

Учреждение образования
«БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

И. Н. Кузнецов

**ТЕХНОЛОГИЯ МИКРОБНОГО
СИНТЕЗА АНТИБИОТИКОВ,
ВИТАМИНОВ И ФЕРМЕНТОВ**
Лабораторный практикум

Рекомендовано
учебно-методическим объединением
по химико-технологическому образованию
в качестве учебно-методического пособия
для студентов учреждений высшего образования
по специальности 1–48 02 02
«Технология лекарственных препаратов»
специализации 1–48 02 02 02 «Промышленная
технология лекарственных препаратов»

Минск 2018

УДК 663.18(076.5)
ББК 30.16я73
К89

Р е ц е н з е н т ы :

кафедра фармацевтической технологии
УО «Белорусский государственный медицинский
университет» (кандидат фармацевтических наук,
доцент, заведующий кафедрой *Н. С. Голяк*);
заведующий отделом технологии лекарственных
средств ГП «НПЦ ЛОТИОС» кандидат
биологических наук *К. М. Белявский*

Все права на данное издание защищены. Воспроизведение всей книги или ее части не может быть осуществлено без разрешения учреждения образования «Белорусский государственный технологический университет».

Кузнецов, И. Н.

К89 Технология микробного синтеза антибиотиков, витаминов и ферментов. Лабораторный практикум : учеб.-метод. пособие для студентов специальности 1–48 02 02 «Технология лекарственных препаратов» специализации 1–48 02 02 01 «Промышленная технология лекарственных препаратов» / И. Н. Кузнецов. – Минск : БГТУ, 2018. – 88 с.
ISBN 978-985-530-668-0.

Учебно-методическое пособие включает теоретический материал и лабораторные работы по технологии производства белка одноклеточных, аминокислот, ферментов, витаминов, органических кислот, нуклеиновых кислот, антибиотиков, кровезаменителей.

В теоретической части каждого раздела представлены сведения о применении продукта, современном состоянии и способах его производства.

Лабораторные работы построены на моделировании процессов микробиологического синтеза и получения целевого продукта и включают химические, биохимические и микробиологические методы контроля производства.

УДК 663.18(076.5)

ББК 30.16я73

ISBN 978-985-530-668-0

© УО «Белорусский государственный технологический университет», 2018
© Кузнецов И. Н., 2018

ПРЕДИСЛОВИЕ

Технология микробного синтеза предполагает формирование знаний, необходимых для производственной, проектной и научно-исследовательской деятельности в области промышленной технологии микробиологических производств. В рамках данной дисциплины изучаются объекты микробиологических производств, технологические процессы, являющиеся обязательными составными частями современного производства продуктов микробного синтеза в условиях асептики, теоретические основы и промышленные способы производства важнейших продуктов микробного синтеза, области использования микробиологической продукции и требования стандарта к ее качеству.

В последнее десятилетие происходят существенные изменения в области микробных биотехнологий. Традиционная биотехнология, связанная с крупнотоннажным производством микробных масс, все в большей степени уступает место биотехнологическим процессам, базирующимся на применении генетически измененных клеток различного происхождения. Одним из направлений биотехнологии является производство сырья, субстанций и полупродуктов для фармацевтической промышленности.

Настоящий лабораторный практикум составлен в соответствии с учебными планами подготовки студентов специальности «Технология лекарственных препаратов» и предназначен для обучения студентов по ведущей специальной дисциплине «Технология микробного синтеза антибиотиков, витаминов и ферментов».

Цель данного издания – овладение основными практическими навыками управления процессами микробного синтеза, выделения и очистки продуктов, а также методами химического, биохимического и микробиологического контроля биотехнологических процессов. В лабораторных работах используются методы спектрофотометрии, ионообменной, гель-хроматографии, флуориметрии и другие физико-химические методы исследований.

В лабораторном практикуме представлен теоретический материал и лабораторные работы по важнейшим микробиологическим производствам фармацевтических продуктов и новым для отечественной практики биотехнологическим направлениям.

В каждой лабораторной работе указаны цель, реактивы, материалы и оборудование, приведен порядок ее выполнения.

ПРАВИЛА ТЕХНИКИ БЕЗОПАСНОСТИ

При работе в химической лаборатории студенты должны знать и выполнять все правила по технике безопасности, соблюдать чистоту, быть внимательными и точно проводить опыты.

