

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

ИНСТИТУТ ИНЖЕНЕРНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ И ЕСТЕСТВЕННЫХ НАУК

КАФЕДРА БИОТЕХНОЛОГИИ И МИКРОБИОЛОГИИ

**ВЛИЯНИЕ КАЧЕСТВА ПОСЕВНОГО МАТЕРИАЛА НА
ПРОЦЕСС БИОСИНТЕЗА L - ЛИЗИНА**

Выпускная квалификационная работа
обучающегося по направлению подготовки 19.03.01 Биотехнология
очной формы обучения, группы 07001316
Роганиной Виктории Юрьевны

Научный руководитель
проф., к.б.н. Сиротин А.А.

БЕЛГОРОД 2017

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение.....	3
Глава 1. Обзор литературы.....	5
1.1 История развития лизиновой промышленности.....	5
1.2 Методы получения аминокислот.....	6
1.3 Свойства лизина.....	9
1.4 Микроорганизмы - продуценты лизина.....	10
1.5 Биосинтез лизина в микробной клетке.....	11
1.6 Приготовление питательных сред и их стерилизация.....	14
1.7 Подготовка посевного материала.....	17
1.8 Ферментация.....	20
Глава 2. Объект и методы исследования.....	25
2.1 Объект исследования.....	25
2.2 Методы исследования.....	26
Глава 3. Результаты и их обсуждения.....	32
3.1 Анализ количественных показателей результатов эксперимента...	32
3.2 Оценка экономической эффективности.....	47
Заключение и выводы.....	49
Список используемой литературы.....	50

ВВЕДЕНИЕ

В последнее время в Российской Федерации, в том числе и в Белгородской области, идет бурное развитие животноводства (свиноводства, птицеводства), вследствие этого необходимо обеспечивать животных кормами, которые будут полноценными, то есть будут содержать все необходимые компоненты, в том числе весь набор незаменимых аминокислот. Одной из таких аминокислот является лизин. Это незаменимая аминокислота, которая не синтезируется в организме человека и животных, недостаток которой приводит к резкому снижению продуктивности животных, ухудшает качество продукции, нарушает баланс других аминокислот в синтезе белка. При недостатке лизина в рационе нарушается азотистый обмен.

Лизин применяют в качестве кормовой добавки. Это связано с низким его содержанием в растительных кормах и высокой потребностью в нем. Очищенный лизин используется как добавка в продукты питания человека, а также в препараты медицинского назначения. Использование лизина в качестве кормовой добавки позволяет увеличить привес животных и птицы на 10 – 30 %, повышает надой молока на 12 %, увеличивает яйценоскость кур на 10 %. [33]

Избранная нами тема актуальна не только для нашей работы, но и для производства ЗАО «Завод премиксов №1», так как предполагается сокращение производственного цикла биосинтеза лизина.

Цель исследования: изучить влияние процесса подготовки посевного материала для преферментера и попытаться сократить время на подготовку инокулята для ферментации.

Для достижения поставленной цели сформулированы следующие задачи:

- проанализировать данные литературы, всю доступную информацию по биосинтезу лизина, включая технологию подготовки инокулята для ферментации;

- изучить и модифицировать технологию подготовки инокулята путем сокращения времени на его выращивание;

- определить достоверность полученных результатов путем статической обработки цифровых данных с использованием критерия Стьюдента;

- оценить экономическую эффективность результатов эксперимента.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 История развития лизиновой промышленности

Лизин – диаминомонокарбоновая аминокислота, была выделена в 1889 г. из гидролизата казеина, и которая была синтезирована в 1902 году. До 50 – х годов лизин экстрагировали из овощных белков после химического гидролиза, но такой продукт был малопригоден для введения в корм животным.

К середине 50 – х годов в Японии было начато промышленное производство лизина. Наиболее дешевым и освоенным способом является микробиологический метод. Лизин можно получать и химическим методом - из капролактама, но этот способ получения очень сложный, дорогой и многостадийный, а также не эффективен. Из микроорганизмов лизин синтезируют некоторые виды бактерий, актиномицетов и других микроорганизмов. Но нормально растущая клетка синтезирует лизин только для своих собственных нужд.

Японские ученые С. Киносита, К. Накаяма и С Китада получили мутантные штаммы бактерий, которые способны к перепроизводству лизина, то есть они вырабатывают больше аминокислоты, чем нужно им самим для нормального функционирования. Максимальная ее концентрация достигала 20 г в 1 л культуральной жидкости. В настоящее время высокопродуктивные штаммы получают во многих лабораториях мира, где концентрация лизина в 1 л культуральной жидкости достигает от 60 г / л и до 180 г / л. [45]

Мутантные штаммы получают путем воздействия на нормальные клетки микроорганизмов ультрафиолетовым светом, быстрыми нейтронами или обрабатывают этиленмином, а затем возникшие мутантные штаммы (под действием этих агентов), селекционеры отбирают наиболее «работоспособные».

Перспективными штаммами являются те, у которых наблюдается высокая скорость синтеза лизина и относительно небольшое снижение максимальной скорости синтеза лизина в динамике.

В 70 – х годах было создано японо – французское производство, затем был запущен завод по производству лизина в Мексике. С 1980 года до 1990 производство лизина возросло с 35 килотонн до 160 килотонн в год.

Среди ведущих компаний по производству L – лизина являются японская Ajinomoto Co и американская Archer Daniels and Midlands, которые производят по 33 % каждая, являясь при этом основными поставщиками на мировом рынке. Другими крупными компаниями являются: Degussa – Huels, BASF (Германия), Kyowa Hokko (Япония), Cheil jedang Corporation (Южная Корея). [58]

В России кристаллический лизин был впервые получен в 1964 году на опытно – производственной установке института атомной энергии имени Курчатова. В конце 80 – х годов в СССР производством лизина занимались пять предприятий, которые в общей сложности выпускали 32 тыс. тонн продукта в год. С развалом Советского союза на территории РФ осталось только одно профильное производство – Шебекинский завод, выпускавший жидкую фракцию, в которой содержание чистого лизина достигало максимально 14%.

В настоящее время на территории России построен действующий завод по производству L – лизина, который находится в Белгородской области в Шебекинском районе – ЗАО «Завод Премиксов №1». На данный момент мощность завода составляет 57 тысяч тонн готового продукта в год. [59]

1.2 Методы получения аминокислот

Аминокислоты являются составными элементами белков. В природные белки входят 20 аминокислот, десять из которых незаменимы, то есть не могут синтезироваться в организме человека и животных. К незаменимым

аминокислотам относят: фенилаланин, изолейцин, лейцин, лизин, метионин, треонин, триптофан, валин, аргинин, гистидин. Недостаток хотя бы одной из них в пище человека и в кормах животных может привести к нарушению обмена веществ в организме, к замедлению его роста и развития.

На сегодняшний день известны четыре метода получения аминокислот:

1. Химический метод (тонкий органический синтез).
2. Химико – энзиматический метод (энзиматическая трансформация химически синтезированных предшественников аминокислот с образованием биологически активных L – изомеров). Метод достаточно дорогой.
3. Биологический метод (применение гидролиза белоксодержащих субстратов).
4. Прямой микробиологический синтез (биотехнологический метод) (получение L – аминокислот). Метод более дешевый, экономически выгодный. [13]

Наиболее распространенными методами получения аминокислот являются химико – энзиматический и микробиологический.

1. Химический метод.

Аминокислоты синтезируют подобно другим органическим кислотам. Но в процессе химического синтеза получается смесь D и L – стереоизомеров (рацематы). Биологически активны в основном L – формы, D – формы могут быть токсичны. Существуют некоторые трудности при разделении этих изомеров. Химическое производство аминокислот связано с использованием дорогостоящего оборудования и агрессивных токсических соединений в качестве исходного сырья. Процесс протекает при высоких температурах, с использованием дорогостоящих катализаторов, с образованием побочных продуктов.

При помощи химического синтеза получают такие аминокислоты как: глицин, D – и L – метионин, D – изомер которого малотоксичен. Рацемическую смесь метионина можно разделить при помощи биоконверсии

D – формы в L – форму под влиянием специальных ферментов живых клеток микроорганизмов.

2. Химиико – энзиматический метод.

Этот метод получения аминокислот состоит из двух этапов. Сначала химическим способом синтезируется «предшественник» - соответствующая карбоновая кислота, затем эта кислота превращается в соответствующую аминокислоту. Эта биоконверсия осуществляется ферментами живых клеток.

В качестве примеров использования химиико – энзиматического метода можно привести:

- Синтез аспаргиновой кислоты из фумаровой (используются клетки *Escherichia coli*).

- Синтез L – фенилаланина из коричной кислоты (используются клетки дрожжей).

Этим методом можно производить практически все аминокислоты, но из – за дороговизны и сложности получения органических кислот – предшественников этот метод не всегда экономически выгоден. [8]

3. Биологический метод.

Это самый древний способ получения аминокислот – кислотный, щелочной или ферментативный гидролиз белоксодержащих субстратов. При высокой температуре белок распадается на аминокислоты или фрагменты из несколько аминокислот. При этом образуется смесь пептидов и аминокислот, выделение которых сложная задача.

Этот метод применяют с использованием «бросового» сырья, то есть отходы производства таких как: рога, копыта, волосы, перья, пух, состоящие из кератина, в котором содержится много серосодержащей аминокислоты – цистеина и других аминокислот. [14]

4. Прямой микробиологический метод.

Метод основан на использовании биообъектов, то есть является биотехнологическим. В качестве биообъектов применяют промышленные штаммы - продуценты аминокислот.

В регуляции и управлении метаболическими процессами природных микроорганизмов используют ретроингибирование (принцип обратной связи). Эта регуляция осуществляется либо за счет ингибирования активности одного из начальных ферментов собственного синтеза избыточным продуктом, то есть самой аминокислотой, либо репрессируется весь комплекс ферментов всей биохимической цепочки метаболизма клетки, что является естественной реакцией живого микроорганизма – продуцента для сохранения собственного равновесия на клеточном уровне.

Основная задача биотехнолога состоит в том, чтобы нарушить эти механизмы и получить целевой продукт в необходимом количестве.

В качестве примера микробиологического синтеза можно привести получение таких аминокислот как: лизин (продуцент *Corynebacterium glutamicum*), треонина (*E.coli*). [5]

1.3 Свойства лизина

Лизин (Lysin) – 2,6 – диаминогексановая кислота с эмпирической формулой $C_6H_{14}N_2O_6$ (рис.1).

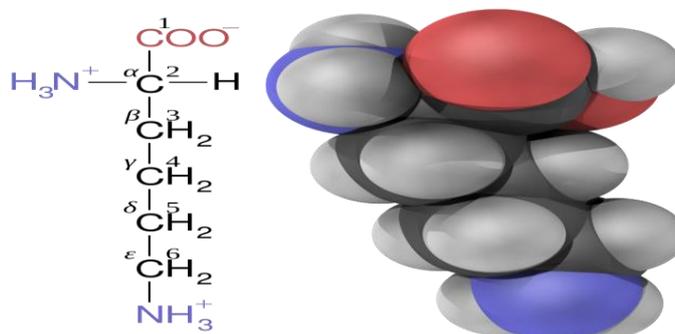


Рис.1. Молекулярная формула лизина [4]

Молярная масса лизина 146,19 г/моль. D и L – изомеры лизина образуют бесцветные кристаллы с одинаковой температурой плавления 224 °С. Лизин хорошо растворим в воде, в водных растворах кислот и щелочей,

не растворим в диэтиловом эфире. По химическим свойствам лизин – это аминокислота с сильными основными свойствами.

