возрастающей скоростью.

2. Фаза ускоренного роста. В этой фазе происходит уже деление клетки, повышается содержание белков, РНК, нуклеиновых кислот. Эта фаза логарифмического роста (экспоненциальная кривая), когда компонентов питания достаточно и микробная клетка полностью адаптирована к условиям в ферментере. Фаза логарифмического (экспоненциального) роста характеризуется постоянной максимальной скоростью деления клеток и скоростью роста. Для различных видов бактерий эти величины различны.

Во время логарифмической фазы роста популяция клеток обладает высокой биохимической активностью, клетки содержат максимальное количество РНК, белка, они имеют приблизительно одинаковый размер и наиболее жизнеспособны.



3. Фаза стационарная, когда количество живых клеток постоянно и нет роста биомассы. Стационарная фаза наступает тогда, когда число жизнеспособных клеток достигает максимума и не увеличивается, так как скорость размножения бактерий равна скорости их отмирания.

Клетки в стационарной фазе роста меньше по размеру, содержат меньше РНК, более устойчивы к различного рода воздействиям, их химический состав клеток зависит от фактора, лимитирующего рост. В клетках в этот период идет интенсивный синтез и накопление продуктов вторичного метаболизма.

Продолжительность этой фазы может быть от нескольких часов до нескольких дней в зависимости от вида микроорганизма.

В стационарной фазе роста может происходить апоптоз – явление разделения на две субпопуляции, одна из которых погибает и подвергается автолизу, клетки же другой популяции, используя продукты автолиза как субстрат, продолжают размножаться.

4. Фаза отмирания (гибели) клеток. В фазе отмирания происходит логарифмическое снижение числа живых клеток. Скорость отмирания бактерий варьирует в зависимости от условий среды и физиологических особенностей микроорганизма, а также от накопления продуктов жизнедеятельности (органических кислот, антибиотиков, бактериоцинов и др).

Процесс образования метаболитов на разных этапах роста клетки.

В логарифмической фазе образуются первичные метаболиты – аминокислоты, нуклеотиды, белки, нуклеиновые кислоты, углеводы и т.д – продукты, жизненно важные для роста микроорганизмов. Первичные метаболиты синтезируются природными микроорганизмами в количествах, необходимых лишь для удовлетворения собственных потребностей.

В стационарной фазе некоторые микроорганизмы синтезируют вещества – вторичные метаболиты – представляющие огромный интерес как биологически активные вещества: например, антибиотики, гормоны, бактериоцины и т.д. представляют коммерческий интерес для нужд промышленности и сельского

хозяйства. Поэтому задача генетиков и промышленных микробиологов состоит в создании мутантных форм микроорганизмов-сверхпродуцентов.

### 2.3. Методы исследования

Количественный учет микроорганизмов.

Титр клеток – это количество клеток микроорганизмов, выросших в единице объема в естественных субстратах или искусственных питательных средах.

Существуют методы определения числа клеток позволяют определять как общее количество микроорганизмов в исследуемом материале, так и количество жизнеспособных клеток.

Методы количественного учета микроорганизмов могут быть разделены на прямые и косвенные:

- прямые методы – это методы прямого счета (микроскопические);
- косвенные – основанные на измерении параметров, величина которых зависит от количества или биомассы микроорганизмов (методы оптические (нефелометрия, спектрофотометрия и т. д.) и методы подсчета колоний (методы посева)).

Методы прямого подсчета клеток под микроскопом используют для определения общего количества микроорганизмов в различных материалах. Это такие методы как подсчет в специальных счетных камерах, в фиксированных мазках или препарате живой капли.

Методы прямого подсчета клеток широко применяются в исследованиях микрофлоры воды и почвы.

В биотехнологическом производстве чаще применяется нефелометрическим методом определения количества микробных клеток. В основе метода лежит измерение количества света, рассеянного взвесью клеток. Величину светорассеяния измеряют с помощью спектрофотометров, в которых измеряется первичный пучок света, который проходит через пробу и, не отклоняясь, падает

на фотоэлемент. Обычно при этом сравнивается интенсивность света, проходящего через суспензию клеток и через среду без клеток. Для измерения светорассеяния выбирают светофильтр, обеспечивающий максимум пропускания света данной взвесью.

Определение количества жизнеспособных клеток путем посева на питательные среды (чашечный метод Коха).

Сущность метода подсчета количества клеток путем посева заключается в посеве определенного объема исследуемой суспензии микроорганизмов на агаризованную питательную среду в чашках Петри и подсчете формирующихся колоний, принимая во внимание, что каждая колония – потомство одной жизнеспособной клетки. Существует много вариантов метода:

- При посеве на поверхность агара (метод Коха). Проводят в три этапа: приготовление разведений исследуемого материала, посев на агаризованную среду в чашках Петри и подсчет сформировавшихся колоний.

- Метод посева в агаризованную среду осуществляют путем внесения в стерильную чашку Петри суспензии микроорганизмов из соответствующего разведения с последующим заливанием расплавленной и охлажденной до  $45^{\circ}$  агаризованной средой. Содержимое чашки перемешивают и дают среде застыть, как показано на рисунке 2.2.

- Метод посева в тонком слое агаризованной среды предполагает внесение разведенной суспензии микроорганизмов в пробирки с небольшим объемом (2,5 – 3,5 мл) расплавленной полужидкой агаризованной средой, которую затем разливают по стерильным чашкам, уже содержащим один слой застывшей агаризованной среды и дают застыть верхнему слою.

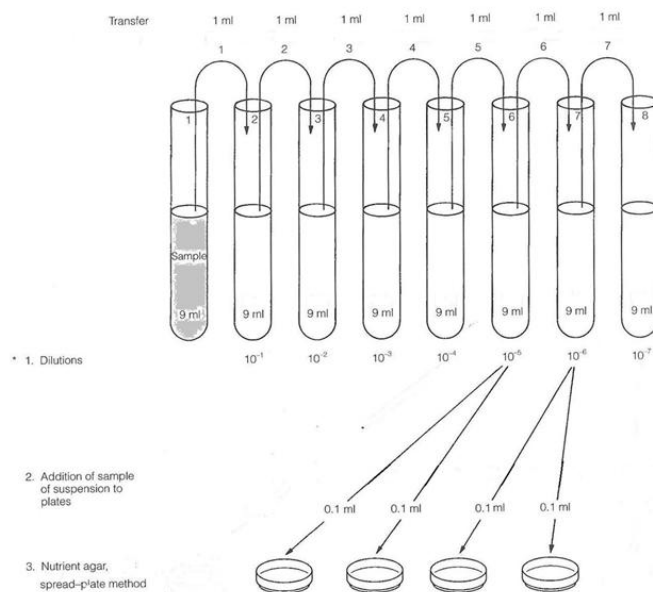


Рис. 2.2. Методика серийных разведений и высевов на агаризованные среды.

- Метод разведения с последующим высевом на твердую питательную среду. Из 1 мл взвеси бактерий при соблюдении правил стерильности производят десятикратные разведения до десятой степени.

Затем по 1 мл каждого из трех последних разведений переносят и равномерно распределяют шпателем на подсушенных чашках Петри с питательным агаром. Чашки помещают в термостат на сутки, затем сохраняют при комнатной температуре. На третьи сутки в чашках вырастают единичные колонии. При использовании указанной методики можно предположить, что каждая колония выросла из одной клетки.

В биотехнологии процессы получения конкретного целевого продукта должны быть более технологичными, экономичными и экологичными.

Оценка альтернативности вариантов только через себестоимость продукта – односторонняя. Оценкой эффективности биотехнологии, помимо качества получаемого продукта, может служить сопоставление экспериментального и теоретического выхода продукта, рассчитанные по материально-энергетическому балансу процесса. При этом затраты и стоимость сырья в

крупномасштабных биотехнологических процессах, как правило, являются определяющими, поэтому материально-энергетическая оценка в данном случае очень существенна. И, напротив, при использовании процессов на основе высокопродуктивных рекомбинантных штаммов-продуцентов основная доля затрат относится не к сырью, а к созданию продуцента и его поддержанию, а также разработке специальных условий его культивирования, то есть в данном случае экономика сырьевых и энергоресурсов играют второстепенную роль.

Конечная концентрация продукта должна планироваться с учетом продолжительности процесса и величины выхода продукта. Достижение конечной высокой концентрации продукта является основной задачей технолога. Для ее достижения необходима высокая концентрация популяции клеток-продуцента в объеме питательной среды при производстве.

Таким образом, изучаемая в данной работе тема затрагивает острый вопрос – выявления условий для создания максимальной концентрации культуры клеток-продуцента лизина.

## **2.4. Условия исследований (приготовление питательных сред, подготовка оборудования к работе, методики испытаний и пр.)**

### **2.4.1. Получение воды очищенной**

Для получения очищенной воды методом обратного осмоса на установку подают по трубопроводу водопроводную (питьевую) воду от источника централизованного водоснабжения с давлением не менее 0,2 МПа. Напор воды контролируют с помощью встроенного манометра. Установленный в системе очистки воды картридж удаляет механические примеси, свободный хлор и смягчает воду, предотвращая накопление минеральных отложений на мембране картриджа обратного осмоса. После предварительной очистки вода поступает в картридж обратного осмоса. Глубина очистки обратного осмоса (соотношение количества получаемого фильтрата очищенной воды по отношению к

питающей водопроводной воде) составляет  $(50\pm 20)$  %. Концентрат сбрасывается в канализацию.

Удельная электропроводимость очищенной воды на выходе из системы очистки воды составляет менее  $18,0$  МОм/см (КТ-1.). Очищенная вода накапливается в емкости.

#### **2.4.2. Санитарная обработка производства**

Подготовка вентиляционного воздуха.

Воздух, подаваемый в производственные помещения, отнесенные к классу чистоты D, проходит 2-х ступенчатую очистку:

- первая ступень: фильтры грубой очистки класса G4 на воздухозаборе (с эффективностью не менее 60 %);
- вторая ступень: фильтры тонкой очистки класса F9, после вентилятора (с эффективностью не менее 95 %).

Воздух, подаваемый в производственные помещения, отнесенные к классу чистоты «К», проходит 2-х ступенчатую очистку.

Приготовление моющих и дезинфицирующих растворов.

Мерным цилиндром вместимостью  $0,05$  л отмеряют  $(0,050\pm 0,001)$  л синтетического моющего средства «Вирулен». В полипропиленовое ведро наливают  $(10,0\pm 0,1)$  л теплой водопроводной воды и перемешивают. Приготовленный раствор используют при подготовке производственных помещений к работе.

Мерным цилиндром вместимостью  $1$  л отмеряют  $(0,69\pm 0,01)$  л раствора перекиси водорода с массовой долей 30 % и переливают его в стакан вместимостью  $2,5$  л. В стакан добавляют  $(1,61\pm 0,01)$  л водопроводной воды и перемешивают. Полученный раствор используют в случае возникновения аварийных ситуаций при культивировании штамма-продуцента, а также для инактивации остатков культуральной жидкости по окончании работы.

Приготовление 70 % раствора спирта.

Мерными цилиндрами вместимостью 1,0 л и 0,5 измеряют, соответственно,  $(0,730 \pm 0,001)$  л этилового спирта и  $(0,270 \pm 0,001)$  л очищенной воды. Оба компонента переносят во флакон «Simax» на 1 л, перемешивают и завинчивают крышкой.

На флакон наносят этикетку с указанием наименования содержимого, концентрации и даты приготовления. Хранят в герметично закрытом флаконе в течение 1 месяца. Раствор используют для обработки рук и поверхности оборудования.

Подготовка производственных помещений.

Готовым 0,5 % раствором «Вирулен» моют в производственных помещениях и коридорах поверхности стен на уровне двух метров, полы.

Для уборки используют уборочный инвентарь, промаркированный для каждого помещения.

Стеклянные поверхности обрабатывают дважды 70 % раствором этилового спирта с экспозицией  $(15 \pm 1)$  мин.

После проведения генеральной уборки помещение обрабатывают ультрафиолетом в течение  $(0,5 \pm 0,1)$  ч.

Подготовка технологической одежды.

Стирка технологической одежды сотрудников лаборатории производят без ее предварительной дезинфекции в режиме стирки хлопчатобумажных изделий с кипячением с использованием автоматической стиральной машины.

Одежду сотрудников лаборатории перед стиркой замачивают в 3 % растворе перекиси водорода с 0,5 % синтетическим моющим средством. Для этого сотрудники складывают использованную спец.одежду в бак с раствором из расчета 5 л раствора на 1 кг сухой одежды. Через  $(60 \pm 10)$  мин после замачивания одежду отжимают, помещают в ведро с крышкой и передают для последующей стирки при температуре  $(90 \pm 1)$  °С.

После окончания стирки и сушки спец.одежду проглаживают и помещают в индивидуальный пакет в специальный шкаф, откуда ее по мере необхо-

димости берут сотрудники.

Замену использованной спец.одежды производят 1 раз в неделю (или по мере загрязнения).

Приготовление растворов для мойки посуды. Приготовление хромовой смеси.

На весах КП-3 взвешивают  $(0,140 \pm 0,001)$  кг калия бихромата. Приготовленную навеску переносят в фарфоровую ступку и при растирании растворяют, добавляя  $(0,04 \pm 0,01)$  л горячей очищенной воды. В вытяжном шкафу (ШВ-4) содержимое ступки переносят в фарфоровую кружку соответствующего объема и к полученному водному раствору калия бихромата осторожно приливают  $(1,00 \pm 0,01)$  л концентрированной серной кислоты. Полученная хромовая смесь имеет темно-коричневый цвет и сиропобразную консистенцию. Хранят хромовую смесь в вытяжном шкафу в фарфоровой или стеклянной посуде с притертой крышкой.

Мойка, сушка и стерилизация посуды.

Мойку биохимической и аналитической посуды, которая соприкасалась с белком, начинают с промывания водопроводной водой, затем замачивают в раковине в 2 % растворе детергента и моют, тщательно удаляя загрязнения «ершиком». Промывают 10-тикратно проточной водопроводной водой. Далее посуду доверху заполняют хромовой смесью и выдерживают  $(1,0 \pm 0,1)$  ч. Ополаскивают 10 раз водопроводной водой полным объемом, 5 раз – очищенной водой.

Биохимическую посуду, которая не соприкасалась с белком, моют проточной водой 10 раз полным объемом, 5 раз – очищенной водой.

Микробиологическую посуду моют 2 % раствором детергента, тщательно удаляя загрязнения «ершиком». Промывают 10-тикратно проточной водопроводной водой, 3 раза – очищенной водой.

Сушку стеклянной и пластиковой посуды проводят в сухожаровом шкафу (ШС-5) при температуре  $(100 \pm 2)$  °С.



Стерилизацию микробиологической посуды, закрытой пергаментной бумагой, проводят автоклавированием в течение  $(20 \pm 1)$  мин при температуре  $(120 \pm 2)$  °С.

Срок хранения стерильных принадлежностей без растворов пять суток, с растворами – трое суток.

