

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

ИНСТИТУТ ИНЖЕНЕРНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ И ЕСТЕСТВЕННЫХ НАУК  
**Кафедра биотехнологии и микробиологии**

**ИЗУЧЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ  
ГЛЮКОЗНОГО СИРОПА, ПОЛУЧЕННОГО ИЗ  
ВТОРИЧНЫХ ПРОДУКТОВ ГЛУБОКОЙ ПЕРЕРАБОТКИ  
ЗЕРНА ПШЕНИЦЫ В ПРОЦЕССЕ ПОЛУЧЕНИЯ ЛИЗИНА**

**Выпускная квалификационная работа**  
студентки очной формы обучения  
направления подготовки 19.03.01 Биотехнология  
4 курса группы 07001316  
Цапковой Валерии Олеговны

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

**БЕЛГОРОД 2017**

## Оглавление

ВВЕДЕНИЕ.....	3
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	5
1.1. Строение и состав зерна пшеницы. Особенности сырья, используемого при производстве крахмала .....	5
1.1.1. Пшеничная мука.....	7
1.1.2. Получение крахмала. Технология производства пшеничного крахмала.....	8
1.1.3. Строение и свойства крахмала.....	11
1.2. Производство сахаристых гидролизатов крахмала.....	12
1.2.1. Амилолитические ферменты. Понятие и свойства. ....	13
1.2.2. Гидролиз крахмала. Виды гидролиза.....	18
1.2.3. Двухступенчатый ферментативный гидролиз крахмала. Ферментативное разжижение. Использование $\alpha$ -амилаз в процессе ферментативного гидролиза крахмала .....	22
1.2.4. Осахаривание разжиженного крахмала. Использование глюкоамилаз и протеолитических ферментов в процессе ферментативного гидролиза крахмала. Оценка процесса гидролиза.....	24
1.3. Свойства лизина.....	28
1.3.1. Методы получения лизина.....	30
1.3.2. Характеристика <i>Corynebacterium glutamicum</i> . ....	32
1.3.3. Приготовление стерильных питательных сред. ....	33
1.3.4. Получение посевного материала в производственных инокуляторах или посевных аппаратах.....	35
1.3.5. Ферментация.....	36
ГЛАВА 2. ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКАЯ ЧАСТЬ.....	40
2.2. Объект исследования.....	40
2.2.1. Методика постановки эксперимента.....	41
2.2.2. Методы исследования.....	52
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	60
3.1. Результаты ферментативного гидролиза крахмала В.....	60
3.2. Результаты биохимических анализов основных показателей биосинтеза лизина <i>Corynebacterium glutamicum</i> В-11404 при использовании глюкозного сиропа, полученного в процессе ферментативного гидролиза крахмала В....	63
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	71
СПИСОК ИЗУЧЕННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	72

## ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время в Российской Федерации проблемы нехватки ресурсов, ограниченного количества продуктов питания, в частности сельскохозяйственных продуктов, становятся с каждым годом все более остро. Численность населения растет, и обороты производства также приходится увеличивать всеми возможными способами. При этом качество изготавливаемой продукции не должно нести негативные последствия.

Мясо и мясные продукты в питании человека являются основными источниками полноценного белка. Лизин является первой лимитирующей аминокислотой в корме свиней и второй — в корме птиц. Также он способствует интенсивному росту молодняка, образованию меланинового пигмента в оперении птиц; влияет на формирование эритроцитов и отложение в костях кальция. Так, добавление лизина в корм животных, не только делает их мясо здоровым, с полноценным сбалансированным набором белков, жиров и углеводов, но и ускоряет развитие [5, 7].

Актуальность исследования связана с тем, что сейчас лизин широко используется в качестве пищевой добавки в рационах сельскохозяйственных животных, птицы. В растительных кормах он имеется в незначительных количествах, поэтому в рационах животных и птицы его часто не хватает.

Получение L – лизина и разработка способов, повышающих продуктивность производства данной аминокислоты, являются главным решением проблемы несбалансированных кормов и в перспективе способствуют развитию сельского хозяйства [5].

Данная тема направлена на поиск новых источников углеводного питания для микроорганизмов – продуцентов лизина.

Цель исследования: изучение возможности применения глюкозного сиропа, полученного путем ферментативного гидролиза из вторичных продуктов переработки зерна пшеницы (пшеничного крахмала группы В), в качестве компонента питательной среды при производстве L-лизина.

Для достижения поставленной цели сформулированы следующие задачи:

- проанализировать литературные данные по гидролизу крахмала и биосинтезу лизина;
- провести ферментативный гидролиз крахмала В с помощью амилолитических ферментов ( $\alpha$ -амилазы и глюкоамилазы) и протеолитических ферментов (ферментный препарат грибной протеазы Протоферм FP)
- сравнить данные исследования контроля и эксперимента по использованию в качестве компонента питательной среды глюкозного сиропа, полученного в процессе гидролиза крахмала В при получении L-лизина;
- сделать выводы о влиянии изменения компонента питательной среды на рост культуры микроорганизмов – продуцентов лизина;
- сделать выводы о влиянии изменения компонента питательной среды на выход конечного продукта (L-лизин, г/л);

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Строение и состав зерна пшеницы. Особенности сырья, используемого при производстве крахмала

Зерно пшеницы и пшеничная мука успешно используются в качестве сырья для производства крахмала. Технологии последнего десятилетия направлены на создание методов получения высококачественных клейковины и крахмала по безотходной технологии производства [15].

На сегодняшний день в Российской Федерации выращивают пшеницы двух основных ботанических видов – мягкие и твердые. На долю мягкой пшеницы приходится более 90% посевов и сборов.

В состав оболочек пшеничного зерна входят клетчатка–18-22%, азотистые вещества–4,5-4,8%, минеральные вещества–3,5-4,5%, пентозаны и гемицеллюлоза–43-45%. Эндосперм пшеницы состоит из паренхимных клеток, содержащих крахмальные гранулы и сетку нерастворимых в воде белков. Также в состав клеток входят минеральные вещества, углеводы и незначительное количество водорастворимых белков. Состав эндосперма зерна пшеницы напрямую зависит от климата мест произрастания пшеницы, условий выращивания, сорта пшеницы. Зародыш пшеницы состоит из белков (33-39%) и небольшого количества липидов и липидоподобных соединений (12-19%) [15,22,40].

Весь крахмал зерна пшеницы равномерно сконцентрирован в эндосперме, который располагается по всей внутренней части зерна и составляет до 85% его массы. Он состоит из крупных тонкостенных клеток, заполненных зернами крахмала, которые прочно связаны белковыми веществами, не поддающимися механическому отделению.

Белки распределены в эндосперме неравномерно: наибольшее их количество содержится в его периферийных частях. Других составляющих

(жир, сахара и клетчатка) в эндосперме немного, наряду с белками они находятся в окраинных частях эндосперма. Химический состав зерна одной и той же культуры колеблется в широких пределах в зависимости от почвенно-климатических условий, агротехнических мероприятий и генетических особенностей сорта.

Зерно мягких видов пшеницы округлое, имеет ярко выраженную бороздку (опущение на конце зерна, противоположном зародышу), хорошо заметную глубокую бороздку, проходящую вдоль зерновки. Из всех злаковых культур пшеница отличается наиболее высоким содержанием белка, однако он неполноценен из-за дефицита аминокислот лизина и метионина [23,32,42].

В крахмало-паточном производстве может использоваться пшеница основных групп: средняя и слабая. Некондиционная пшеница используется для глубокой переработки ограниченно [23,42].

В зерне, подвергшемся самосогреванию, возрастает количество микроорганизмов, изменяется химический состав, увеличивается количество растворимых веществ, растет кислотность, ухудшается качество клейковины [15].

Применение такой пшеницы и муки из нее для выработки крахмала затруднено, плохо идет разделение. Проросшая пшеница также плохо поддается переработке. Вследствие активации ферментной системы зерна при прорастании повышается содержание растворимых веществ, в том числе сахаров. Вследствие действия протеаз и липаз уменьшается выход клейковины и ухудшаются ее свойства [32,42].

### 1.1.1. Пшеничная мука

В настоящее время в РФ пшеничная мука вырабатывается пяти основных сортов: крупчатка, высший, I, и II сорта и обойная. Мука всех сортов может использоваться при производстве крахмала, при этом главную роль играют факторы экономической целесообразности и требования к качеству продуктов производства. Основным показателем, характеризующим качество муки – зольность: чем она ниже, тем выше качество муки. Показатель зольности определяет соотношение в муке отрубей и эндосперма [1,15,22].

В процессе размола измельчению подвергаются все части зерна. Размеры частиц колеблются от 10 до 250 мкм. Из стекловидных пшениц получают муку с более крупными частицами, в тоже время размол мучнистых сортов происходит до крахмала и белковых частиц. Средний размер частиц муки при односортом помоле находится в пределах 16 мкм, большая половина частиц имеет размеры менее 15 мкм. Однако следует учитывать, что в муке много частиц размером более 35 мкм, т. е. по сути это обломки клеточных структур с большим количеством крахмальных зерен в белковой матрице. Мука состоит в основном из крахмала [1,23,32].

Важным показателем при разделении крахмала и белка является плотность их частиц. Пшеничный белок имеет плотность 1,329-1,341 г/см<sup>3</sup>, крахмальные зерна – 1,470-1,495 г/см<sup>3</sup>. Существенное влияние на качество муки оказывает технология помола. В зависимости от выхода пшеничной муки II сорта содержание белка в ней может колебаться от 12,8 до 16,6%, клейковины – от 23,6 до 40%, крахмала – от 67,6 до 73% [15,32].

## 1.1.2. Получение крахмала. Технологии производства пшеничного крахмала

Технологические схемы производства пшеничного крахмала многочисленны и разнообразны, но независимо от этого включают следующие операции: смешивание муки с водой (замешивание теста), разделение клейковины и крахмала, очистка полученного крахмала от механических примесей, освобождение клейковины от крахмала [34].

В настоящее время используются 2 наиболее распространенных метода получения пшеничного крахмала: метод Мартина («сладкий способ») и применяемый в США метод «взбитого теста» (баттер – процесс) [15,22].

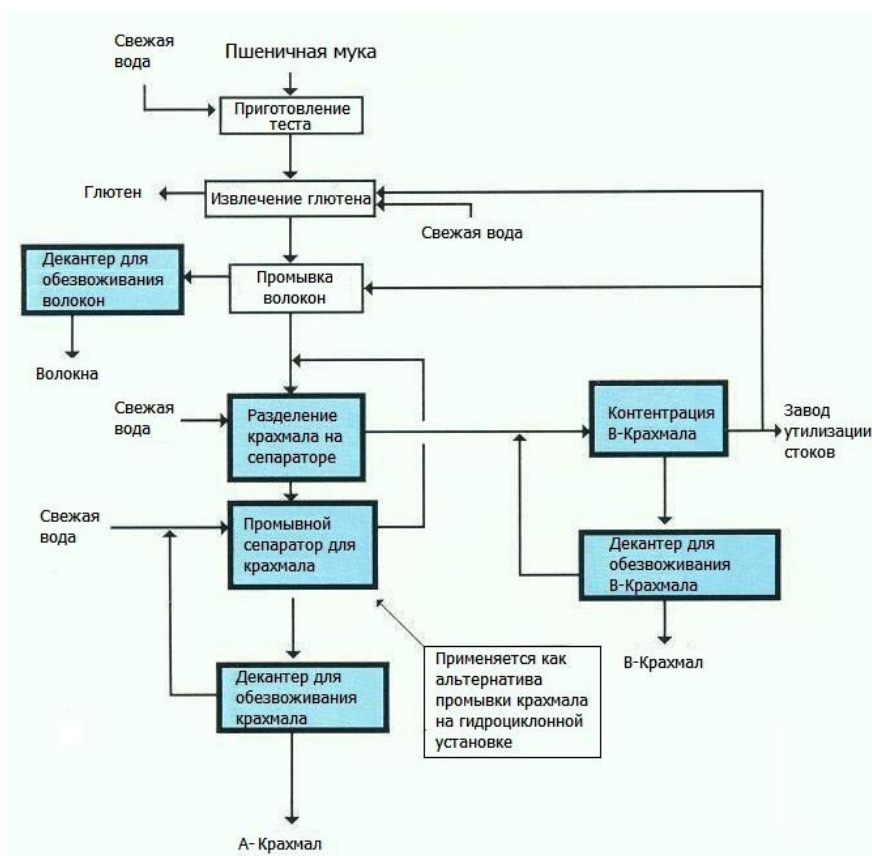


Рис.1.1.2.а. Схема производства пшеничного крахмала по способу Мартина

Основные стадии производства крахмала по Мартину:

1. Приготовление густого теста путем смешивания просеянной пшеничной муки с водой: просеянная пшеничная мука 72-76% выхода смешивается с



небольшим (50-70%) количеством холодной воды (20 °С) в густое тесто в месильной машине непрерывного действия[15].

2. Отлежка полученного теста: далее тесто из месильной машины попадает в бункер–отстойник для отлежки, где находится в течение 20-40 минут для полного набухания клейковины. Из бункера для отлежки тесто отправляется на отмывание крахмала.

3. Отмывание крахмала из теста и промывание клейковины/глютена: вымывание крахмала из теста осуществляется при температуре воды 18–35 °С. Для вымывания используют ленточные смесители, дежи с двойным шнеком и вращающиеся сита [22].

В Чехии данная стадия производства крахмала проводится в устройстве инженера Малинского, которое включает в себя три барабана, работающих непрерывно. Барабаны оборудованы зубчатыми валками для разминания теста и тестоперевалочными конструкциями, с помощью которых тесто перемещается по секциям барабанов. Движение промывной воды в устройстве организовано навстречу клейковине так, что крахмальная суспензия с последних стадий промывания клейковины поступает в барабан предварительного промывания теста, из которого затем отводится в сборник. Промытая клейковина перемещается на вальцовую сушилку[15,34].

4. Сушка клейковины/глютена, измельчение и упаковка: высушивание клейковины осуществляется при температуре не более 65 °С. Пленка высушенной клейковины, снимается с поверхности валков ножом, отправляется сначала в бункер, а затем на молотковую дробилку для измельчения. Измельченную клейковину просеивают и упаковывают.

5. Концентрирование крахмальной суспензии, полученной при отмывании теста для выделения, промывания, механического обезвоживания и очистки крахмала от механических примесей.

В производстве крахмала по способу Мартина предусмотрен этап очистки крахмальной суспензии для отделения кусочков клейковины, крахмала и мезги. Этот этап производится на ситовых аппаратах, отстойниках, или центрифугах. Частицы клейковины присоединяются к основной массе клейковины и высушиваются на вальцовых или кольцевых сушилках. Выход продуктов при этом составляет: крахмал I сорта - 48 – 50%, крахмал II сорта - 18 – 20 %, клейковина - 10 – 12 %. Существенным недостатком этого метода является большой расход воды, на переработку 1т муки приходится 8-12 м<sup>3</sup> воды [33].

#### 6. Сушка, измельчение сухого крахмала, упаковка крахмала I и II сортов.

Одна из главных особенностей получения крахмала из зерна пшеницы является разделение крахмала на 2 сорта – крахмал А (I сорта) и крахмал В (II сорта). При глубокой комплексной переработке зерна пшеницы получение данных сортов крахмала происходит отдельно.

Крахмал А представлен гранулами, имеющими размер 20-35 микрон, по сравнению с крахмалом В является более чистым продуктом и содержит незначительное количество механических примесей. По своим характеристикам пшеничный крахмал I сорта схож с кукурузным крахмалом, являющимся высококачественным[15.22].

Крахмал В представлен гранулами, имеющими размер 2-15 микрон, при этом он сильно загрязнен белками, липидами (жирами), клетчаткой, а также пентозами. Крахмал В составляет 15-20% от общего количества[15,22,34].