Студенты получают допуск к лабораторным работам после прохождения инструктажа и обучения правилам техники безопасности, в том числе и пожарной безопасности, которые проводит преподаватель, ведущий занятия.

Приступая к работе, необходимо: осознать методику работы, правила ее безопасного выполнения; проверить соответствие взятых веществ тем веществам, которые указаны в методике работы.

Опыт следует проводить в точном соответствии с его описанием в методических указаниях, особенно придерживаться очередности добавления реактивов.

Для выполнения опыта надо пользоваться только чистой, сухой лабораторной посудой; для отмеривания каждого реактива нужно иметь мерную посуду (пипетки, бюретки, мензурку, мерный цилиндр или мерный стакан); не следует выливать избыток налитого в пробирку реактива обратно в емкость, чтобы не испортить реактив.

Если в ходе опыта требуется нагревание реакционной смеси, надо следовать предусмотренным методическим указаниям способа нагрева: на водяной бане, на электроплитке или на газовой горелке и др. Сильно летучие горючие вещества опасно нагревать на открытом огне.

Пролитые на пол и стол химические вещества обезвреживают и убирают под руководством лаборанта (преподавателя) в соответствии с правилами.

При работе в лаборатории необходимо соблюдать следующие требования: выполнять работу нужно аккуратно, добросовестно, внимательно, экономно, быть наблюдательным, рационально и правильно использовать отведенное на нее время.

По окончании работы следует привести в порядок свое рабочее место: вымыть посуду, протереть поверхность рабочего лабораторного стола, закрыть водопроводные краны, выключить электрические приборы.

Правила техники безопасности в лаборатории при работе с кислотами и щелочами. Кислоты и щелочи в большинстве относятся к веществам повышенного класса опасности и способны вызвать химические ожоги и отравления. Поэтому необходимо внимательно следить за тем, чтобы реактивы не попадали на лицо, руки и одежду.

Нельзя ходить по лаборатории с концентрированными кислотами и щелочами, а наливать их следует только в отведенном для этого месте.

Разливать концентрированную азотную, серную и соляную кислоты следует только при включенной вентиляции в вытяжном шкафу.

Запрещается набирать кислоты и щелочи в пипетку ртом. Для этого нужно применять резиновую грушу и прочее оборудование для отбора проб.

Серную, азотную и другие кислоты для приготовления их растворов необходимо приливать к воде тонкой струей при непрерывном перемешивании, а не наоборот. Наливать воду в кислоту запрещается!

Растворять твердые щелочи следует путем медленного добавления их небольшими кусочками в воду при непрерывном перемешивании. Кусочки щелочи нужно брать только щипцами.

При смешивании веществ, которое сопровождается выделением тепла, необходимо пользоваться термостойкой толстостенной стеклянной или фарфоровой посудой.

Разлитые кислоты или щелочи нужно немедленно засыпать песком, нейтрализовать и только после этого проводить уборку.

При попадании на кожу или одежду кислоты или щелочи, надо смыть ее большим количеством воды.

Правила техники безопасности в лаборатории с химической посудой. Основным травмирующим фактором, который связан с использованием стеклянной посуды, аппаратов и приборов, являются острые осколки стекла, способные вызвать порезы тела работающего, а также ожоги рук при неосторожном обращении с нагретыми до высокой температуры частями стеклянной посуды.

Размешивать реакционную смесь в сосуде стеклянной палочкой или шпателем надо осторожно, не допуская разлома сосуда. Держать сосуд при этом необходимо за его горловину.

Сосуды с горячей жидкостью при их переносе нужно держать двумя руками: одной – за дно, другой – за горловину, используя при этом полотенце (чтобы избежать ожогов кистей и пальцев рук).

Толстостенную посуду при закрывании ее пробкой следует держать за верхнюю часть горловины. Нагретый сосуд нельзя закрывать притертой пробкой, пока он не охладится.

В опытах с нагревом необходимо пользоваться посудой, которая имеет соответствующую маркировку.

В случае пореза стеклом нужно сначала внимательно осмотреть рану и извлечь из нее осколки стекла, если они есть, а затем обмыть раненое место 2%-ным раствором перманганата калия, смазать йодом и завязать бинтом или заклеить лейкопластырем.

Правила техники безопасности в лаборатории при работе с реактивами. Если к работе не дано указаний относительно дозировки реактивов, то брать их для проведения опытов необходимо в возможно меньшем количестве (экономия материалов и времени, которые затрачиваются на опыт).