L – лизин входит в число десяти незаменимых аминокислот, является необходимым компонентом кормов для животных. Лизин применяют как кормовую добавку для восполнения дефицита этой аминокислоты в растительных белках.

Лизин выполняет множество важных функций:

1. Необходим для усвоения кальция.
2. Участвует в построении коллагена.
3. Оказывает противовирусное действие, особенно в отношении вирусов, вызывающих герпес и острые респираторные инфекции.
4. Снижает повышенный уровень триглицеридов в плазме крови, участвует в выработке антител, гормонов и ферментов.

Лизин принимает участие во всех процессах ассимиляции и роста, регуляции обмена белков, жиров и углеводов, участвует в окислительно – восстановительных процессах, активирует пере – и дезаминирование аминокислот, поддерживает баланс углерода в организме. [4]

1.4 Микроорганизмы - продуценты лизина

Микроорганизмы, образующие аминокислоты, не накапливают их в клетке, а постоянно секретируют в питательную среду, поэтому аминокислоты необходимо выделять из фильтрата культуральной жидкости. Выращивают микроорганизмы в стерильных условиях. Продуценты аминокислот являются ауксотрофными мутантами.

Микроорганизмы способны синтезировать лизин из различных источников углерода и азота. Лизин образуют бактерии, актиномицеты, сине – зеленые водоросли, цианобактерии, некоторые виды микроскопических грибов.

Промышленность располагает значительным количеством гомосеринзависимых мутантов, способных образовывать большие

количества внеклеточного лизина. Они относятся к родам *Brevibacterium*, *Micrococcus*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas*, *Aerobacter*. Основными видами этих бактерий являются *Brevibacterium flavum*, *Brevibacterium ammoniagenes*, *Micrococcus glutamicus*, *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium hoogii*, *Azotobacter suis* и другие. [6]

У нас в стране в качестве продуцента лизина используют ауксотрофные по гомосерину мутанты *Corynebacterium glutamicum* и *Brevibacterium flavum*.

Corynebacterium glutamicum, имеет следующие культурально – морфологические признаки:

- клетки палочковидные, с булавидными вздутиями, неподвижные, грамположительные, спор не образуют;

- через 2 – 4 суток роста при 30 °С на твердой агаризованной среде образуются колонии диаметром 2 – 4 мм, кремово – желтого цвета, поверхность гладкая, форма выпуклая, край ровный, структура тестообразная;

- при посеве штрихом через 2 – 4 суток рост умеренный, край гладких поверхность глянцевая.

1.5 Биосинтез лизина в микробной клетке

Биосинтез лизина у различных микроорганизмов протекает по – разному. Существуют два различных пути синтеза лизина. Один начинается с 2 – кетоглутаровой через 2 – аминокетопированную кислоту (рис. 2).

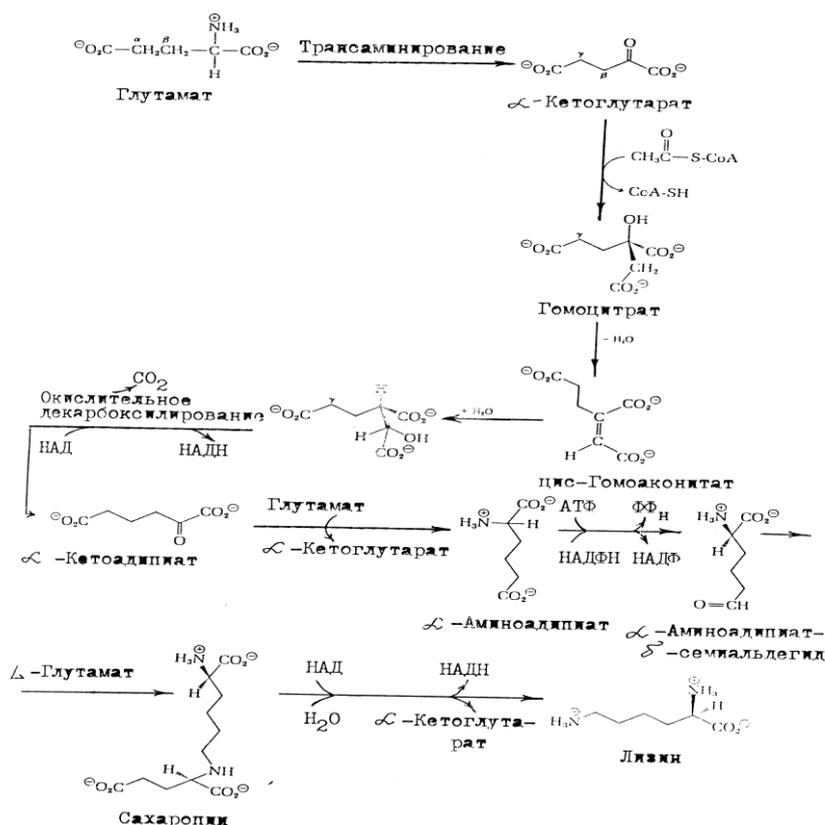


Рис.2. Аминоадипиновый путь биосинтеза лизина [16]

По этому пути лизин образуется в клетках дрожжей, грибов, актиномицетов и некоторых видов водорослей. Регуляция биосинтеза L – лизина по аминоадипиновому пути идет по первому ферменту, катализирующему превращение 2 – кетоглутаровой кислоты в гомолимонную, так как избыток лизина в среде тормозит образование последней. [16]

Второй путь начинается с аспаргиновой кислоты и проходит через 2,6 – диаминопимелиновую кислоту (рис. 3).

Системы регуляции биосинтеза лизина по диаминопимелиновому пути у различных бактерий неодинаковы. У *Corynebacterium glutamicum* и *Brevibacterium flavum* первый фермент диаминопимелинового пути β – аспартаткиназа не имеет системы изоферментов и не ингибируется ни одним из конечных продуктов. Ингибирование этого фермента наблюдается только при совместном действии двух конечных метаболитов: лизина и треонина. Это отличие и помогло получить ауксотрофные мутанты, у которых нет факторов, предотвращающих сверхсинтез L – лизина. [44]

1.6 Приготовление питательных сред и их стерилизация

При составлении технологии получения аминокислот в процессе культивирования продуцентов подбирают такие условия, при которых скорость синтеза аминокислоты клетками продуцента являлась бы высокой и сохранялась максимально долго, при этом образование побочных продуктов синтеза сводилось бы к минимуму.

Максимальная скорость биосинтеза достигается при создании оптимальных условий таких как: pH среды, степени аэрации, температуры, оптимальных концентраций источников углерода, азота, минеральных солей, а также ростовых факторов.

Для того, чтобы удовлетворить все требования продуцента (при биосинтезе лизина), питательная среда должна содержать следующие компоненты: глюкоза, соли: NH_4SO_4 , MnSO_4 , MgSO_4 , FeSO_4 , KH_2PO_4 , гидролизат пшеничного глютена (либо кукурузный экстракт, который получают путем обработки кукурузных жмыхов серной кислотой при температуре 90 – 100 °C), пеногаситель синтетический – это химический агент, который используют для подавления вспенивания культуральной жидкости (например «Лапрол», «Бреокс»), витамины (тиамин, биотин). [35]

Важное значение имеет соотношение углерода и азота в среде. Оптимальное соотношение специфично для каждого штамма, отклонение от него приводит к нарушению биосинтеза лизина. При увеличении азота

вместо лизина в среде начинает накапливаться аланин. Если в среде мало азота, снижается выход лизина. При низкой аэрации образуется молочная кислота.

Источниками азота могут быть аминокислоты, мочевины, соли аммония, аммиак. Многие продуценты обладают уреазной активностью и способны использовать мочевины в качестве источника аммонийного азота.

Также необходимым компонентом для биосинтеза лизина является фосфор, который вводится в среду в виде калиевых солей фосфорной кислоты, но его количество должно быть строго ограниченным (0,008 – 0,02 мг/л), десятикратное повышение его концентрации приводит для *Corynebacterium glutamicum* к снижению синтеза лизина практически наполовину.

Продуценты лизина испытывают потребность в ряде микро- и макроэлементов: магний, железо, медь, марганец. Магний и другие соли обычно вводят в виде соли серной кислоты. Железо, медь и марганец специально обычно не вносят, так как они содержатся в достаточных количествах в кукурузном экстракте, мелассе и других компонентах среды. [57]

Все продуценты лизина являются витамин зависимыми. Для успешного биосинтеза лизина в среду необходимо добавлять биотин и тиамин.

При недостатке биотина скорость биосинтеза лизина снижается в 20 – 30 раз, но одновременно резко повышается скорость биосинтеза глутаминовой кислоты. В культуральной жидкости ее накапливается до 20 – 30 г/л.

Высокая концентрация биотина в среде способствует образованию цитоплазматической мембраны, легко проницаемой для основных аминокислот и трудно проницаемой для кислых и нейтральных аминокислот. В результате создаются благоприятные условия для образования повышенного количества внеклеточного лизина за счет высокой концентрации внутриклеточной глутаминовой кислоты, которая является

необходимым поставщиком аминных групп при образовании аспарагиновой кислоты. [12]

При нехватке тиамин (витамин В₁) культура плохо растет и вместо L – лизина образуется основным L – аланин. Это происходит из – за того что, роль тиамин связана с его участием в качестве коэнзимной формы фермента декарбоксилазы в декарбоксилировании пировиноградной кислоты. При достаточном количестве тиамин синтез аланин исключается, а выход лизин увеличивается.

Источниками биотин и тиамин в промышленных питательных средах являются гидролизат пшеничного глютена, кукурузный экстракт, меласса, гидролизат соевого шрота.

При приготовлении питательной среды предварительно растворяют сахара и соли, суспендируют нерастворимые компоненты. Крахмалсодержащее сырье предварительно клейстеризуют. Эти процессы проводят в небольших реакторах с мешалками, затем их смешивают в смесителе – реакторе с плоским дном, снабженным барботажным устройством для ввода пара. Для окончательного растворения и суспендирования нагревают острым паром до 70 – 80 °С. При такой температуре не происходит разложение термолабильных компонентов среды. Питательная среда перед подачей в ферментер должна быть обеззаражена, при этом она должна сохранить свою биологическую полноценность. [40]

Методы стерилизации питательных сред: термический, химический, фильтрационный, радиационный. Термический способ стерилизации применяется наиболее часто в микробиологической промышленности.

Тепловая стерилизация может привести к химическим изменениям в составе питательной среды, например, к разложению нестойких к нагреванию соединений, что приводит к потере необходимых веществ для питания микроорганизмов, а также к образованию продуктов,

ингибирующий рост микроорганизмов. Такие изменения возникают при температурах выше, чем температура стерилизации.

Если в состав стерилизуемой среды входят термолабильные компоненты, то их стерилизацию следует проводить отдельно, а затем в асептических условиях добавлять к простерилизованной среде. Лабильность компонентов можно изменить за счет изменения pH стерилизуемой среды. Например, для глюкозы оптимальными значениями являются $\text{pH} = 3,0$, а для сахарозы – $\text{pH} = 8,0$.