Производство пшеничного крахмала методом "взбитого теста" (баттер - процесс) непрерывно и полностью механизировано. По выходам готовой продукции и потерям сухих веществ муки этот способ мало отличается от способа Мартина.

### 1.1.3. Строение и свойства крахмала

Крахмал представляет собой важнейший резервный высокомолекулярный гомополисахарид растений, относящийся к группе углеводов и состоящий из двух частей: линейной амилозы и разветвленного амилопектина. Молекулы амилозы и амилопектина соединяются друг с другом с помощью водородных связей, выстраиваясь в радиальные слои и образуя при этом гранулы крахмала. Мономером амилозы и амилопектина является  $\alpha$ - глюкоза [1,15].

Амилоза состоит из длинных, неразветвленных цепей остатков D-глюкозы, соединенных между собой  $\alpha$ -(1-4)-связями. Молекулярная масса таких цепей варьируется от нескольких тысяч до 500 000. Такие изменения объясняются тем, что учитывая метаболические потребности клетки, остатки моносахаридов, при помощи ферментов, способны присоединяться к полисахаридам или отщепляться от них.

Амилопектин также является высокомолекулярным углеводом, но в отличие от амилозы его цепи сильно разветвлены. В неразветвленных участках амилопектина остатки глюкозы соединены друг с другом связями (1-4), а в участках ветвления цепи –  $\alpha$ -(1-6) [1].

Содержание амилопектина определяет вязкость крахмала, в свою очередь амилоза существенно влияет на прочность гелей. Крахмал с высоким содержанием амилозы, например, кукурузный, в большей степени проявляет желирующие свойства, а крахмал, состоящий в основном из амилопектина, например, пшеничный крахмал, отличается высоким проявлением вязкости. Гранулы большего размера имеют важное свойство: в воде они легче набухают.

Содержание амилозы в пшеничном крахмале составляет 19,2% -33,7%, а амилопектина может достигать 75%. Крахмал синтезируется высшими и

низшими растительными организмами в хлоропластах из глюкозы, образующейся зелеными растениями в процессе фотосинтеза.

В зернах крахмала содержатся 98–99,5% полисахаридов и 0,5–2% веществ неуглеводной природы (в т. ч. белки, липиды, липидоподобные соединения, зольные элементы).

Зерна пшеничного крахмала сильно различаются размерами: гранулы, имеющие размеры менее 15 мкм составляют до 78%, более крупные гранулы, размером 22–36 мкм – около 3,7%, имеется незначительное количество мелких зерен, размером 2–5 мкм. Зерна пшеничного крахмала имеют эллиптическую и округлую сдавленную форму [20].

## **1.2. Производство сахаристых гидролизатов крахмала**

К сахаристым гидролизатам относят продукты полного или частичного гидролиза крахмала, пригодные для пищевого употребления. Такими продуктами являются патоки различной степени осахаривания, кристаллическая глюкоза, сухие очищенные гидролизаты. Общим в технологическом процессе всех этих продуктов являются такие операции, как гидролиз, очистка и концентрирование [20].

Гидролиз крахмала может производиться кислотами, амилолитическими ферментами, а также комбинированным способом с использованием кислоты и ферментов. Кислотный гидролиз в настоящее время осуществляется в основном с применением серной, либо соляной кислот. При этом можно достичь различной степени гидролиза с получением низкоосахаренных гидролизатов, крахмальной карамельной патоки (средняя степень гидролиза), высокоосахаренной патоки и глюкозных гидролизатов.

Комбинированным методом производят разжижение и начальное осахаривание крахмала кислотой, а затем гидролизаты после очистки или без нее направляют на ферментативное осахаривание для получения высокоосахаренной патоки или глюкозных сиропов [15,20].

Ферментные препараты могут применяться также и для двойного осахаривания, при котором первая стадия – разжижение производится с использованием  $\alpha$ -амилазы. Гидролизаты после осахаривания направляются на очистку, при которой из них удаляются нерастворимые и растворимые примеси. Очистка от нерастворимых примесей производится фильтрованием или центрифугированием с последующим фильтрованием [4].

Очистка от растворимых примесей – минеральных и органических веществ и освобождение от красящих веществ производится с применением активных порошкообразных или гранулированных углей, ионообменными смолами.

Концентрирование гидролизатов осуществляется выпариванием в одну или несколько ступеней. Гидролизаты могут использоваться как в жидком концентрированном виде, так и в порошкообразном. Для этого очищенные гидролизаты предварительно выпаривают и высушивают в распылительных сушилках или кристаллизаторах – грануляторах. Особое место в технологии занимает процесс кристаллизации, который выполняет задачи очистки и концентрирования при производстве кристаллической глюкозы [4, 15].

### **1.2.1. Амилолитические ферменты. Понятие и свойства.**

Ферментные препараты уже продолжительное время используются в качестве катализаторов в крахмало-паточном производстве. Ферменты являются веществами белковой природы. Это – биологические катализаторы, которые осуществляют все биохимические реакции в живой природе.

Важнейшим источником ферментов являются различные микроорганизмы – бактерии, дрожжи, плесневые грибы, которые и используются для их промышленного получения.

Амилолитические ферменты – группа ферментов, необходимых для осахаривания крахмала, то есть разлагающие крахмал и завершающие процесс гидролиза образованием элементарных компонентов. К используемым в практике амилолитическим ферментам относятся  $\alpha$ -амилаза,  $\beta$ -амилаза, амилоглюкозидаза, амило-1,6-глюкозидаза. Каждый из этих ферментов обладает специфическим действием на крахмал [35].

$\alpha$ -амилаза (декстриногенамилаза) — по механизму действия относится к эндоферментам, то есть действует на молекулу субстрата изнутри, что приводит к быстрому снижению вязкости раствора крахмала [17].

$\alpha$ -Амилазы различного происхождения являются слабокислыми водорастворимыми белками. Характерной чертой каждой  $\alpha$ -амилазы является наличие в ней кальция, который не только входит в состав активного центра фермента и стабилизирует его структуру, но и способствует сохранению правильной конформации молекулы фермента, обеспечивающей проявление активности [21, 35]. Кальций обеспечивает устойчивость  $\alpha$ -амилаз к денатурации и разрушению протеолитическими ферментами. Удаление кальция из молекулы фермента, приведет к инактивации этого фермента. В состав некоторых  $\alpha$ -амилаз входит цинк.

Считается, что  $\alpha$ -амилаза катализирует разрыв  $\alpha$ -1,4-глюкозидных связей в крахмале и его аналогах с образованием низкомолекулярных разветвленных олигосахаридов и незначительного количества мальтозы и глюкозы [13].

Различают две фазы действия  $\alpha$ -амилазы на крахмал. Первая фаза, или фаза декстринизации характеризуется расщеплением крахмала на

высокомолекулярные полисахариды – декстрины, которые при проведении йодной пробы дают фиолетовую или синюю окраску. Затем, молекулярная масса декстринов снижается, редуцирующая способность повышается, и в результате реакции с йодом происходит переход от темно-бурого окрашивания декстринов к ярко–красному, постепенно снижается интенсивность цвета. В фазе декстринизации вязкость субстрата резко снижается [13, 35].

Вторая фаза, или фаза осахаривания характеризуется неполным разложением декстринов, образовавшихся в фазе декстринизации, до тетра- и тримальтозы, которые медленно гидролизуются до моно- и дисахаридов. Окраска при реакции с йодом не изменяется, и возрастает восстанавливающая способность гидролизата [35].

$\alpha$ -Амилазы, выделенные из различных источников проявляют различную декстринизирующую и осахаривающую способность [17]. Например, грибные  $\alpha$ -амилазы обладают сильным осахаривающим действием, тогда как  $\alpha$ -амилазы, полученные путем глубинного культивирования бактерий, проявляют высокую декстринизирующую способность. Таким образом, благодаря высокой декстринизирующей способности, действие бактериальных  $\alpha$ -амилаз приводит к снижению вязкости клейстеризованного крахмала.

$\alpha$ -Амилазы различных источников имеют различные свойства: сродство к субстрату, оптимум pH, термостабильность, степень гидролиза субстрата при оптимальных условиях действия. Наиболее термостабильными считаются бактериальные  $\alpha$ -амилазы, а наиболее кислотоустойчивыми –  $\alpha$ -амилазы солода и грибные [21].

$\alpha$ -Амилаза действует на крахмал и его гомологи по принципу многоцепочечного механизма, расщепляя внутренние гликозидные связи со

скоростью в разы большей, чем скорость расщепления конечных связей. При этом на скорость расщепления влияет концентрация крахмала, а также наличие точек ветвления субстрата, которые изменяют вязкость раствора.

Грибные и бактериальные  $\alpha$ -амилазы не атакуют  $\alpha$ -1,6-связей в амилопектине, поэтому при его гидролизе образуются устойчивые разветвленные  $\alpha$ -предельные декстрины.

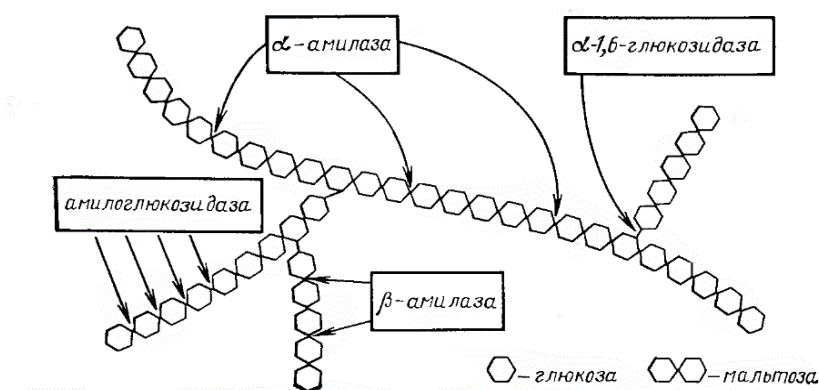


Рис. 1.2.1 а. Механизм действия различных типов амилаз на крахмал

Оптимальные условия действия грибных и солодовых  $\alpha$ -амилаз: значения рН находятся в пределах 4,5–5,5, а температурный оптимум находится в пределах 55–65 °С. Бактериальные  $\alpha$ -амилазы проявляют наиболее высокую активность при значениях рН 6–7 и температурах 65–90 °С [21, 43].

Добавление в субстрат ионов Са (до 30 мг/л) вызывает небольшое увеличение активности, обусловленное стабилизацией фермента кальцием, но при добавлении 120 мг/л Са-ионов достигается максимальная активность, дальнейший эффект не наблюдается. Ион кальция добавляют в суспензию крахмала перед ферментативным разжижением крахмала. Конечная степень осахаривания крахмала бактериальной  $\alpha$ -амилазой составляет 70–75%, для грибных  $\alpha$ -амилаз 84–87%.



При промышленном производстве глюкозы из крахмала  $\alpha$ -амилазы используются для разжижения крахмального клейстера. Процесс клейстеризации происходит при высоких температурах, важно использовать  $\alpha$ -амилазы, обладающие высокой термостабильностью. Чаще всего препараты  $\alpha$ -амилазы для производства глюкозы получают из бактериальных продуцентов, например, *Bacillus subtilis*, *Bac. mesentericus*, *Bac. diastaticus*. Температурный оптимум для таких  $\alpha$ -амилаз находится в пределах 80–90 °С [11,17].

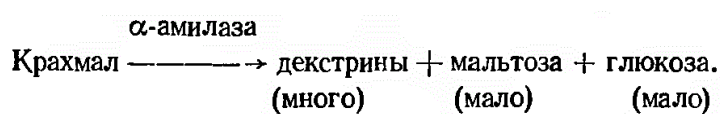


Рис 1.2.1 б. Схема ферментативного гидролиза крахмала под действием  $\alpha$ -амилазы

Скорость расщепления крахмала  $\alpha$ -амилазой зависит от ряда факторов: источника фермента, температуры среды, рН среды, концентрации фермента и субстрата, присутствия активаторов и ингибиторов. Доказано, что  $\alpha$ -амилаза, как и другие амилазные ферменты гидролизует клейстеризованный крахмал со скоростью, во много раз большей, чем нативный [11,17,43].

$\alpha$ -Амилазные препараты характеризуются в основном способностью катализировать гидролиз крахмала до декстринов с различной молекулярной массой [37].

Одним из наиболее эффективных препаратов  $\alpha$ -амилаз, применяющихся в настоящее время при гидролизе крахмала является Klearflow™ АА.

1. Klearflow™ АА – ферментный комплекс термостабильных  $\alpha$ -амилаз для разжижения крахмала. Препарат относится к ферментным комплексам быстрого действия и используется в процессах производства декстрозы. Это

гидролизующие крахмал  $\alpha$ -амилазы с повышенной термоустойчивостью и низким уровнем Са-ионов в условиях промышленного разжижения. Гидролитические свойства оптимизированы для производства декстрозы и сочетают лучшие свойства термостабильных бактериальных  $\alpha$ -амилаз, полученных из *Bac. licheniformis* и *Bac. stearothermophilus*.

$\alpha$ -Амилазы снижают вязкость, возникающую во время процесса разжижения крахмала, гидролизуя  $\alpha$ -D-1,4-глюкозидные связи крахмала до производства растворимых декстринов для эффективного осахаривания до декстрозы. Быстрое понижение вязкости обеспечивает высокое качество смеси и позволяет перерабатывать высокую концентрацию сухих веществ без потери качества гидролизата [11,21].

Ферментный препарат имеет ряд преимуществ, по сравнению с использованием одиночных традиционных  $\alpha$ -амилаз:

- Отсутствие остаточного крахмала после стадии разжижения
- Быстрое понижение вязкости, позволяет перерабатывать высокую концентрацию сухих веществ, тем самым понижая расходы, связанные с выпариванием
- Обеспечивает хорошую фильтруемость разжиженного крахмала
- Рабочий диапазон pH помогает избежать потерей декстрозы в виде мальтулозы, и не повышать цветность, тем самым снижая затраты на очистку
- Не требуется добавления Са-ионов в большинстве процессов и систем
- Не требуются изменения в производственных процессах

### 1.2.2. Гидролиз крахмала. Виды гидролиза

Первой технологической операцией при производстве сахаристых крахмалопродуктов является гидролиз крахмала. Гидролиз крахмала – это

взаимодействие его с водой в присутствии катализаторов, при этом крахмал может гидролизироваться частично, образуя в качестве продуктов декстрины, либо полностью, образуя глюкозу [20].

В зависимости от экономических факторов, технических возможностей производства и от того, какие продукты производятся, гидролиз крахмала проводят с использованием в качестве катализатора кислот, ферментов или их совокупности. Независимо от вида катализатора, процесс гидролиза крахмала можно разделить на три стадии: клейстеризация крахмала, разжижение его и осахаривание [20, 21].

При гидролизе всегда производится температурная клейстеризация крахмала в присутствии катализатора. Зачастую эта стадия совмещается со следующей – разжижением, когда под действием катализатора длинные цепочки молекул крахмала, находящегося в виде высоковязкого клейстера, разрываются на более короткие. Вязкость клейстера при этом снижается в несколько тысяч раз – крахмал разжижается. Отсюда и название процесса – процесс разжижения крахмала. В разжиженном продукте с низкой вязкостью легче проходят дальнейшие процессы разрыва молекулы крахмала вплоть до образования глюкозы [21].

Кислота в качестве катализатора может использоваться на каждой стадии гидролиза – при клейстеризации, разжижении и осахаривании до различного содержания редуцирующих веществ. Содержание редуцирующих веществ в продуктах гидролиза характеризуется глюкозным эквивалентом (ГЕ).