#### **2.4.3. Приготовление питательных сред LB с биотином и глюкозой.**

В колбу вместимостью 1,0 л, наливают мерным цилиндром  $(0,700 \pm 0,001)$  л очищенной воды (ВР.1). Взвешивают на весах  $(0,0100 \pm 0,0001)$  кг триптона,  $(0,0050 \pm 0,0001)$  кг дрожжевого экстракта,  $(0,0100 \pm 0,0001)$  кг хлористого натрия, и добавляют в колбу. Перемешивают с помощью магнитной мешалки ММ-8, добавляют  $(0,001 \pm 0,0001)$  л 0,01 % раствора d-биотина в спирте и доливают очищенную воду до объема  $(1,00 \pm 0,01)$  л, доводят рН раствора до  $(7,1 \pm 0,1)$  раствором 40 % гидроокиси натрия и еще раз перемешивают.  $(0,100 \pm 0,0001)$  л среды переливают мерным цилиндром в колбу вместимостью  $(0,250 \pm 0,001)$  л. К оставшейся среде добавляют  $(0,0135 \pm 0,0001)$  кг агара и еще раз перемешивают. Колбы закрывают ватно-марлевой пробкой, обвязывают пергаментом и автоклавируют при температуре  $(116 \pm 2)$  °С, давлении 0,08 МПа в течение  $(40 \pm 1)$  мин. После стерилизации колбы охлаждают до  $(70 \pm 2)$  °С и к неагаризованной и агаризованной среде в ламинарном шкафу стерильно добавляют  $(0,001 \pm 0,0001)$  л и  $(0,009 \pm 0,0001)$  л стерильного 50 % раствора глюкозы. Затем там же агаризованную среду разливают мерным цилиндром вместимостью 0,05 л по  $(0,025 \pm 0,001)$  л в стерильные чашки Петри или по 0,010 в стерильные пробирки. Чашки или пробирки подсушивают в термостате при температуре  $(37 \pm 1)$  °С в течение 24 ч.

Чашки Петри, пробирки со средой LB с d-биотином и глюкозой и неагаризованную среду LB с d-биотином и глюкозой хранят при температуре  $(6 \pm 2)$  °С в течение  $(14 \pm 1)$  суток в холодильнике.

#### 2.4.4. Методика определения содержания лизина в КЖ методом ТСХ с хроматоденситометрией.

1. Аппаратура, материалы и реактивы:
  - сканирующий денситометр CAMAG TLC Scanner 3;
  - автосамплер для нанесения проб на ТСХ пластинки CAMAG Automatic TLC Sampler 4 – ATS4;
  - пластинки хроматографические «Сорбфил» ПТСХ-ПА-УФ и ПТСХ-АФ-В-УФ размером 10x15 см, ТУ 26-11-17-89, АО «Сорбполимер»;
  - камеры хроматографические с перегородкой в центре дна и крышкой для элюирования пластинок размером 10x15 см;
  - кювета для обработки хроматограммы раствором обнаруживающего реагента методом погружения для пластинок размером 10x15 см;
  - весы аналитические лабораторные по ГОСТ 24104;
  - шкаф сушильный, термостатированный;
  - автоматические пипетки «Eppendorf» на 1 мл, 200мкл, 100мкл, 20мкл;
  - носики к автоматическим пипеткам «Eppendorf» на 1 мл, 200мкл, 100мкл, 20мкл;
  - настольная центрифуга «Eppendorf»;
  - центрифужные пробирки «Eppendorf» на 1,5 мл<sup>3</sup>;
  - виалы, Waters;
  - крышки к виалам, Waters4
  - мерные колбы на 25, 50, 100, 500 мл;
  - пикнометры объемом 10,0 мл;
  - мерный цилиндр на 100 мл с притертой пробкой;
  - бумага фильтровальная лабораторная – ФС ГОСТ 12026-76;
  - ацетон, “о.с.ч.” 9-5, ОП-2, ТУ 6-99-5518-88;
  - этиловый спирт, “о.с.ч.” 20-5, ОП-2, ТУ 6-09-19-122-86;

- спирт метиловый по ГОСТ 6995;
- изопропиловый спирт, “о.с.ч.” 13-15, ТУ 6-09-07-1718-91;
- 25%-ный водный раствор аммиака, “ч.д.а”, ТУ 3760-79;
- ледяная уксусная кислота, “х.ч.”, ГОСТ 6175;
- вода, очищенная на установке "Supper Q" , "Millipore";
- стандартный образец L- лизина (Sigma);
- нингидрин, «р.а.», кат. № 6762, "Merck".

## 2. Приготовление растворов стандартных образцов лизина и проб КЖ.

10 мг лизина (навеска с точностью до 0.2 мг) в пикнометре вместимостью 10 мл растворяют в 5 мл 30% водного раствора этанола. Объем пикнометра доводят до метки 30% водного раствора этанола и тщательно перемешивают. Полученный раствор содержит 1 мг/мл лизина.

Из этого раствора готовим рабочие стандартные растворы в 30% водном этаноле с концентрациями 0,1 мг/мл; 0,2 мг/мл; 0,3 мг/мл. Стандартные растворы хранят в холодильнике при температуре не выше +5<sup>0</sup>С. Растворы устойчивы в течение 3 недель.

Пробы КЖ тщательно перемешивают, отбирают аликвоты по 1,0 мл, центрифугируют при 18000 об/мин в течение 1-2 мин, надосадочную жидкость разбавляют 30%-ным водным этиловым спиртом, таким образом, чтобы концентрация лизина в подготовленных пробах находилась бы в пределах от 0,1 до 0,3 мг/мл. Рабочие стандартные растворы и пробы КЖ помещают в вials и закрывают крышками. Анализ проб проводят в день приготовления.

## 3. Подготовка хроматографической камеры.

Хроматографическую камеру обкладывают по внутренним стенкам фильтровальной бумагой таким образом, чтобы нижняя часть бумаги касалась дна камеры. 55 мл изопропилового спирта и 45 мл раствора 25%-ного водного аммиака помещают в мерный цилиндр на 100 мл с притертой пробкой, тщательно перемешивают и вносят в хроматографическую камеру, смачивая при

этом фильтровальную бумагу. Уровень подвижной фазы на дне камеры должен быть не менее 1,0 мм и не более 5,0 мм. Насыщение камеры 1 час при 20°C.

#### 4. Подготовка хроматографических пластинок.

Пластинки перед работой промывают метанолом (восходящий метод) до верхнего края, высушивают и активируют при 120°C в течение 20 мин в сушильном шкафу.

#### 5. Приготовление раствора нингидринового реактива.

0,3 г нингидрина растворяли в 97 мл ацетона, добавляли 3,0 мл ледяной уксусной кислоты и тщательно перемешивали. Раствор нингидрина хранили в бутылке из темного стекла. Раствор устойчив при хранении при температуре не выше +5°C в течение двух недель. При хранении необходимо отсутствие паров аммиака, первичных (вторичных) аминов, а также табачного дыма

6. Нанесение стандартных образцов и проб КЖ на хроматографическую пластинку.

Для нанесения образцов используют автосамплер SAMAG ATS4.

Промытую и активированную пластинку помещают на столик автосамплера. Вials со стандартными растворами и образцами КЖ помещают в штатив автосамплера.

Расстояние от линии нанесения до нижнего края пластинки – 15 мм. Расстояние от точки нанесения до краев пластинки – 15 мм. Общее количество образцов на одной пластинке (включая стандарты) от 10 до 17 штук. Наносимый объем стандартных образцов и исследуемых проб КЖ – 1,0 мкл. Нанесение осуществляется полосой шириной 5 мм.

#### 7. Разделение образцов.

Пластинку помещают в предварительно насыщенную хроматографическую камеру и элюируют до высоты 1,5 см от верхнего края пластинки, длина пробега составляет 7,0 см. Пластинку высушивают в течение 10-15 мин при комнатной температуре (вытяжной шкаф!), а затем – в сушильном шкафу при температуре  $65 \pm 3^\circ\text{C}$  в течение 30 мин.

#### 8. Обработка хроматограммы нингидриновым реактивом.

Кювету для обработки хроматограммы заполняют раствором нингидринового реактива. Хроматограмму быстрым движением руки помещают в камеру (время экспозиции 17-20 сек.), после чего вынимают, высушивают при 20<sup>0</sup>С в течение 5 мин. в вытяжном шкафу, а затем помещают в сушильный шкаф, при температуре 65±3<sup>0</sup>С и выдерживают в течение 4-5 мин. Хроматограмму вынимают из шкафа и на ее поверхности наблюдают малиновые пятна лизина на белом фоне. Окраска пятен устойчива в течение 7 часов при температуре 20<sup>0</sup>С при нахождении хроматограммы в защищенном от света месте. Количественную обработку хроматограммы производят сразу же по окончании данной операции.

#### 9. Количественная обработка хроматограммы.

Для количественной обработки хроматограммы используют сканирующий денситометр CAMAG TLC Scanner 3 при длине волны 500 нм и размером щели 3.00 x 0.2 мм.

Прием данных и количественную обработку полученных результатов проводят на компьютере с использованием программы WinCATS (построение калибровки по площадям и расчет количества лизина – нг в пятне (в 1мкл)).

Концентрацию лизина в анализируемых образцах –  $C_{\text{лизина}}$  в г/л, рассчитывают по формуле:

$$C_{\text{лизина хлор}} = P \times C_x / 1000, \text{ где}$$

$C_x$  – количество лизина в пятне, нг

$P$  – разведение образца.

1000 – коэффициент пересчета

Концентрация лизина сульфата рассчитывается по следующей формуле;

$$C_{\text{лизина сульф}} = 1,07 \times C_{\text{лизин хлор}}, \text{ где}$$

1,07 – коэффициент пересчета,

$C_{\text{лизин хлор}}$  – концентрация хлорида лизина в анализируемых образцах.

### 2.4.5. Определение оптической плотности культуральной жидкости (OD)

Плотность бактериальной суспензии выражена поглощательной способностью или Оптической плотностью.

При помощи спектрофотометра измеряется количество света, поглощаемого при прохождении светового луча через жидкую культуру. Осуществляется измерение клеток, взвешенных в культуре в рассеянном свете, проходящем через суспензию, и количество нерассеянного света. Для одноклеточных организмов оптическая плотность пропорциональна сухому весу клетки.

При высокой концентрации клеток, культуру необходимо разбавлять.

1. Аппаратура, материалы и реактивы.

- Спектрофотометр (Spectronic Genesys 20);
- Одноразовые кюветы;
- Вихревой миксер;
- Пробирки;
- Мерные колбы 25 мл;
- Штатив для пробирок;
- Рабочий стол с ламинарным потоком;
- 10 мл стерильная пипетка;
- Автоматическая пипетка 1000  $\mu$ л;
- Наконечники для стерильной пипетки;
- Горелка Бунзена;
- Автоклав;
- Вода, очищенная при помощи обратного осмоса;
- HCl 32 %;
- 0,1M HCl.

2. Ход работы

- Налейте 900 мл воды, очищенной при помощи обратного осмоса, в мерную колбу;
- Отберите пипеткой 9,8 мл 32 % HCl в колбу;

- Дополните до отметки 1000 мл водой, очищенной при помощи обратного осмоса;

- Перелейте раствор в колбу с синим колпачком.

#### 2.1. Подготовка спектрофотометра к работе:

- Включите спектрофотометр;
- Аппарат включается на автоматической калибровке;
- Нажмите «Enter»;
- Выберите длину волны 620 нм;
- Выберите режим «100 % поглощения»;
- Дайте аппарату стабилизироваться в течение 15 минут перед использованием;
- Поместите кювету с водой, очищенной при помощи обратного осмоса, или 0,1 М HCl в эталонное кюветное отделение.

#### 2.2. Подготовка пробы

- Поместите встряхивающуюся колбу в рабочий стол с ламинарным потоком;
- Покрутите встряхивающуюся колбу и асептически отберите пробу из культуры;
- Соответственно разбавьте пробу, 1-10 в начале и 1-25 или 1-100 позже в процессе ферментации.
- Используйте вихревой миксер для перемешивания разбавленной среды или покрутите мерную колбу 10-15 раз перед считыванием оптической плотности;
- Налейте пробу в кювету и снимите показания с проб по отношению к эталону.
- Занесите считанные данные в протокол испытаний и рассчитайте оптическую плотность неразбавленной культуры.
- Когда измеренная оптическая плотность  $OD_{620}$  превысит 0,5, необходимо произвести дальнейшие разбавления.

- Разбавьте с помощью 0,1 М HCl, если в колбе присутствует карбонат кальция.



### 3. Результаты исследований

Испытания проводились в условиях Центральной заводской лаборатории (ЦЗЛ), экспериментальные ферментации – в условиях цеха производства лизина (ЦПЛ) ЗАО «Завод Премиксов №1».

#### Список оборудования:

- бокс биологической безопасности серии AC 2;
- стерилизатор паровой LAC – 5085 SP;
- магнитная мешалка C –MAG HS7;
- микробиологический инкубатор Thermo Scientific Heratherm;
- моечная машина LABCONCO;
- стерилизатор воздушный автоматический ГП -160 – «ПЗ»;
- pH-метр FiveEasy tm FE 20;
- весы неавтоматического действия AJ-CE/AJH-CE;
- весы электронные лабораторные GR -300 ;
- микроскоп стереоскопический панкратический MC -2ZOOV 2 CR;
- микроскоп стереоскопический MC -3 –ZOOM LED;
- биологический тринокулярный микроскоп проходящего света MEIJI TECHNO, ЗН:127372;
- аквадистиллятор электрический ДЭ – 10 «СПб»;
- холодильник Samsung;
- облучатель-рециркулятор ОБР – 15;
- газовая горелка Fuego basic;
- счетчик колоний микроорганизмов СКМ – 2;
- термостат суховоздушный охлаждающий ТСО -1/80 СПУ;
- дозатор одноканальный Ленпипет Блэк – 2 шт.
- встряхиватель ИКА Vortex 3

#### Постановка эксперимента.

Проведено три опыта в ЦПЛ. Подготовка инокулята для биореактора типа Cell-tainer проводилась по стандартной методике.

Для приготовления рабочей партии культуры используют отдельную криопробирку из Банка клеток, с культурой штамма-продуцента лизина *Corynebacterium glutamicum* ВКПМ В-11404.

Криопробирку с замороженной рабочей культурой размораживают при комнатной температуре в течение  $(0,50 \pm 0,01)$  ч периодически встряхивая. После оттаивания криопробирку снаружи дезинфицируют 70 %-ным раствором этилового спирта. В ламинарном шкафу над пламенем спиртовки из криопробирки бактериологической петлей проводят рассев до отдельных колоний в 5 чашках Петри с агаризованной средой LB с глюкозой и биотином. Затем чашки Петри с засевом ставят в термостат при температуре  $(30 \pm 1)$  °С и инкубируют до 72 ч.