Для обеспечения контроля стерилизации используют споры тест микроорганизмов *Bacillus stearothermophilus* штамма 1518. Если после проведения стерилизации из ампулы с тест-культурой высеивание дает отрицательный результат, считают, что произошло уничтожение всех микроорганизмов, контаминировавших среду. [17]

1.7 Подготовка посевного материала

Каждая производственная культура, которая используется в качестве продуцента целевого продукта, должна иметь свой паспорт, в котором указаны: ее название, род (вид), коллекционный номер, средний уровень активности, серия, дата выпуска, срок годности, характеристика для выращивания и хранения культуры.

Процесс подготовки посевного материала состоит из нескольких этапов.

На первых этапах исходную культуру выращивают на агаризованной среде в пробирке, при ее высевании можно пронаблюдать ее морфологию с целью изучения ее чистоты. Затем выращивание ведется в колбах в жидкой питательной среде на качалке (шейкере). Ее размножают в колбах в течение суток. На этой стадии включается процесс аэрации и перемешивание со средой при определенной температуре, как правило температура составляет $31 - 32\text{ }^{\circ}\text{C}$ при 250 оборотов. [43]

Далее исходную культуру, перемешанную с жидкой питательной средой, переливают в посевной аппарат (инокулятор, ферментатор), который оборудован барботерами и мешалками или пневмоциркуляционной системой, в количестве 10 – 25 % объема инокулятора.

При подготовке инокулята происходит ступенчатое увеличение биомассы. Поэтому могут использоваться один или несколько посевных аппаратов, возрастающие по объему (выращивание инокулята осуществляется до уровня 5 – 10 % от объема основного ферментера). У инокулятора есть устройство подачи и фильтрации воздуха. Этот ферментер, как и основной, снабжен технологическими окнами, датчиками, отбойниками и др.

В посевном аппарате питательная среда стабильна, в то время как в ферментере, по мере накопления целевого продукта концентрация углерода и азота падает, таким образом, с течением времени состав питательной среды меняется. Поэтому микроорганизмы начинают испытывать дефицит питания, и их ответом на такое воздействие является выработка, например, антибиотика. [15] Примеры состава питательных сред при выращивании продуцента лизина *Corynebacterium glutamicum* (Г), представлены в таблице 1 и 2.

Таблица 1

Меласная среда

Компоненты	Посевной аппарат	Промышленный ферментер
Меласса (по содержанию сахара)	7,5	7 – 12
Кукурузный экстракт (содержание сухих веществ 50 %)	2	1,2 – 1,5
Сульфат аммония	2	2
Однозамещенный фосфат калия	0,05	0,05
Двухзамещенный фосфат калия	0,05	0,05
Мел	1	1
Пенегаситель синтетический	0,1	0,1
Вода	Остальное	Остальное
pH среды	6,9 – 7,0	7,0 – 7,2

Таблица 2

Ацетатная среда

Компоненты	Посевной аппарат	Промышленный аппарат
Ацетат аммония	1,5	1,5
Глюкоза	1,0	1,0
Однозамещенный фосфат калия	0,02	0,02
Сульфат магния	0,04	0,04
Сульфат аммония	3,0	3,0
Гидролизат соевой муки	1,5	1,5
Вода	Остальное	Остальное
pH среды	6,9 – 7,0	7,0 – 7,2

Поддержание и подготовка чистой культуры является очень важной предферментационной стадией, так как продуцент и его физиолого-

биохимические характеристики, свойства определяют эффективность всего биотехнологического процесса. [54]

1.8 Ферментация

Культивирование является основной стадией технологического процесса и во многом определяет количественные и качественные характеристики производства в целом. На стадии ферментации происходит накопление как самой биомассы, так и продуктов жизнедеятельности (метаболизма) микроорганизмов. При биосинтезе конечный продукт может накапливаться как внутри клеток, так и выделяться в культуральную жидкость. Конечный продукт при биосинтезе лизина выделяется непосредственно в культуральную жидкость.

Важнейшими параметрами ферментации являются продолжительность культивирования и концентрация целевого продукта. Эти параметры с учетом потерь на последующих стадиях определяют в итоге съем готового продукта с единицы объема ферментера в единицу времени, то есть продуктивность аппарата. [23]

Ферментация происходит в строго асептических условиях, с соблюдением правил асептики. Асептика – это комплекс мероприятий, направленный на предотвращение микробного и другого загрязнения при получении стерильной продукции на всех этапах технологического процесса.

Создание асептических условий для крупного промышленного производства очень сложная задача, но которая решается двумя путями. Первый путь – это обеспечение технологической гигиены производства. Сюда относится комплекс мер, обеспечивающий снижение загрязненности посторонней микрофлорой производственной среды, а также препятствующий распространению производственного продуцента. Второй путь заключается в использовании специального технологического оборудования, такого как фильтры, стерилизаторы и другие. Целью которых является стерилизация, то есть полное освобождение от посторонней

микрофлоры всех видов материальных потоков, вводимых в ферментер, а также его внутренних полостей. Чтобы процесс культивирования проходил в асептических условиях, необходимо обеспечить стерилизуемость и герметичность аппаратов и трубопроводов, стерильность аэрирующего воздуха, питательной среды и пеногасителя и других добавок, вводимых в культиватор. [30]

Выращивание продуцента лизина осуществляется периодическим, глубинным способом в биохимических ферментерах (биореакторах). Биореакторы – это емкости, камеры, в которых происходит выращивание микроорганизмов в жидких и на твердых питательных средах. Ферментер изготавливают из высококачественной нержавеющей стали, для того чтобы, он не подвергался коррозии и не выделял в среду токсичные соли металлов. Основные элементы ферментера: двойные стенки, промежуток между которыми заполняется охлаждающей или нагревающей жидкостью, входные отверстия для газовых и жидких потоков, система контроля за составом питательной среды и условиями внутри реактора. Процесс, происходящий в ферментере, называется ферментацией. При периодическом способе культивирования биореактор заполняется исходной питательной средой и инокулятом микроорганизмов. В течение определенного промежутка времени в ферментёре происходит взаимодействие микроорганизмов с субстратом, в результате происходит образование продукта в культуре. [1]

Биохимические превращения в аппарате могут происходить от нескольких часов до нескольких суток. Регуляция условий внутри биореактора – важнейшая задача периодического культивирования. В ходе периодической ферментации выращиваемая культура проходит ряд последовательных стадий: лаг-фазу, экспоненциальную, замедления роста, стационарную. При этом происходят существенные изменения физиологического состояния биообъекта, а также ряда параметров среды. В экспоненциальной фазе как раз и происходит образование целевого продукта

– аминокислоты (лизина). Периодически ферментер опорожняют, производят выделение и очистку продукта, и начинается новый цикл. [10]

Ферментация – это совокупность последовательных операций по получению биологически активных и полезных веществ. В ее ходе происходит взаимодействие продуцента с субстратом и образование целевых продуктов (биомасс, эндо- и экзопродуктов). [21]

Необходимые условия культивирования при биосинтезе лизина.

Промышленными продуцентами лизина являются ауксотрофные штаммы (то есть способные к росту только в присутствии в питательных средах специфических ростовых веществ, преимущественно некоторых аминокислот, у которых способность к внутриклеточному синтезу была утрачена вследствие мутации) бактерий вида *Brevibacterium flavum* и *Corynebacterium glutamicum*. [38]

Для успешного хода ферментации необходимо поддерживать правильные условия культивирования, а именно, состав питательной среды, технологические параметры такие как: рН, парциальное давление, температуру, расход воздуха.

Важным фактором при культивировании является значение рН. Продуцентами лизина являются бактериальные штаммы оптимум рН которых лежит в области близкой к нейтральной или слабощелочной среде. Для всех известных продуцентов лизина величина рН, которая обеспечивает максимальное накопление лизина и рост культуры, находится в пределах от 6,85 до 7,2. [22]

Так как продуценты лизина являются аэробными микроорганизмами, то их рост и образование конечного продукта (лизина) в большой степени зависит от снабжения кислородом. Кислород, используемый бактериальными клетками, должен быть растворен в питательной среде. В связи с этим для лучшего растворения кислорода в среде осуществляют барботирование среды воздухом с одновременным ее перемешиванием. Количество растворенного в среде кислорода определяется системой и конструкцией

аэрирующих и перемешивающих устройств. Продуценты лизина, будучи аэробами, испытывают неодинаковую потребность в кислороде, но так как процесс биосинтеза лизина связан с высокой активностью дегидрогеназ цикла трикарбоновых кислот и с активностью ферментов глиоксилатного цикла, все они нуждаются в интенсивной аэрации. Недостаточная аэрация приводит к усилению образования аланина и молочной кислоты за счет снижения выхода лизина. Тем не менее, степень аэрации должна быть умеренной, поскольку слишком сильная аэрация приводит к усиленному росту культуры, а это также приводит к снижению выхода конечного продукта. Концентрация растворенного кислорода контролируется по парциальному давлению кислорода (pO_2). [28]

Парциальное давление (pO_2) – это давление отдельно взятого компонента газовой смеси, то есть концентрация растворенного кислорода (показатель дыхания клеток), контролирует дыхание клеток. Чем сильнее дыхание, тем меньше pO_2 . Парциальное давление поддерживается на постоянном уровне путем изменения скорости потока воздуха и скорости перемешивания.

Аэрация культуры в ферментере производится постоянным пропуском фильтрованного атмосферного воздуха через питательную среду. Проходя через ряд фильтров, воздух стерилизуется и поступает в среду через трубу, доходя до дна реактора. Скорость подачи кислорода должна быть равна скорости потребления, иначе наступает временный недостаток кислорода, что повреждает дышащие клетки. Для обеспечения максимального выхода лизина необходимо в момент критического снижения pO_2 (в период от 16 – 20 часов роста) подать в культуру такое количество воздуха, чтобы оно не падало ниже 20 – 30 % полного насыщения. [24]

L –лизин, производимый микробиологическим способом, может выпускаться в виде жидкого концентрата лизина (ЖКЛ) или кормового концентрата лизина (ККЛ).