Применение кислоты в качестве катализатора кроме некоторых преимуществ, проявляющихся в большой скорости гидролиза из-за высокой температуры процесса и дешевизне катализатора, имеет ряд недостатков. Гидролизаты загрязняются продуктами термического кислотного разложения сахаров, что ухудшает их качество. Невозможно достичь достаточно полного

осахаривания крахмала, в связи, с чем значительно снижается выход глюкозы.

В связи со специфичностью и благодаря направленности действия ферментов, их применение дает значительные преимущества на любой стадии гидролиза. В связи с низкими температурами и рН, близкими к нейтральным, кислотное и термическое разжижение минимально.

Гидролизаты обладают низкой цветностью, их ГЭ достигает 98% , что значительно облегчает выполнение следующих технологических этапов – очистку сиропов и кристаллизацию глюкозы [12].

При ферментативном гидролизе крахмала в производстве глюкозы значительно повышается выход кристаллического продукта, открывается возможность получать достаточно чистые продукты гидролиза в виде гранул и порошков. В крахмало–паточном производстве применение различных ферментов позволяет вырабатывать патоки с различным составом углеводов [29].

Клейстеризация и разжижение крахмала проводят несколькими способами: кислотным, кислотнo–ферментативным или ферментативным. Кислотное разжижение осуществляется в одну стадию, в связи с неизбирательностью действия кислоты, тогда как ферментативное разжижение проводится в две и более стадий. Для ферментативного разжижения используются препараты  $\alpha$ -амилаз [12, 16].

Прежде чем гидролизовать крахмал до глюкозы, необходимо разрушить нативную структуру крахмального зерна, при этом крахмальные молекулы подвергаются диспергированию, происходит процесс клейстеризации. Неклейстеризованные зерна крахмала очень медленно атакуются ферментом.

В процессе клейстеризации крахмала значительно возрастает вязкость. Для того, чтобы ее снизить клейстер обрабатывают либо кислотой, либо бактериальной  $\alpha$ -амилазой, катализирующей быстрое разрушение цепей в молекуле крахмала. Процесс разжижения крахмала оказывает влияние на качество конечного гидролизата. С одной стороны необходимо полностью клейстеризовать все крахмальные зерна, иначе снизится выход продукта, ухудшится фильтрационная способность гидролизата, с другой – более глубокий гидролиз крахмала при разжижении приводит к снижению содержания глюкозы в гидролизатах при осахаривании [12, 21].

Ухудшение фильтрационной способности обусловлено наличием в гидролизатах неклеястеризованных крахмальных зерен и образованием ретроградированного (менее чувствительного к воздействию фермента) крахмала. Ретроградация крахмала – это переход крахмальных полисахаридов из растворимого состояния в нерастворимое вследствие агрегации молекул. Процесс ретроградации крахмала – это результат образования водородных связей между молекулами крахмала в растворе. Известно, что ретроградируют, в большей степени, молекулы амилозы. Это объясняется особенностями строения амилозы. Линейная структура амилозы обуславливает образование большого числа водородных связей, в отличие от разветвленной молекулы амилопектина. Ретроградированная амилоза нерастворима в воде и устойчива к действию амилолитических ферментов.

Пшеничный и кукурузный крахмалы гораздо быстрее ретроградируют, чем крахмал из тапиоки и картофеля. Молекулы различных размеров ретроградируют по-разному. Существуют молекулы амилозы критического размера, у которых ретроградация достигает максимальной величины. У больших и меньших молекул процесс ретроградации происходит медленнее, либо не происходит совсем [20].

Существует ряд факторов, влияющих на скорость ретроградации. Скорость ретроградации значительно увеличивается со снижением температуры и увеличением концентрации. При 60–70 °С ретроградация отсутствует. При рН 2 скорость ретроградации мала, при рН 7 ретроградация достигает максимальной величины, при рН свыше 10 ретроградация отсутствует. При прогрессирующей ретроградации реакция с йодом сопровождается изменением окрашивания от исходного синего до красного.

### 1.2.3. Двухступенчатый ферментативный гидролиз крахмала.

#### Ферментативное разжижение. Использование $\alpha$ -амилаз в процессе ферментативного гидролиза крахмала

Процесс ферментативного разжижения крахмала можно осуществлять с использованием в качестве катализатора либо бактериальной  $\alpha$ -амилазы по двухстадийной схеме, либо термостабильной  $\alpha$ -амилазы (термамил) по одностадийной схеме.

Двухступенчатый ферментативный гидролиз, в отличие от одноступенчатого дает возможность избежать проблем с фильтрацией, вызванных ретроградацией крахмала и наличием в нем неклеистеризованных зерен.

Разжижение осуществляют в непрерывнодействующей установке.

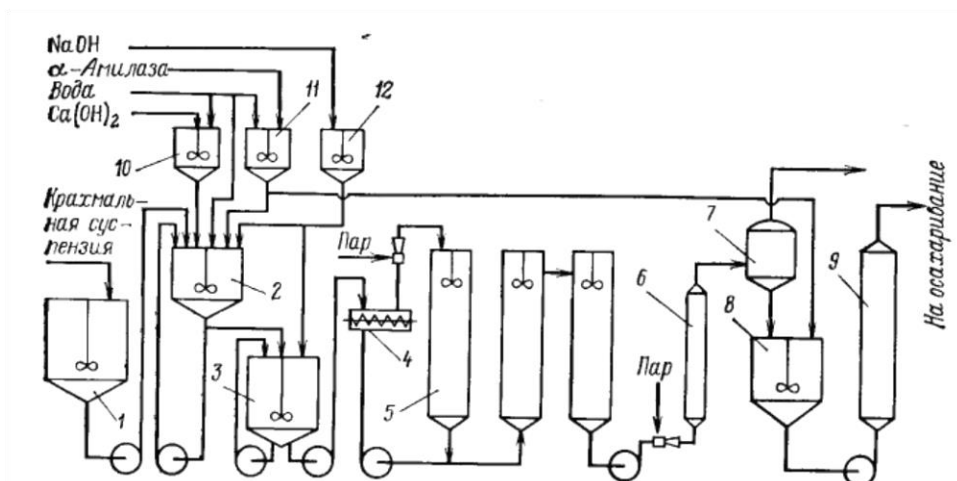


Рис 1.2.3 а. Аппаратурное оформление станции двойного ферментативного разжижения крахмала: 1–сборник крахмальной суспензии; 2–мерник; 3–сборник подготовки продукта к разжижению; 4–смеситель; 5–колонна предварительного разжижения; 6–выдерживатель; 7–испаритель; 8– сборник для внесения  $\alpha$ -амилазы; 9–колонна для окончательного разжижения; 10–дозировочный сборник для  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  или  $\text{CaO}$ ; 11–дозировочный сборник для  $\alpha$ -амилазы; 12– дозировочный сборник  $\text{NaOH}$

Крахмальная суспензия концентрацией около 40% поступает из сборника крахмальной суспензии (1) в мерник (2), где разводится водой до постоянной концентрации 35%. В суспензию добавляется раствор едкого натра для доведения рН до 6–6,5, раствор  $\alpha$ -амилазы и ее стабилизаторов:  $\text{CaO}$  или  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ . При переходе в сборник подготовки продукта к разжижению (3) регулируется рН и после перемешивания в статическом смесителе (4) продукт нагревается острым паром до 85 °С и последовательно проходит группу колонн предварительного разжижения (5), где производится I стадия разжижения крахмала. При этом, благодаря действию  $\alpha$ -амилазы, происходит разрыв длинных цепочек крахмала [43].

Вязкость клейстера значительно снижается. Полная клейстеризация крахмальных зерен достигается путем подогревания продукта прямо или косвенно до температуры 140–150 °С и выдерживания этой температуры в течение 3–5 минут [12, 21].

Чтобы разжижить клейстеризованный при термообработке крахмал продукт направляется на II стадию разжижения. Для этого сироп почти мгновенно охлаждается до 85 °С в циклоне–испарителе (7), далее он отправляется в сборник для внесения  $\alpha$ -амилазы, где в сироп снова добавляется раствор фермента (8), затем продукт выдерживается в ряде колонн для окончательного разжижения (9) или многосекционном аппарате непрерывного действия в течение 2 часов до момента, когда содержание редуцирующих сахаров достигнет 10–20% [1, 37].

Данная установка для ферментативного разжижения крахмала предполагает косвенный обогрев продукта на I стадии, обеспечивая снижение расхода  $\alpha$ -амилазы [17, 43].

С помощью термостабильной  $\alpha$ -амилазы достигается хорошее разжижение и при одностадийном добавлении фермента. Так, в 30–40%-ную крахмальную суспензию добавляется раствор соды для доведения рН до 6,5–7,0 [17]. В крахмальную суспензию непосредственно перед устройством для разжижения добавляется 1 г термостабильной  $\alpha$ -амилазы на 1 кг крахмала. Температура повышается до 105–110 °С прямой инъекцией пара и выдерживается в течение 5–10 минут. После первичного разжижения крахмал охлаждается до 95 °С и выдерживается 1–2 часа до полного разжижения. При двойном ферментативном гидролизе крахмала и дальнейшем осахаривании глюкоамилазой можно получить гидролизаты, содержащие до 98% редуцирующих веществ, включая до 96% глюкозы.

#### **1.2.4. Осахаривание разжиженного крахмала. Использование глюкоамилаз и протеолитических ферментов в процессе ферментативного гидролиза крахмала. Оценка процесса гидролиза.**

После стадии полного разжижения следует этап осахаривания крахмала амилоглюкозидазой в условиях оптимальных для ее действия.

При высокой температуре скорость реакции ферментативного гидролиза повышается, но понижается ее стабильность. При низкой температуре скорость гидролиза понижается, соответственно, стабильность фермента возрастает, как и опасность возникновения микробной инфекции. микробная инфекция, оказывает влияние на показатель рН, который зачастую оказывается за пределами оптимальных значений действия



фермента. Наиболее благоприятной температурой для стадии ферментативного осахаривания крахмала является 60 °С [13].

В настоящее время в крахмало–паточной промышленности используются ферментные препараты очищенной глюкоамилазы: глюконигрин Г20х, используемый при производстве кристаллической глюкозы и глюкаваморин Г20х, разрешенный при производстве глюкозного концентрата и крахмальных паток различного углеводного состава. Глюкаваморин состоит в основном из глюкоамилазы. Оптимальные условия действия: рН 4,0–5,5;  $t^{\circ} = 56–58$  °С [11, 17].

Так, при использовании глюкаваморина Г20х на стадии осахаривания крахмала, выход глюкозы составляет 94,5%, при этом выход сухих веществ равен 5,5–6% [17]. Данные ферментные препараты применяют также в жидком виде после очистки ультрафильтрацией. Препараты глюкоамилазы выбирают по следующим критериям: степень конверсии крахмала в глюкозу, трансферазная способность фермента (не выше 6 ед/г), наличие примеси протеаз (не более 10 ед/г).

При использовании глюкоамилазы совместно с пуллуланазой длительность стадии осахаривания сокращается до 48 часов, а дозировка глюкоамилазы уменьшается в 2 раза (до 1,25 ед/г). Выход глюкозы возрастает на 1,5–2 % за счет снижения доли продуктов конденсации сахаров и трансгликозилирования [11].

В промышленности используют препараты, гидролизующие крахмал с образованием 94,5–97,5% глюкозы. Наличие продуктов трансгликозилирования сахаров и расщепления белка затрудняет очистку глюкозных сиропов и снижает выход глюкозы. Перед этапом осахаривания разжиженный крахмал охлаждается до 55 – 60 °С, рН доводится до оптимального значения [11,20].

Процесс осахаривания разжиженного крахмала глюкоамилазой осуществляется при постоянной температуре 55–60 °С, при рН 4,5–4,7, оптимальное количество фермента 2,5 ед/г крахмала [12].

В первые часы стадия осахаривания протекает интенсивно, далее замедляется, достигая максимального показателя 98% глюкозы в расчете на сухие вещества по прошествии 72 часов. Это объясняется тем, что в разжиженном продукте находится много крупных полимеров, к которым глюкоамилаза имеет большое сродство. При дальнейшем гидролизе скорость реакции понижается по причине того, что глюкоамилаза имеет меньшее сродство к олигосахаридам. Отдельная часть олигосахаридов не гидролизуется даже после длительного осахаривания.

В процессе осахаривания периодически контролируется показатель рН и количество сухих веществ (СВ). По истечении первых суток определяют йодную пробу и содержание редуцирующих веществ для того, чтобы убедиться в правильности протекания этапа осахаривания.

Отрицательная йодная проба (фиолетовое или синее окрашивание) свидетельствует о нарушениях процесса: показатели рН и температуры не соответствуют оптимальным, дозировка фермента не соблюдена [13].

Процесс осахаривания считается завершенным, когда достигается необходимый ГЭ. В конце процесса содержание редуцирующих сахаров определяется спустя 8 часов. По окончании стадии осахаривания процесс останавливают инактивацией фермента путем подогрева продукта в теплообменнике, предпочтительно пластинчатого типа, или инъекцией пара в смесителе конструкции НПО по крахмалопродуктам. При выдерживании осахаренного крахмалопродукта при 80 °С в течение 20 минут глюкоамилазная активность полностью прекращается [37].

Количественная оценка процесса гидролиза проводится по процентному содержанию редуцирующих веществ (РВ) от массы абсолютно сухого сырья. Осахаривание глюкоамилазой можно проводить в разных режимах, получая продукты с РВ от 28 % и больше. На состав образующихся олигосахаридов оказывает существенное влияние степень конверсии крахмала [43]. В продуктах с РВ 30–40% имеется большое количество олигосахаридов со степенью полимеризации 3–7. При РВ более 40% существенно снижается концентрация мальтотриозы, достигая минимума при РВ около 70 %; при процентном содержании РВ от 66 до 95% существенно снижается концентрация мальтозы. Продуктами неполного осахаривания крахмала глюкоамилазой являются различные виды крахмальной патоки.

Качество гидролизатов, полученных после осахаривания, напрямую зависит от качества крахмала. При осахаривании крахмала с содержанием белка до 0,75%, содержание общего азота в гидролизате находится на одинаковом уровне. При более высоком процентном содержании белка в крахмале количество общего азота возрастает, что нежелательно. Примеси растворимого белка в крахмале полностью переходят в гидролизат, ухудшая его качество [12, 43].

В настоящее время существуют ферментные препараты, позволяющие улучшить реологические показатели осахаренного суслу в результате гидролиза белка зерна, снять коллоидно – белковые образования на оборудовании и коммуникациях. Широко применяются концентрированные ферментные препараты протеолитического действия, позволяющие значительно повысить эффективность используемого сырья за счет более глубоко его гидролиза, стабилизировать технологические параметры процесса.

Протеолитические ферменты – это ферментные препараты класса гидролаз, действующие на пептидные связи в молекулах белков и пептидов. В настоящее время существует классификация протеолитических ферментов, основанная на схеме, предложенной в 1937 году М. Бергманом и Д. Фрутоном [26, 44].

Согласно данной схеме протеазы разделяются на эндо- и экзопептидазы [26, 28]. Эндопептидазы способны гидролизовать глубинные пептидные связи и расщеплять молекулу белка на более мелкие фрагменты; экзопептидазы не могут гидролизовать пептидные связи, находящиеся в середине цепи, и действуют либо с карбоксильного, либо с аминного конца цепи, отщепляя последовательно одну за другой концевые аминокислоты [24].

Важная роль в определении интенсивности процесса гидролиза крахмала принадлежит именно протеолитическим ферментам. Протеазы, осуществляя ограниченное расщепление белков, способствуют освобождению амилаз из связанного состояния, а также гидролизуют ту часть запасных белков, которая прочно связана с поверхностью крахмальных гранул, облегчая тем самым доступ фермента к субстрату. Так, кислые протеазы грибного происхождения, относящиеся к классу эндопептидаз, осуществляют глубокий гидролиз белка.