Контроль морфологических свойств культуры проводят визуально через 48-72 ч роста. При росте на агаризованной среде продуцент образует круглые колонии диаметром 2-4 мм, желтовато-кремовые, поверхность гладкая, форма выпуклая, край ровный, структура однородная тестообразная. При появлении колоний иного типа, свидетельствующих о наличии посторонней микрофлоры, культуры бракуют. Забракованные чашки Петри с культурой автоклавируют. При микроскопировании, как показано на рисунке 3.1 культура представляет собой овальные бактерии размером  $1,0-1,5 \times 0,6-0,8$  мкм, неподвижные, спор не образуют.

Отбор продуктивных клонов.

Отобранные типичные колонии (не менее 10) пересевают каждую на 2 пробирки со скошенной агаризованной средой LB с глюкозой и биотином и выращивают при температуре  $(30 \pm 1)$  °С в течение 48-72 ч. К концу роста на агаризованной среде продуцент образует желтовато-кремовый, гладкий газон.

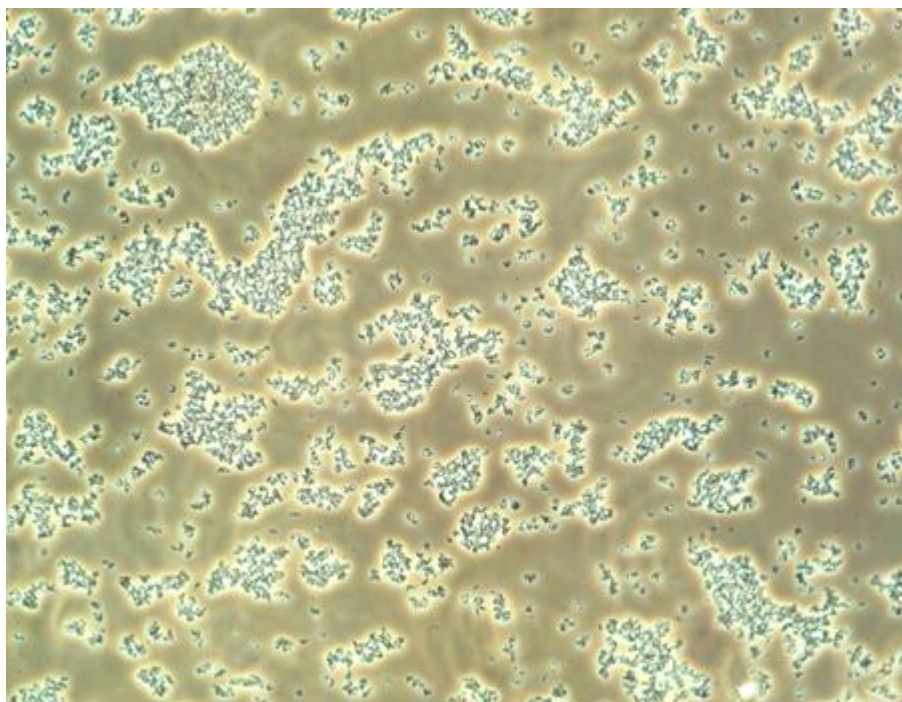


Рис. 3.1. Фотография культуры *Corynebacterium glutamicum*

Индивидуальные клоны засевают в ламинарном шкафу при помощи петли в 3 пробирки, содержащие  $(0,003 \pm 0,0001)$  л стерильной посевной среды для контроля продуктивности клона.

Посевной материал выращивают в шейкере-инкубаторе при скорости вращения  $(240 \pm 10)$  об/мин, температуре  $(30 \pm 1)$  °С в течение  $(20 \pm 2)$  ч. По окончании инкубирования посевной материал представляет собой суспензию желтовато-коричневого цвета. При микроскопировании культура представляет собой Грам-положительные овальные бактерии размером  $1,0-1,5 \times 0,6-0,8$  мкм, неподвижные, неспорообразующие. Хранение выросшего инокулята не допускается.

Полученный посевной материал вносят стерильно в ламинарном шкафу в колбы Эрленмейера вместимостью 750 мл, содержащие  $(0,030 \pm 0,001)$  л стерильной ферментационной среды для контроля продуктивности клона, из расчета  $(0,003 \pm 0,0001)$  л посевного материала (одна пробирка) на колбу. Ферментацию проводят в шейкере-инкубаторе при скорости вращения  $(240 \pm 10)$  об/мин, температуре  $(30 \pm 1)$  °С в течение  $(72 \pm 1)$  ч.

По окончании ферментации отбирают пробу культуральной жидкости для определения содержания лизина, центрифугируют ее для отделения биомассы при  $(12000 \pm 100)$  об/мин в течение  $(1 \pm 1)$  мин, содержание лизина в культуральной жидкости у отбираемых для дальнейшей работы клонов должно быть не менее 35 г/л.

Приготовление рабочей партии культуры.

Отбирают наиболее продуктивный клон и размножают его путем посева на 25 пробирок со скошенной агаризованной средой LB с d-биотином и глюкозой, которые инкубируют в термостате при  $(30 \pm 1)$  °C в течение  $(72 \pm 2)$  ч. Затем проводят микроскопию мазка. Пробирки с культурой типичной по морфологии хранят в холодильнике при температуре  $(6 \pm 2)$  °C в течение 3-х недель и используют в качестве рабочей партии при выращивании посевного материала, а также для закладки на хранение.

Допускается не более 3 пассажей для получения последующих рабочих партий из данной рабочей партии.

Выращивание посевного материала на агаризованной среде.

Посевной материал для засева ферментера готовят в две стадии. Сначала рабочую культуру при помощи петли в ламинарном шкафу высевают на 5-10 пробирок с агаризованной питательной средой LB с биотином и глюкозой. Пробирки инкубируют в термостате при температуре  $(31 \pm 1)$  °C в течение  $(50 \pm 2)$  ч. Затем проверяют морфологию культуры и отсутствие посторонней микрофлоры визуально и микроскопированием мазка. Забракованные пробирки с культурой автоклавируют. Отобранные культуры используют для засева посевных колб.

Выращивание инокулята в колбах.

Для выращивания инокулята используют колбы Эрленмейера вместимостью 0,750 л со средой для выращивания инокулята  $(0,050 \pm 0,001)$  л. Колбы (4 шт.) засевают в ламинарном шкафу микробиологической петлей из расчета две петли на колбу.

Культивирование в колбах ведут в шейкер-инкубаторе, при скорости вращения  $(240 \pm 10)$  об/мин, температуре  $(31 \pm 1)$  °С в течение  $(8 \pm 1)$  ч. В процессе культивирования уносимая влага составляет до 8-10 % от объема среды.

Готовый инокулят (в количестве  $(0,200 \pm 0,001)$  л) с оптической плотностью не менее 30 ед. (определение проводят при длине волны 590 нм и толщине кюветы 1 см) и при отсутствии посторонней микрофлоры. Забракованные колбы с посевным материалом автоклавируют.

При стандартных показателях активности инокулята производился засев преферментера с объемом питательной среды 30 м<sup>3</sup> различной дозой засева 0,01%; 1% и 10%.

По технологической карте процесса биосинтеза посев основного ферментера производился полученным посевным материалом. Производственная ферментация проводилась по технологической инструкции с соблюдением основных параметров процесса (аэрация, температура, уровень рН, содержание РВ и пр.).

Отбор проб производился каждые 2 часа роста преферментера и основного ферментера.

Анализ культуральной жидкости по показателям Содержание лизина и ОП проводился в условиях ЦЗЛ. Проведены испытания по Определению количества жизнеспособных клеток путем высева на питательные среды по Методикам утвержденным на производстве.

### **3.1.Методика серийных разведений и определения КОЕ (колонеобразующих единиц)**

1. Стерильную пептонную воду стерильно в ламинарном шкафу дозатором разлить в 10 стерильных пробирок, по 9 мл в каждую пробирку. Внести дозатором стерильно в ламинарном шкафу в первую пробирку 1мл культуральной жидкости, как показано на рисунке 2.3. Встряхнуть пробирку во встряхивателе для равномерного распределения культуры. Другим стерильным наконеч-

ником взять из первой пробирки 1мл пробы и внести во вторую пробирку. Из второй пробирки взять 1мл пробы и внести в третью и т.д. Каждую пробирку перед тем, как взять из нее 1мл, обязательно тщательно встряхивать на встряхивателе. При этом получают разведения: в первой пробирке – 10-1 (проба разведена в 10 раз), во второй – 10-2 (проба разведена в 100 раз), в третьей – 10-3 (проба разведена в 1000 раз) и т.д.

2. Из пробирок 5,6,7 взять стерильным наконечником по 0,1мл пробы и внести стерильно в ламинарном шкафу на агаризованную среду в чашку Петри. Однородно распределить культуру с помощью стерильного шпателя Дригальского по всей поверхности агара до тех пор, пока не адсорбируется вся жидкость. Из каждой пробирки сделать по две повторности. Чашки инкубировать в термостате при температуре 31о С в течение 48 часов.

3. По истечении времени инкубирования для достоверности результата произвести подсчет выросших колоний только в тех чашках, где выросло от 30 до 300 колоний на чашке, как показано на рисунке 3.2. Подсчитать все колонии на каждой чашке и вывести среднее значение между двумя повторностями одного разведения.

4. При подсчете КОЕ учитывать разведение и объем пробы, взятой для внесения на агаризованную среду (0,1мл). Пример: на чашках из пробирки 7 выросло 51 и 75 колоний:  $51 \times 10^7 \times 10 = 5,1 \times 10^9$  и  $75 \times 10^7 \times 10 = 7,5 \times 10^9$ . Среднее значение:  $6,3 \times 10^9$ . Следовательно, КОЕ в 1 мл проверяемой пробы:  $6,3 \times 10^9$ .

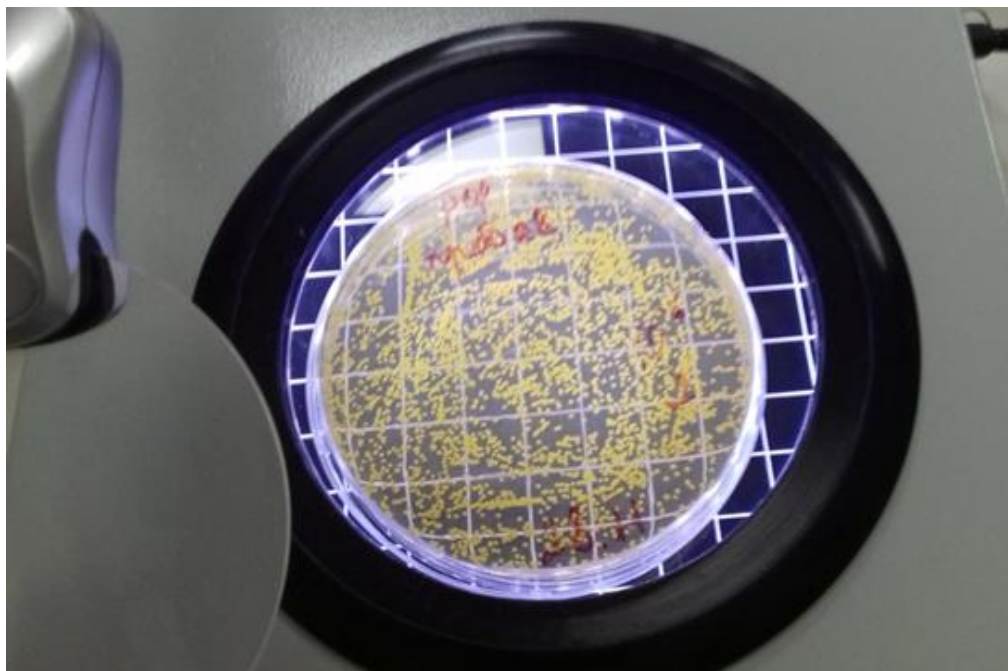


Рис. 3.2. Колонии *Corynebacterium glutaminicum*

Схема эксперимента представлена в таблице 3.1.

Таблица 3.1.

Схема эксперимента по изменению технологической карты производства лизина

Номер опыта	Доза засева преферментера, %	Объем преферментера, м <sup>3</sup>	Объем основного ферментера, м <sup>3</sup>	Количество серийных высевов для подсчета КОЕ/г (см <sup>3</sup> )
1 контроль	0,01	30	300	3
2	1	30	300	3
3	10	30	300	3

Опыт 1. Контрольный. Производственный цикл выполнялся по стандартной инструкции ведения технологического процесса биосинтеза лизина.

Доза засева преферментера составила 0,01% инокулята от первичного объема питательной среды.

Выполнено 3 повторности опыта, результаты которого изложены в таблицах 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7. Графически результаты опытов показаны на рисунках 3.3.

Таблица 3.2.

Количество жизнеспособных клеток в преферментере опыт 1 повторность 1

№ пробы	Часы роста	Число колоний на чашке, шт		КОЕ/Г (см <sup>3</sup> )		Среднее значение
		1 чашка	2 чашка	1 чашка	2 чашка	
1	2	4	0	-	-	-
		30	31	3,0x10 <sup>6</sup>	3,1x10 <sup>6</sup>	3,05x10 <sup>6</sup>
2	4	3	3	-	-	-
		35	44	3,5x10 <sup>6</sup>	4,4x10 <sup>6</sup>	3,95x10 <sup>6</sup>
3	6	30	20	3,0x10 <sup>7</sup>	2,0x10 <sup>7</sup>	2,5x10 <sup>7</sup>
		160	170	1,65x10 <sup>7</sup>	1,65x10 <sup>7</sup>	1,65x10 <sup>7</sup>
4	8	82	75	8,2x10 <sup>7</sup>	7,5x10 <sup>7</sup>	7,85x10 <sup>7</sup>
		305	283	3,05x10 <sup>7</sup>	2,83x10 <sup>7</sup>	2,83x10 <sup>7</sup>
5	10	8	5	-	-	-
		64	68	6,4x10 <sup>7</sup>	6,8x10 <sup>7</sup>	6,6x10 <sup>7</sup>
6	12	30	27	3,0x10 <sup>8</sup>	2,7x10 <sup>8</sup>	2,85x10 <sup>8</sup>
		100	105	1,0x10 <sup>8</sup>	1,05x10 <sup>8</sup>	1,03x10 <sup>8</sup>
7	14	44	58	4,4x10 <sup>8</sup>	5,8x10 <sup>8</sup>	5,1x10 <sup>8</sup>
		169	174	1,69x10 <sup>8</sup>	1,74x10 <sup>8</sup>	1,68x10 <sup>8</sup>
8	16	98	94	9,8x10 <sup>8</sup>	9,4x10 <sup>8</sup>	9,6x10 <sup>8</sup>
		283	291	2,83x10 <sup>8</sup>	2,91x10 <sup>8</sup>	2,87x10 <sup>8</sup>
9	18	38	47	3,8x10 <sup>9</sup>	4,7x10 <sup>9</sup>	4,25x10 <sup>9</sup>
		251	269	2,51x10 <sup>9</sup>	2,69x10 <sup>9</sup>	2,6x10 <sup>9</sup>
10	20	20	18	-	-	-
		108	112	1,08x10 <sup>10</sup>	1,12x10 <sup>10</sup>	1,1x10 <sup>10</sup>
11	22	18	11	-	-	-
		128	145	1,28x10 <sup>10</sup>	1,45x10 <sup>10</sup>	1,37x10 <sup>10</sup>
12	24	22	19	-	-	-
		205	221	2,05x10 <sup>10</sup>	2,21x10 <sup>10</sup>	2,13x10 <sup>10</sup>
С-т	18	12	10	-	-	-
		185	211	1,85x10 <sup>10</sup>	2,11x10 <sup>10</sup>	1,98x10 <sup>10</sup>



Таблица 3.3.