Готовая культуральная жидкость (КЖ) перед концентрированием должна содержать минимальное количество редуцирующих сахаров, так как в процессе концентрирования они могут образовывать при участии ϵ -аминогрупп лизина соединения, не усвояемого животными, то есть происходит безвозвратная потеря целевого продукта. Остаточная концентрация сахара должна быть около 0,5 – 1,0 г/л. [20]

В зависимости от назначения из КЖ можно получить различные микробиологические препараты (рис.4): жидкий концентрат лизина (ЖКЛ), сухой кормовой концентрат лизина (ККЛ), кристаллический лизин. [34]

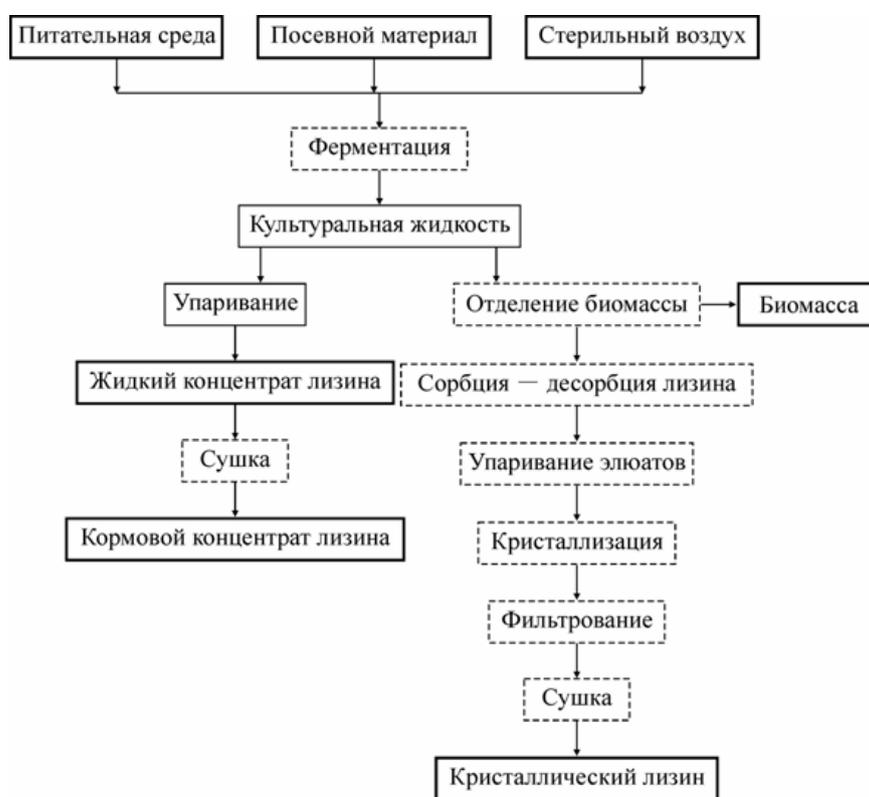


Рис. 4. Технологическая схема производства лизина [34]

Изучив литературные данные, можно сделать вывод о том, что информации о продуцентах лизина много, в то время как о технологии получения инокулята недостаточно. Поэтому мы и выбрали тему «Влияние качества посевного материала на процесс биосинтеза L - лизина» для того, чтобы изучить и модифицировать технологию подготовки инокулята, путем сокращения времени на его выращивание.

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объект исследования

В качестве объекта исследования использовали штамм *Corynebacterium glutamicum* В – 11167 и технологию подготовки инокулята для биосинтеза лизина.

Общая характеристика продуцента: штамм – продуцент на основании генетического анализа 16S – РНК определен как штамм *Corynebacterium glutamicum* В – 11167.

Культурально – морфологические характеристики: клетки неподвижные, палочковидной формы с булавидными вздутиями, по окраске по Грамму являются грамположительными, не спорообразующие. Через 2 – 4 суток роста, на твердой агаризованной среде, образуют колонии диаметром 2 – 4 мм, кремово – желтого цвета, поверхность гладкая, форма выпуклая, край ровный, структура тестообразная, однородная.

Физиолого – биохимические признаки: для данного штамма характерен аэробный тип дыхания. *Corynebacterium glutamicum* В – 11167 хорошо растет на мальтозе, глюкозе, сахарозе, маннозе, не растет на галактозе, лактозе, раффинозе. Азот усваивается в виде солей аммония и мочевины. Оптимальный температурный режим составляет 30 – 32 °С. Оптимальные значения рН составляет 6,8 – 7,2. Данная культура, *Corynebacterium glutamicum* В – 11167, является витамин зависимой, для нормального роста в среду необходимо добавлять биотин и тиамин. [48]

Посевная культура продуцента может быть приготовлена двумя способами: периодическим и непрерывным.

Периодический способ: исходную культуру продуцента с чашек Петри с агаром Хоттингера пересевают в пробирки с 2% мясопептонным агаром и выращивают в течение суток при температуре 29 – 30 °С. На основе этой культуры готовят на стерильной водопроводной воде суспензию плотностью 10⁸ клеток на 1 мл (ориентировочно 8-10 мл воды на одну пробирку).

Полученной суспензией засевают стерильную питательную среду в качалочных колбах. Посевные колбы выдерживают на качалках в течение суток при температуре 30 °С. При подготовке инокулята происходит ступенчатое увеличение биомассы. Поэтому могут использоваться один или несколько инокуляторов, возрастающих по объему. При периодическом способе получения посевной культуры независимо от количества стадий длительность выращивания продуцента на каждой стадии составляет 16 – 24 ч.

Непрерывный способ получения посевного материала. Обновление исходной культуры и первые этапы размножения культуры осуществляют в лабораторных условиях, но вместо качалочных колб выращивания культуры проводят на специальном лабораторном стенде в небольших аппаратах с автоматическим регулированием заданных параметров, что позволяет значительно увеличить количество получаемой культуры и сократить время выращивания производственной культуры за счет увеличения дозы посевного материала. Тем не менее, экономический коэффициент образования лизина не зависит от методики приготовления посевного материала. [7]

2.2. Методы исследования

1. Эксперимент «Влияние качества посевного материала на процесс биосинтеза лизина».

В ходе исследования мы применили три варианта опыта:

1) Контрольный вариант – выращивание инокулята в колбе в течение 18 часов (принятая в заводской технологии).

2) В первом опытном варианте мы сократили время подготовки инокулята на 9 часов роста, что составляет 50 % от контроля.

3) Во втором опытном варианте мы сократили время на 6 часов, что составило 33,33% к контролю.

Цель данного эксперимента состоит в том, чтобы попытаться сократить время получения посевного материала, без больших потерь в готовом продукте, то есть выходе лизина и оптической плотности культуры.

2. Методы приготовления препаратов (качественный анализ микрофлоры):

1) Метод раздавленной капли (для определения подвижности бактерий);

2) Фиксированный микропрепарат.

3. Метод разведений с посевом на твердую питательную среду для определения концентрации клеток *Corynebacterium glutamicum* (КОЕ/г);

4. Определение оптической плотности суспензии клеток;

5. Хроматографический анализ культуральной среды для определения количества лизина в пробе г/л;

6. Биохимические методы исследования (содержание глюкозы, рН среды, содержание сухих веществ, неорганический азот);

7. Статистическая обработка результатов разностным методом.

1. Эксперимент включает из несколько этапов:

1) Приготовление питательных сред.

2) Засев криокультурой посевных колб и получение посевного материала трех типов: на 9 часов, на 12 часов и на 18 часов роста.

3) Засев посевного материала на ферментационную среду.

Суть методики: полученный посевной материал засеваем на ферментационную среду в объеме ($V_{\text{фс}}$) по 10 мл, предварительно разлитую по колбам Эрленмейера (250 мл) в, и инокулируем посевным материалом в объеме ($V_{\text{пм}}$) по 1 мл. Ставим на шейкер на 72 часа при температуре 30 – 32 °С, 250 оборотов. По прошествии времени колбы снимают для химического (определения значения рН, содержание лизина г/л) и микробиологического контроля (производится высеивание на стерильность и определения количества, размеров клеток).

2. Метод микроскопирования.

Микроскопия – это совокупность методов наблюдения и исследования с помощью оптического микроскопа. Это основной метод изучения объектов. Самое главное в микроскопии это четко увидеть очертание микроорганизмов, что позволит правильно идентифицировать объект. [32]

С помощью метода микроскопирования мы определяли культуру на чистоту, то есть стерильность. Для наблюдения за подвижностью объекта использовали препараты, приготовленные из живых микроорганизмов (метод раздавленная капля). Далее изучали фазово – контрастным методом при увеличении X 800. Для изучения морфологии объекта использовали микроскопию окрашенных препаратов. В качестве красителя применяли раствор метиленовой сини. Препараты исследовали с иммерсионным объективом при увеличении X 1000.

3. Определение концентрации клеток методом серийных разведений.

Суть метода заключается в посеве определенного объема (предварительно разбавленного), исследуемых микроорганизмов, на поверхность твердой питательной среды, инкубации и подсчета выросших колоний. Учет количества микроорганизмов проводят по числу развивающихся колоний, предполагая, что одна микробная клетка дает начало одной колонии (рис.5). [18]

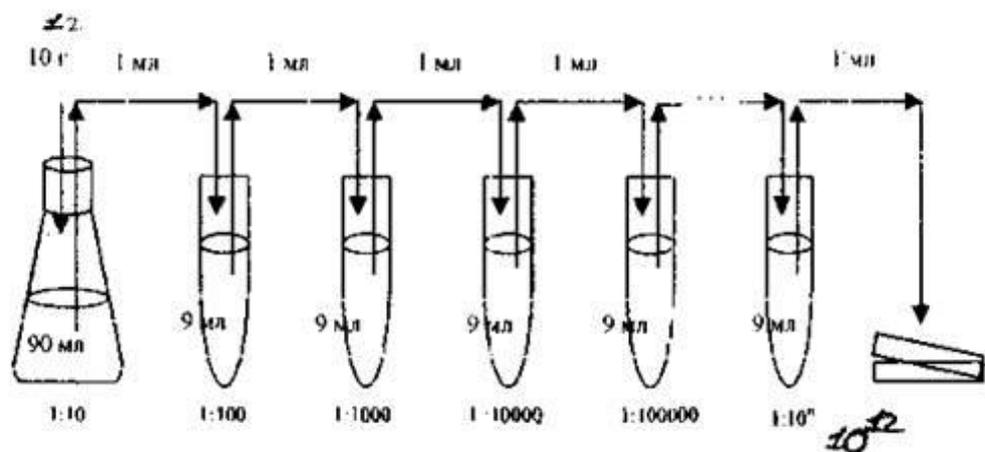


Рис. 5. Метод серийного разведения пробы [2]

4. Определение оптической плотности суспензии клеток.

Оптическая плотность – это мера непрозрачности вещества для световых лучей или мера пропускания света для прозрачных объектов и отражения непрозрачных.

Правила определения оптической плотности: в колбу дозатором вносим разбавленную гомогенную пробу, перемешиванием, наливаем в кювету и ставим в карусель матовой стороной кюветы на себя. Сделать измерение. Показания прибора должно находиться в пределах от 0,2 до 0,5. Рассчитать оптическую плотность по формуле: $ОД = С * К$ разведения.

5. Биохимические методы исследования (содержание глюкозы, рН среды, содержание сухих веществ, неорганический азот);

1) Определение общего (неорганического) азота – метод Кельдаля.

Метод основан на разложении неорганического вещества пробы при добавлении щелочи в присутствии приемного раствора борной кислоты с добавлением воды, путем парогенерации. Титрование выполняем вручную 0,1 н H_2SO_4 / после дистилляции.

2) Определение сухих веществ (СВ) при помощи рефрактометра автоматического цифрового RX – 5000 alpha

Рефрактометр – это оптический прибор для измерения концентрации растворов с помощью явления преломления света. Метод рефрактометрии основан на оптическом явлении преломления луча при прохождении его через границу раздела фаз: газ – жидкость.

Для того, чтобы измерить СВ необходимо выбрать соответствующую шкалу, нанести каплю пробы на призму рефрактометра, закрыть крышку и произвести измерение прибором.

3) Определение рН при помощи рН метра «Mettler Toledo»

Для измерения рН в пробе достать электрод из раствора KCL, промыть его дистиллированной водой, промокнуть фильтровальной бумагой и опустить непосредственно в пробу. Измерять рН.

4) Определение глюкозы на автоматическом анализаторе глюкозы «Энзискан Ультра».

Формула для обработки результата:

$$C = (C_m * 180 * n) / 1000, \text{ г/л}$$

где, n - разведение, C_m - результат на дисплее прибора, ммоль/ л.