Избыток реактива нельзя высыпать и выливать обратно в сосуд, из которого он был взят.

После расходования реактива банку или стакан необходимо сразу закрыть пробкой и поставить на место.

Сухие реактивы следует брать с помощью лопаток, пластмассовых или металлических шпателей. Шпатель должен быть всегда сухим и чистым. После использования следует его тщательно обтереть.

Когда реактив отбирается пипеткой, ни в коем случае нельзя той же пипеткой, не вымыв ее, брать реактив из другой емкости.

Чтобы предотвратить попадание брызг на лицо или одежду, при наливании реактивов нельзя наклоняться над сосудом.

Нельзя держать банку или стакан с реактивом, которые нужно открыть, на весу, их необходимо поставить на лабораторный стол и только после этого открывать.

I. БЕЛОК ОДНОКЛЕТОЧНЫХ

Мировой дефицит белка оценивается в 15–30 млн. т. Белковый дефицит может быть устранен интенсификацией сельскохозяйственного производства, использованием ресурсов Мирового океана, органическим или микробиологическим синтезом белков.

Микробный синтез белка имеет ряд преимуществ: высокую скорость роста микробных клеток по сравнению с растительными и животными, мягкие условия процесса биосинтеза (температура 30...45°C, рН 4–6, атмосферное давление), возможность применения дешевого сырья в виде отходов производств, независимость накопления биомассы от климатических условий.

В кормопроизводстве широко используется белок сои. Большая часть территории Республики Беларусь малопригодна для эффективного возделывания этой культуры, что и предопределило быстрое развитие крупнотоннажной отрасли по получению микробного белка. Повышение цен на энергоносители до уровня мировых привело к резкому снижению рентабельности и сокращению производства микробного белка.

Из-за высоких энергетических затрат на производство сухой биомассы микробный белок не может конкурировать с более дешевым белком сои. Однако все развитые страны располагают отработанными на промышленных установках технологическими процессами производства микробного белка из различных видов сырья.

Качество белоксодержащего продукта оценивается прежде всего по содержанию истинного белка и по его аминокислотному составу. Микробная биомасса содержит 42–50% истинного белка от сухой массы и превосходит по этому показателю соевую муку (37%), не уступая по содержанию незаменимых аминокислот. Повышает пищевую ценность микробной биомассы высокое содержание витаминов группы В.

Питательная среда для культивирования продуцентов белка одноклеточных должна содержать источник углерода (субстрат), азот, фосфор, калий в доступной для микробных клеток форме и микроэлементы (Fe, Mg, Mn, Zn). В промышленных условиях применяют разнообразные субстраты: углеводы различного происхождения (в составе гидролизатов растительного сырья, сульфитных щелоков, свеклосахарной мелассы), спирты (этанол, метанол), а также жидкие

отходы пищевой промышленности (молочную сыворотку, после-спиртовую барду, картофельный сок и др.).

Типовая технологическая схема производства сухой микробной массы включает следующие операции: приготовление питательной среды, получение посевного материала, производственная ферментация, сгущение микробной суспензии в центробежных машинах, термообработка суспензии с целью получения легкоусвояемого плазмолизата, концентрирование биомассы упариванием под разрежением, сушка концентрата с получением порошкообразного или гранулированного продукта, фасовка и упаковка товарного продукта.

В качестве продуцентов кормового белка широко используют дрожжи (точнее, дрожжеподобные грибы), реже применяют бактерии и очень редко – мицелиальные грибы. Предпочтение отдают дрожжевым культурам, как наиболее изученным и не требующим, в отличие от бактерий, асептических условий культивирования. Важнейшими характеристиками культур – продуцентов белка – являются: выход биомассы от ассимилированного субстрата (экономический коэффициент), удельная скорость роста популяции, содержание белка в биомассе и продуктивность культуры по абсолютно сухой биомассе (АСБ), г АСБ/(л·ч).

Для промышленных продуцентов белка выход биомассы на различных субстратах колеблется в пределах 33–100% и определяется главным образом физиологическими особенностями штамма, долей углерода в молекуле субстрата и доброкачественностью питательной среды. Чем больше доля углерода в молекуле субстрата, тем выше ожидаемый выход биомассы.