Анализ технологического процесса биосинтеза по стадиям.

№ пробы	Время роста	Cell-tainer		Преферментер		Ферментер		
		ΔОП	КОЕ	ΔОП	КОЕ	ΔОП	КОЕ	Лизин
1	2	-	-	0	$3,0 \times 10^6$	33,9	$6,4 \times 10^9$	-
2	4	-	-	0,2	$3,9 \times 10^6$	50,6	$2,2 \times 10^{10}$	30,9
3	6	-	-	0,5	$2,1 \times 10^7$	99,0	$3,0 \times 10^{10}$	40,1
4	8	-	-	0,9	$5,3 \times 10^7$	128,9	$3,6 \times 10^{10}$	51,8
5	10	-	-	1,2	$6,6 \times 10^7$	141,3	$3,8 \times 10^{10}$	65,2
6	12	-	-	1,4	$2,0 \times 10^8$	145,0	$4,2 \times 10^{10}$	73,4
7	14	-	-	3,5	$3,4 \times 10^8$	150,1	$4,7 \times 10^{10}$	82,4
8	16	-	-	4,0	$6,2 \times 10^8$	153,0	$5,0 \times 10^{10}$	90,2
9	18	55,4	$2,0 \times 10^{10}$	10,6	$3,4 \times 10^9$	154,5	$5,4 \times 10^{10}$	96,2
10	20	-	-	16,8	$1,1 \times 10^{10}$	154,8	$5,9 \times 10^{10}$	104,2
11	22	-	-	36,2	$1,4 \times 10^{10}$	148,8	$4,3 \times 10^{10}$	115,7
12	24	-	-	51,4	$2,1 \times 10^{10}$	146,5	$3,9 \times 10^{10}$	124,2
13	32	-	-	-	-	123,0	$3,6 \times 10^{10}$	135,8
14	40	-	-	-	-	117,4	$3,4 \times 10^{10}$	152,2
15	48	-	-	-	-	112,4	$3,2 \times 10^{10}$	161,3

Таблица 3.4.

Количество жизнеспособных клеток в преферментере опыт 1 повторность 2

№ пробы	Часы роста	Число колоний на чашке		КОЕ/г (см <sup>3</sup> )		Среднее значение
		1 чашка	2 чашка	1 чашка	2 чашка	
1	2	36	38	$3,6 \times 10^6$	$3,8 \times 10^6$	$3,7 \times 10^6$
		41	45	$4,1 \times 10^6$	$4,5 \times 10^6$	$4,3 \times 10^6$
2	4	34	35	$3,4 \times 10^7$	$3,5 \times 10^7$	$3,45 \times 10^7$
		155	175	$1,55 \times 10^7$	$1,75 \times 10^7$	$2,55 \times 10^7$
3	6	285	290	$2,85 \times 10^7$	$2,9 \times 10^7$	$5,99 \times 10^7$
4	8	87	92	$8,7 \times 10^7$	$9,2 \times 10^7$	$8,95 \times 10^7$
5	10	37	41	$3,7 \times 10^8$	$4,1 \times 10^8$	$3,9 \times 10^8$
6	12	280	258	$2,8 \times 10^8$	$2,58 \times 10^8$	$3,3 \times 10^8$
7	14	82	95	$8,2 \times 10^8$	$9,5 \times 10^8$	$8,85 \times 10^8$
8	16	174	182	$1,74 \times 10^8$	$1,82 \times 10^8$	$5,32 \times 10^8$
9	18	85	91	$8,5 \times 10^8$	$9,1 \times 10^9$	$8,8 \times 10^8$
10	20	265	281	$2,65 \times 10^8$	$2,81 \times 10^9$	$5,77 \times 10^9$
11	22	96	98	$9,6 \times 10^9$	$9,8 \times 10^9$	$9,75 \times 10^9$
12	24	184	198	$1,84 \times 10^{10}$	$1,98 \times 10^{10}$	$1,91 \times 10^{10}$
13	25	254	249	$2,54 \times 10^{10}$	$2,49 \times 10^{10}$	$2,52 \times 10^{10}$
C/t	18	238	214	$2,38 \times 10^{10}$	$2,14 \times 10^{10}$	$2,26 \times 10^{10}$

Таблица 3.5.

Анализ технологического процесса биосинтеза по стадиям.

№ пробы	Время роста	Cell-tainer		Преферментер		Ферментер		
		ΔОП	КОЕ	ΔОП	КОЕ	ΔОП	КОЕ	Лизин
1	2	-	-	0	3,7x10 <sup>6</sup>	33,6	6,1x10 <sup>9</sup>	-
2	4	-	-	0,02	4,3x10 <sup>6</sup>	55,2	2,2x10 <sup>10</sup>	20,9
3	6	-	-	0,5	2,6x10 <sup>7</sup>	97,0	3,1x10 <sup>10</sup>	31,2
4	8	-	-	1,4	5,9x10 <sup>7</sup>	112,7	3,4x10 <sup>10</sup>	40,3
5	10	-	-	1,7	8,9x10 <sup>7</sup>	130,0	3,7x10 <sup>10</sup>	52,8
6	12	-	-	1,9	3,3x10 <sup>8</sup>	138,8	4,0x10 <sup>10</sup>	63,1
7	14	-	-	4,2	5,3x10 <sup>8</sup>	148,1	4,3x10 <sup>10</sup>	73,7
8	16	-	-	7,8	5,8x10 <sup>9</sup>	151,9	5,0x10 <sup>10</sup>	84,6
9	18	54,4	2,3x10 <sup>10</sup>	13,3	9,8x10 <sup>9</sup>	154,5	5,8x10 <sup>10</sup>	93,2
10	20	-	-	25,8	1,9x10 <sup>10</sup>	155,6	5,9x10 <sup>10</sup>	100,2
11	22	-	-	47,9	2,5x10 <sup>10</sup>	151,5	6,4x10 <sup>10</sup>	108,7
12	24	-	-	-	-	147,8	5,0x10 <sup>10</sup>	117,2
13	32	-	-	-	-	139,2	4,3x10 <sup>10</sup>	126,8
14	48	-	-	-	-	127,2	3,8x10 <sup>10</sup>	154,5

Таблица 3.6.

Количество жизнеспособных клеток в преферментере опыт 1 повторность 3

№ пробы	Часы роста	Число колоний на чашке		КОЕ/г (см <sup>3</sup> )		Среднее значение	
		1 чашка	2 чашка	1 чашка	2 чашка		
1	2	3	6	-	-	-	3,15x10 <sup>6</sup>
		32	31	3,2x10 <sup>6</sup>	3,1x10 <sup>6</sup>	3,15x10 <sup>6</sup>	
2	4	7	12	-	-	-	3,5x10 <sup>6</sup>
		36	34	3,6x10 <sup>6</sup>	3,4x10 <sup>6</sup>	3,5x10 <sup>6</sup>	
3	6	30	32	3,0x10 <sup>7</sup>	3,2x10 <sup>7</sup>	3,1x10 <sup>7</sup>	2,31x10 <sup>7</sup>
		142	161	1,42x10 <sup>7</sup>	1,61x10 <sup>7</sup>	1,52x10 <sup>7</sup>	
4	8	88	74	8,8x10 <sup>7</sup>	7,4x10 <sup>7</sup>	8,1x10 <sup>7</sup>	5,42x10 <sup>7</sup>
		275	271	2,75x10 <sup>7</sup>	2,71x10 <sup>7</sup>	2,73x10 <sup>7</sup>	
5	10	8	11	-	-	-	7,85x10 <sup>7</sup>
		74	83	7,4x10 <sup>7</sup>	8,3x10 <sup>7</sup>	7,85x10 <sup>7</sup>	
6	12	33	37	3,3x10 <sup>8</sup>	3,7x10 <sup>8</sup>	3,5x10 <sup>8</sup>	2,95x10 <sup>8</sup>
		237	242	2,37x10 <sup>8</sup>	2,42x10 <sup>8</sup>	2,4x10 <sup>8</sup>	
7	14	92	85	9,2x10 <sup>8</sup>	8,5x10 <sup>8</sup>	8,85x10 <sup>8</sup>	5,43x10 <sup>8</sup>
		198	202	1,98x10 <sup>8</sup>	2,02x10 <sup>8</sup>	2,0x10 <sup>8</sup>	
8	16	90	81	9,0x10 <sup>8</sup>	8,1x10 <sup>9</sup>	8,55x10 <sup>9</sup>	5,62x10 <sup>9</sup>
		280	257	2,8x10 <sup>8</sup>	2,57x10 <sup>9</sup>	2,69x10 <sup>9</sup>	
9	18	5	9	-	-	-	9,25x10 <sup>9</sup>
		97	88	9,7x10 <sup>9</sup>	8,8x10 <sup>9</sup>	9,25x10 <sup>9</sup>	
10	20	20	15	-	-	-	1,77x10 <sup>10</sup>
		180	174	1,8x10 <sup>10</sup>	1,74x10 <sup>10</sup>	1,77x10 <sup>10</sup>	
11	22	25	22	-	-	-	2,38x10 <sup>10</sup>

## Продолжение табл. 3.6

		231	245	$1,31 \times 10^{10}$	$2,45 \times 10^{10}$	$2,38 \times 10^{10}$	
12	24	15	17	-	-	-	$2,6 \times 10^{10}$
		248	272	$2,48 \times 10^{10}$	$2,72 \times 10^{10}$	$2,6 \times 10^{10}$	
C/t	20	212	190	$2,38 \times 10^{10}$	$2,12 \times 10^{10}$	$1,9 \times 10^{10}$	$2,01 \times 10^{10}$

Таблица 3.7.

Анализ технологического процесса биосинтеза по стадиям.

№ пробы	Время роста	Cell-tainer		Преферментер		Ферментер		
		ΔОП	КОЕ/Г (см <sup>3</sup> )	ΔОП	КОЕ/Г (см <sup>3</sup> )	ΔОП	КОЕ/Г (см <sup>3</sup> )	Лизин
1	2	-	-	0	$3,2 \times 10^6$	34,6	$5,9 \times 10^9$	-
2	4	-	-	0,02	$3,5 \times 10^6$	49,6	$2,4 \times 10^{10}$	20,9
3	6	-	-	0,5	$2,3 \times 10^7$	92,7	$3,1 \times 10^{10}$	31,2
4	8	-	-	1,4	$5,4 \times 10^7$	114,5	$3,3 \times 10^{10}$	45,7
5	10	-	-	1,7	$7,9 \times 10^7$	123,0	$3,6 \times 10^{10}$	57,2
6	12	-	-	1,9	$3,0 \times 10^8$	136,8	$4,0 \times 10^{10}$	63,8
7	14	-	-	3,8	$5,4 \times 10^8$	140,0	$4,5 \times 10^{10}$	75,3
8	16	-	-	7,2	$5,6 \times 10^9$	151,4	$5,2 \times 10^{10}$	80,9
9	18	54,8	$2,0 \times 10^{10}$	14,9	$9,3 \times 10^9$	154,5	$5,5 \times 10^{10}$	87,7
10	20	-	-	24,0	$1,8 \times 10^{10}$	155,6	$6,3 \times 10^{10}$	95,8
11	22	-	-	38,0	$2,4 \times 10^{10}$	155,5	$6,4 \times 10^{10}$	118,7
12	24	-	-	51,5	$2,6 \times 10^{10}$	147,8	$5,2 \times 10^{10}$	134,1
13	32	-	-	-	-	138,2	$4,4 \times 10^{10}$	142,8
14	40	-	-	-	-	123,2	$3,7 \times 10^{10}$	153,2
15	48	-	-	-	-	118,4	$3,2 \times 10^{10}$	164,3

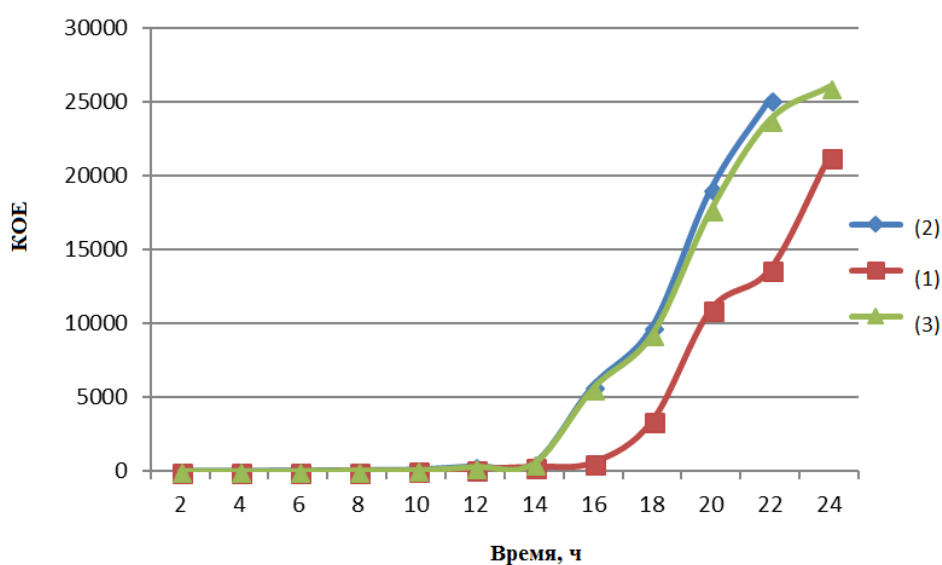


Рис. 3.3. Графики скорости роста культуры в преферментере опыт 1 повторности 1-3

Посевы по методике проводились в соответствии с требованиями биологической безопасности с использованием специального оборудования (Бокс биологической безопасности серии АС2 – защита объекта/защита оператора) при выполнении манипуляций, как показано на рисунке 3.4.



Рис. 3.4. Рабочее место микробиолога

**Опыт №1** (контрольный) показал, что среднее время роста преферментера составляет 22,7 часа роста. Бактериальная популяция при дозе засева 0,01% имеет продолжительную лаг-фазу до 14-15 часов и экспоненциальную фазу – 8-9 часов, что коррелирует с показаниями оптической плотности культуральной жидкости как  $\Delta ОП = 5,0-7,0$  и  $\Delta ОП = 48,0-50,0$ , соответственно. После посева рабочего ферментера, полученным посевным материалом, популяция клеток проходит лаг-фазу за 3-4 часа роста. Средний уровень накопления лизина составляет 160,7 г/кг, как показано на рисунке 3.5.