### 1.3. Свойства лизина

Лизин (лат. lysin) – алифатическая диаминомонокислотная аминокислота, имеет химическую формулу  $C_6H_{14}N_2O_2$ . Лизин представляет собой белый порошок с молекулярной массой равной 146,19 [39]. D и L – формы лизина имеют одинаковую температуру плавления 224 °С и образуют прозрачные кристаллы в виде шестиугольных пластинок или игл. Впервые

лизин был выделен в 1889 году из гидролизата казеина немецким химиком Эмилем Дрекселем [7].

Лизин как представитель незаменимых аминокислот входит в состав практически любых белков (в большей степени животных белков), также необходим для восстановления и роста тканей, производства гормонов, ферментов и антител.

Оптическая активность молекулы лизина выражается в ее способности вращать плоскость поляризованного света и обеспечивается наличием в ней ассиметрического атома углерода. Изомер, вращающий плоскость поляризованного света влево, называется левовращающим (L-лизин), вправо-правовращающим (D-лизин). Природный лизин хорошо растворим в кислотах, в воде и основаниях, но практически не растворим в эфире и спирте. Молекула лизина, обладает ярко выраженными свойствами основания [3].

Лизин способен вступать в специфические химические реакции с различными соединениями: альдегидами, кислотами, нингидрином, дансилхлоридом и другими, что применяется в основе его аналитического определения.

Лизин участвует в процессах роста и ассимиляции, участвует в окислительно – восстановительных процессах, активизирует трансаминирование и дезаминирование аминокислот, принимает непосредственное участие в регуляции обмена белков, жиров и углеводов, способствует транспорту стронция и кальция в клетки [3, 7, 6].

Действие: лизин обладает широким спектром противовирусного действия, в частности это касается вирусов, вызывающих герпес; лизин снижает уровень триглицеридов в сыворотке крови, а в сочетании с витамином С и пирролидин- $\alpha$ -карбоновой кислотой (пролином)

предупреждает закупорку артерий, вызванных образованием липопротеинов. Синтетический лизин применяют для обогащения пищевых продуктов и кормов животных.

### 1.3.1. Методы получения лизина

Одним из основных недостатков ограничивающих развитие животноводства в России, является дефицит кормового белка, а для животных с однокамерным желудком (птица, свиньи) отрицательно сказывается несбалансированность растительных белков по аминокислотному составу, в большей степени по лизину, и отчасти по триптофану и метионину [3, 7].

Лизин – наиболее дефицитная аминокислота в растительных белках. Насколько велик дефицит лизина, видно из следующих данных. Исходя из потребности в 4,5 – 5% лизина от сырого протеина, в белке ячменя не хватает 20% лизина (1,2 кг/т), овса – 30% (1,7 кг/т), кукурузы – 40% (1,9 кг/т), пшеницы – 43% (2,9 кг/т), в среднем это около 30% дефицита. Из-за недостатка лизина эти 30% неполноценного протеина не могут использоваться для синтеза белка животных продуктов, создавая вместе с тем неблагоприятно отражающийся на обменных процессах дисбаланс аминокислот [3].

Добавка недостающего лизина превращает растительный белок в столь же полноценный, как и белок рыбной муки или дрожжей. Отсюда становится очевидной важность изыскания дополнительных источников лизина, а также сырья, которое можно использовать при его производстве.

Наиболее экономичным путем является повышение содержания лизина в кормовых культурах с помощью селекции. Первые успехи в этом направлении в СССР были достигнуты советским генетиком и

селекционером Михаилом Ивановичем Хаджиновым, получившим гибридные сорта кукурузы с содержанием 4,4 – 4,6% лизина. Эти сорта при скармливании почти уже не требуют обогащения лизином [3].

Важными источниками лизина являются зернобобовые и кормовые продукты промышленной выработки, содержащие повышенные его количества. За счет этих излишков они могут служить источниками покрытия дефицита лизина в белке других кормов.

В настоящее время стало возможным получение лизина микробиологическим способом, при котором он образуется в биологически активной L – форме [3, 5].

Все указанные пути покрытия дефицита лизина дополняют друг друга, а не исключают, и каждый из них должен быть использован в соответствии с его зоотехнической и экономической эффективностью.

Лидерами по производству лизина путем микробиологического синтеза считаются Китай (40%) и США (30%), общий объем производства лизина в мире – около 1 млн. тонн в год, темпы роста производства составляют около 10% в год. До 2015 года в России производство лизина отсутствовало, был 100% импорт данной аминокислоты. В 2005 году в Белгородской области было создано первое производство лизина в России ЗАО «Завод премиксов №1». В настоящее время это уникальное в своем роде предприятие обеспечивает два основных направления деятельности:

- 1) производство премиксов для всех видов птицы, животных и рыбы;

- 2) промышленное получение аминокислот (L–лизин сульфата общим объемом производства до 57 тыс. тонн в год) и дополнительных продуктов глубокой переработки зерна (отруби, мука, глютен пшеничный, патока крахмальная, пшеничный В-крахмал, пентозан) [6].

### 1.3.2. Характеристика *Corynebacterium glutamicum*.

Микроорганизмы, продуцирующие аминокислоты, не накапливают их в клетке, а постоянно секретируют в питательную среду, поэтому аминокислоты необходимо выделяют из фильтрата культуральной жидкости. В настоящее время известны бактерии, актиномицеты, сине-зеленые водоросли, цианобактерии, способные синтезировать лизин, используя различные источники углерода и азота [5].

На территории РФ в качестве микроорганизмов, синтезирующих лизин, в большей степени, используются гомосериндефицитные мутанты ауксотрофных бактерий родов *Corynebacterium* и *Brevibacterium* и *Micrococcus*.

Род *Corynebacterium* представляет собой группу грамположительных аэробных или факультативно-анаэробных бактерий. Бактерии рода *Corynebacterium* являются неподвижными, неспорообразующими, каталазоположительными прямыми или слегка изогнутыми палочковидными хемоорганотрофами. Микроорганизмы рода *Corynebacterium* широко распространены в природе и по большей части безвредны [45, 48].

Род *Corynebacterium* был открыт в 1896 году Карлом Леманном и Робертом Нейманом как таксономическая группа палочковидных микроорганизмов, имеющих один специфический морфологический признак – булавовидные вздутия на концах (*coryne* — с греч. «булава»). Эти вздутия – «метахроматические тельца», «полярные зерна» после работ А. Мейера чаще называют волютиновыми зёрнами.

*Corynebacterium* включает в себя около 50 видов фенотипически разнообразных групп бактерий. Примерно 30 видов являются паразитами растений, остальные 20 видов – сапрофиты, питающиеся мертвой органикой. Они могут также входить в микрофлору организма человека, где находят



подходящую среду обитания практически в любой части человеческого организма. Так, к группе коринебактерий относится возбудитель дифтерии человека–токсикогенная бактерия Клебса–Леффлера [45].

Вид *Corynebacterium glutamicum* является хорошо изученной почвенной бактерией и представляет большое значение в области биотехнологии, в большей степени, для ферментативного производства L-аминокислот для пищевой и кормовой промышленности.

*C. glutamicum* не патогенна, быстро растет, относительно мало требует для своего развития, имеет относительно стабильный геном, при этом не склонна к внеклеточной секреции протеазы [45, 50].

Клетки *C. glutamicum* представляют собой неподвижные грамположительные неспорообразующие палочки, длиной 1–1,5 мкм и шириной 0,6–0,8 мкм [10]. При выращивании на мясо–пептонном агаре (МПА), спустя 3–5 суток роста, культура образует округлые колонии диаметром 2–4 мм, слегка возвышающиеся, окрашенные в слабо–желтый цвет; поверхность гладкая, структура однородная, края ровные. Культура не способна гидролизовать крахмал, использует следующие сахара: глюкозу, фруктозу, мальтозу, сахарозу, маннозу; не использует галактозу и лактозу [45, 46, 47].

### 1.3.3. Приготовление стерильных питательных сред

Эффективность микробного синтеза зависит от эффективности продуцента, а также от состава питательной среды и условий культивирования [5].

Максимальная скорость биосинтеза лизина достигается при соблюдении оптимальных условий процесса: рН питательной среды,

температура, степень аэрации, оптимальные концентрации всех компонентов среды.

Чтобы обеспечить максимальную интенсивность биосинтеза лизина культурой *C. glutamicum*, питательная среда кроме источников углерода и минерального азота, должна содержать 180–200 мг метионина, 800 мг треонина, 15–29 мкг биотина в пересчете на литр питательного субстрата [2, 5, 41].

Для развития культуры требуются также присутствие тиамин или пиримидиновой части его молекулы. Для удовлетворения этих требований в состав питательной среды включаются следующие компоненты: глюкоза,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{FeSO}_4$ ,  $\text{MnSO}_4$ , гидролизат пшеничного глютена (либо кукурузный экстракт), крахмальная патока (67,4% по содержанию сухих веществ, витамины (тиамин и биотин), пеногаситель [3, 5].

В состав такой комплексной среды входит (в пересчете на сухое вещество) 19–24% минеральных веществ, до 6% общего азота, в т.ч. около 10% белкового и столько же  $\alpha$ -аминного. Аммиачный азот составляет более половины от общего азота и является основным источником азота как для образования бактериальной биомассы, так и для биосинтеза лизина [5].

Среди главных источников азота выделяют соли аммония, мочевины, пшеничный гидролизат, а также гидролизаты казеина, дрожжевые экстракты.

В качестве источников углерода используются меласса, уксусная кислота, либо смеси того и другого.

Большое значение имеет соотношение источников углерода и азота в субстрате. Оптимальное соотношение специфично для каждого штамма, отклонение от него приводит к нарушению биосинтеза лизина [8].

Нормальное протекание биосинтеза лизина обеспечивается наличием в среде солей макроэлементов: калия, фосфора, магния. Добавок

микроэлементов, как правило, не производят, они содержатся в достаточном количестве в кукурузном экстракте и гидролизатах дрожжей.

Все продуценты лизина, в т.ч. *C. glutamicum* нуждаются в витаминах: биотине и тиамине. Пониженное содержание этих факторов снижает рост культуры и синтез лизина. Допустимым нижним пределом концентрации биотина является 6 мкг/л, десятикратное повышение его содержания против нормы практически не сказывается на выходе лизина. Культура использует не только свободный, но и связанный биотин [41, 45, 46].

При нехватке тиамина культура плохо растет и вместо L – лизина образуется, в большей степени, L – аланин. Потребность продуцента в тиамине связана с его участием в декарбоксилировании пировиноградной кислоты, в качестве коэнзимной формы фермента. При добавлении в питательный субстрат оптимального количества тиамина, выход L-лизина увеличивается, а L-алинина практически исключается. Источниками биотина и тиамина в промышленных питательных средах является гидролизат пшеничного глютена, кукурузный экстракт, меласса, гидролизат соевого шрота [5, 8].

Питательная среда стерилизуется острым паром в стерилизационной колонке. Температура 130–132 °С поддерживается в подогревателе типа «труба в трубе» 10–15 минут. После охлаждения в теплообменнике до 30–32 °С питательная среда подается в стерильные ферментаторы [5, 39].

#### **1.3.4. Получение посевного материала в производственных инокуляторах или посевных аппаратах**

Процесс подготовки инокулята для биосинтеза лизина происходит в несколько стадий.

Посевной материал для биосинтеза лизина готовится высевом

односуточной культуры *S. glutamicum* на агаризованную среду в пробирке с последующим выращиванием в термостате при 30–32 °С. На этом этапе при высеивании можно рассмотреть морфологические характеристики культуры, с целью определения ее чистоты.

Дальнейшее размножение ведется в колбах на качалках с использованием жидкой питательной среды, по составу похожей на среду, которая будет использоваться на этапе ферментации. Культуру размножают в колбах на качалках в течение суток [3, 5].

Затем исходную культуру, перемешанную с жидкой питательной средой, переливают в посевной аппарат (инокулятор, ферментатор), оборудованный барботерами и мешалками или пневмоциркуляционной системой, коэффициент заполнения 0,6. Необходимое количество посевного материала 5-10% от объема среды в аппарате для главной ферментации. В качестве питательного субстрата может использоваться кукурузно-меласная среда. Оптимальная температура роста культуры в посевных инокуляторах 30–32 °С, рН 6,5–6,8. Интенсивность аэрации 3,6 г О<sub>2</sub> л/час. Продолжительность роста культуры в посевных ферментаторах 24–48 часов [39].

Об окончании процесса предферментации судят по оптической плотности культуральной жидкости и морфологическим признакам выросших клеток.

Важным средством регуляции биосинтеза лизина является интенсивность аэрации среды. На стадии размножения культуры требуется более интенсивное снабжение клеток кислородом, чем на стадии биосинтеза лизина. В условиях интенсивного перемешивания и аэрации среды увеличивается рост культуры, но снижается продуктивность биосинтеза лизина [8, 27].

По завершении процесса ферментации в посевных ферментаторах готовая культура не должна содержать посторонней микрофлоры и фагов, при этом культура имеет титр около 10<sup>9</sup> клеток на 1 мл. После проведения

микробиологического контроля выращенный продуцент передают на стадию производственной ферментации [27].

### 1.3.5. Ферментация

Культивирование является главным этапом технологического процесса и в целом определяет количественные и качественные характеристики производства. На стадии ферментации происходит накопление как самой биомассы, так и продуктов жизнедеятельности (метаболизма) микроорганизмов. Биосинтез сопровождается либо накоплением конечного продукта внутри клетки, либо выделением его в окружающую среду

Ферментация проходит в стандартных биореакторах объемом 50, 63 и 100 м<sup>3</sup> с соблюдением асептических условий, которые обуславливают нормальный рост и развитие промышленного продуцента [2, 5].

Выращивание продуцента лизина осуществляется периодическим, глубинным способом в биохимических ферментаторах (биореакторах). Сущность периодического способа заключается в том, что весь объем питательной среды и инокулята микроорганизмов загружают в аппарат однократно, далее при оптимальных условиях ведут процесс до тех пор, пока не накопится нужное количество биомассы.

Рабочие ферментаторы снабжены необходимыми коммуникациями, теплообменниками, перемешивающими устройствами, штуцерами для подачи питательной среды и соответствующим оборудованием для ввода в нее стерильного воздуха, дополнительных питательных ингредиентов, растворов кислот и щелочей для поддержания рН среды на необходимом уровне, системами ввода стерильного пеногасителя и передачи культуральной жидкости на дальнейшую переработку. Перед началом культивирования ферментеры промывают и стерилизуют паром в течение 1 ч при 0,1 Мпа [39].

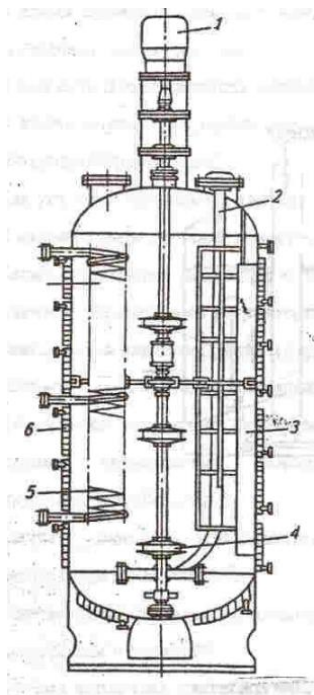


Рис. 1.3.5 а. Схема устройства биореактора для глубинного культивирования микроорганизмов: 1–двигатель; 2–труба для подачи воздуха; 3–отражательные перегородки; 4–мешалка; 5–змеевик; 6–рубашка

Стерильный питательный субстрат в момент введения в ферментатор имеет температуру, близкую к среде выращивания культуры продуцента (32–35 °С), или около 80°С, однако тогда для достижения температуры, оптимальной для протекания ферментации, жидкую фазу охлаждают подачей холодной воды в рубашку аппарата или в теплообменники, расположенные внутри биореактора [2, 39].