Перед посевом производись анализы ферментационной среды, а затем делались анализы пробы после ферментации.

5. Хроматографический анализ культуральной среды для определения количества лизина в пробе г/л.

Хроматограф состоит из дегазатора, насоса, автосемплера, колонки и детектора.

Пробы разводят в воде, с добавлением внутреннего стандарта, далее фильтруется в виалу и помещается в ячейку автосемплера. Результатом анализа является хроматограмма, по площадям пиков рассчитывается количество аминокислоты.

Расчёт лизина в пробе:

$C(\text{лизина}) = S_{\text{лизина}} / S_{\text{орнитина}} * \text{разведение} * 0,1 * K_1 * K_2, \text{ г/кг}$, где K_1 и K_2 - контроль.

7. Метод вариационной статистики – разностный метод.

Биометрия или биологическая статистика – это область научного знания, охватывающая классификацию, систематизацию и обработку экспериментальных данных в биологии, медицине, сельском хозяйстве методами математической статистики.

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:

$$d = V_2 - V_1$$

3) Отклонения, между каждой разностью и средним значением рассчитывают:

$$d - \bar{d}$$

4) Ошибка разностей (S_d):

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

5) Критерий существенности Стьюдента фактический:

$$t = \frac{(x_2 - x_1)}{S_d}$$

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. [41]

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЯ

3.1 Анализ количественных показателей результатов эксперимента

После анализа доступной тематической литературы можно сделать вывод, что продуценты лизина являются мезофильными микроорганизмами, имеющие оптимум роста, развития и биосинтеза лизина при температуре 28 – 30 °С. Отклонение от этой температуры нежелательны. Повышение температуры на 5 – 7 °С от оптимальной приводит к быстрому автолизу культуры, и в среде накапливается значительно меньше лизина. Понижение температуры на 4 – 6 °С также не выгодно, так как культивирование затягивается на 12 – 20 часов, хотя выход лизина при этом не снижается. [27]

В ходе изучения технологии получения лизина были усвоены правила и техника приготовления питательных сред. Приготовление питательной среды осуществляется в специальном отделении цеха по производству лизина, оборудованном реакторами, дозаторами и теплообменным оборудованием. Для постановки эксперимента мы готовили питательные среды: агаризованная LB среда с биотином и глюкозой, питательная среда для посевных колб, ферментационная среда для контроля продуктивности клона. Их состав и методика приготовления представлены ниже.

Таблица 3

Питательная среда для посевных колб

Наименование компонента	Количество	Единицы измерения
Вода	50	мл
KH_2PO_4	0,1	г
K_2HPO_4	0,6	г
D – биотин 0,02% р – р	0,1	мл
50 % р – р ГПГ	10	мл
Глюкоза	2,6	мл
Вода до	12	мл
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,05 % раствор	10	мл
Тиамин 0,00025% раствор	5	мл

Взвешивают соли и растворяют в 50 мл воды при помощи магнитной мешалки (раствор №1). Затем добавляют D – биотин 0,02 % раствор в раствор №1. Отдельно берут 5 мл кислого ГПГ и доводят рН до 6,6, при помощи 25 % аммиачной воды, затем доводят дистиллированной водой до 10 мл, и добавляют в раствор №1. Общий объем доводят до 73 мл, также доводят рН до 7,8 25 % аммиачной воды. Стерилизуют при температуре 116 °С 30 минут.

Берут 2,6 г глюкозы, растворяют в 5 мл воды на магнитной мешалке с подогревом или на водяной бане, после полного растворения доводят водой до 12 мл.

Раствор магния и раствор глюкозы стерилизуют при температуре 116 °С 30 минут. После того, как все растворы простерилизованы и охлаждены, их соединяют стерильно в ламинарном боксе.

Таблица 4

Ферментационная среда для контроля продуктивности клона

Наименование компонентов	Количество	Единицы измерения
Вода	450	мл
KH_2PO_4	1	г
Аммоний хлористый	7,4	г
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	1	г
Кальций углекислого	12,5	г
ГПГ 50%	100	мл
D – биотин 0,02% р – р	0,5	мл
Глюкоза	110	г
Вода до	150	мл
Тиамин 0,005 % водный раствор	4	мл

Взвешивают соли и перемешивают в 450 мл воды при помощи магнитной мешалки до полного растворения (раствор №1). Затем в раствор №1 добавляют биотин. Отдельно берут 50 мл кислого ГПГ и доводят рН до 6,3, 25 % аммиачной воды, и доводят объем дистиллированной водой до 100 мл (добавляют в раствор №1). Общий объем доводят до 746 мл водой. Стерилизуют при температуре 116 °С.

Берут 110 г глюкозы, растворяют в 80 мл воды на магнитной мешалке с подогревом или на водяной бане, после полного растворения довести водой

до 150 мл. Стерилизуют при температуре 116 °С 30 минут. После того, как все растворы простерилизованы и охлаждены, их соединяют стерильно в ламинарном боксе.

Таблица 5

Агаризованная LB среда с биотином и глюкозой

Наименование компонента	Количество	Единицы измерения
Пептон	10	г
Дрожжевой экстракт	5	г
Хлорид натрия	10	г
D – биотин 0,02%	0,5	мл
Вода дистиллированная	700	мл

Взвешивают все компоненты и растворяют в 700 мл дистиллированной воды при помощи магнитной мешалки. Доводят общий объем до 990 мл дистиллированной водой. Доводят рН раствора до 7,1 40 % раствором гидроокиси натрия. Затем добавляют 15 г агар – агара и ставят на плитку для его растворения.

Отдельно растворяют 5 г глюкозы в 6 мл дистиллированной воды, после полного ее растворения общий объем доводят до 10 мл. Стерилизуют при 116 °С 30 минут. После того, как растворы простерилизованы и остыли, их соединяют стерильно в ламинарном боксе.

Питательная среда после охлаждения в теплообменнике до температуры 30 – 32 °С подается в стерильные ферментеры (биореактор). Биореакторы оснащены термостатирующим, аэрирующим, перемешивающим и регулирующим рН среды устройствами. Ферментер

представляет собой вертикальную емкость различной вместимости, например, малые от 1 до 10 л и многотонажные более 1000 л. [51]

После проведения ферментации в ферментере, образовавшийся готовый продукт необходимо отделить от среды, то есть его нужно выделить. При производстве лизина культуральную жидкость (ЖКЛ) предварительно стабилизируют 25 % раствором гидросульфита натрия, подкисляют соляной кислотой до pH 4,5 – 5,0. Образующийся при этом термостабильный монохлорид лизина упаривают в вакуумно – выпарных аппаратах до 40 % содержания сухих веществ. Готовый ЖКЛ не замерзает при температуре до – 18 °С и сохраняет свои свойства в течение 3 месяцев.

ККЛ (культурально кристаллический лизин) получают на основе ЖКЛ, высушивая жидкий концентрат в распылительных сушилках при температуре на более 90 °С до остаточной влажности 4 – 8 %. Сухой препарат лизина гигроскопичен и в процессе хранения подвержен порче. Для устранения этого недостатка в концентрат перед высушиванием вводят наполнители в виде костной муки, бентонита, пшеничных отрубей или негашеной извести. Высушивание полученной пасты проводят конвективным способом на ленточных сушилках. [37]

Получаемый кормовой лизин должен соответствовать всем предъявляемым требованиям к его качеству. Одним из стандартов является ГОСТ Р56913-2016. Настоящий стандарт распространяется на лизин, получаемый микробиологическим или химическим синтезом, применяемый при производстве продукции комбикормовой промышленности или для обогащения рационов животных в сельском хозяйстве. [26]

В качестве основного объекта нашего исследования выступает технология подготовки инокулята для биосинтеза лизина. Принятым в технологии получения посевного материала служит засев криокультуры посевных колб.

Криокультура – это продукт технологии заморозки в состоянии глубокого охлаждения организмов с целью сохранения всех физиологических свойств культуры и в дальнейшем возможности её разморозки и использования. Это приводит к ограничению или к прекращению клеточного обмена веществ, также это приводит клетки в состояние анабиоза. Для хранения биологического материала, например, для микроорганизмов, используют криопробирки.

Каждая культура имеет паспорт с описанием морфологии, характеристики среды для ее культивирования, физиологии, а также описание условий для ее хранения.

После разморозки культуры берется среда для посевных колб и разливается по колбам Эрленмейера (2000 мл) в объеме по 200 мл и засеивается одной криокультурой (объем пробирки 1,8 мл), которую предварительно размораживают при комнатной температуре. Все манипуляции производят стерильно в ламинарном боксе. Инкубируют на шейкере 18 часов (контроль), 12 и 9 часов (эксперимент) при температуре 30 – 32 °С, 250 оборотов мешалки.

По истечении инкубационного периода колбы снимают для химического (определения рН и оптической плотности) и микробиологического контроля (производится высев на стерильность и определение размеров клеток). Содержимое колб затем используют в качестве посевного материала для засева на ферментационную среду.

В результате нашего исследования мы получили три типа инокулята. Первый тип 18 часов – это время культивирования посевного материала по принятой на заводе методике. Этот период был взят за контроль. Затем мы изменили методику и сократили время подготовки инокулята на 33,33 % (12 часов роста) и на 50 % (9 часов роста). Наш выбор продиктован стремлением сократить время подготовки инокулята и полагался на кривую роста культуры *Corynebacterium glutamicum* В – 11167, которая была построена на

основе зависимости оптической плотности от времени культивирования (рис.6).

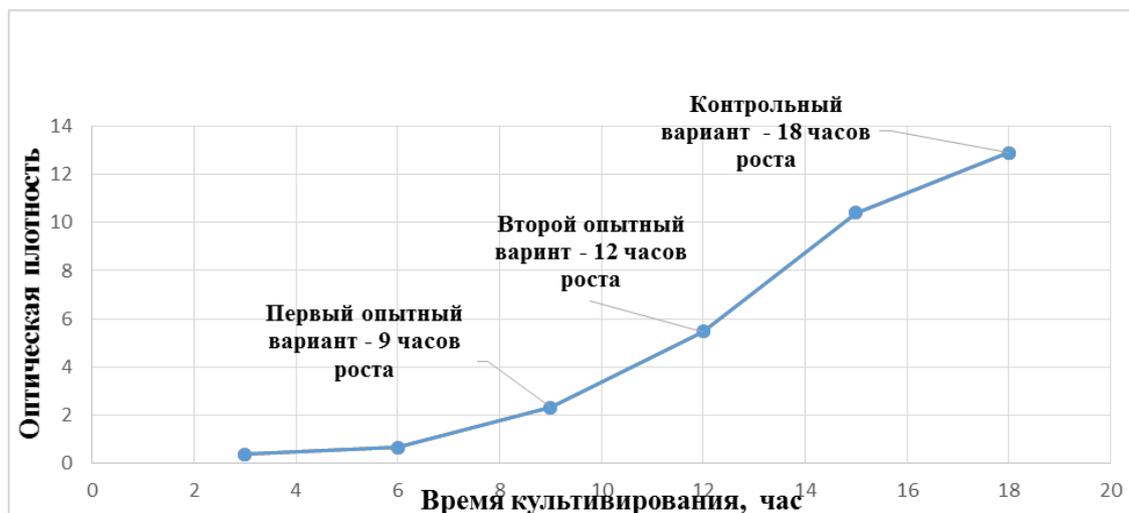


Рис.6. Кривая роста культуры *Corynebacterium glutamicum* В – 11167

Каждый период, выбранный нами для исследования, соответствует разным фазам цикла развития культуры, а именно 9 часов роста – это начало экспоненциальной фазы, 12 часов – это середина экспоненциальной фазы роста, 18 часов (контроль) соответствует концу экспоненциальной фазы. Полученные нами данные по посевному материалу, в зависимости от времени его получения, представлены в таблице 6.