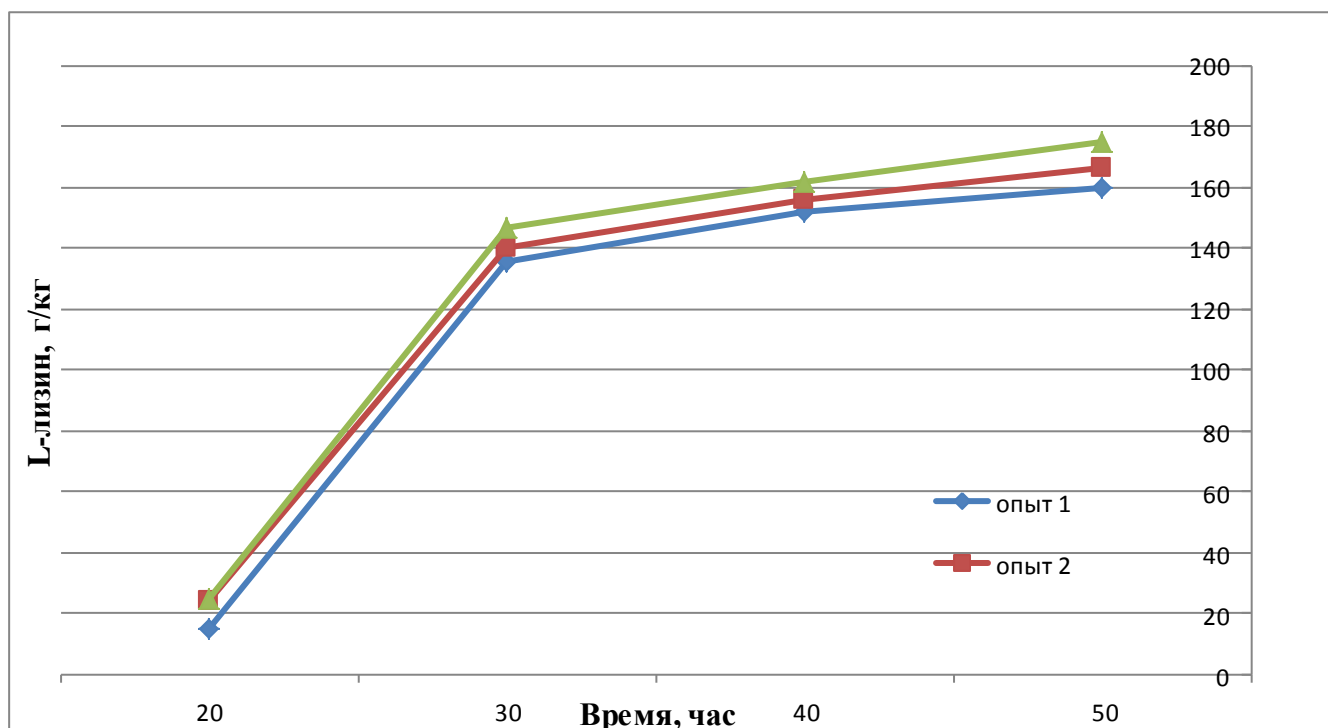


Рис.3.5. Уровень накопления L-лизина в процессе биосинтеза, г/кг опыт 1-3

**Опыт №2.** Производственный цикл выполнялся по стандартной инструкции ведения технологического процесса биосинтеза лизина.

Доза засева преферментера составила 1% инокулята от первичного объема питательной среды.

Выполнено 3 повторности опыта, результаты которого изложены в таблицах 3.8, 3.9, 3.10, 3.11, 3.12, 3.13. Графически результаты опытов показаны на рисунках 3.6.

Таблица 3.8.

Количество жизнеспособных клеток в преферментере опыт 2 повторность 1

№ пробы	Часы роста	Число колоний на чашке, шт		КОЕ/г (см <sup>3</sup> )		Среднее значение
		1 чашка	2 чашка	1 чашка	2 чашка	
1	2	9	7	-	-	3,45x10 <sup>6</sup>
		33	36	3,3x10 <sup>6</sup>	3,6x10 <sup>6</sup>	

Продолжение табл. 3.8

2	4	31	32	$3,1 \times 10^7$	$3,2 \times 10^7$	$3,04 \times 10^7$
		288	295	$2,88 \times 10^7$	$2,95 \times 10^7$	
3	6	78	76	$7,8 \times 10^8$	$7,6 \times 10^8$	$4,68 \times 10^8$
		161	168	$1,61 \times 10^8$	$1,68 \times 10^8$	
4	8	77	81	$7,7 \times 10^9$	$8,1 \times 10^9$	$5,43 \times 10^9$
		298	294	$2,98 \times 10^9$	$2,94 \times 10^9$	
5	10	9	5	-	-	$1,51 \times 10^{10}$
		154	149	$1,54 \times 10^{10}$	$1,49 \times 10^{10}$	
6	12	37	32	$3,7 \times 10^{10}$	$3,2 \times 10^{10}$	$2,39 \times 10^{10}$
		138	125	$1,38 \times 10^{10}$	$1,25 \times 10^{10}$	
7	14	39	47	$3,9 \times 10^{10}$	$4,7 \times 10^{10}$	$3,1 \times 10^{10}$
		189	191	$1,89 \times 10^{10}$	$1,91 \times 10^{10}$	
C-t	18	38	34	$3,8 \times 10^{10}$	$3,4 \times 10^{10}$	$2,61 \times 10^{10}$
		168	155	$1,68 \times 10^{10}$	$1,55 \times 10^{10}$	

Таблица 3.9.

## Результаты анализа технологического процесса биосинтеза по стадиям

№ пробы	Время роста	Cell-tainer		Преферментер		Ферментер		
		ΔОП	КОЕ/г (см <sup>3</sup> )	ΔОП	КОЕ/г (см <sup>3</sup> )	ΔОП	КОЕ/г (см <sup>3</sup> )	Лизин
1	2	-	-	0	$3,5 \times 10^6$	34,6	$6,0 \times 10^9$	-
2	4	-	-	0,8	$3,1 \times 10^7$	56,0	$2,5 \times 10^{10}$	20,9
3	6	-	-	3,5	$4,8 \times 10^8$	99,6	$3,2 \times 10^{10}$	36,1
4	8	-	-	9,3	$5,3 \times 10^9$	114,2	$3,6 \times 10^{10}$	47,2
5	10	-	-	23,2	$1,6 \times 10^{10}$	129,1	$4,1 \times 10^{10}$	59,8
6	12	-	-	34,8	$2,5 \times 10^{10}$	138,7	$4,5 \times 10^{10}$	67,4
7	14	-	-	49,0	$3,1 \times 10^{10}$	146,2	$5,0 \times 10^{10}$	78,1
8	16	51,4	$2,6 \times 10^{10}$	-	-	154,5	$5,9 \times 10^{10}$	88,7
9	18	-	-	-	-	157,5	$6,3 \times 10^{10}$	97,5
10	20	-	-	-	-	159,5	$6,4 \times 10^{10}$	106,2
11	22	-	-	-	-	163,5	$6,5 \times 10^{10}$	115,3
12	24	-	-	-	-	162,6	$5,6 \times 10^{10}$	127,5
13	32	-	-	-	-	152,7	$4,8 \times 10^{10}$	144,6
14	40	-	-	-	-	144,6	$4,3 \times 10^{10}$	159,6
15	48	-	-	-	-	136,9	$4,1 \times 10^{10}$	166,5

Таблица 3.10.

Количество жизнеспособных клеток в преферментере опыт 2 повторность 2

№ пробы	Часы роста	Число колоний на чашке		КОЕ/г (см <sup>3</sup> )		Среднее значение
		1 чашка	2 чашка	1 чашка	2 чашка	
1	3	12	8			3,5x10 <sup>6</sup>
		33	37	3,3x10 <sup>6</sup>	3,7x10 <sup>6</sup>	
2	5	34	31	3,4x10 <sup>7</sup>	3,1x10 <sup>7</sup>	3,09x10 <sup>7</sup>
		294	289	2,94x10 <sup>7</sup>	2,89x10 <sup>7</sup>	
3	7	80	78	8,0x10 <sup>8</sup>	7,8x10 <sup>8</sup>	4,76x10 <sup>8</sup>
		160	162	1,60x10 <sup>8</sup>	1,62x10 <sup>8</sup>	
4	9	76	78	7,6x10 <sup>9</sup>	7,8x10 <sup>9</sup>	5,34x10 <sup>9</sup>
		296	297	2,96x10 <sup>9</sup>	2,97x10 <sup>9</sup>	
5	11	11	8			1,64x10 <sup>10</sup>
		168	159	1,68x10 <sup>10</sup>	1,59x10 <sup>10</sup>	
6	13	39	35	3,9x10 <sup>10</sup>	3,5x10 <sup>10</sup>	2,54x10 <sup>10</sup>
		140	134	1,4x10 <sup>10</sup>	1,34x10 <sup>10</sup>	
7	15	37	49	3,7x10 <sup>10</sup>	4,9x10 <sup>10</sup>	3,13x10 <sup>10</sup>
		196	194	1,96x10 <sup>10</sup>	1,94x10 <sup>10</sup>	
С-т	19	36	37	3,6x10 <sup>10</sup>	3,7x10 <sup>10</sup>	2,65x10 <sup>10</sup>
		160	158	1,6x10 <sup>10</sup>	1,58x10 <sup>10</sup>	

Таблица 3.11.

Результаты анализа технологического процесса биосинтеза по стадиям

№ пробы	Время роста	Cell-tainer		Преферментер		Ферментер		
		ΔОП	КОЕ/г (см <sup>3</sup> )	ΔОП	КОЕ/г (см <sup>3</sup> )	ΔОП	КОЕ/г (см <sup>3</sup> )	Лизин
1	2	-	-	0	3,5x10 <sup>6</sup>	36,4	6,2x10 <sup>9</sup>	-
2	4	-	-	0,9	3,0x10 <sup>7</sup>	56,6	2,5x10 <sup>10</sup>	21,9
3	6	-	-	3,3	4,7x10 <sup>8</sup>	98,5	3,3x10 <sup>10</sup>	35,1
4	8	-	-	8,9	5,4x10 <sup>9</sup>	114,9	3,6x10 <sup>10</sup>	45,4
5	10	-	-	21,2	1,5x10 <sup>10</sup>	129,6	4,1x10 <sup>10</sup>	58,4
6	12	-	-	34,2	2,4x10 <sup>10</sup>	140,7	4,5x10 <sup>10</sup>	67,5
7	14	-	-	50,6	3,1x10 <sup>10</sup>	147,0	4,9x10 <sup>10</sup>	76,2
8	16	52,5	2,5x10 <sup>10</sup>	-	-	154,7	5,7x10 <sup>10</sup>	86,5
9	18	-	-	-	-	156,8	6,2x10 <sup>10</sup>	97,4
10	20	-	-	-	-	158,8	6,4x10 <sup>10</sup>	105,1
11	22	-	-	-	-	163,6	6,5x10 <sup>10</sup>	112,3
12	24	-	-	-	-	161,8	5,3x10 <sup>10</sup>	126,1
13	32	-	-	-	-	157,7	4,5x10 <sup>10</sup>	131,2
14	40	-	-	-	-	146,9	4,1x10 <sup>10</sup>	149,1
15	48	-	-	-	-	133,5	4,0x10 <sup>10</sup>	165,3

Таблица 3.12.

Количество жизнеспособных клеток в преферментере опыт 2 повторность 3

№ пробы	Часы роста	Число колоний на чашке		Среднее значение 2-х повторностей, КОЕ/г		Среднее значение
		1 чашка	2 чашка	1 чашка	2 чашка	
1	2	8	5	-		
		37	34	$3,7 \times 10^6$	$3,1 \times 10^6$	$3,55 \times 10^6$
2	4	33	36	$3,3 \times 10^7$	$3,6 \times 10^7$	$3,18 \times 10^7$
		294	287	$2,94 \times 10^7$	$2,87 \times 10^7$	
3	6	85	72	$8,5 \times 10^8$	$7,2 \times 10^8$	$4,77 \times 10^8$
		163	174	$1,63 \times 10^8$	$1,74 \times 10^8$	
4	8	73	78	$7,3 \times 10^9$	$7,8 \times 10^9$	$5,23 \times 10^9$
		295	287	$2,95 \times 10^9$	$2,87 \times 10^9$	
5	10	3	8	-	-	$1,25 \times 10^{10}$
		135	115	$1,35 \times 10^{10}$	$1,15 \times 10^{10}$	
6	12	32	30	$3,2 \times 10^{10}$	$3,0 \times 10^{10}$	$2,11 \times 10^{10}$
		112	110	$1,12 \times 10^{10}$	$1,1 \times 10^{10}$	
7	14	40	42	$4,0 \times 10^{10}$	$4,2 \times 10^{10}$	$2,87 \times 10^{10}$
		163	165	$1,63 \times 10^{10}$	$1,65 \times 10^{10}$	
С-т	18,5	31	35	$3,1 \times 10^{10}$	$3,5 \times 10^{10}$	$2,37 \times 10^{10}$
		152	134	$1,52 \times 10^{10}$	$1,34 \times 10^{10}$	

Таблица 3.13.

Результаты анализа технологического процесса биосинтеза по стадиям.