При биосинтезе лизина, конечный продукт выделяется непосредственно в культуральную жидкость. Основными факторами, обеспечивающими оптимальный биосинтез лизина культурой, являются хорошо сбалансированная по необходимым компонентам среда и, т. к. продуценты лизина – аэробные микроорганизмы, то ключевым фактором выступает снабжение кислородом (аэрация). Недостаточная аэрация приводит к усилению образования аланина и молочной кислоты за счет снижения выхода лизина. Так, степень аэрации должна быть умеренной, слишком сильная аэрация приводит к усиленному росту культуры, а это

также приводит к снижению выхода конечного продукта. Контроль концентрации растворенного кислорода осуществляют по парциальному давлению кислорода ( $pO_2, \%$ ) [5].

Оптимальные условия роста культуры в рабочих биореакторах: температура 28–32 °С, рН 7,0–7,5 (поддерживается добавлением в среду аммиачной воды). Продолжительность ферментации составляет 48–72 часа [2, 3, 5].

Процесс культивирования состоит из двух этапов: в первые сутки клетки потребляют около 25% азотистых веществ и углеводов, в этот период происходит накопление почти всей биомассы; на следующем этапе скорость накопления биомассы резко снижается, однако в культуральной жидкости (КЖ) происходит накопление лизина [19].

В зависимости от назначения КЖ можно получить разные микробиологические препараты: жидкий концентрат лизина (ЖКЛ), сухой кормовой концентрат лизина (ККЛ) и кристаллический лизин [6].

## ГЛАВА 2. ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКАЯ ЧАСТЬ

### 2.1. Объект исследования

В качестве первого объекта исследования использовали штамм *Corynebacterium glutamicum* В-11404. Вторым объектом исследования выступает технология приготовления питательной среды для биосинтеза L-лизина.

#### *Corynebacterium glutamicum* В-11404

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 [31].

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) [31, 46].



## 2.2 Методика постановки эксперимента

1. Эксперимент «Изучение использования глюкозного сиропа, полученного в процессе двухступенчатого ферментативного гидролиза пшеничного крахмала В, в качестве источника углерода в процессе биосинтеза лизина».

Цель данного эксперимента состоит в том, чтобы путем двухступенчатого ферментативного гидролиза пшеничного крахмала В получить глюкозный сироп и затем использовать его в качестве источника углерода при биосинтезе лизина. А также изучить влияние такой замены источника углерода на выход конечного продукта, то есть на содержание лизина.

1. Эксперимент состоит из нескольких этапов:

1) Двухступенчатый ферментативный гидролиз пшеничного крахмала В (получение глюкозного сиропа).

2) Приготовление и стерилизация питательных сред.

3) Приготовление инокулята *C. glutamicum* В-11404 для производства лизина.

4) Засев полученного посевного материала на питательную среду, содержащую гидролизат крахмала В. Ферментация

Этапы эксперимента: 1) Двухступенчатый ферментативный гидролиз пшеничного крахмала В (получение глюкозного сиропа).

В ходе проведения процесса двухступенчатого ферментативного гидролиза нами были использованы три ферментных комплекса, относящиеся к разным группам гидролитических ферментов: амилолитические ( $\alpha$ -амилаза и глюкоамилаза), протеолитические (протеаза).

1. Klearflow™ AA – ферментный комплекс термостабильных α-амилаз для разжижения крахмала, относится к ферментным комплексам быстрого действия и используется в процессах производства декстрозы.

Сухое вещество	До 40% веса
pH	5,5–5,8
Дозировки	Требуемые для достижения $\geq 10$ DE–приблизительно 0,32 кг/тонну сухого крахмала
Условия разжижения	Первоначальное: 106-110 °С в течение 5-7 минут; Оптимальное разжижение достигается при $t^\circ = 105 \pm 3$ °С
	Вторичное: 95 °С в течение 90-120 минут, для достижения $\geq 10$ DE; Оптимальное разжижение достигается при 94 °С

Рис 2.2 а. Рекомендуемые условия по применению Klearflow™ AA для разжижения крахмала

2. Ферментный препарат (ФП) Optimax – комплекс высокоактивных глюкоамилаз, препарат грибного происхождения. Используется для осахаривания крахмала, предварительно разжиженного ферментом α-амилаза. Дозируется в замес после стадии разжижения. Наиболее эффективные условия действия фермента составляют  $t^\circ = 55-62$  °С, показатель pH 4,2–4,7. Наилучшая активность глюкоамилазы проявляется при повышенной температуре, но следует помнить, что при температуре выше 64 °С активность резко снижается. Оптимальная дозировка глюкоамилазы при указанной температуре составляет 0,7 грамм препарата на 1 килограмм крахмала, содержащегося в сырье [11, 17].

3. ФП грибной протеазы Протоферм FP – источник кислых протеаз получают путем глубинного культивирования генетически не модифицированного штамма плесневого гриба *Aspergillus niger* [28].

Основные ферменты в препарате: протеиназы и пептидазы. Обработка крахмальной суспензии кислыми протеазами способствует повышению атакуемости крахмала зерна амилолитическими ферментами ( $\alpha$ -амилазой и глюкоамилазой), что позволяет увеличить степень сбраживания за счет более полного гидролиза крахмала и получить сусло, обогащенное свободными аминокислотами [21, 24, 26]. Эффективность действия ФП Протоферм FP находится в области значений pH 2,5–6,0 и интервале температур 30–58 °C.

а) Подготовка крахмала к гидролизу и взвешивание ферментов, необходимых для гидролиза.

Готовим крахмальную суспензию для гидролиза. Содержание СВ в суспензии должно равняться 32%. Остальное вода. Учитывая содержание влаги в крахмале (7%) рассчитываем соотношение воды и крахмала для приготовления 1000 мл крахмальной суспензии [12].

Взвесили 320 г крахмала. В конической колбе на 1000 мл приготовили крахмальную суспензию путем тщательного смешивания крахмала с водой. Измерили pH суспензии. pH крахмальной суспензии доводим 0,1N HCl до 5,8. На автоматическом цифровом рефрактометре определили содержание сухих веществ в крахмальной суспензии. Провели первую йодную пробу: розово-синее окрашивание раствора суспензии при добавлении раствора йода свидетельствует о том, что этап гидролиза не начался, суспензия содержит большое количество крахмала и высокомолекулярных декстринов.

На аналитических весах взвесили 0,21 г ферментного препарата термостабильных  $\alpha$ -амилаз Klearflow™ AA; 0,4096 г ферментного препарата Optimax (глюкоамилазы); 0,0368 г ферментного препарата грибной протеазы Протоферм FP [21].

б) Стадия клейстеризации. Первичное разжижение крахмала

Помещаем колбу с крахмальным замесом на водяную баню с температурой воды в ней 94 °С, далее при тщательном перемешивании суспензии нагреваем ее. При нагревании суспензии до  $t^{\circ} = 50$  °С, добавляем в суспензию ферментный препарат Klearflow™ АА и продолжаем нагревать колбу [21]. Проводим йодную пробу: изменение окраски раствора суспензии при добавлении раствора йода на коричнево–розовую свидетельствует о постепенном разложении крахмала на среднемолекулярные декстрины и небольшое количество сахаров [13].

Максимальная температура суспензии на стадии первичного разжижения крахмала достигала 89 °С. На данном этапе крахмал разрушается под действием высоких температур и после начального пика вязкости, вязкость падает в течение следующих 30 минут.

#### в) Вторичное разжижение крахмала

Снизили температуру воды в водяной бане до 90 °С и продолжили нагревать колбу с суспензией, при этом периодически помешивая. Этап вторичного разжижения продолжается при максимальной температуре суспензии 88 °С в течение 120 минут. По истечении часа этапа вторичного разжижения, проводим йодную пробу. В процессе реакции йодной пробы раствор приобретает красно–коричневую окраску. Положительная йодная проба свидетельствует о нормальном протекании процесса гидролиза: показатели рН и температуры соответствуют оптимальным, дозировка  $\alpha$ –амилазы соблюдена. Красно–коричневая окраска показывает, что крахмал своевременно разлагается до среднемолекулярных и низкомолекулярных декстринов и сахаров [12, 21].

#### г) Этап осахаривания крахмала

Остудили крахмальную суспензию до 55 °С, при этом раствор продолжили греть на водяной бане при данной температуре. Измерили рН

суспензии. Показатель рН равен 5,8. рН крахмальной суспензии доводим 0,1Н НСl до 4,43. Стадия осахаривания крахмала длится 48–55 часов, при постоянном перемешивании раствора магнитной мешалкой. По истечении 20 минут стадии осахаривания, мы вносили в крахмальную суспензию ферментный препарат грибной протеазы Протоферм FP. Еще через 20 минут в суспензию добавляли ферментный препарат Optimax (глюкоамилазу). Суспензия греется на водяной бане еще 50 часов, после чего для инактивации ферментов и завершения процесса гидролиза колбу снова нагревают до 70 °С, рН суспензии доводится до 3,0. Далее гидролизат остужают до комнатной температуры.

В течение всего процесса гидролиза, периодически отбирали пробы (через каждые 4 часа) для контроля показателя рН и количества сухих веществ (СВ). Правильность протекания процесса проверяли йодной пробой и анализом на содержание редуцирующих веществ (в пересчете на глюкозу) [13].

## 2) Приготовление и стерилизация питательных сред.

а) Состав и методика приготовления питательных сред, необходимых для проведения процесса ферментации, используемая на «Заводе Премиксов № 1». Номер рецептуры 2 (ГПГ кислый).

Состав питательной среды при приготовлении посевного материала (преферментатор):

### Раствор №1.

Состав	Кол-во	Ед.
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	1,70	г
MnSO <sub>4</sub> *5H <sub>2</sub> O 2% водный раствор	1, 70	мл
FeSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O 2% водный раствор	1,70	мл
КН <sub>2</sub> РО <sub>4</sub>	1,70	г

Пенегаситель (Лапрол ПД-1)	0,68	г
Кукурузный экстракт	120,00	мл
Вода	До 900,55	мл

Взвесили 1,70 г 7-водного раствора  $MgSO_4$ , прилили растворы солей  $MnSO_4$  и  $FeSO_4$ ; Взвесили 1,70 г  $KH_2PO_4$ , растворили в небольшом количестве воды и добавили к смешанным солям. На аналитических весах взвесили 0,68 г пеногасителя, в мерном цилиндре отмеряем 120 мл кукурузного экстракта, компоненты добавляем к получившемуся раствору. В мерной колбе на 1000 мл все компоненты тщательно перемешиваем, доводим до метки водой. Стерилизовали раствор при  $t^\circ = 121^\circ C$  в течение 20 минут.

#### Раствор № 2.

Состав	Кол-во	Ед
Глюкозный сироп (СВ-67,4% DE-96,8%)	599,4	г

Взвесили 599,4 г глюкозного сиропа, полученного в процессе гидролиза крахмала В. Нужно количество компонента рассчитали по содержанию СВ и DE в крахмальной патоке, согласно стандартной методике приготовления питательных сред для посевного материала. Раствор глюкозного сиропа стерилизовали при  $121^\circ C$  в течение 20 минут.

#### Раствор № 3.

Состав	Кол-во	Ед
d-биотин 0,02% спиртовой раствор	3,45	мл
Тиамин 0,005% водный раствор	6,8	мл

Стерилизацию витаминов проводили фильтрованием. После стерилизации все три раствора смешивали, соблюдая асептические условия.

Эксперимент проводили в трех повторностях, в связи с этим количество глюкозного сиропа для питательной среды пересчитывалось, так как показатели DE и СВ для каждой повторности отличались.

Состав и приготовление питательной среды для ферментации (рабочий ферментер):

#### Раствор № 1

Состав	Кол-во	Ед.
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	53,20	г
MnSO <sub>4</sub> *5H <sub>2</sub> O 2% водный раствор	2,40	мл
FeSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O 2% водный раствор	2,40	мл
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	3,39	г
Пенегаситель (Бреокс ПГС–30)	0,90	г
Вода	До 718, 08	мл

Взвесили 53,20 г (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и растворили в небольшом количестве воды; пипеточным дозатором отмерили и прилили растворы солей MnSO<sub>4</sub>, FeSO<sub>4</sub> и MgSO<sub>4</sub>; На аналитических весах взвесили 0,90 г пеногасителя. В мерной колбе на 1000 мл все компоненты тщательно перемешиваем, доводим водой. Стерилизовали раствор при t° = 121 °С в течение 20 минут.

#### Раствор № 2.

Состав	Кол-во	Ед
Гидролизат пшеничного глютена рН–4,1, NH <sub>2</sub> –1,88%	158,0	мл

Раствор стерилизовали при t° = 121 °С в течение 20 минут.

#### Раствор № 3.

Состав	Кол-во	Ед
--------	--------	----

КН <sub>2</sub> РO <sub>4</sub>	9,70	г
Вода	До 100	мл

Взвесили и растворили в небольшом количестве воды 9,70 г КН<sub>2</sub>РO<sub>4</sub>, довели водой до метки. Тщательно перемешали, для полного растворения, нагрели на водяной бане. Стерилизовали при  $t^{\circ} = 121^{\circ}\text{C}$  в течение 20 минут.

#### Раствор № 4.

Состав	Кол-во	Ед
Глюкозный сироп (СВ–67,4% DE-96,8%)	74,93	г

#### Раствор № 5.

Состав	Кол-во	Ед
d-биотин 0,02% спиртовой раствор	4,50	мл
Тиамин 0,005% водный раствор	9,00	мл

Стерилизацию витаминов проводили фильтрованием и добавляли к растворам 1, 2, 3 и 4 после стерилизации, соблюдая асептические условия.

Эксперимент проводили в трех повторностях, в связи с этим количество глюкозного сиропа для питательной среды пересчитывалось, так как показатели DE и СВ для каждой повторности отличались.

В процессе ферментации в среду добавляли подпитки.

Приготовление подпиток для ферментации:

Состав	Кол-во	Ед
Крахмальная патока СВ–67,4%, DE–96,8	1200	г



Раствор стерилизовали при  $t^{\circ} = 116^{\circ}\text{C}$  в течение 30 минут

Ростовая подпитка:

Состав	Кол-во	Ед
Гидролизат пшеничного глютена рН–4,1, NH <sub>2</sub> –1,88%	120	мл

Раствор стерилизовали при  $t^{\circ} = 121^{\circ}\text{C}$  в течение 20 минут.

Подпитка сульфата аммония:

Состав	Кол-во	Ед
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	120	г
Вода	180	г

Раствор стерилизовали при  $t^{\circ} = 121^{\circ}\text{C}$  в течение 20 минут.

3) Приготовление инокулята *C. glutamicum* В–11404 для производства лизина.

Питательная среда А.

Компонент	Масса (г)
Глюкоза	10.8
Фруктоза	10.8

Влили 40 мл очищенной воды в 250 мл колбу и поместили ее на пластину для перемешивания. Взвесили 10,8 г глюкозы и 10,8 г фруктозы и растворили. После растворения довели водой до 60 мл, далее в две колбы на 50 мл добавили по 30 мл сахарного раствора и стерилизовали в автоклаве сахарный раствор в течение 20 минут при  $t^{\circ} = 121^{\circ}\text{C}$ .