Таблица 6

Данные по посевному материалу

Время выращивания инокулята	pH	Оптическая плотность (OD)
9 часов	6,76	2,31
12 часов	6,60	4,6
18 часов	5,30	12,9

Следующим этапом нашего эксперимента является засев полученного инокулята на ферментационную среду, но перед посевом производился анализ среды. Данные представлены в таблице 7.

Таблица 7

Качественные показатели пробы среды до ферментации

рН	Оптическая плотность (OD)	N ₂	Сухие вещества (СВ), %	Глюкоза
7,38	2,02	0,592	12,26	92,016

Ферментационную среду в объеме ($V_{фс}$) по 10 мл разливают по колбам Эрленмейера (250 мл) и инокулируют посевным материалом в объеме ($V_{пм}$) по 1 мл. Ставят колбы на шейкер – 72 часа при температуре 30 – 32 °С, 250 оборотов. По прошествии времени колбы снимают для химического (определение значения рН, содержание лизина г/л) и микробиологического (производится высев на стерильность и определения количества, размеров клеток) контроля.

Микроскопирование. Одним из способов микробиологического контроля является метод микроскопирования. В нашей работе мы использовали две техники приготовления препаратов:

1. Раздавленная капля.
2. Фиксированный препарат.

Метод раздавленной капли применяют для изучения живых объектов. Суть метода: на поверхность обезжиренного предметного стекла наносят каплю воды или физ. раствора, затем прокаленной в верхних слоях горелки микробиологической петлей, добавляют в нее небольшое количество бактерий и покрывают покровным стеклом. Излишки жидкости, выходящие за пределы покровного стекла, убирают фильтровальной бумагой. Приготовленные препараты изучаются фазово – контрастным методом. [31]

Фазово – контрастный метод микроскопирования – это метод получения изображений в оптических микроскопах, основанный на получении, с помощью специальных приспособлений, увеличенных

изображений, имеющих повышенную контрастность для наиболее сложных, прозрачных, бесцветных микрообъектов, различающихся лишь по показателю плотности (преломления) структур. Этот метод обеспечивает контрастность изучаемых неокрашенных объектов за счет кольцевой диафрагмы, которая находится в конденсоре, так называемая фазовая пластинка, которая находится в объективе. Данная конструкция микроскопа дает возможность преобразовать не воспринимаемые глазом фазовые изменения прошедшего через неокрашенный препарат света в изменение его амплитуды, то есть яркости получаемого изображения. [39]

По культурально – морфологическим характеристикам *Corynebacterium glutamicum* является неподвижной клеткой. В ходе изучения препарата подвижных клеток обнаружено не было, что свидетельствует о чистоте объекта. (рис.7)

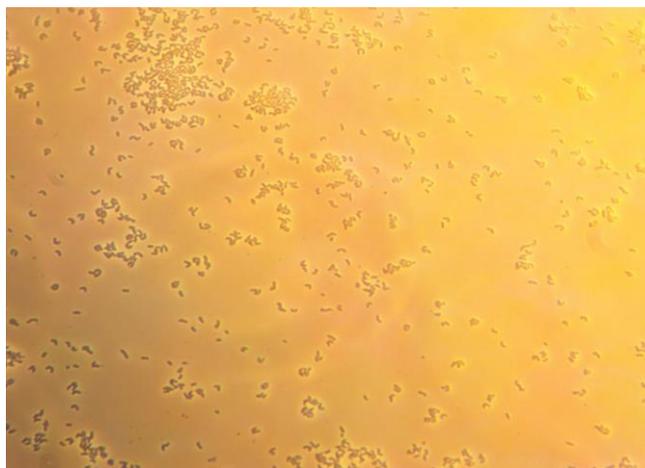


Рис.7. Препарат раздавленная капля (ув. X 800). Микрофотография

Методика приготовления фиксированного препарата.

Для приготовления фиксированного препарата необходимо выполнить следующие действия:

1. Приготовление мазка бактерий;

На обезжиренное предметное стекло наносят каплю воды или изотонического раствора хлорида натрия, в которую петлей вносят исследуемый материал и распределяют мазок таким образом, чтобы получился тонкий и равномерный мазок.

2. Высушивание;

Мазки высушивают на воздухе или в струе теплого воздуха над пламенем горелки.

3. Фиксация;

Для фиксации мазка предметное стекло несколько раз быстро проводят через пламя горелки. Цель фиксации в том, чтобы убить микроорганизмы, тем самым обеспечить лучшее прикрепление мазка к стеклу, сделать мазок более восприимчивым к краске.

4. Окраска;

Фиксированный мазок на 1 – 2 минуты покрывают раствором метиленового синего.

5. Промывка;

Избыток краски тщательно смывают струёй воды до полного обесцвечивания стекающих капель.

6. Высушивание;

После окраски препарат высушивают над пламенем горелки и рассматривают с иммерсионным объективом, для этого необходимо нанести каплю иммерсионного масла на фиксированный, окрашенный и хорошо высушенный препарат. [49]

Методику приготовления фиксированных препаратов мы применяли для изучения морфологии культуры. После просмотра мазка мы установили,

что в препарате присутствуют разной длины палочки. Просмотрев двадцать полей, мы посчитали примерное соотношение коротких и длинных палочек, что составляет 150 длинных и 300 коротких. (рис.8) Большое количество коротких клеток свидетельствует о начале образования лизина. [60]

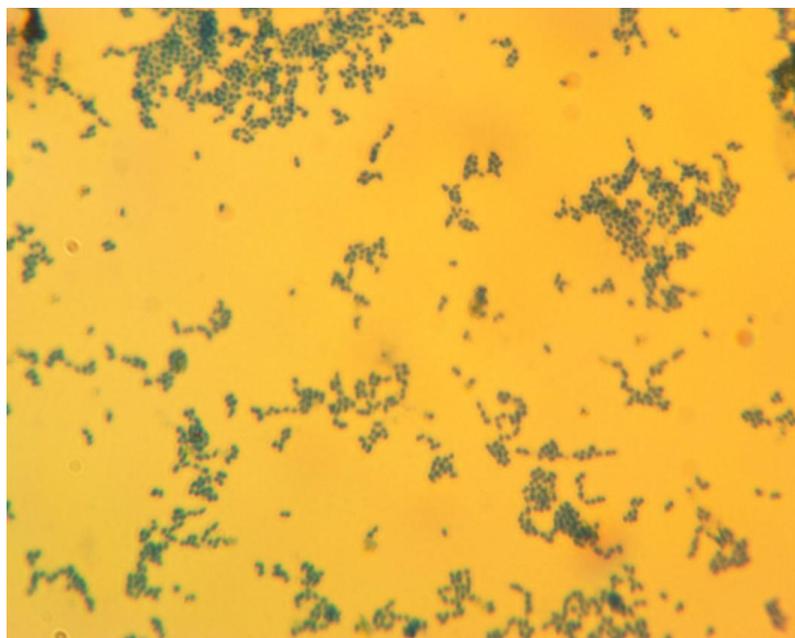


Рис.8. Фиксированный препарат (ув. X1000).Микрофотография

Засеяв инокулят на ферментационную среду и выдержав 72 часа, мы получили данные по влиянию качества посевного материала на процесс биосинтеза лизина, то есть его накопления в культуральной жидкости, представленные в таблице 8.

Таблица 8

Качественные показатели пробы после ферментации в колбе 72 часа

Варианты эксперимента	pH	Оптическая плотность (OD)	N ₂	Содержание сухих веществ (СВ), %	Глюкоза
9 часов	5,75	55,65	0,235	8,21	9,80
12 часов	6,06	68,1	0,224	9,5	4,32
18 часов	6,08	73,4	0,192	9,58	2,79

Значение рН в первом и третьем варианте находятся в пределах точности опыта, в то время как значение рН во втором варианте сильно отклоняется. При оценки оптической плотности видно, что ее значения сильно отличаются друг друга, то свидетельствует о различном содержании клеток в культуральной жидкости. Содержание азота обратно пропорционально количеству клеток, чем больше клеток, тем сильнее они нуждаются в азотном питании, следовательно, содержание азота в культуральной жидкости уменьшается от 9 часов роста до 18 часов роста. Содержание сухих веществ увеличивается с ростом количества клеток. Такая же зависимость наблюдается и с содержанием глюкозы.

Для обработки полученных результатов мы применили метод вариационной статистики – разностный метод. Разностный метод обработки используется для опытов, размещенных стандартными методами (например, парный метод Константинова). Этот метод размещения вариантов чаще всего используют в сортоизучении, а также в условиях сильного варьирования плодородия почв. При стандартном размещении контрольный и опытный варианты находятся в равных условиях независимо от повторения. Это повышает существенность различий между вариантами и точность опыта.

Таблица 9

Продукция лизина за 9 часов культивирования посевного материала
(г/л)

№	Контроль (18 часов роста)	9 часов роста	d	d – d	(d – d) ²	Sd(1-2)	T факт. (1-2)
1.	39,05	32,31	6,74	- 2,22	4,9284	0,540	16,17
2.	38,94	28,48	10,46	1,50	2,25		
3.	39,54	28,40	11,14	2,18	4,7524		
4.	37,88	28,67	9,21	0,25	0,0625		
5.	38,37	31,55	6,82	- 2,14	4,5796		
6.	40,10	29,87	10,23	1,27	1,6129		
7.	39,23	30,34	8,89	- 0,07	0,0049		
8.	37,65	32,20	7,45	- 1,51	2,2801		
9.	40,01	30,31	9,70	0,74	0,5476		
	X ₂ = 38,97	X ₁ = 30,24	d = 8,96	∑ = 0	∑ = 21,0184		

В данном случае, мы сократили время на 50 %, средний выход готового продукта сократился до 30,24 г/л, что составляет 24,34 % от контрольного варианта. Это большая разница между выходом лизина в опыте и в контроле, что нежелательно. Сокращая на 50% время при подготовке инокулята, мы теряем слишком много лизина после ферментации (рис.9).

В данном случае, мы сократили время на 50 %, средний выход готового продукта сократился до 30,24 г/л, что составляет 24,34 % от контрольного варианта. Это большая разница между выходом лизина в опыте и в контроле, что нежелательно. Сокращая на 50% время при подготовке инокулята, мы теряем слишком много лизина после ферментации (рис.9).

Критерий Стьюдента между средним арифметическим контролем (18 часов роста) и 9 часов роста (опытный вариант) составляет 16,17, что больше $t_{0,05} = 2,26$ и $t_{0,01} = 3,25$, следовательно, количество лизина больше за 18 часов роста, чем за 9 часов на обоих уровнях доверительной вероятности ($P_{0,05}$ и $P_{0,01}$).