№ пробы	Время роста	Cell-tainer		Преферментер		Ферментер		
		ΔОП	КОЕ/г (см <sup>3</sup> )	ΔОП	КОЕ/г (см <sup>3</sup> )	ΔОП	КОЕ/г (см <sup>3</sup> )	Лизин
1	2	-	-	0	$3,6 \times 10^6$	35,8	$5,9 \times 10^9$	-
2	4	-	-	1,0	$3,2 \times 10^7$	55,7	$2,2 \times 10^{10}$	21,2
3	6	-	-	3,3	$4,7 \times 10^8$	97,5	$3,2 \times 10^{10}$	33,6
4	8	-	-	7,8	$5,3 \times 10^9$	113,9	$3,5 \times 10^{10}$	44,3
5	10	-	-	18,8	$1,3 \times 10^{10}$	129,1	$4,1 \times 10^{10}$	55,6
6	12	-	-	30,3	$2,1 \times 10^{10}$	139,6	$4,5 \times 10^{10}$	64,6
7	14	-	-	47,8	$2,9 \times 10^{10}$	145,2	$4,7 \times 10^{10}$	73,8
8	16	53,6	$2,7 \times 10^{10}$	-	-	150,9	$5,4 \times 10^{10}$	84,2
9	18	-	-	-	-	155,0	$6,0 \times 10^{10}$	93,6
10	20	-	-	-	-	158,1	$6,2 \times 10^{10}$	101,5
11	22	-	-	-	-	160,6	$6,4 \times 10^{10}$	110,6



Продолжение табл. 3.13

12	24	-	-	-	-	156,5	$5,2 \times 10^{10}$	124,8
13	32	-	-	-	-	154,6	$4,6 \times 10^{10}$	129,4
14	40	-	-	-	-	144,7	$4,2 \times 10^{10}$	147,6
15	48	-	-	-	-	132,5	$3,9 \times 10^{10}$	163,9

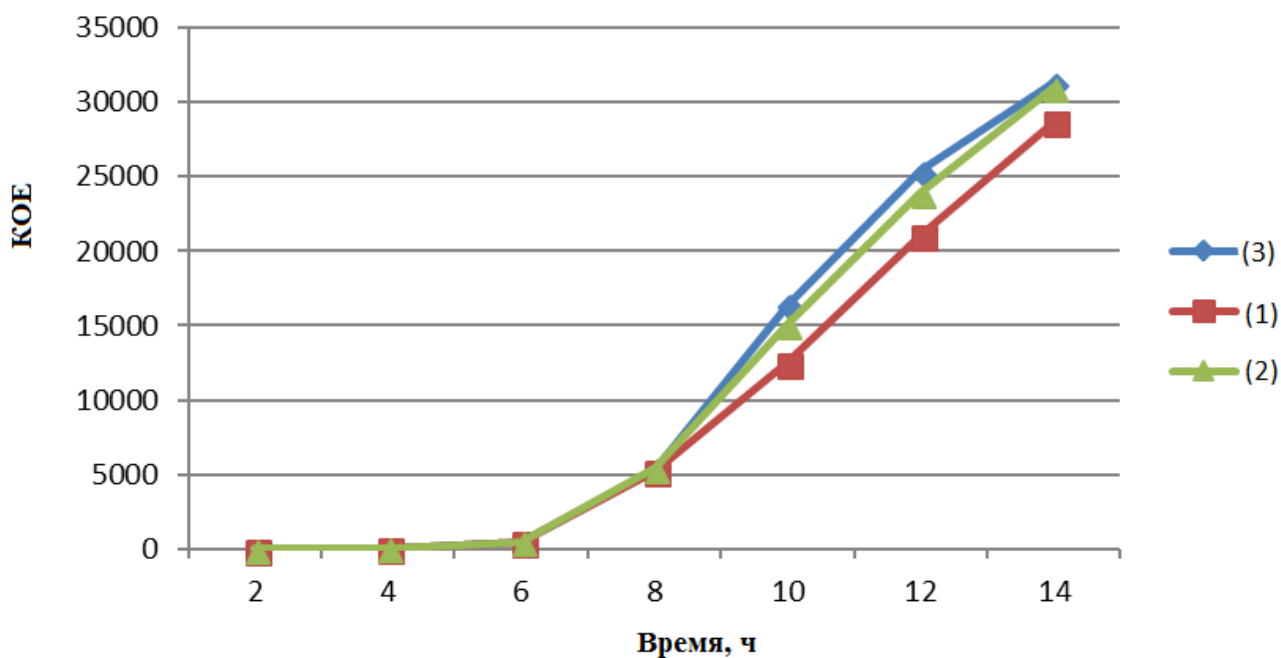


Рис. 3.6. Графики скорости роста культуры в преферментере опыт 2 повторности 1-3

При проведении посевов на агаризованные питательные среды использовались современные материалы (стерильные пластиковые чашки Петри диаметром 90 мм) как показано на рисунке 3.7.



Рис. 3.7. Серийные высевы на агаризованные питательные среды

Опыт № 2 показал, что среднее время роста преферментера составляет 14 часов роста. Бактериальная популяция при дозе засева 1% имеет лаг-фазу продолжительностью до 6 часов и экспоненциальную фазу – до 8 часов, что коррелирует с показаниями оптической плотности культуральной жидкости как  $\Delta ОП = 5,0-7,0$  и  $\Delta ОП = 48,0-50,0$ , соответственно. После посева рабочего ферментера, полученным посевным материалом, популяция клеток проходит лаг-фазу за 3-4 часа роста. Средний уровень накопления лизина составляет 165,2 г/кг, как показано на рисунке 3.5.

**Опыт №3.** Производственный цикл выполнялся по стандартной инструкции ведения технологического процесса биосинтеза лизина.

Доза засева преферментера составила 10% инокулята от первичного объема питательной среды.

Выполнено 3 повторности опыта, результаты которого изложены в таблицах 3.14, 3.15, 3.16, 3.17, 3.18, 3.19. Графически результаты опытов показаны на рисунке 3.8.

Таблица 3.14.

Количество жизнеспособных клеток в преферментере опыт 3 повторность 1

№ пробы	Часы роста	Число колоний на чашке		Среднее значение 2-х повторностей, КОЕ/г (см <sup>3</sup> )		Среднее значение
		1 чашка	2 чашка	1 чашка	2 чашка	
1	1	5	9			$5,35 \times 10^9$
		56	51	$5,6 \times 10^9$	$5,35 \times 10^9$	
2	2	2	4			$8,8 \times 10^9$
		85	91	$8,5 \times 10^9$	$9,1 \times 10^9$	
3	4					$2,66 \times 10^{10}$
		42	38	$4,2 \times 10^{10}$	$3,8 \times 10^{10}$	
		134	129	$1,34 \times 10^{10}$	$1,29 \times 10^{10}$	
4 п/п	5	2	1			$2,89 \times 10^{10}$
		37	45	$3,7 \times 10^{10}$	$4,5 \times 10^{10}$	
		165	169	$1,65 \times 10^{10}$	$1,69 \times 10^{10}$	
C-t п/п	20	32	31	$3,2 \times 10^{10}$	$3,1 \times 10^{10}$	$2,34 \times 10^{10}$

Таблица 3.15.

Результаты анализа технологического процесса биосинтеза по стадиям

№ пробы	Время роста	Cell-tainer		Преферментер		Ферментер		
		ΔОП	КОЕ/Г (см <sup>3</sup> )	ΔОП	КОЕ/Г (см <sup>3</sup> )	ΔОП	КОЕ/Г (см <sup>3</sup> )	Лизин
1	2	-	-	13,1	3,7x10 <sup>9</sup>	39,6	5,9x10 <sup>9</sup>	-
2	4	-	-	26,3	8,4x10 <sup>9</sup>	56,9	2,3x10 <sup>10</sup>	20,2
3	6	-	-	38,4	2,5x10 <sup>10</sup>	99,0	3,5x10 <sup>10</sup>	35,2
4	8	-	-	52,6	2,9x10 <sup>10</sup>	115,9	3,7x10 <sup>10</sup>	46,4
5	10	-	-	-	-	130,0	4,2x10 <sup>10</sup>	59,1
6	12	-	-	-	-	137,9	5,0x10 <sup>10</sup>	66,4
7	14	-	-	-	-	146,6	6,3x10 <sup>10</sup>	74,3
8	16	54,6	2,8x10 <sup>10</sup>	-	-	152,0	6,4x10 <sup>10</sup>	85,1
9	18	-	-	-	-	156,1	7,4x10 <sup>10</sup>	95,4
10	20	-	-	-	-	160,7	8,6x10 <sup>10</sup>	104,0
11	22	-	-	-	-	164,3	9,0x10 <sup>10</sup>	118,2
12	24	-	-	-	-	162,0	6,2x10 <sup>10</sup>	126,4
13	32	-	-	-	-	155,9	4,7x10 <sup>10</sup>	143,2
14	40	-	-	-	-	149,7	4,4x10 <sup>10</sup>	159,1
15	48	-	-	-	-	39,5	4,3x10 <sup>10</sup>	172,4

Таблица 3.16.

Количество жизнеспособных клеток в преферментере опыт 3 повторность 2

№ пробы	Часы роста	Число колоний на чашке		Среднее значение 2-х повторностей, КОЕ/Г (см <sup>3</sup> )		Среднее значение
		1 чашка	2 чашка	1 чашка	2 чашка	
1	1	9	4			3,1x10 <sup>9</sup>
		28	34	2,8x10 <sup>9</sup>	3,4x10 <sup>9</sup>	
2	2	6	10			7,6x10 <sup>9</sup>
		82	70	8,2x10 <sup>9</sup>	7,0x10 <sup>9</sup>	
3	4	31	28	3,1x10 <sup>10</sup>	2,8x10 <sup>10</sup>	2,28x10 <sup>10</sup>
		168	154	1,68x10 <sup>10</sup>	1,54x10 <sup>10</sup>	
4	5	34	37	3,4x10 <sup>10</sup>	3,7x10 <sup>10</sup>	2,71x10 <sup>10</sup>
		185	189	1,85x10 <sup>10</sup>	1,89x10 <sup>10</sup>	
C-t	20	33	32	3,3x10 <sup>10</sup>	3,2x10 <sup>10</sup>	2,3x10 <sup>10</sup>
		138	131	1,38x10 <sup>10</sup>	1,31x10 <sup>10</sup>	

Таблица 3.17.

Результаты анализа технологического процесса биосинтеза по стадиям.

№ пробы	Время роста	Cell-tainer		Преферментер		Ферментер		
		ΔОП	КОЕ/г (см <sup>3</sup> )	ΔОП	КОЕ/г (см <sup>3</sup> )	ΔОП	КОЕ/г (см <sup>3</sup> )	Лизин
1	2	-	-	13,0	3,1x10 <sup>9</sup>	38,7	5,7x10 <sup>9</sup>	-
2	4	-	-	25,6	7,6x10 <sup>9</sup>	57,7	2,3x10 <sup>10</sup>	19,2
3	6	-	-	36,4	2,3x10 <sup>10</sup>	97,7	3,3x10 <sup>10</sup>	34,2
4	8	-	-	51,2	2,7x10 <sup>10</sup>	116,9	3,8x10 <sup>10</sup>	45,2
5	10	-	-	-	-	128,6	4,1x10 <sup>10</sup>	58,7
6	12	-	-	-	-	137,1	4,9x10 <sup>10</sup>	65,4
7	14	-	-	-	-	146,0	6,3x10 <sup>10</sup>	72,5
8	16	54,6	2,7x10 <sup>10</sup>	-	-	150,7	6,3x10 <sup>10</sup>	84,4
9	18	-	-	-	-	154,8	7,3x10 <sup>10</sup>	94,4
10	20	-	-	-	-	159,7	8,1x10 <sup>10</sup>	103,3
11	22	-	-	-	-	163,2	9,0x10 <sup>10</sup>	117,0
12	24	-	-	-	-	161,0	5,8x10 <sup>10</sup>	125,4
13	32	-	-	-	-	156,6	4,6x10 <sup>10</sup>	142,6
14	40	-	-	-	-	149,0	4,4x10 <sup>10</sup>	158,3
15	48	-	-	-	-	140,1	4,0x10 <sup>10</sup>	171,1

Таблица 3.18.

Количество жизнеспособных клеток в преферментере опыт 3 повторность 3

		Число колоний на чашке		Среднее значение 2-х повторностей, КОЕ/г (см <sup>3</sup> )		Среднее значение
		1 чашка	2 чашка	1 чашка	2 чашка	
	1	9	8	-	-	3,65x10 <sup>9</sup>
		32	41	3,2x10 <sup>9</sup>	4,1x10 <sup>9</sup>	
	2	9	11	-	-	8,4x10 <sup>9</sup>
		93	75	9,3x10 <sup>9</sup>	7,5x10 <sup>9</sup>	
	4	36	31	3,6x10 <sup>10</sup>	3,1x10 <sup>10</sup>	2,53x10 <sup>10</sup>
		172	167	1,72x10 <sup>10</sup>	1,67x10 <sup>10</sup>	
	5	41	36	4,1x10 <sup>10</sup>	3,6x10 <sup>10</sup>	2,96x10 <sup>10</sup>
		201	213	2,01x10 <sup>10</sup>	2,13x10 <sup>10</sup>	
C-t	20,5	30	33	3,0x10 <sup>10</sup>	3,3x10 <sup>10</sup>	2,31x10 <sup>10</sup>
		152	139	1,52x10 <sup>10</sup>	1,39x10 <sup>10</sup>	

Таблица 3.19.

## Результаты анализа технологического процесса биосинтеза по стадиям

№ пробы	Время роста	Cell-tainer		Преферментер		Ферментер		
		ΔОП	КОЕ/г (см <sup>3</sup> )	ОП	КОЕ/г (см <sup>3</sup> )	ΔОП	КОЕ/г (см <sup>3</sup> )	Лизин
1	2	-	-	3,6	5,4x10 <sup>9</sup>	40,9	6,8x10 <sup>9</sup>	-
2	4	-	-	24,6	8,8x10 <sup>9</sup>	59,6	2,1x10 <sup>10</sup>	19,5
3	6	-	-	34,5	2,7x10 <sup>10</sup>	99,0	3,0x10 <sup>10</sup>	35,6
4	8	-	-	47,4	2,9x10 <sup>10</sup>	119,5	3,2x10 <sup>10</sup>	46,2
5	10	-	-	-	-	127,2	3,6x10 <sup>10</sup>	59,3
6	12	-	-	-	-	137,8	3,9x10 <sup>10</sup>	63,8
7	14	-	-	-	-	146,8	6,0x10 <sup>10</sup>	74,4
8	16	53,6	2,6x10 <sup>10</sup>	-	-	148,6	6,4x10 <sup>10</sup>	85,8
9	18	-	-	-	-	154,3	6,5x10 <sup>10</sup>	95,2
10	20	-	-	-	-	158,8	8,5x10 <sup>10</sup>	105,3
11	22	-	-	-	-	163,7	8,9x10 <sup>10</sup>	118,4
12	24	-	-	-	-	159,0	4,8x10 <sup>10</sup>	124,3
13	32	-	-	-	-	150,1	4,3x10 <sup>10</sup>	138,6
14	40	-	-	-	-	143,1	4,1x10 <sup>10</sup>	156,4
15	48	-	-	-	-	137,8	4,0x10 <sup>10</sup>	171,3

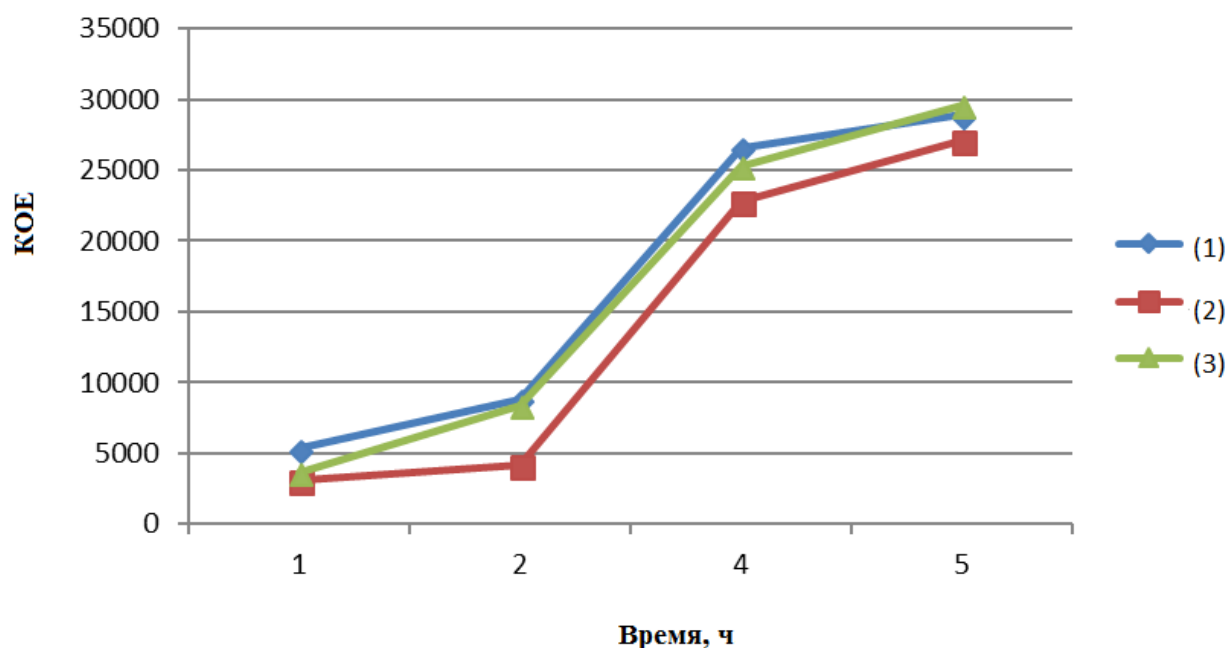


Рис. 3.8. Графики скорости роста культуры в преферментере опыт 3 повторности 1-3

Подсчет количества колониобразующих единиц производился на приборе «Счетчик колоний микроорганизмов СКМ – 2», представленном на рисунке

3.9. Подсчет количества колоний микроорганизмов производился при маркировке колоний электропером на чашке Петри и выводом данных подсчета на цифровой индикатор. Звуковой контроль процесса счета с помощью сигнала, раздающегося в момент маркировки, возможность регулируемой LED-подсветки по контуру чашки Петри, устанавливаемая на приборе увеличительная линза с возможностью регулировки ее по высоте обеспечивает качественный учет колоний микроорганизма, как показано на рисунке 3.9.