### Питательная среда В.

Компонент	Масса (г)
Лимонная кислота	0.09
NaCl	1.8
Порошкообразный дрожжевой экстракт	3.6
Питательная среда «Circle grow»	9

В колбу поместили 1 г  $\text{CaCO}_3$ , добавили 200 мл очищенной воды в мензурку и поместили ее на пластину для перемешивания, последовательно взвесили компоненты, приведенные в таблице. По мере растворения компонентов, довели уровень pH до 7,5 добавлением  $\text{NH}_4\text{OH}$ . Довели до 300 мл очищенной водой и распределили в две колбы с перегородкой по 150 мл, содержащие  $\text{CaCO}_3$ .  $\text{CaCO}_3$  поддерживает уровень pH для выращивания культур в течение длительного периода.

Соединение сред А и В произвели в ламинарном боксе в стерильных условиях. Криозамороженную культуру разморозили при комнатной температуре, затем засеяли ее в колбы со средой, в количестве 1 пробирка криозамороженной культуры на две колбы. Культивирование в колбах вели в шейкер–инкубаторе при скорости вращения 240 об/мин, температуре 31 °С в течение 8 ч. Для дальнейшего использования готового инокулята отбирали пробу для проверки качества (измерение оптической плотности (не менее 30 ед), pH (6,8–7,2) и контроль отсутствия посторонней микрофлоры).

Забракованные колбы с посевным материалом подвергались автоклавированию. На следующей стадии использовали колбы 0,75 л, выращивание проводили в шейкер–инкубаторе при температуре 31 °С, продолжительность выращивания – 16 часов.

После размножения культуры в колбах на качалках, культуру размножают в посевных ферментаторах объемом 5 л, оборудованных барботерами, устройствами для измерения и регулирования рН среды, температуры, скорости вращения мешалки.

Объем инокулята 150 мл, начальный объем среды преферментатора равен 1000 мл. Через каждые 4 часа, соблюдая асептические условия, отбирали пробы для осуществления химического (определение оптической плотности, фактической рН) и микробиологического (высев на стерильность и определение размеров, количества клеток) контроля. Оптимальная температура роста культуры равна 31 °С, рН 6,5–6,8. Продолжительность роста культуры в посевном ферментаторе 14 часов.

4) Засев полученного посевного материала на питательную среду, содержащую гидролизат крахмала В. Ферментация

Биосинтез лизина осуществляется в рабочих ферментаторах, изготовленных из нержавеющей стали. Объем инокулята преферментера составляет 280 мл. Оптимальная для *C. glutamicum* В-11404 температура 32 °С, нормальное развитие культуры и биосинтез лизина наблюдали при рН 7,0. Во время ферментации имело место подкисление ферментационной среды, поэтому автоматически регулировали реакцию среды путем периодических добавок  $\text{NH}_4\text{OH}$  [19].

Через каждые 4 часа после начала ферментации, соблюдая асептические условия, отбирали пробы для осуществления химического (определение оптической плотности, фактической рН, определение содержания свободного аммиачного азота, глюкозы, сухих веществ, лизина) и микробиологического (высев на стерильность и определение размеров, количества клеток) контроля.

### 2.3. Методы исследования

Методы исследования:

1) Метод истощающего штриха;

Метод истощающего штриха применяется для проверки суспензии микроорганизмов на степень загрязненности (по однородности выросших колоний) [30].

Рассев петлей (метод истощающего штриха) предполагает нанесение инокулята бактериологической петлей на поверхность твердой питательной среды в чашках Петри.

В основе метода посева истощающим штрихом лежит механическое разобщение микробных клеток путем снижения их концентрации по ходу нанесения суспензии микроорганизмов бактериальной петлей штриховыми движениями по поверхности плотной питательной среды [9].

Суть метода: посев осуществляли в ламинарном боксе: правой рукой взяли бактериальную петлю и прокаливали ее над пламенем горелки; левой рукой держали пробирку с отобранной суспензией, вынули пробку из пробирки; стерильной бактериальной петлей произвели забор небольшого количества материала, содержащего микроорганизмы; край пробирки и пробку слегка обожгли и пробирку закрыли пробкой; зигзагообразными движениями наносили исследуемый материал на всю поверхность питательного агара чашки Петри бактериальной петлей; петлю после посева фламбировали [9, 25].

После посева чашки Петри переворачивали вверх дном, чтобы конденсационная вода, образовавшаяся на крышке чашки, не мешала получить изолированные колонии. Чашки выдерживали в термостате 2–3 суток.

2) Приготовление препарата по методу раздавленной капли и его микроскопия;

Методом микроскопии осуществляют проверку суспензии микроорганизмов на чистоту (по морфологической однородности популяции), а также для изучения формы, взаимного расположения, подвижности клеток и их размеров [9, 36].

Сущность метода раздавленной капли: на середину обезжиренного предметного стекла наносят каплю воды, куда бактериологической петлей, прокаленной в пламени горелки и охлажденной, помещают небольшую массу бактерий, хорошо размешивают. Препарат накрывают покровным стеклом, капля тонким слоем заполняет все пространство между покровным и предметным стеклом, но не выступает за края покровного стекла. Излишек выступившей жидкости удаляют фильтровальной бумагой. Препарат помещают на предметный столик оптического микроскопа и рассматривают при большом увеличении (40\*0,65) или с иммерсией [30, 36].

Препарат «раздавленная капля» готовится быстро, и позволяет установить форму клеток микроорганизмов, их размеры, наличие или отсутствие подвижности, однако такие препараты недолговечны [36].

Методы микроскопии позволяют идентифицировать живые микроорганизмы, благодаря их визуальным особенностям.

3) Биохимические методы;

а) Йодная проба суспензии на крахмал (проводится в процессе гидролиза для контроля за протеканием процесса) [13].

Йодная проба основана на том, что раствор йода при комнатной температуре дает с крахмалом и высокомолекулярными декстринами окрашивание от темно-синего до красного цвета, тогда как все сахара и более мелкие декстрины не изменяют его желто-коричневого цвета [13].

Йодная проба: из колбы с крахмальной суспензией отбирали 5 мл пробы разбавляли ее 45 мл воды; 0,1Н раствор йода разбавили водой в 5 раз для получения 0,02Н раствора; к раствору суспензии добавили полученный йодный раствор и наблюдали изменение окрашивания [13].

б) Определение свободного аммиачного азота в пробах (метод Кьельдаля) на аппарате «Кьельтек 8200».

Метод основан на разложении неорганического азота пробы. Достоинство «Кьельтека» состоит в гибкости методик: в отличие от спектрометров он позволяет определять различные фракции азота.

Суть метода: пробирку для дистилляции поместили в химический стакан и установили на весы. Отобрали 2 г гомогенной пробы одноразовой пипеткой [18]. Дистилляционную пробирку перенесли в камеру прибора. Закрыли дверцу аппарата, нажали старт. Процесс идет примерно 5 минут. После проведения процесса парогенерации извлекли из аппарата «Кьельтек» приемную колбу. В ней раствор, имеющий розовую окраску. Содержимое колбы оттитровали раствором 0,1Н серной кислоты при помощи цифровой бюретки. Расчет результатов основан на исходной массе или объеме в г или мл используемой пробы [36].

Расчет результатов основан на исходной массе или объеме в г или мл используемой пробы. Формула для обработки результатов:

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

, где: V1 – объем титранта для пробы в мл; V2 – объем титранта для контроля в мл; m – масса или объем пробы, M – используемая молярность серной кислоты, 14,007/1000 – коэффициент преобразования для азота (N) в г/л [36].

в) Определение содержания сухих веществ в пробе на автоматическом цифровом рефрактометре RX-5000α.

Рефрактометр - оптический прибор, измеряющий показатель преломления света в среде. Рефрактометрия, выполняющаяся с помощью рефрактометров, является одним из распространённых методов идентификации химических веществ, количественного и структурного анализа, определения физико-химических параметров веществ. RX-5000α – это цифровой автоматический рефрактометр, способный устанавливать температуру измерения, и проводящий измерения индекса рефракции,  $n_{D,20}$  или концентрации различных жидкостей быстро и точно [9, 36].

Суть метода: почистили и вытерли поверхность призмы рефрактометра бумажной салфеткой. Одноразовой пипеткой набрали несколько миллилитров пробы. Нанесли образец на поверхность призмы. Закрыли крышку, запустили процесс кнопкой START. На экране показана температура пробы и ее охлаждение или нагревание до нужной. На экране появляется результат СВ (%).

г) Определение pH с помощью лабораторного pH-метра «Mettler-Toledo Education Line EL20».

Суть метода: достали электрод pH метра из раствора KCl в котором он хранится. Промыли электрод дистиллированной водой, промокнули фильтровальной бумагой. Произвели калибровку по 2-м свежеприготовленным буферным растворам комнатной температуры с  $pH = 4,0$  и  $pH = 7,1$ . После успешной калибровки pH-электрода измерили pH в пробе культуральной жидкости, путем опускания его непосредственно в пробу [18].

д) Определение глюкозы на автоматическом анализаторе глюкозы «Энзискан ультра»

Автоматический анализатор глюкозы «Энзискан ультра» мембранного типа предназначен для измерения молярной концентрации глюкозы в

культуральной жидкости (КЖ). Калибровка анализатора осуществляется каждые 4 часа калибровочным раствором глюкозы 10 ммоль/л в режиме «Сыворотка». Калибровка проводится двукратно. Когда последующее значение тока совпадает с предыдущим – анализатор откалиброван.

Суть метода: измерение молярной концентрации глюкозы в пробе: для анализа брали центрифугат КЖ. Пробу разводили дистиллированной водой. Набрали дозатором разведенную пробу, удалили излишки пробы с наконечника дозатора и вводили в канал «ввод пробы», нажатие производили до второго упора и не отпускали, пока дозатор не был удален из канала. Через 10 секунд на дисплее появился результат и автоматически включилась «Промывка». Обработка результатов: для перевода из моль/л в г/л:  $C = (C_m * 180 * n) / 1000$ , где  $n$  – разведение,  $C_m$  – результат на дисплее прибора, моль/л.

е) Определение оптической плотности в КЖ на спектрофотометре ЮНИКО–2800

Оптическая плотность – это мера непрозрачности вещества для световых лучей или мера пропускания света для прозрачных объектов и отражения непрозрачных, линейно связана с концентрацией определяемого вещества [25].

Суть метода: измерение оптической плотности проводили на спектрофотометре при длине волны 390 нм. Гомогенную пробу разбавили дистиллированной водой в несколько раз (разбавление зависит от номера пробы, т. е. времени протекания процесса). Наполнили кювету раствором для сравнения (дистиллированная вода). Установили кювету с контрольным раствором на пути прохождения света. Нажимаем кнопку 100%Т для обнуления. Далее взяли чистую кювету, с помощью одноразовой пипетки заполнили ее раствором пробы. Установили кювету с раствором пробы в спектрофотометр. Ручкой для перемещения кюветодержателя подвели в



рабочую зону кювету с раствором пробы. Нажал кнопку start. Результат высвечивается на экране. Показания прибора должно находиться в пределах от 0,2 до 0,5.

4) Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) – это метод колоночной хроматографии, в котором подвижной фазой (элюентом) служит жидкость, движущаяся через хроматографическую колонку, заполненную неподвижной фазой (сорбентом) [25, 36].

Определение количественного содержания лизин хлорида в пробе на жидкостном градиентном хроматографе «Стайер»;

Принцип действия жидкостного градиентного хроматографа "Стайер" основан на разделении анализируемой пробы на составляющие компоненты в хроматографической колонке и последующем измерении их содержания спектрофотометрическим и кондуктометрическим детекторами.

Суть метода: пробу разбавили водой, с добавлением внутреннего стандарта, затем при помощи шприцевого фильтра пропустили раствор в виалу и затем поместили в ячейку автосамплера. Перемешивание пробы, воды и ОРА осуществляется в микс виалке, с дальнейшей дериватизацией. Элюент из ёмкости через фильтр подается насосом в автосамплер, в поток подвижной фазы вводится проба из микс виалки. Затем через фильтр образец с током элюента поступает в элемент разделения через предколонку, в разделительную колонку. Элюент (смесь растворителей) поступает в флуоресцентный детектор и перемещается в сливную емкость, при протекании элюата через измерительный контур детектора происходит регистрация хроматограммы и передача данных на аналоговый регистратор (самописец). Результат анализа – хроматограмма, по площадям пиков рассчитывается количественное содержание аминокислот [9, 25].

5) Статистическая обработка данных разностным методом;

Биологическая статистика — научная отрасль на стыке биологии и вариационной статистики, связанная с разработкой и использованием статистических методов в научных исследованиях.

Сущность разностного метода заключается в определении ошибки средней разности, а не разности средних как в дробном и обобщённом методах. Разностный метод предусматривает сравнение сопряжённых, коррелирующих пар.

Разностный метод обработки используется для опытов, размещённых стандартными методами (например, ямб-, дактиль-методы). Этот метод размещения вариантов чаще всего используют в сортоизучении, а также в условиях сильного варьирования плодородия почв. Разностный метод обработки используется для опытов, размещённых стандартными методами. При стандартном размещении контрольный и опытный варианты находятся в равных условиях независимо от повторения, что повышает существенность различий между вариантами и точность опыта.

#### Основные формулы при обработке данных.

1) Среднее арифметическое:

$$\bar{x} = \Sigma V / n$$

,где  $V$  – дата,  $n$  – число объектов в группе.

2) Разность ( $d$ ) между гибридами вычисляют по повторениям:

$$d = V_2 - V_1$$

Затем определяют средние арифметические разности ( $d_{cp}$ ).

3) Отклонения между каждой разностью и средним значением рассчитывают:

$$d - d_{cp}$$

Эти отклонения возводят в квадрат и складывают, а их суммы  $\sum(d-d_{cp})^2$  используют для вычисления ошибок разностей ( $S_d$ ).

4) Ошибка разностей ( $S_d$ ):

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

,где n – число повторений.

5) Критерий существенности Стьюдента фактический:

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

Фактический критерий сравнивают с теоретическим и делают выводы, пользуясь правилом: если фактический критерий Стьюдента равен теоретическому значению или больше него, то разность между вариантами существенна на определенном уровне значимости ( $P=0,001$ ;  $0,01$  или  $0,05$ ).

Теоретические значения критериев Стьюдента берут из таблицы чисел степеней свободы, которые вычисляются по формуле:

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

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

### 3.1. Результаты ферментативного гидролиза крахмала В

Полученные нами данные по изучению использования глюкозного сиропа, полученного в процессе двухступенчатого ферментативного гидролиза пшеничного крахмала В, в качестве источника углерода в процессе биосинтеза лизина.

Содержание глюкозы (г/л) в глюкозном сиропе, полученном в процессе двухступенчатого ферментативного гидролиза крахмала В. Повторность № 1 (28. 07. 2016).