Важно учитывать факторы, влияющие на эффективность ферментационного процесса, знание которых позволяет квалифицированно управлять синтезом микробной массы. В мировой практике чаще всего применяется отход производства сахара – меласса.

Лабораторная работа № 1

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ПРОДУЦЕНТОВ БЕЛКА

Цель работы: приобретение практических навыков по выращиванию дрожжей-продуцентов белка на различных источниках углерода, освоение методов контроля ферментационного процесса и сравнительный анализ качества полученной биомассы.

Реактивы, материалы и оборудование: меласса, гидроксид кальция, дигидрофосфат калия, гидрофосфат калия, сульфаты аммония, магния, железа, цинка, марганца, аммиачная вода, пеногаситель (олеиновая кислота или др.); мембранные фильтры, качалочные колбы вместимостью 250 мл, рН-метр, лабораторный ферментатор, фотоэлектроколориметр, центрифуга, микроскоп.

Порядок выполнения работы

1. Приготовление посевного материала на агаризованной среде. 2. Приготовление питательных сред. 3. Получение посевного материала в качалочных колбах. 4. Выращивание дрожжей на ферментационной установке. 5. Построение кривой роста культуры, расчет удельной скорости роста. 6. Оценка физиологического состояния культуры. 7. Определение концентрации биомассы дрожжей в культуральной жидкости. 8. Выделение биомассы из культуральной жидкости. 9. Определение содержания белка в биомассе дрожжей.

1. Приготовление посевного материала на агаризованной среде

В качестве продуцентов белка на мелассе и сахарозе используют дрожжи *Candida scottii*, *Hansenula anomala*, *Trichosporon cutaneum*, *Saccharomyces cerevisiae*; на этаноле – *Candida utilis*, *Hansenula anomala*. Применяют один из видов по указанию преподавателя.

Скошенную агаризованную среду в пробирках (сусло-агар) засевают густым штрихом, соблюдая правила асептики, и инкубируют в термостате при температуре 32...34°C в течение 48 ч.

Сусло-агар (СА) готовят следующим образом. Солодовое сусло разбавляют водой до 6–8°Б. К разбавленному суслу добавляют агар-агар до концентрации 2,5%, разваривают на водяной бане, охлаждают до 46...48°C и нейтрализуют до рН 5,2–5,6. Стерилизуют автоклавированием при 0,12 МПа в течение 30 мин.

2. Приготовление питательных сред

Подготовку питательной среды для качалочных колб и лабораторного ферментатора, а также выращивание продуцентов белка

осуществляют по одному из приведенных ниже вариантов (в зависимости от вида источника углерода).

2.1. Приготовление питательных сред при выращивании дрожжей на мелассе

Приготовление питательной среды. Свекловичную мелассу разбавляют водопроводной водой до содержания сахара 2–8%. Количество разбавляемого сусла рассчитывают таким образом, чтобы получить 1200 мл питательной среды. Проверяют и при необходимости корректируют величину рН среды (4,2–4,4). 200 мл среды разливают в четыре качалочные колбы вместимостью 250 мл (по 50 мл). Качалочные колбы и колбу с оставшимися 1000 мл среды стерилизуют в автоклаве в течение 15–20 мин при давлении 0,06 МПа.

2.2. Приготовление питательной среды для выращивания дрожжей на этаноле

Готовят 1200 мл жидкой среды следующего состава (г/л): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 3,0; KH_2PO_4 – 4,0; K_2HPO_4 – 3,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,1; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,05; ZnSO_4 – 0,05; $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,05. Устанавливают величину рН среды 4,2–4,4. 200 мл среды разливают в четыре качалочные колбы (по 50 мл). Колбу с оставшейся средой и качалочные колбы стерилизуют в автоклаве при давлении 0,07 МПа в течение 30 мин. Этанол вводят в питательную среду перед засевом в количестве 2% от ее объема.

3. Получение посевного материала в качалочных колбах

Засев качалочных колб производят в условиях асептики. В пробирку с культурой вливают 6–8 мл питательной среды из колбы, бактериологической петлей снимают культуру с агаризованной среды и полученную суспензию возвращают в качалочную колбу. Дрожжи выращивают на качалке в течение 6–8 ч и при 32...34°C. В процессе культивирования поддерживают величину рН культуральной среды 4,2–4,4, применяя водный раствор аммиака (рН среды определяют индикаторной бумагой с пределом измерений 3,0–5,4). Содержимое качалочных колб используют для засева лабораторного ферментатора.