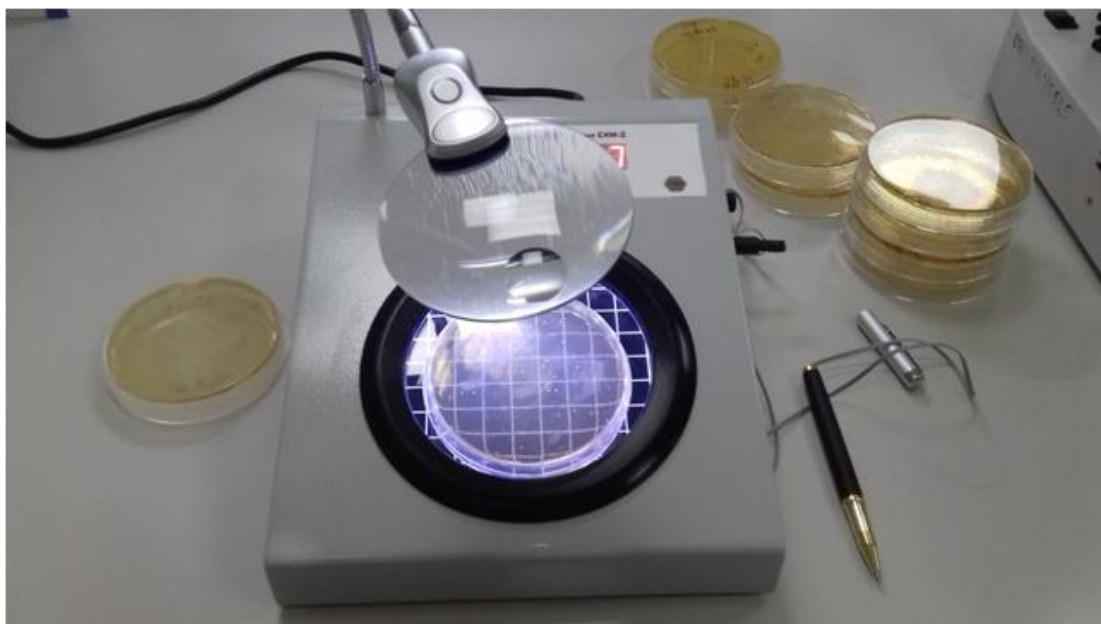


Рис. 3.9. Счетчик колоний микроорганизмов СКМ – 2

Опыт № 3 показал, что среднее время роста преферментера составляет 8 часов роста. Бактериальная популяция при дозе засева 10% имеет лаг-фазу продолжительностью до 2-3 часов и экспоненциальную фазу – до 5 часов, что коррелирует с показаниями оптической плотности культуральной жидкости как  $\Delta ОП = 5,0-7,0$  и  $\Delta ОП = 48,0-50,0$ , соответственно. После посева рабочего ферментера, полученным посевным материалом, популяция клеток проходит лаг-фазу за 2-3 часа роста. Средний уровень накопления лизина составляет 171,6 г/кг, как показано на рисунке 3.5.

Результаты проведенного эксперимента изложены в сводной таблице 3.20.

Таблица 3.20.

Количество жизнеспособных клеток в преферментере опыт 1-3 повторность 1-3

Часы роста	Повторн 1		Повторн 2		Повторн 3		Среднее значение
Опыт 1							
	1 чашка	2 чашка	1 чашка	2 чашка	1 чашка	2 чашка	
2	$3,0 \times 10^6$	$3,1 \times 10^6$	$3,6 \times 10^6$	$3,8 \times 10^6$	$3,2 \times 10^6$	$3,1 \times 10^6$	$3,3 \times 10^6$
4	$3,5 \times 10^6$	$4,4 \times 10^6$	$4,1 \times 10^6$	$4,5 \times 10^6$	$3,6 \times 10^6$	$3,4 \times 10^6$	$3,9 \times 10^6$
6	$3,0 \times 10^7$	$2,0 \times 10^7$	$1,55 \times 10^7$	$1,75 \times 10^7$	$3,0 \times 10^7$	$3,2 \times 10^7$	$2,4 \times 10^7$
8	$8,2 \times 10^7$	$7,5 \times 10^7$	$8,7 \times 10^7$	$9,2 \times 10^7$	$8,8 \times 10^7$	$7,4 \times 10^7$	$8,3 \times 10^7$
10	$6,4 \times 10^7$	$6,8 \times 10^7$	$3,7 \times 10^8$	$4,1 \times 10^8$	$7,4 \times 10^7$	$8,3 \times 10^7$	$6,1 \times 10^7$
12	$3,0 \times 10^8$	$2,7 \times 10^8$	$2,8 \times 10^8$	$2,58 \times 10^8$	$3,3 \times 10^8$	$3,7 \times 10^8$	$3,0 \times 10^8$
14	$4,4 \times 10^8$	$5,8 \times 10^8$	$8,2 \times 10^8$	$9,5 \times 10^8$	$9,2 \times 10^8$	$8,5 \times 10^8$	$7,6 \times 10^8$
16	$9,8 \times 10^8$	$9,4 \times 10^8$	$1,74 \times 10^8$	$1,82 \times 10^8$	$9,0 \times 10^8$	$8,1 \times 10^9$	$6,6 \times 10^8$
18	$3,8 \times 10^9$	$4,7 \times 10^9$	$8,5 \times 10^8$	$9,1 \times 10^9$	$9,7 \times 10^9$	$8,8 \times 10^9$	$7,4 \times 10^9$
20	$1,08 \times 10^{10}$	$1,12 \times 10^{10}$	$2,65 \times 10^9$	$2,81 \times 10^9$	$1,8 \times 10^{10}$	$1,74 \times 10^{10}$	$1,9 \times 10^{10}$
22	$1,28 \times 10^{10}$	$1,45 \times 10^{10}$	$9,6 \times 10^9$	$9,8 \times 10^9$	$1,31 \times 10^{10}$	$2,45 \times 10^{10}$	$4,3 \times 10^{10}$
24	$2,05 \times 10^{10}$	$2,21 \times 10^{10}$	$2,54 \times 10^{10}$	$2,49 \times 10^{10}$	$2,48 \times 10^{10}$	$2,72 \times 10^{10}$	$2,4 \times 10^{10}$
C/t 18	$1,85 \times 10^{10}$	$2,11 \times 10^{10}$	$2,38 \times 10^{10}$	$2,14 \times 10^{10}$	$2,38 \times 10^{10}$	$2,12 \times 10^{10}$	$2,2 \times 10^{10}$
Опыт 2							
2	$3,3 \times 10^6$	$3,6 \times 10^6$	$3,3 \times 10^6$	$3,7 \times 10^6$	$3,7 \times 10^6$	$3,1 \times 10^6$	$3,5 \times 10^6$
4	$3,1 \times 10^7$	$3,2 \times 10^7$	$3,4 \times 10^7$	$3,1 \times 10^7$	$2,94 \times 10^7$	$2,87 \times 10^7$	$3,1 \times 10^7$
6	$7,8 \times 10^8$	$7,6 \times 10^8$	$8,0 \times 10^8$	$7,8 \times 10^8$	$1,63 \times 10^8$	$1,74 \times 10^8$	$5,8 \times 10^8$
8	$7,7 \times 10^9$	$8,1 \times 10^9$	$7,6 \times 10^9$	$7,8 \times 10^9$	$2,95 \times 10^9$	$2,87 \times 10^9$	$6,2 \times 10^9$
10	$1,54 \times 10^{10}$	$1,49 \times 10^{10}$	$1,68 \times 10^{10}$	$1,59 \times 10^{10}$	$1,35 \times 10^{10}$	$1,15 \times 10^{10}$	$1,5 \times 10^{10}$
12	$3,7 \times 10^{10}$	$3,2 \times 10^{10}$	$3,9 \times 10^{10}$	$3,5 \times 10^{10}$	$3,2 \times 10^{10}$	$3,0 \times 10^{10}$	$3,4 \times 10^{10}$
14	$3,9 \times 10^{10}$	$4,7 \times 10^{10}$	$3,7 \times 10^{10}$	$4,9 \times 10^{10}$	$4,0 \times 10^{10}$	$4,2 \times 10^{10}$	$4,2 \times 10^{10}$
C/t 18	$3,4 \times 10^{10}$	$1,8 \times 10^{10}$	$3,6 \times 10^{10}$	$1,6 \times 10^{10}$	$3,1 \times 10^{10}$	$3,5 \times 10^{10}$	$2,8 \times 10^{10}$
Опыт 3							
2	$8,5 \times 10^9$	$9,1 \times 10^9$	$8,2 \times 10^9$	$7,0 \times 10^9$	$9,3 \times 10^9$	$7,5 \times 10^9$	$8,3 \times 10^9$
4	$4,2 \times 10^{10}$	$3,8 \times 10^{10}$	$1,68 \times 10^{10}$	$1,54 \times 10^{10}$	$1,68 \times 10^{10}$	$1,54 \times 10^{10}$	$2,4 \times 10^{10}$
6	$3,7 \times 10^{10}$	$4,5 \times 10^{10}$	$3,4 \times 10^{10}$	$3,7 \times 10^{10}$	$4,1 \times 10^{10}$	$3,6 \times 10^{10}$	$3,8 \times 10^{10}$
C/t 18	$3,2 \times 10^{10}$	$3,1 \times 10^{10}$	$3,3 \times 10^{10}$	$3,2 \times 10^{10}$	$3,0 \times 10^{10}$	$3,3 \times 10^{10}$	$3,2 \times 10^{10}$

Таблица 3.21.

## Расчет достоверности различий по t-критерию Стьюдента

Часы роста	1	$t_{Эмп}$ 1 и 2	2	$t_{Эмп}$ 2 и 3	3	$t_{Эмп}$ 1 и 3
2	$3,3 \times 10^6$	0,9	$3,5 \times 10^6$	22,6*	$8,3 \times 10^9$	22,6*
4	$3,9 \times 10^6$	34,3*	$3,1 \times 10^7$	4,7*	$2,4 \times 10^{10}$	4,7*
6	$2,4 \times 10^7$	4,3*	$5,8 \times 10^8$	23,1*	$3,8 \times 10^{10}$	23,6*
8	$8,3 \times 10^7$	5,9*	$6,2 \times 10^9$			
10	$6,1 \times 10^7$	18,8*	$1,5 \times 10^{10}$			
12	$3,0 \times 10^8$	22,1*	$3,4 \times 10^{10}$			
14	$7,6 \times 10^8$	21,6*	$4,2 \times 10^{10}$			
16	$6,6 \times 10^8$					
18	$7,4 \times 10^9$					
20	$1,9 \times 10^{10}$					
22	$4,3 \times 10^{10}$					
24	$2,4 \times 10^{10}$					
C/t 18	$2,2 \times 10^{10}$	0,9	$2,8 \times 10^{10}$	1,7	$3,2 \times 10^{10}$	10,8*
$p \leq 0.05$	2.23	$p \leq 0.01$	3.17			

\*-различия достоверны

Расчет достоверности различий по t-критерию Стьюдента показал, что полученные данные по определению количества жизнеспособных клеток в преферментере можно считать достоверными, следовательно, возможно сделать выводы на основе полученных опытных данных.

Графически результаты опытов показаны на рисунке 3.10.

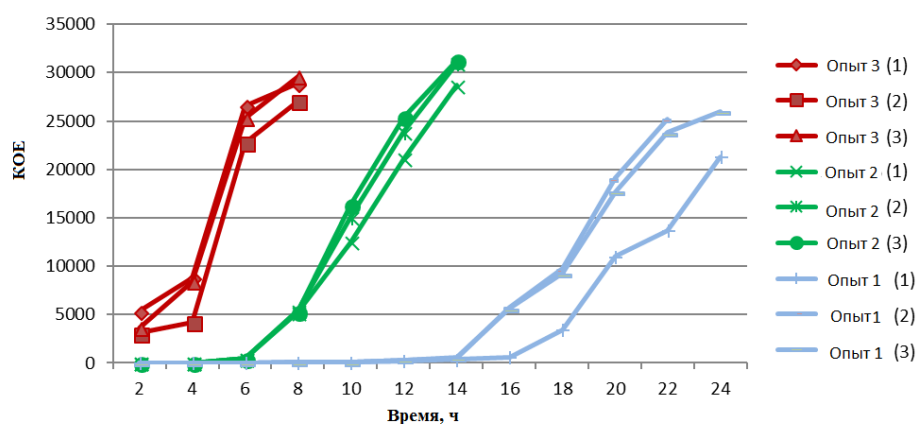


Рис. 3.10. Графики скорости роста культуры в преферментере опыт 1-3 повторности 1-3



Результаты определения КОЕ в микробной популяции преферментера предназначенного для посева основного ферментера показали, что с увеличением засевной дозы преферментера значительно уменьшается продолжительность лаг-фазы, незначительно сокращается продолжительность фазы экспоненциального роста, что в последствии ведет к сокращению времени наработки посевного материала для основного ферментера.