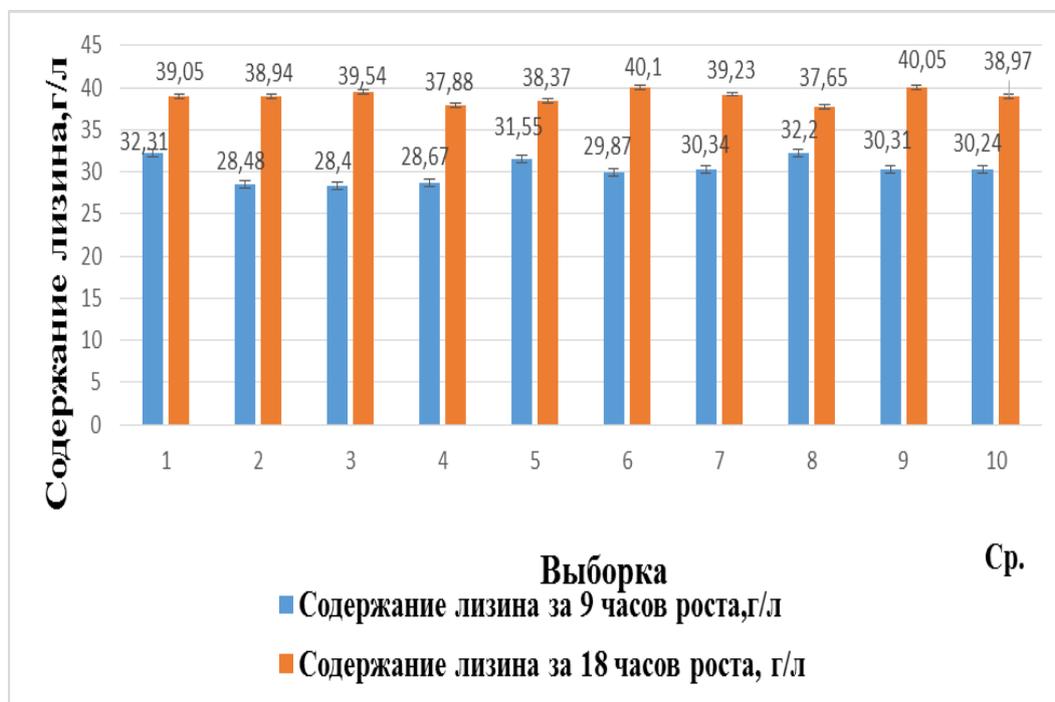


Рис.9. Динамика синтеза лизина за 9 часов культивирования, г/л

Следовательно, этот вариант подготовки посевного материала не соответствует заданной цели эксперимента, а именно попытаться сократить время получения инокулята, без больших потерь в готовом продукте.

Таблица 10

Продукция лизина за 12 часов культивирования посевного материала
(г/л)

№	Контроль (18 часов роста)	12 часов роста	d	d - d	(d - d) ²	Sd(1-2)	T факт. (1-2)
1.	39,05	36,87	2,18	- 0,08	0,0064	0,275	8,218
2.	38,94	36,78	2,16	-0,1	0,01		
3.	39,54	37,32	2,22	- 0,04	0,0016		
4.	37,88	36,91	0,97	- 1,29	1,6641		
5.	38,37	36,55	1,82	- 0,44	0,1936		
6.	40,10	36,23	3,87	1,61	2,5921		
7.	39,23	37,14	2,09	- 0,17	0,0289		
8.	37,65	35,77	1,88	- 0,38	0,1444		
9.	40,01	36,86	3,15	0,89	0,7921		
	$X_2 = 38,97$	$X_3 = 36,71$	$d = 2,26$	$\Sigma = 0$	$\Sigma = 5,4332$		

Из таблицы видно, что выход готового продукта (лизина) меньше за 12 часов роста, что составляет 36,71 г/л, чем за 18 часов роста 38,97 г/л в контрольном варианте. Это можно объяснить разным содержанием количества клеток в культуральной жидкости. Мы определили концентрацию клеток методом серийных разведений. Данные представлены в таблице 11.

Таблица 11

Концентрации клеток *Corynebacterium glutamicum* (КОЕ/г)

Повторности	Варианты опыта		
	18 часов	12 часов	9 часов
	10^{-7}	10^{-6}	10^{-6}
1	$9,4 * 10^9$	$8,8 * 10^8$	$4,5 * 10^8$
2	$9,6 * 10^9$	$8,5 * 10^8$	$4,0 * 10^8$
3	$8,8 * 10^9$	$9,9 * 10^8$	$4,8 * 10^8$
Среднее значение	$9,3 * 10^9$	$9,07 * 10^8$	$4,4 * 10^8$

Тем не менее, мы считаем, что, сокращая 33,33 % времени при подготовке инокулята, мы не несем больших потерь в готовом продукте, так как разница между экспериментом и контролем составляет всего 2,26 г/л или 5,8 %. Это соответствует цели эксперимента, а именно попытка сократить время получения инокулята увенчалась успехом, без больших потерь в готовом продукте. За этот выигранный промежуток времени можно произвести большее количество ферментаций, следовательно, произвести больше лизина.

Критерий Стьюдента между средним арифметическим в контроле (18 часов роста) и за 12 часов роста составляет 8,218. Сравнивая фактический критерий с теоретическим значением на двух уровнях доверительной вероятности ($P_{0,05}$ и $P_{0,01}$), можно сделать вывод, что выход готового продукта (лизина) меньше за 12 часов роста, чем за 18 часов роста в контрольном варианте. (рис.10).

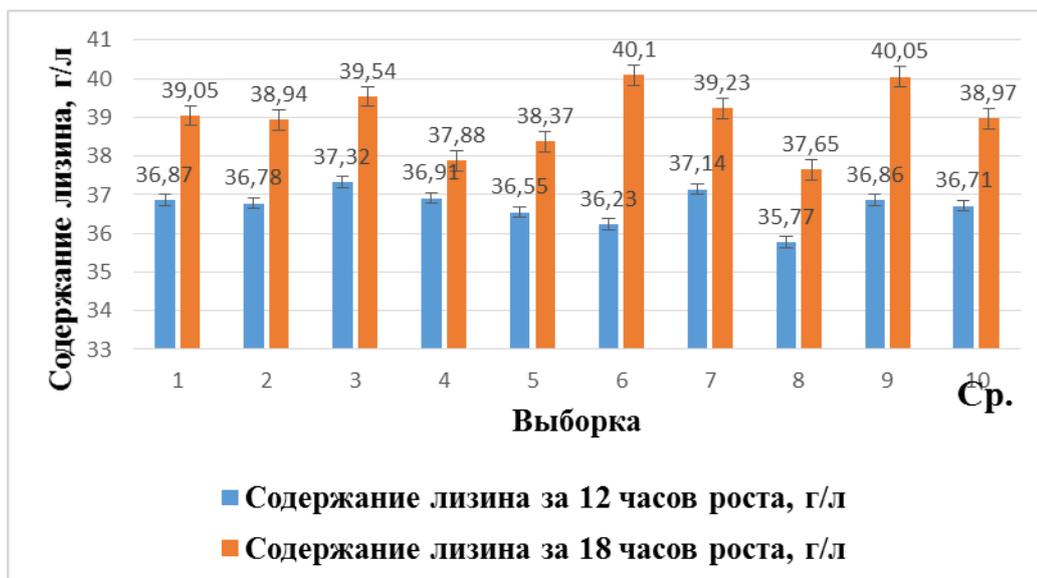


Рис.10. Динамика синтеза лизина за 12 часов культивирования г/л

3.2 Оценка экономической эффективности

Основываясь на полученных нами данных, мы составили приблизительную оценку экономической эффективности внедрения результатов эксперимента.

Сокращая 33,33% времени при подготовке инокулята без существенных потерь в выходе продукта, прежде всего, мы экономим на электроэнергии.

Если выращивать посевной материал (ПМ) 18 часов, то расход электроэнергии составит:

$1,12 \text{ кВт} (\text{потребляемая мощность шейкера}) * 18 \text{ часов роста} = 20,16 * 3,55$ (цена за 1 кВт) = 71,57 рублей – это затраты за одну ферментацию.

После ферментации с одной колбы за 18 часов роста выход готового продукта составляет:

Выход продукции = $12 \text{ мл} * 1,030 * 9,58 = 1,18 \text{ г}$ (Выход продукции = $V * \rho * \text{СВ}\%$, где V – объем среды, ρ – плотность КЖ, СВ % - содержание сухих веществ). Следовательно, затраты на производство 1 г лизина составят: $71,57 / 1,18 = 60,65$ рублей.

Если выращивать ПМ 12 часов, то электроэнергии расходуется:

$$1,12\text{кВт} * 12 \text{ часов роста} = 13,44 * 3,55 = 47,71 \text{ рублей}$$

$$\text{Выход продукции} = 12 \text{ мл} * 1,023 * 9,45 \% = 1,16 \text{ г}$$

Затраты на производство 1 г лизина в опытном варианте составили $47,71/1,16 = 41,13$ рублей

Экономия затрат на производство 1 г лизина составляет: $60,65 - 41,13 = 19,52$ рублей, что в условиях производства представляет определенный интерес.

Кроме того, благодаря сокращенному по времени циклу за 1 год можно произвести большее количество ферментаций, а именно:

$$\text{В году } 365 \text{ дней} * 24 \text{ часа} = 8760 \text{ часов, следовательно,}$$

$$\text{При принятой технологии } 8760 / (18 \text{ часов роста по } 72 \text{ часа на } 1 \text{ ферментацию}) = 97 \text{ ферментаций в год}$$

$$\text{В сокращенном варианте } 8760 / (12 \text{ часов роста по } 72 \text{ часа на } 1 \text{ ферментацию}) = 104 \text{ ферментации в год}$$

Из этого можно сделать вывод, что, сокращая время при подготовке инокулята на 33,33 %, предприятие может получить дополнительно 7 ферментаций в год.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

В ходе выполнения данной работы мы провели анализ отечественных и зарубежных источников литературы по изучаемой проблеме и определили основные аспекты технологии при подготовке инокулята *Corynebacterium glutamicum* штамм В – 11167 для биосинтеза лизина. Модифицировали технологию подготовки инокулята путем сокращения времени на его выращивание. Проанализировали влияние времени получения посевного материала на накопление лизина в культуральной жидкости.

Таким образом, мы определили, что наиболее эффективное накопление лизина происходит в колбах за 18 часов роста, то есть в контрольном варианте (принятая на заводе технология). Однако эффект достаточно высокий и в колбах за 12 часов роста, а именно при сокращении времени на 33,33 % выход продукта сокращается лишь на 5,8%.

В результате проведенных исследований, установлено, что культивирование бактерий *Corynebacterium glutamicum* В – 11167 в колбах на жидкой питательной среде и инокулятом, выросшим за 18 и 12 часов роста, дает близкие показатели по накоплению лизина в культуральной жидкости.

В результате эксперимента нами установлено, что при сокращении времени на 33,33 % от контроля потери по сравнению с контрольным вариантом составляют лишь 2,26 г, или 5,8 %. Следовательно, поставленная в работе задача успешно решена.