Табл. 3.1.1

№ п/п	Разведение	Содержание глюкозы, г/л
1	1:10	32,50
2	1:50	118,18
3	1:100	168,17
4	1:100	174,96
5	1:118	215,00
6	1:200	218,75
7	1:200	218,95
8	1:200	224,42
9	1:250	231,22
10	1:218	237,13
11	1:200	244,78
12	1:224	248,28
13	1:228	250,73
14	1:225	256,44

Содержание глюкозы (г/л) в глюкозном сиропе, полученном в процессе двухступенчатого ферментативного гидролиза крахмала В. Повторность № 2 (19.10.2016)

Табл. 3.1.2

№ п/п	Разведение	Содержание глюкозы, г/л
1	1:15	34,63
2	1:50	117,62
3	1:100	118,81
4	1:200	131,34
5	1:200	136,27
6	1:200	156,22
7	1:225	201,14
8	1:275	202,35
9	1:300	216,49
10	1:300	220,14
11	1:300	246,16
12	1:320	251,18
13	1:300	278,42
14	1:300	284,39

Содержание глюкозы (г/л) в глюкозном сиропе, полученном в процессе двухступенчатого ферментативного гидролиза крахмала В. Повторность № 3 (5.02.2017)

Табл. 3.1.3

№ п/п	Разведение	Содержание глюкозы, г/л
1	1:10	43,09
2	1:50	199,26
3	1:100	223,92
4	1:200	231,34
5	1:300	232,92
6	1:300	244,22
7	1:300	249,34
8	1:300	262,96
9	1:300	269,22
10	1:300	273,96
11	1:300	275,91
12	1:300	289,98
13	1:300	294,42
14	1:300	295,38

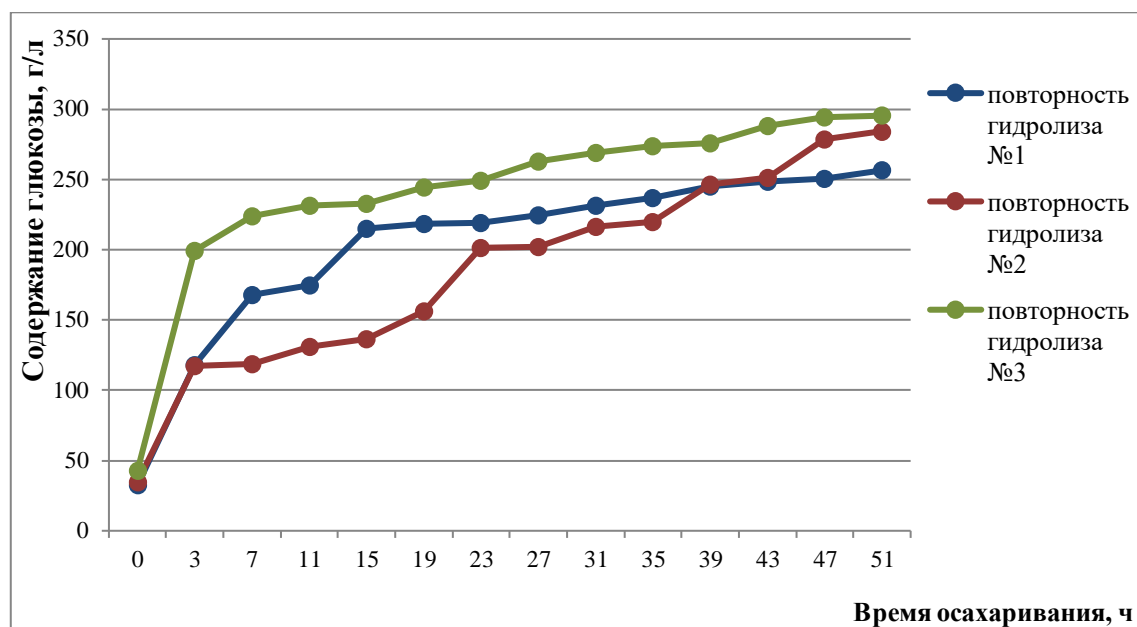


Рис 3.1.1 График зависимости содержания глюкозы от продолжительности стадии осахаривания, в процессе гидролиза Крахмала В.

Крахмальная патока, полученная в процессе переработки крахмала А (контроль), используемая на «Заводе Премиксов № 1» в качестве источника углерода при биосинтезе лизина содержит 67,4% СВ, ее DE равен 96,8%.

Характеристики глюкозного сиропа, полученного в процессе двухступенчатого ферментативного гидролиза крахмала В

Табл. 3.1.4

№ повторности	Содержание глюкозы, г/л	N <sub>2</sub> , %	СВ, %	NH <sub>3</sub> , %	DE, %
1	256,44	0,05	30,26	0,06	86,81
2	284,39	0,04	31,07	0,05	89,12
3	295,38	0,04	32,12	0,05	91,11

Сравнительные данные по количеству крахмальной патоки (контроль) и глюкозного сиропа (эксперимент), необходимого при приготовлении питательных сред для биосинтеза лизина (преферментатор)

Табл. 3.1.5

Источник углерода для питательной среды	№ опыта	СВ, %	DE, %	м, г (рецепт №2)	Количество добавочной воды, мл	Концентрация глюкозы (г/л) в питательной среде, в пересчете на СВ–67,4% и DE–96,8%
Крахмальная патока (крахмал А)	контроль	67,40	96,80	240,0	до 1000,00	103,68
Глюкозный сироп (крахмал В)	1	30,26	86,81	599,4	до 900,55	104,26
	2	31,07	89,12	567,7	до 932,25	104,09
	3	32,12	91,11	534,24	до 965,71	103,52

Сравнительные данные по количеству крахмальной патоки (контроль) и глюкозного сиропа (эксперимент), необходимого при приготовлении питательных сред для биосинтеза лизина (рабочий ферментатор)

Табл. 3.1.6

Источник углерода для питательной среды	№ опыта	СВ, %	DE, %	м, г (рецепт №2)	Количество добавочной воды, мл	Концентрация глюкозы (г/л) в питательной среде, в пересчете на СВ–67,4% и DE–96,8%
Крахмальная патока	контроль	67,40	96,80	30,0	до 700,00	18,88
Глюкозный сироп	1	30,26	86,81	74,93	до 718,08	18,99
	2	31,07	89,12	70,96	до 722,05	18,96
	3	32,12	91,11	66,78	до 726,23	18,85

### 3.2. Результаты биохимических анализов основных показателей биосинтеза лизина *Corynebacterium glutamicum* В–11404 при

**использовании глюкозного сиропа, полученного в процессе  
ферментативного гидролиза крахмала В.**

Результаты биохимических анализов процесса ферментации с использованием в качестве источника углерода глюкозного сиропа (эксперимент) и крахмальной патоки (контроль).

Повторность № 1 (28. 07. 2016).

Табл. 3.2.1

	Часы роста	pH	Глюкоза, г/л	N <sub>2</sub> ,%	ОП, ед	Лизин, г/л	СВ,%
Контроль (источник углерода– крахмальная патока– крахмал А)	3	6,96	96,16	1,222	15,17	4,03	11,98
	7	6,98	81,13	1,002	28,49	34,99	11,93
	11	6,98	62,41	0,912	50,08	51,04	10,28
	15	7,17	50,14	0,834	81,12	67,05	10,99
	19	7,16	32,14	0,741	93,47	79,54	11,26
	23	7,18	21,46	0,702	122,40	90,20	15,32
	27	7,16	15,47	0,637	126,16	96,85	16,04
	31	7,13	12,21	0,426	122,41	105,00	18,54
	35	7,12	7,96	0,356	131,41	121,16	20,02
	39	7,18	5,22	0,305	125,12	129,73	20,08
	43	7,15	3,11	0,261	125,19	134,42	21,16
	47	7,32	1,01	0,246	111,37	141,35	23,46
	49	7,40	0,82	0,225	108,09	152,91	23,02
Эксперимент (источник углерода– глюкозный сироп– крахмал В)	3	6,97	91,17	2,066	14,88	6,04	9,0
	7	6,99	79,14	1,489	26,15	39,2	8,59
	11	6,98	72,11	1,165	42,8	50,30	10,44
	15	6,98	51,14	1,102	80,71	64,97	12,69
	19	7,14	43,12	1,072	122,4	81,24	13,41
	23	7,16	24,73	1,030	129,9	93,21	15,11
	27	7,19	13,17	0,921	133,16	102,61	16,89
	31	7,12	11,20	0,712	116,22	112,45	16,34
	35	7,12	10,36	0,539	118,04	121,94	18,22
	39	7,19	7,00	0,422	120,71	131,37	20,36
	43	7,15	4,11	0,303	122,01	139,01	20,78
	47	7,36	0,93	0,210	118,48	142,48	23,12
	49	7,48	0,06	0,151	114,6	145,64	22,16



Результаты повторности № 1 (контроль и эксперимент) показывают увеличение оптической плотности (до 47 часа ферментации), сухих веществ (до 47 часа ферментации) и выхода лизина (на протяжении всего процесса ферментации). Это связано с активным ростом биомассы и синтезом лизина. Небольшое содержание азота и глюкозы по истечении 49 часов ферментации (постоянное уменьшение этих компонентов) связано с активным ростом клеток и микробиологическим синтезом лизина.

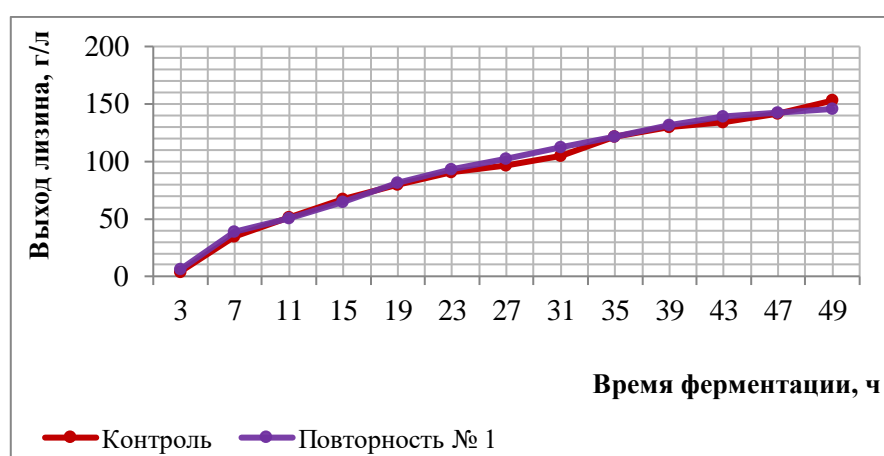


Рис. 3.2.1. График зависимости выхода лизина от времени ферментации

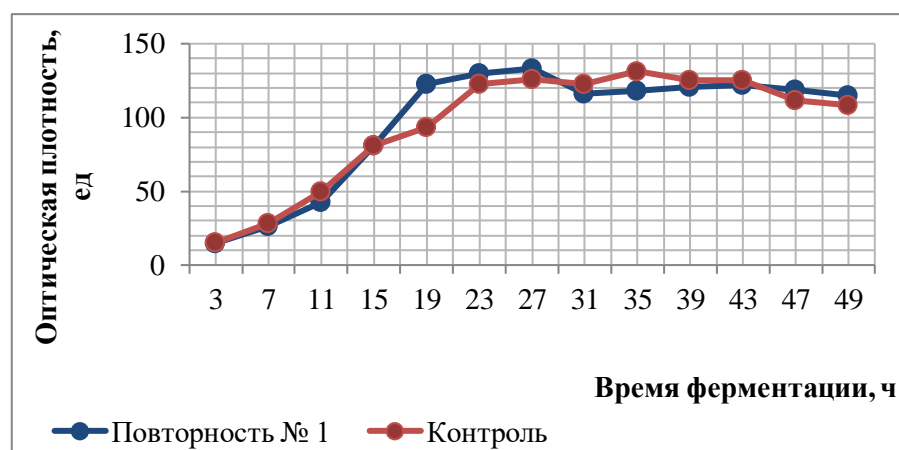


Рис. 3.2.2. График зависимости оптической плотности от времени ферментации

Результаты биохимических анализов процесса ферментации с использованием в качестве источника углерода глюкозного сиропа (эксперимент) и крахмальной патоки (контроль). Повторность № 2 (19. 10. 2016).

Табл. 3.2.2.

	Часы роста	рН	Глюкоза, г/л	N <sub>2</sub> ,%	ОП, ед	Лизин, г/л	СВ,%
Контроль (источник углерода– крахмальная патока– крахмал А)	3	6,98	98,18	1,224	15,13	3,99	11,96
	7	7,08	81,10	1,004	28,38	35,01	11,90
	11	7,11	62,38	0,908	50,11	50,99	10,30
	15	7,17	50,15	0,830	81,08	67,03	10,98
	19	7,18	32,12	0,738	93,52	79,51	11,28
	23	7,18	21,48	0,708	123,48	96,18	15,38
	27	7,22	15,42	0,642	126,14	104,78	16,08
	31	7,15	12,11	0,424	122,38	112,00	18,62
	35	7,18	7,93	0,348	131,45	121,19	20,04
	39	7,25	5,28	0,301	125,08	129,71	20,12
	43	7,30	3,15	0,258	125,11	134,44	21,18
	47	7,38	1,03	0,244	111,33	141,40	23,44
49	7,42	0,80	0,220	108,08	152,04	22,99	
Эксперимент (источник углерода– глюкозный сироп– крахмал В)	3	6,94	90,52	2,034	4,72	5,06	8,59
	7	6,96	78,11	2,004	25,98	38,2	7,68
	11	6,98	72,73	1,018	42,83	48,30	10,44
	15	6,98	52,14	1,004	80,76	65,47	12,34
	19	7,16	43,36	0,904	96,6	80,30	13,48
	23	7,18	24,56	0,850	130,01	92,68	15,30
	27	7,18	13,18	0,736	133,20	102,52	16,68
	31	7,16	11,20	0,712	116,18	113,48	16,36
	35	7,14	10,34	0,648	118,06	122,94	18,94
	39	7,16	7,11	0,434	120,67	131,40	20,38
	43	7,17	4,20	0,330	121,52	139,01	21,18
	47	7,40	0,98	0,230	118,30	140,48	23,20
49	7,46	0,08	0,218	115,6	146,30	22,18	

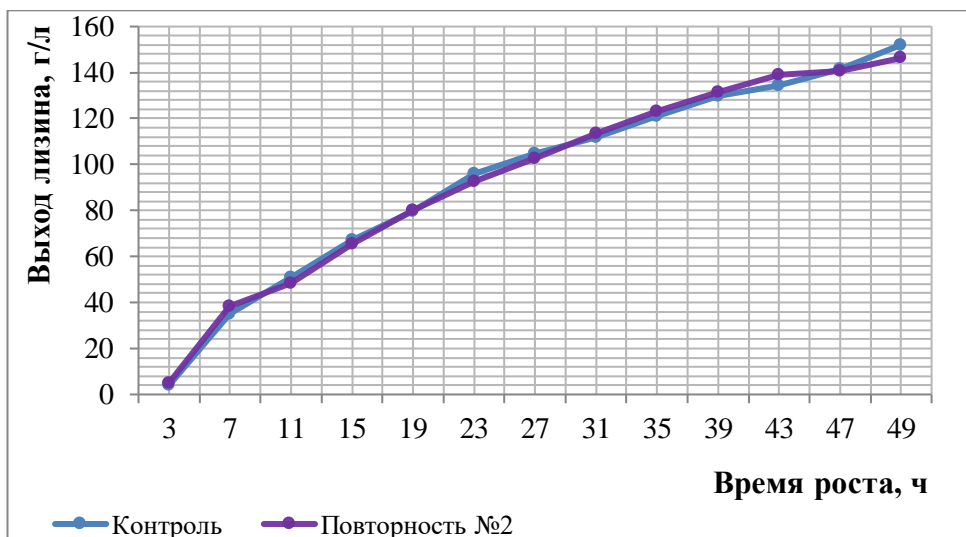


Рис. 3.2.3. График зависимости выхода лизина от времени ферментации

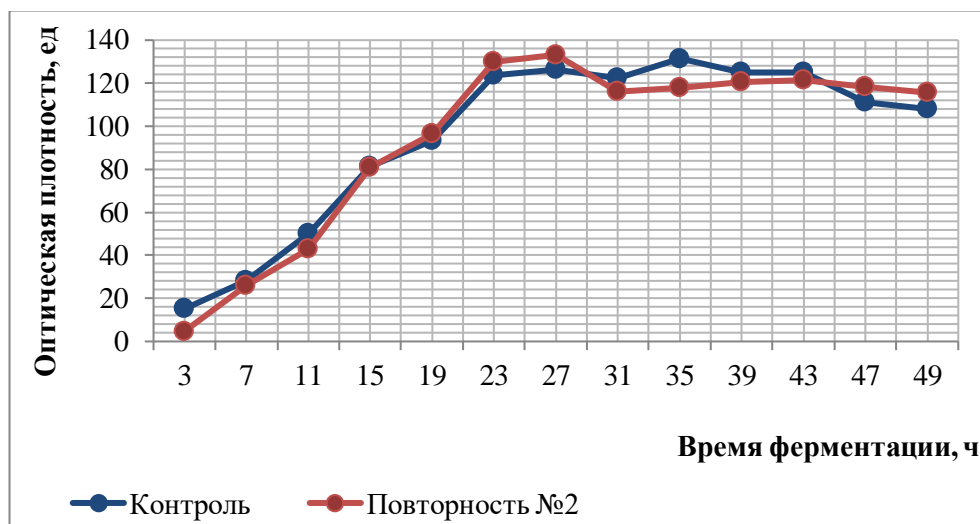


Рис. 3.2.4. График зависимости оптической плотности от времени ферментации

Результаты биохимических анализов процесса ферментации с использованием в качестве источника углерода глюкозного сиропа (эксперимент) и крахмальной патоки (контроль). Повторность № 3 (5. 02. 2017).