## Заключение

Результаты данных, полученных в ходе эксперимента, обработаны и занесены в таблицу 3.22.

Таблица 3.22.

### Расчет эффективности процесса биосинтеза лизина

Этап технологического процесса	Опыт 1 контроль	Опыт 2	Опыт 3
Подготовка оборудования	12,00	12,00	12,00
Стерилизация оборудования	2,00	2,00	2,00
Преферментация	22,70	12,00	8,00
Ферментация	48,00	48,00	48,00
Итого:	84,70	74,00	70,00
Изменения продолжительности цикла, %	100,00	86,05	81,40
Уровень накопления L-лизина в процессе биосинтеза, г/кг	160,70	165,20	171,61
Уровень накопления L-лизина, %	100,00	102,80	106,79
Время преферментации в общем технологическом цикле, %	26,80	16,22	11,43
Общая продуктивность процесса, г/л/час (при продуктивности ферментации -1,15 г/л/час)	0,64	0,75	0,79
Общая продуктивность процесса, %	100,00	117,19	123,44

Получены фактические данные, что при увеличении дозы засева преферментера до 1% и 10% при контрольной дозе 0,01% продолжительность лаг-фазы роста клеток культуры сокращается до 6 час и 4 час соответственно (контроль – 16 час).

Общее время роста преферментера сокращается до 12 час и 8 час соответственно, относительно контрольного – 22,7 часа роста и снижает время преферментации в общем технологическом цикле до 16,22% и 11,43% соответственно, относительно контрольного – 26,80%.

Лаг-фаза развития культуры в рабочем ферментере после посева преферментом с различными дозами засева не имеет существенной разницы.

Общая продуктивность процесса, при продуктивности ферментации – 1,15 г/л/час, увеличивается до 0,75 и 0,79 г/л/час, по сравнению с контролем – 0,64 г/л/час.

Уровень накопления лизина в рабочем ферментере инокулированного преферментом с разными дозами посева 1%, 10% увеличивается на 2,8 и 6,79 % соответственно, по сравнению с контролем.

Сокращение продолжительности цикла на 13,95% и 18,6%, позволяет увеличить общую продуктивность процесса биосинтеза на 17,19 и 23,44%.

Результаты биологического эксперимента, проведенного в условиях промышленного производства позволяют сделать вывод, что цели и задачи исследования: изучение влияния засевной дозы на скорость нарастания биомассы *Corynebacterium glutamicum-11404* в преферментёре и уровень продуктивности биосинтеза лизина в основном ферментере выполнены.

Эксперименты по увеличению засевной дозы преферментера показали:

- продолжительность роста культуры в преферментере уменьшилась;
- инокулят, полученный при увеличенной засевной дозе повышает уровень продуктивности культуры в основном ферментере.

Изменение параметров «инокуляционной цепи» имеет большое значение для изменения продолжительности полного технологического цикла производства лизина.

Сокращенный технологический цикл позволит повысить коэффициент использования оборудования, уменьшить расход энергоносителей (пар, электроэнергия и пр.) и увеличить выход готовой продукции. Проведенные исследования позволяют сделать выводы, что увеличенная доза засева уменьшает себестоимость готовой продукции и повышает рентабельность производства лизина.

Выводы:

1. Наиболее эффективной дозой засева является доза – 10% инокулята от объема питательной среды преферментера.
2. Продолжительность производственного цикла при 10 % дозе засева сокращается на 18,6%.
3. Общая продуктивность процесса повышается на 23,44%.

### Список использованной литературы

1. Аузан, С.И., – Биохимические изменения состава кормового концентрата L-лизина в зависимости от условий культивирования *Brevibacterium* штамм 22 // Автореф. канд. дисс. – Рига, 1970. – 28 с.
2. Бекер, М. Е., Упит А. А. – Аминокислоты микробного синтеза. – Рига, 1968. – 68 с.
3. Беккер М.Е. Введение в биотехнологию – Рига: Пищевая промышленность, 1978 – 231 с.
4. Большой практикум по микробиологии. – М.: Высшая школа. – 1962. – 491с.
5. Биотехнология. Принципы и применения. – Пер. с англ./ Под ред. И.Хиггинса, Д.Беста, Дж. Джойса. – М.: Мир. – 1988.
6. Блохина И.Н., Огарков В.И., Угодчиков Г.А. Управление процессами культивирования микроорганизмов. Горький, Волго – Вятское книжное изд., 1983. – 163 с.
7. Биотехнология: Учебное пособие для ВУЗов. В 8 кн./ Под ред. Егорова Н.С., Самуилова В.Д. – М.: Высшая школа. – 1987.
8. Биотехнология Кн. 3: Клеточная инженерия/Под ред. Н. С. Егорова, В. Д. Самуилова. / Р. Г. Бутенко, М. В. Гусев, А. Ф. Киркин и др. – М.: Высш. шк., 1987. – 127 с.
9. Биотехнология Кн. 4: Автоматизация биотехнологических исследований/Под ред. Н. С. Егорова, В. Д. Самуилова. / Д. В. Зудин, В. М. Кантере, Г. А. Угодчиков. – М.: Высш. шк., 1987. – 112 с.
10. Биотехнология Кн. 2: Современные методы создания промышленных штаммов микроорганизмов/Под ред. Н. С. Егорова, В. Д. Самуилова. / В. Г. Дебабов, В. А. Лившиц. – М.: Высш. шк., 1988.— 208 с.
11. Биотехнология Кн. 8: Инженерная энзимология / Под ред. Н. С. Егорова, В. Д. Самуилова. / А. А. Клёсов, В. К. Швядас и др. – М.: Высш. шк.,

1987. – 143 с.

12. Биотех. 2: Современные методы создания промышленных штаммов микроорганизмов 1988-208 с Автор: Дебабов В.Г., Лившиц В.А.

13. Биотехнология. Принципы и применение: Пер. с англ./ Пол.ред. И. Хиггинса, Д. Беста и Дж. Джонса. – М: Мир, 1988. – 480 с.

14. Биотехнология/ Под ред. Кестнера А. И.

15. Букин В.Н., Куцева Л.С., Баздырева Н.М. – Микробиологический способ получения лизина. – В кн.: Лизин – получение и применение в животноводстве. – М.: Наука, 1973. – 8-22 с.

16. Вальдман А.Р., Бекер В.Ф. – Биологические свойства кормового концентрата лизина (ККЛ). – В кн.: Лизин – получение и применение в животноводстве. – М.: Наука, 1973. – 40-52 с.

17. Вальдман А.Р., Бекер В.Ф., Аузан С.И. Состав и биологическая эффективность кормового концентрата лизина. – В кн.: Лизин получение и применение в животноводстве. – М.: Наука, 1973. – 52 с.

18. Вальдман А.Р., Бекер В.Ф. – Сравнительная биологическая оценка различных препаратов лизина, полученных микробиологическим способом. В кн.: Биологически активные кормовые добавки. – Рига: Зинатне, 1965. – 128 с.

19. Винаров А.Ю., Кухаренко А.А., Панфилов В.И. Лабораторные и промышленные ферментёры. -М.: РХТУ им. Д.И. Менделеева, 2004 -97 с.

20. Виестур У.Е., Шмите И.а., Жилевич А.В. Биотехнология: Биологические агенты, технология, аппаратура. – Рига: Зинатне, 1987.-263 с.

21. Воробьев А.А., Быков А.С., Панков Е.П., Рыбакова А.М. Микробиология.- М.: Медицина, 2003.- 238 с.

22. Воробьева Л.И. –Пропионовокислые бактерии.- М. Издательство Московского Университета, 1995г.-288с.

23. Войно Л.И., Строева С.С., Устинова Ю.В. – Методические указания к лабораторному практикуму по дисциплине «Общая биология и микробиология» для студентов направления 240700.62 «Биотехнология». – Москва, 2013. –

12 с.

24. Волова Т. Г. Биотехнология – Новосибирск: Изд-во Сибирского отделения Российской Академии наук, 1999. – 252 с.
25. Высоцкий В. В., Мазурова И. К. и Шмелева Е. А. – Сравнительное электронно-микроскопическое изучение 8 представителей рода *Corynebacterium*, выращенных на твердой питательной среде в стационарной фазе развития // Журн, микр., эпид, и иммун., № 9. -1976. – 121 с.
26. Герасименко В. Г. Введение в биотехнологию. - Киев. Выша школа. 1989.
27. Горленко В.А. Кутузова Н.М. Пятунина С.К. – Научные основы биотехнологии. Часть 1. Нанотехнологии в биотехнологии.- М.Прометей, 2013г.-262с.
28. Гусев М.В., Минаева Л.А. Микробиология. – М.: Академия, 2003.- 464 с.
29. Гидролитические ферменты: URL: <http://helpiks.org/5-109299.html>: дата обращения 21.01.2017
30. Грачева И.М. – Технология ферментных препаратов. – М.: Агропромиздат, 1987. – 335 с.
31. Дебабов В.Г., Лившиц В.А. Современные методы создания промышленных штаммов микроорганизмов. – М.: Высшая школа, 1988. – 208 с.
32. Ешков Н.П. Основы биотехнологии. – СПб.: Наука. – 1995.
33. Егоров Н.С. Практикум по микробиологии. – М.: Издательство Московского Университета, 1976. 307 с.
34. Егоров Н.С. Биотехнология. Проблемы и перспективы. – М.: Высшая школа. – 1987.
35. Жарикова Г.Г. Основы микробиологии.- М.: Академия, 2008. – 136 с.
36. Загоскина Н.В., Назаренко Л.В., Калашникова Е.А. Биотехнология: теория и практика. – М.Оникс, 2009 г.-496с.

37. Касаткин А.Г. Основные процессы и аппараты химической технологии. Государственное научно-техническое издательство химической литературы М.:1961 г.-830 с.
38. Красноштанова А.А., Крылов Б.А., Бабусенко Е.С. – Основы биотехнологии. Учебное пособие. – Москва, РХТУ им. Д.И. Менделеева, 2001. – 84 с.
39. Кнорре Д.Г., Мызина С.Д. Биологическая химия. – 3-е изд., испр. – М.: Высшая школа. – 2000. – 479с.
40. Лабораторный регламент ЛР-00479942-1-2011. – Получение лизина на основе продуктов глубокой переработки зерна. – М.: ФГИУ ГосНИИгенетика, 2011. – 35 с.
41. Личко Н.М., Курдина В.Н. и др. – Технология переработки продукции растениеводства / под ред. Личко Н.М. – М.: Колос, 2000. -552 с.
42. Лысак, В.В. Микробиология : учеб. пособие / В. В. Лысак. – Минск: БГУ, 2007. – 424 с.
43. Манаков, М.Н. Теоретические основы технологии микробиологических производств: Учеб пособие по спец.Биотехнология. / М.Н. Манаков, Д. Г. Победимский – М.: Агропромиздат. – 1990. – 271 с.
- 44.Мишустин А.И., Котова И.Б. – Микробиология- М.: Агропромиздат 1987 г.-368 с.
45. Нетрусов А.И., Егорова М.А., Захарчук Л.М. – Практикум по микробиологии: учебное пособие для студентов высших учебных заведений / под ред. Нетрусова А. И. – М.: Академия, 2005. – 608 с.
46. Озолин Р. К. – Получение и применение аминокислот. – Рига, 1970. – 17 с.
47. Основы биотехнологии: Методические рекомендации к занятиям/ Сост. Гурина С. В., Потехина Т. С. – СПб.: СПХФИ. – 1997. – 44с.
48. Сиротин А.А. Практикум по микробиологии/ А.А. Сиротин.- Белгород, 2007. – 78 с.

49. Сиротин А.А., Глухарева Н.А., Оспищева Н.В., Бондаренко В.В., Резун А.П., Зенинская Н.А. – Процесс биосинтеза лизина штаммом *Corynebacterium Glutamicum B-11167* на основе сред, содержащих гидролизат пшеничного глютенa // Современные проблемы науки и образования. – 2012. – № 6.
50. Саруханов А. В., Быков В. А. Оборудование микробиологических производств: Справочник. – М.: Колос. – 1993. –384с.
51. Тимощенко Л.В., Чубик М.В., Пестряков А.Н. – Основы микробиологии и биотехнологии: учебное пособие. – Томск: Изд-во Томского политехнического университета, 2012. – 188 с.
52. Трегубов Н.Н., Костенко В.Г. – Технохимический контроль крахмало-паточного производства. – М.: Агропромиздат, 1991. – 271 с.
53. Уайтхерст Р.Дж. – пер. с англ. д-ра хим. наук С.В. Макарова. – СПб.: Профессия, 2013. – 408 с.
54. Фаустов А.С., Чубирко М.И., Бобрешова О.В., Попов В.И., Аристов И.В., Кулинцов П.И. – Лизин – одна из важнейших незаменимых аминокислот в обеспечении полноценного питания / под общ. ред. Фаустова А.С. – Воронеж: ВГУ, 2003. – 88 с.
55. Федорова Р.А. – Биохимические основы продуктов переработки зерна. – СПб.: Университет ИТМО, 2017. – 98 с.
56. Федосеев К.Г. – Процессы и аппараты биотехнологии в химико-фармацевтической промышленности. – М. издательство «Медицина», 1969 г. - 198 с.
57. Химический журнал – №12. – М.: ЗАО «ХимПресс», 2013. – 64 с.
58. Шлегель Г. Общая микробиология.- М.: Мир, 1987. – 567 с.
59. Burkovski A. – *Corynebacteria: Genomics and Molecular Biolog.* – 2008. – 340 с.
60. Яровенко В.Л., Гопгер Л.И. Производство ферментных препаратов из грибов и бактерий.- М.:Агропроиздат, 1976. – 444 с.
61. Inui M., Murakami S., Okino S., Kawaguchi H., Vertés A.A., Yukawa



H. Metabolic Analysis of *Corynebacterium glutamicum* during Lactate and Succinate Productions under Oxygen Deprivation Conditions. *J Mol Microbiol Biotechnol* (2004) 7:182-196.

62. Kind S., Jeong W.K., Schröder H., Wittman C. Systems-wide metabolic pathway engineering in *Corynebacterium glutamicum* for bio-based production of diaminopentane. *Metab Eng.* (2010) 12(4):341-51.

63. Pelechova J., Smekol P., Koura O. et al. Biosynthesis of L-lysine in *Corynebacterium glutamicum* on sucrose, ethanol and acetic acid. *Folia Microbiol.*, 1980, vol. 25, N 4, s. 341-346.

64. Smekal P., Pelechova I., Kindlova E. et al. Biosynteza L-lysinu na bazi hydrolyzatu dneva a kyseliny octove u kmenu *Corynebacterium glutamicum*. I. Utlizace uhlikatych zdroju. *Krasny prum*, 1980, t. 26, N 3, s. 200-202.

65. Zahoor A; Lindner SN; Wendisch VF (October 2012). "Metabolic Engineering of *Corynebacterium glutamicum* Aimed at Alternative Carbon Sources and New Products". *Computational and Structural Biotechnology Journal*. 3 (4): 1-1