4. Выращивание дрожжей на ферментационной установке

Перед началом работы ферментатор объемом 5 л тщательно промывают водой и стерилизуют. Для этого в него заливают 2000 мл 70%-ного этилового спирта и включают мешалку на 20–30 мин. Затем спирт сливают и дважды промывают ферментатор стерильной водой.

В подготовленный к работе ферментатор заливают стерильную питательную среду, включают мешалку, системы термостатирования и подачи воздуха. При достижении требуемой температуры ($(32 \pm 1)^\circ\text{C}$) засевают ферментатор через посевной штуцер дрожжевой суспензией из качалочных колб. Через 5–10 мин после засева отбирают пробу (10 мл) для определения исходной концентрации дрожжей в культуральной жидкости (см. с. 12).

В процессе ферментации контролируют температуру, рН культуральной жидкости (4,2–4,4) и расход воздуха (2,5–3,0 л/(л·мин)). При необходимости гасят пену введением в ферментационную среду 1–2 капель пеногасителя. Выращивание проводят в течение 8–10 ч.

Процесс заканчивают при выходе кривой роста в стационарную фазу. Культуральную жидкость сливают, ферментатор тщательно промывают 1%-ным раствором хлорамина или гидроксида натрия, а затем водой.

После окончания ферментации определяют концентрацию биомассы дрожжей в культуральной жидкости.

5. Построение кривой роста культуры, расчет удельной скорости роста

Через 5–10 мин после засева ферментатора и затем через каждый час отбирают пробы культуральной жидкости (3–5 мл). Измеряют величину оптической плотности проб на фотоэлектроколориметре против воды при длине волны 600 нм. Полученные данные используют для построения кривой роста культуры. В фазе экспоненциального роста определяют удельную скорость роста культуры μ , ч^{-1} , по формуле

$$\mu = \frac{2,3 \lg(D_2 / D_1)}{\Delta t},$$

где D_2 – оптическая плотность через время Δt ; D_1 – величина начальной оптической плотности культуральной жидкости; Δt – промежуток времени между измерениями оптической плотности, ч.

6. Оценка физиологического состояния культуры

Пробы культуральной жидкости, отобранные в экспоненциальной фазе роста, применяют также для оценки физиологического состояния культуры по доле почкующихся и мертвых клеток.

Определение числа почкующихся клеток осуществляют прямым подсчетом в препарате «раздавленная капля» с использованием микроскопа. Просматривают 4–6 полей зрения. Под почкой следует понимать дочернюю клетку, размер которой не более $2/3$ размера материнской клетки. Активность почкования культуры характеризуется тремя ступенями: слабая активность – доля почкующихся клеток составляет 15–20%; средняя – 20–30% клеток; высокая – 30–40% и более.

Количество мертвых клеток определяют прямым подсчетом в препарате «раздавленная капля», окрашенном метиленовой синью (применяют 0,02%-ный раствор метиленовой сини, приготовленный на фосфатном буфере, который содержит 18,2 г дигидрофосфата калия и 26,1 г гидрофосфата калия в 1 л дистиллированной воды). Мертвые и ослабленные клетки окрашиваются в сине-голубой цвет. Допустимое содержание мертвых клеток составляет не более 1%.

7. Определение концентрации биомассы дрожжей в культуральной жидкости

Мембранный фильтр средней плотности помещают в бюкс (или чашку Петри без крышки) и высушивают в сушильном шкафу при температуре 105°C в течение 2 ч. Затем бюкс с фильтром охлаждают в эксикаторе и взвешивают с точностью не менее 0,001 г.

10 мл суспензии дрожжей фильтруют через приготовленный мембранный фильтр. Биомассу дрожжей на фильтре промывают дистиллированной водой для отделения примесей. Фильтр с биомассой помещают в тот же бюкс и высушивают при 105°C до достижения

постоянной массы. Расчет концентрации биомассы дрожжей в культуральной жидкости C_6 , г/л, производят по формуле

$$C_6 = \frac{(m_2 - m_1) \cdot 1000}{10},$$

где m_2 – масса бюкса с фильтром и дрожжами, г; m_1 – масса бюкса с фильтром без дрожжей, г; 10 – объем дрожжевой суспензии, мл.