При сокращении же времени на 9 часов роста, то есть на 50 %, выход лизина значительно уменьшился и составил 24,34 % от контроля, что явно не представляется целесообразным.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аткинсон, Б. Биохимические реакторы / Б. Аткинсон. – Москва: Пищевая промышленность, 1979. – 280 с.
2. Асонов, Н. Р. Практикум по микробиологии / Н. Р. Асонов. – Москва: Агропромиздат, 1988. – 155 с.
3. Алмагамбетов, К. Х. Основы биотехнологии / К. Х. Алмагамбетов. – Астана: 2006. – 200 с.
4. Баева, А. А. Биотехнология / А. А. Баева. – Москва: 1984. – 145 с.
5. Безбородов, А. М. Биохимические основы микробиологического синтеза / А.М. Безбородов. – Москва: 1984. – С. 120 – 135.
6. Бекер, В. Ф. Лизин микробного синтеза / В.Ф. Бекер, М.Е. Бекер. – Рига: 1974. – С. 15 – 20.
7. Бекер, М. Е. Биотехнология / М.Е. Бекер, Г.К. Лиепиньш, Е.П. Райпулис. – Москва: ВО Агропромиздат, 1990. – 334 с.
8. Беликов, В.М. Аминокислоты, их химический синтез и применение / В.М. Беликов. – Москва: Вестн. АН СССР, 1973. – С. 115 – 123.
9. Бейли, Дж. Основы биохимической инженерии Т.1: учеб. пособие для студ. вузов / Дж. Бейли, Д. Оллис. – Москва: Мир, 1989. – С. 35 – 41.
10. Бирюков, В. Оптимизация периодических процессов микробиологического синтеза / В. Бирюков, В. М. Кантере. – Москва: Наука, 1985. – С. 30 – 36.
11. Блинов, Н.П. Основы биотехнологии: учеб. пособие для студ. вузов / Н. П. Блинов. – Санкт – Петербург: Наука, 1995. – С. 69 – 70.
12. Букин, В. Н. Микробиологический синтез витаминов / В. Н. Букин. – Москва: Мир, 1972. – С. 160 – 165.
13. Быков, В. А. Микробиологическое производство биологически активных веществ и препаратов / В. А. Быков, И. А. Крылов, М. Н. Манаков. – 6-е изд., доп. и перераб. – Москва: Высшая школа, 1987. – С. 50 – 56.

14. Быков, В. А. Производство белковых веществ / В. А. Быков, М. Н. Манакон, В. И. Панфилов, А. А. Свитцов, Н. В. Тарасова. – 5-е изд., доп. и перераб. – Москва: Высшая школа, 1987. – С. 85 – 96.
15. Быков, В. А. Расчет процессов микробиологических производств: учеб. пособие для студ. вузов / В. А. Быков, Ю. Ю. Винаров, В. В. Шерстобитников. – Киев: 1985. – С. 210 – 217.
16. Варфоломеев, С. Д. Биотехнология. Кинетические основы микробиологических процессов: учеб. пособие для студ. вузов / С. Д. Варфоломеев, С. В. Калюжный. – Москва: Высшая школа, 1990. – С. 205 – 215.
17. Васильев, Н. Н. Моделирование процессов микробиологического синтеза / Н. Н. Васильев, В. А. Амбросов, А. А. Складнев – Москва: Лесная промышленность, 1975. – 344 с.
18. Васильева, З. В. Лабораторные работы по микробиологии / З. В. Васильева, Т. А. Кириллова. – Москва: Просвещение, 1979. – 79 с.
19. Виестур, У.Э. Биотехнология. Биотехнологические агенты, технология, аппаратура: учеб. пособие для студ. вузов / У. Э. Виестур, И. А. Шмите, А. В. Жилевич. – Рига: Зинатне, 1987. – С. 51 – 57.
20. Волова, Т. Г. Биотехнология: учеб. пособие для студ. вузов / Т. Г. Волова. – Новосибирск: СО РАН, 1999. – С. 60 – 66.
21. Волова, Т. Г. Введение в биотехнологию / Т. Г. Волова. – Красноярск: ИПК СФУ, 2008. – С. 8 – 10.
22. Воробьева, Л. И. Промышленная микробиология / Л. И. Воробьева. – Москва: Высшая школа, 1989. – С. 50 – 58.
23. Гапонов, К. П. Процессы и аппараты микробиологических производств / К. П. Гапонов. – Москва: Легкая и пищевая промышленность, 1981. – С. 14 – 17.
24. Готшалк, Г. Метаболизм бактерий / Г. Готшалк. – Москва: Мир, 1982. – С. 30 – 35.

25. Гореликова, Г. А. Основы современной пищевой биотехнологии: учеб. пособие / Г. А. Гореликова. – Кемерово: Кемеровский технологический институт пищевой промышленности, 2004. – 100 с.
26. ГОСТ Р 56913 – 2016. Лизин кормовой. Общие технические условия: нац. стандарт Рос. Федерации / разработ. Открытым акционерным обществом «Всероссийский научно-исследовательский институт комбикормовой промышленности» (ОАО «ВНИИКП»). – Введ. 2016-13-04. – Офици. изд. – Москва: Стандартинформ, 2016. – 7 с.
27. Гриневич, А. Г. Техническая микробиология. / А. Г. Гриневич, А. М. Босенко. – Минск: Высшая школа, 1986. – 168 с.
28. Грачева, И. М. Технология микробных белковых препаратов, аминокислот и биоэнергия / И. М. Грачева, Л. А. Иванова, В. М. Контере. 2-е изд., доп. и перераб. – Москва: Колос, 1992. – С. 280 – 288, С. 274 – 276.
29. Егорова, Н. С. Промышленная микробиология / Н. С. Егорова. – Москва: Высшая школа, 1989. – 687 с.
30. Елинов, Н. П. Основы биотехнологии: учеб. пособие для студ. вузов / Н. П. Елинов. – Санкт – Петербург: Наука, 1995. – 127 с.
31. Ежов, Г. И. Руководство к практическим занятиям по микробиологии / Г. И. Ежов. – Москва: Высшая школа, 1981. – С. 5 – 10.
32. Емцев, В. Т. Микробиология / В. Т. Емцев, Е. Н. Мишустин. – Москва: Издательство Юрайт, 2014. – 445 с.
33. Жарипов, А. И. Пищевая биотехнология: научно-практические решения в АПК / А. И. Жарипов. – Москва: Вестник РАСХН, 2003 – 384 с.
34. Куц, П. С. Сушка микробиологических препаратов / П. С. Куц, Э. Г. Тутова. – Москва: ОНТИТЭИ микробиопром, 1975. – 78 с.
35. Лиепиныш, Г. К. Сырье и питательные субстраты для промышленной биотехнологии / Г. К. Лиепиныш, М. Э. Дунце. – Рига: 1986. – С. 128 – 135.

36. Манаков, М. Н. Теоретические основы технологии микробиологических производств / М. Н. Манаков, Д. Г. Победимский. – Москва: Агропромиздат, 1990. – 272 с.
37. Матвеев, В. Е. Научные основы микробиологической технологии / В. Е. Матвеев – Москва: Агропромиздат, 1985. – 224 с.
38. Методы селекции и свойства штаммов микроорганизмов-продуцентов аминокислот / Н. И. Жданова, М. М. Гусятинер // Обзорная информация. Сер. Селекция и генетика промышленных микроорганизмов. – 1980. – №11. С. 4 – 17.
39. Мерфи, Б. Основы световой микроскопии и электронной томографии / Б. Мерфи, Даглас. – США: 2001. – С. 97 – 100.
40. Мосин, О. В. Сырьевые ресурсы биотехнологии / О. В. Мосин. – Москва: Высшая школа, 2000. – 164 с.
41. Моисейченко, В. Ф. Основы научных исследований в агрономии. – Москва: Колос. 1996. – 297 – 298 с.
42. Муровцев, Г. С. Основы сельскохозяйственной биотехнологии: учеб. пособие для студ. вузов / Г. С. Муровцев, Р. Г. Бутенко, Т. Н. Тихоненко, М. И. Прокофьев – Москва: ВО Агропромиздат, 1990. – С.123 – 128.
43. Перт, С. Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток: учеб. пособие для студ. вузов / С. Дж. Перт. – Москва: Мир, 1978. – С.178 – 183.
44. Рубан, Е. А. Биосинтез аминокислот микроорганизмами / Е. А. Рубан. – Москва: Высшая школа, 1968. – С. 90 – 98.
45. Сассон, А. Биотехнология: свершения и надежды/ А. Сассон: пер. с англ. / под ред. Мехедова С. Л., Миркина С. М. – Москва: Мир, 1987. – С. 32 – 36.
46. Саруханов, А. В. Оборудование микробиологических производств: справочник / А. В. Саруханов, В. А. Быков. – Москва: Колос, 1993. – 384 с.

47. Седых, Н. В. Контроль качества биотехнологической продукции / Н. В. Седых. – Рига: Зинатна, 1990. – С. 151 – 158.

48. Сиротин, А. А. Процесс биосинтеза лизина штаммом *Corynebacterium Glutamicum B-11167* на основе сред, содержащих гидролизат пшеничного глютена [Электронный ресурс] / А. А. Сиротин, Н. А. Глухарева, Н. В. Оспищева // Современные проблемы науки и образования: электрон. науч. журн. – 2012. – № 6. . – Режим доступа: <http://www.science-education.ru/pdf/2014/4/555.pdf>.

49. Сиротин, А. А. Практикум по микробиологии / А. А. Сиротин. – Белгород: БелГУ, 2003. С. 6 – 9.

50. Строев, Е. А. Биологическая химия: учеб. пособие для студ. вузов / Е. А. Строев. – Москва: Высшая школа, 1986. – С. 24 – 31.

51. Стренк, Ф. Л. Перемешивание и аппараты с мешалками / Ф. Л. Стренк; под ред. И. А. Щупляка. – Ленинград: Химия, 1975. – 384 с.

52. Соколов, В. Н. Аппаратура микробиологической промышленности / В. Н. Соколов, М. А. Яблокова. – Ленинград: Машиностроение, 1988. – 287 с.

53. Стакишкис, Оптимизация управления биотехнологическими процессами / Сташкинс. – Вильнюс: Мокалос, 1984. – С. 123 – 125 с.

54. Федотова, Н. В. Приготовление питательных сред из отходов зерна для биосинтеза лизина / Н. В. Федотова, С. М. Любимова // Тезисы докладов «Научная конференция студентов и молодых ученых МГУИЭ». – Москва, 2008. – С. 33 – 34.

55. Хиггинс, И. Биотехнология: принципы и применение: учеб. пособие для студ. вузов / И. Хиггинс, Д. Бест, Дж. Джонс. – Москва: Мир, 1988. – 234 с.

56. Шевелуха, В. С. Сельскохозяйственная биотехнология: учеб. пособие для студ. вузов / В. С. Шевелуха, Е. А. Калашникова, Е. С. Воронин. – Москва: Высшая школа, 2008. – 469 с.

57. Яковлев, В. И. Технология микробного синтеза / В. И. Яковлев. – Ленинград: Химия, 1987. – 272 с.

58. Рынок лизина – перспективы инвестиций в новое производство. Аналитика. [Электронный ресурс]. – Москва, 2004. – Режим доступа: <http://www.abercade.ru/research/analysis/25.html>.

59. ЗАО «Завод премиксов № 1». Официальный сайт. [Электронный ресурс]. – Шебекино, 2016. – Режим доступа: <http://www.lysine31.ru>

60. Alcamo В. Fundamentals of Microbiology. с / о Science Editor. Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. Menlo Park, California. 1987. – 873 с.