Табл. 3.2.3

	Часы роста	pH	Глюкоза, г/л	N <sub>2</sub> ,%	ОП, ед	Лизин, г/л	СВ,%
Контроль (источник углерода– крахмальная патока– крахмал А)	3	6,96	98,20	1,226	15,11	3,96	11,94
	7	7,02	81,08	1,004	28,34	34,99	11,93
	11	7,08	62,36	0,906	50,16	50,68	10,28
	15	7,14	50,18	0,828	81,04	68,03	10,96
	19	7,16	32,14	0,736	93,48	79,34	11,26
	23	7,16	21,46	0,706	123,52	96,20	15,36
	27	7,18	15,44	0,640	126,30	104,30	16,04
	31	7,16	12,08	0,426	123,08	112,00	18,52
	35	7,22	7,90	0,346	131,30	122,17	20,06
	39	7,28	5,26	0,301	124,52	127,78	20,12
	43	7,32	3,12	0,260	125,08	134,30	21,18
	47	7,40	1,02	0,242	111,22	141,38	23,44
	49	7,44	0,78	0,218	109,08	151,52	22,99
Эксперимент (источник углерода– глюкозный сироп– крахмал В)	3	6,94	90,52	2,034	4,72	6,66	859
	7	6,96	78,11	2,004	25,98	36,2	7,68
	11	6,98	72,73	1,018	42,83	49,03	10,44
	15	6,98	52,14	1,004	80,76	67,74	12,34
	19	7,16	43,36	0,904	122,6	79,30	13,48
	23	7,18	24,56	0,850	130,01	91,73	15,30
	27	7,18	13,18	0,736	133,20	102,52	16,68
	31	7,16	11,20	0,712	116,18	111,69	16,36
	35	7,14	10,34	0,648	118,06	124,75	18,94
	39	7,16	7,11	0,434	120,67	130,46	20,38
	43	7,17	4,20	0,330	121,52	137,01	21,18
	47	7,40	0,98	0,230	118,30	142,48	23,20
	49	7,46	0,08	0,218	115,6	146,92	22,18

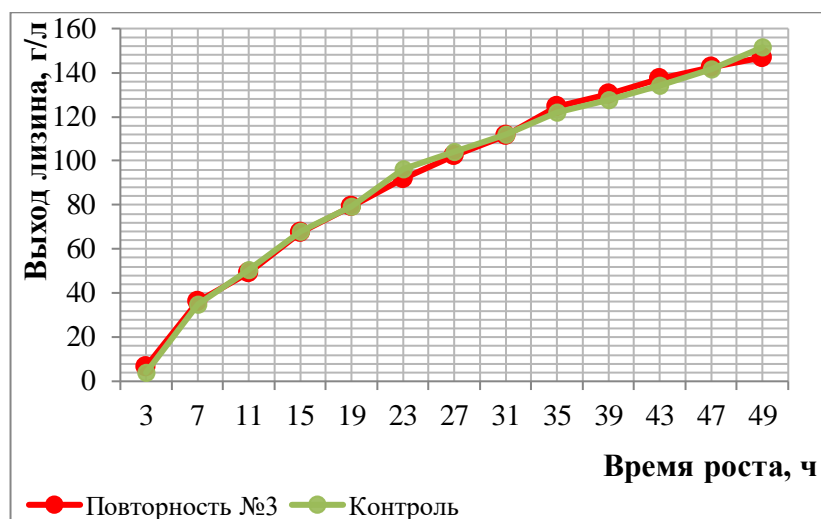


Рис. 3.2.5. График зависимости выхода лизина от времени ферментации

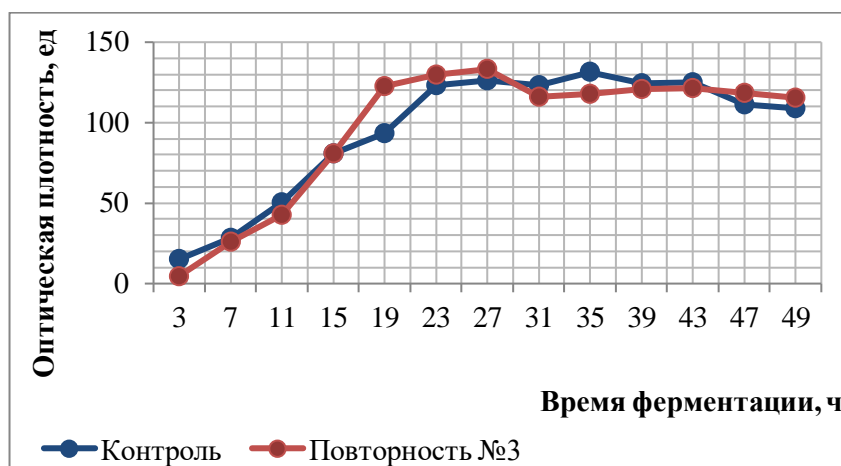


Рис. 3.2.6. График зависимости оптической плотности от времени ферментации

Результаты повторностей № 2 и № 3 (контроль и эксперимент) показывают увеличение оптической плотности (до 43 часа ферментации), сухих веществ (до 47 часа ферментации) и выхода лизина (на протяжении всего процесса ферментации). Это связано с активным ростом биомассы и синтезом лизина. Небольшое содержание азота и глюкозы по истечении 49 часов ферментации (постоянное уменьшение этих компонентов) связано с активным ростом клеток и микробиологическим синтезом лизина.

Сравнительные данные по продукции лизина (г/л) за 49 часов ферментации при использовании питательной среды, содержащей глюкозный сироп (крахмал В) и с применением крахмальной патоки (крахмал А). Статистическая обработка данных.

Табл. 3.2.4.

№	Контроль (углеродный компонент ферментационной среды– крахмальная патока)	Эксперимент (углеродный компонент ферментационной среды–глюкозный сироп–гидролизат крахмала В)	d	d – $\bar{d}$	(d – $\bar{d}$ ) <sup>2</sup>	S <sub>d(1-2)</sub>	t <sub>факт (1-2)</sub>
1	152,91	145,64	7,27	1,4	1,96	0,5983	9,811
2	152,04	146,30	5,74	-0,13	0,0169		
3	151,52	146,92	4,60	-1,27	1,6129		
	$\bar{x}_2 =$ 152,16	$\bar{x}_1 =$ 146,29	$\bar{d} =$ 5,87	$\sum = 0$	$\sum =$ 3,5898		

Критерий Стьюдента между средним арифметическим контролем (углеродный компонент ферментационной среды – крахмальная патока– гидролизат крахмала А) и средним арифметическим экспериментом (углеродный компонент ферментационной среды – глюкозный сироп – гидролизат крахмала В) составляет 9,811, что больше  $t_{0,05} = 3,18$  и  $t_{0,01} = 5,84$ .

Следуя этим данным, можно сказать о статистической значимости сравниваемых показателей так как  $t_{таб} < t_{факт}$ .

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе исследования были решены данные задачи и сформулированы следующие выводы:

1. Были проанализированы литературные данные по гидролизу крахмала и биосинтезу лизина.
2. Был проведен двухступенчатый ферментативный гидролиз крахмала В с помощью амилолитических ферментов ( $\alpha$ -амилазы и глюкоамилазы) и протеолитических ферментов (ферментный препарат грибной протеазы Протоферм FP).
3. В ходе работы было определено, что замена источника углеводного питания в процессе биосинтеза лизина, серьезно не повлияла на выход конечного продукта. Наибольшая разница в выходе лизина между контролем и экспериментом составила 7,27 г/л в пользу крахмальной патоки (гидролизата крахмала А), что составляет около 4,75%.
4. Изменение источника углеводного питания не оказало негативного влияния на рост культуры *Corynebacterium glutamicum* В-11404. Также как и крахмальная патока, полученная путем гидролиза крахмала А, глюкозный сироп (гидролизат крахмала В) обеспечивает высокий показатель роста микроорганизмов и выхода лизина в целом, а глубокий ферментативный гидролиз данного вида сырья в перспективе способен повысить выход лизина.
5. Замена компонента питательной среды при биосинтезе лизина, а именно гидролизата крахмала А на гидролизат крахмала В, в перспективе экономически эффективна. Стоимость крахмала А на Российском рынке составляет около 11 р за кг, а крахмала В – 6,5 р за кг. При этом экономические затраты на сам процесс гидролиза у обоих видов сырья равнозначны. Таким образом, совершенствование методики ферментативного гидролиза крахмала В и развитие отрасли глубокой переработки зерна пшеницы в скором будущем позволят повысить выход L – лизина.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Андреев Н.Р. - Классификация крахмалов и крахмалсодержащего сырья. - Москва, 2001. - 75 с.
2. 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.
3. Бекер, М. Е., Упит А. А. - Аминокислоты микробного синтеза. - Рига, 1968. - 68 с.
4. Бирагова Н.Ф., Бирагова С.Р. - Биотехнология этилового спирта из крахмалсодержащего сырья. - Владикавказ: Терек, 2014. - 68 с.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. Гидролитические ферменты: URL: <http://helpiks.org/5-109299.html>: дата обращения 21.01.2017
  12. ГОСТ Р 52672-2006. Гидролизаты крахмала. Общие технические условия. - Введ. 2014-07-01. - М.: Стандартиформ, 2013. - 15 с.
  13. ГОСТ Р 54330-2011. Ферментные препараты для пищевой промышленности. Методы определения амилолитической активности. - Введ. 2013-01-01.- М.: Стандартиформ, 2012. - 18 с.
  14. Грачева И.М. - Технология ферментных препаратов. - М.: Агропромиздат, 1987. - 335 с.
  15. Гулюк Н.Г. - Крахмал и крахмалопродукты / под. ред. д-ра техн. наук Гулюка Н.Г. - М.: Агропромиздат, 1985. - 235 с.
  16. Дмитриева Е.П. - Двухступенчатый гидролиз крахмала альфа-амилазой // М.: ЦНИИТЭИпищепром, 1979. - 159 с.
  17. Жеребцов Н.А. - Амилолитические ферменты в пищевой промышленности.- М.: Легкая и пищевая промышленность, 1984. - 158 с.
  18. Красноштанова А.А., Крылов Б.А., Бабусенко Е.С. - Основы биотехнологии. Учебное пособие. - Москва, РХТУ им. Д.И. Менделеева, 2001. - 84 с.
  19. Лабораторный регламент ЛР-00479942-1-2011. – Получение лизина на основе продуктов глубокой переработки зерна. – М.: ФГИУ ГосНИИгенетика, 2011. - 35 с.
  20. Ладур Т.А., Лукин Н.Д. - Применение биотехнологии для получения сахаристых продуктов для зернового крахмалосодержащего сырья. - М.: Пищепромиздат, 2004. - 266 с.
  21. Ладур Т.А. - Способы повышения эффективности паточно-глюкозного

- производства с применением ферментных препаратов. - М.: ЦНИИТЭИпищепром, НТРС, 1982. -111 с.
22. Личко Н.М., Курдина В.Н. и др. - Технология переработки продукции растениеводства / под ред. Личко Н.М. - М.: Колос, 2000. -552 с.
23. Малин Н.И. - Технология хранения зерна. - М.: Колос, 2005. -280 с.
24. Мосолов В. В. - Протеолитические ферменты. - М.: Наука, 1971. - 412 с.
25. 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.
26. Области применения протеаз: URL: <http://biofile.ru/bio/17019.html>: дата обращения 07.09.2016
27. Озолин Р. К. - Получение и применение аминокислот. - Рига, 1970. - 17 с.
28. Протеолитические ферменты: URL: <http://www.drau.ru/article/248.html>: дата обращения 03.12.2016
29. Рид. Д. Ферменты в пищевой промышленности. - М.: Пищевая промышленность, 1971. - 342с.
30. Сиротин А.А. Практикум по микробиологии/ А.А. Сиротин.- Белгород, 2007. - 78 с.
31. Сиротин А.А., Глухарева Н.А., Оспищева Н.В., Бондаренко В.В., Резун А.П., Зенинская Н.А. - Процесс биосинтеза лизина штаммом *Corynebacterium Glutamicum* В-11167 на основе сред, содержащих гидролизат пшеничного глютена // Современные проблемы науки и образования. - 2012. - № 6.
32. Соколов А.Я. - Технологическое оборудование предприятий по хранению и переработке зерна. - М.: Хлебоиздат, 1958. - 436 с.
33. Соловьева С.Ю., Ладур Т.А. - Биоконверсия крахмала при производстве патоки заданного углеводного состава. -М.: Пищепромиздат, 2004. - 269 с.

34. Сулейменов М.К., и др. - Мастер-план развития производства зерна и его глубокой переработки. - Астана, 2009. - 433 с.
35. Тарабукин Д.В. - Ферментативные технологии направленной биоконверсии целлюлозо - и крахмалсодержащего растительного сырья: диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук. - Сыктывкар, 2009. - 112 с.
36. Тимощенко Л.В., Чубик М.В., Пестряков А.Н. - Основы микробиологии и биотехнологии: учебное пособие. - Томск: Изд-во Томского политехнического университета, 2012. - 188 с.
37. Трегубов Н.Н., Костенко В.Г. - Технохимический контроль крахмалопаточного производства. - М.: Агропромиздат, 1991. - 271 с.
38. Уайтхерст Р.Дж. - Ферменты в пищевой промышленности. - пер. с англ. д-ра хим. наук С.В. Макарова. - СПб.: Профессия, 2013. - 408 с.
39. 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.
40. Федорова Р.А. - Биохимические основы продуктов переработки зерна. - СПб.: Университет ИТМО, 2017. - 98 с.
41. Химический журнал - №12. - М.: ЗАО «ХимПресс», 2013. - 64 с.
42. Хосни Р. К. - Зерно и зернопродукты / пер. с англ. под общ. ред. к.т.н., проф. Черняева Н. П. - СПб.: Профессия, 2006. - 330 с.
43. Шапошников Г.П., Иванова Е.А. - Совершенные способы производства патоки и глюкозы из крахмала и крахмалосодержащего сырья. - М.: ЦИНТЭИПищепром, 1969. - 40 с.
44. Яровенко В.Л., Калунянц К.А., Голгер Л.И. - Производство ферментных препаратов из грибов и бактерий - М.: Пищевая промышленность, 1970. - 444 с.
45. Burkovski A. - Corynebacteria: Genomics and Molecular Biolog. - 2008. - 340 с.

46. 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.
47. 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.
48. 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.
49. Smekal P., Pelechova I., Kindlova E. et al. Biosynteza L-lysinu na bazi hydrolyzatu dneva a kyseliny octove u kmenu *Corynebacterium glutamicum*. I. Utilizace uhlikatych zdroju. *Krasny prum*, 1980, t. 26, N 3, s. 200-202.
50. 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