8. Выделение биомассы из культуральной жидкости

Биомассу дрожжей отделяют центрифугированием в течение 15 мин при 5000 мин^{-1} или фильтрованием через мембранный либо бумажный фильтр средней плотности. Дрожжи промывают дистиллированной водой, отжимают в фильтровальной бумаге от влаги, отделяют от фильтра, помещают в бюкс и высушивают в сушильном шкафу при температуре 105°C . В сухой массе дрожжей определяют содержание белка одним из методов по указанию преподавателя.

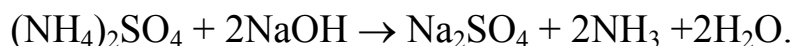
9. Определение содержания белка в биомассе дрожжей

9.1. Определение истинного протеина по Барнштейну

Реактивы, материалы и оборудование: 10%-ный раствор сульфата меди, 2,5%-ный раствор гидроксида натрия, раствор хлорида бария, сульфат меди, сульфат натрия, концентрированная серная кислота (плотность $1,84 \text{ г/см}^3$), 33%-ный раствор гидроксида натрия, 0,1 н. раствор серной кислоты, смешанный индикатор, 0,1 н. раствор гидроксида натрия; колба Кьельдаля вместимостью 250 мл, круглодонная колба вместимостью 800 мл, кусочки фарфора (или другие центры кипения), розовая лакмусовая бумажка, холодильник Либиха.

Метод основан на отделении истинного белка от других азотсодержащих веществ путем осаждения его сульфатом меди в щелочной среде. В осадке определяют азот методом Кьельдаля, сущность которого состоит в минерализации осадка концентрированной серной кислотой при нагревании в присутствии сульфата меди в качестве катализатора и сульфата натрия как водоотнимающего средства. Продуктом минерализации является сульфат аммония, который

разлагают щелочью, и отгоняют аммиак в титрованный раствор серной кислоты:



Ход анализа

В химический стакан отвешивают $(0,5 \pm 0,02)$ г дрожжей известной влажности с погрешностью не более 0,0002 г и приливают 100 мл кипящей дистиллированной воды. Содержимое стакана кипятят в течение 2–3 мин, затем, не охлаждая жидкости, приливают 20 мл 10%-ного раствора сульфата меди, содержимое перемешивают, добавляют 20 мл 2,5%-ного раствора гидроксида натрия, снова перемешивают и оставляют стоять при комнатной температуре в течение 1 ч. Отстоявшуюся жидкость декантируют через фильтр. Осадок в стакане промывают горячей водой и переносят на фильтр, где вновь промывают горячей водой до исчезновения в промывной воде реакции на сульфат-ион. Проверку производят добавлением в пробу промывной воды 2–3 капель раствора хлорида бария. Отсутствие помутнения указывает на полноту промывки.

Промытый осадок вместе с фильтром подсушивают на воздухе и помещают в колбу Кьельдаля, куда наливают также 20 мл концентрированной серной кислоты и добавляют 0,5 г сернокислой меди и 1 г сернокислого натрия. Колбу укрепляют в штативе в наклонном положении над электроплиткой под тягой и включают слабое нагревание. Горло колбы неплотно закрывают стеклянной втулкой или воронкой. В начале минерализации идет бурное выделение газов, жидкость в колбе черная. Постепенно жидкость светлеет, выделение газов уменьшается. В это время усиливают нагрев, опуская колбу на плитку. Раствор в колбе после его обесцвечивания нагревают еще 30 мин для полного окисления всех органических веществ пробы, а затем колбу с образовавшимся сплавом солей охлаждают. В охлажденный раствор приливают 200 мл дистиллированной воды для растворения сплава солей. Содержимое колбы Кьельдаля с помощью дистиллированной воды количественно переносят в круглодонную колбу вместимостью 800 мл, добавляют центры кипения и кусочек розовой лакмусовой бумажки. Затем в колбу быстро вливают 100 мл 33%-ного раствора гидроксида натрия, быстро закрывают колбу пробкой с трубкой, присоединяют к холодильнику (рис. 1) и включают нагрев колбы. Лакмусовая бумажка должна стать синей после прибавления щелочи.

Конденсат из холодильника собирают в коническую колбу вместимостью 250–300 мл, в которую налито 30–50 мл точно отмеренного 0,1 н. раствора серной кислоты и добавлено несколько капель смешанного индикатора (1 объем 0,1%-ного спиртового раствора метиленового голубого и 2 объема 0,1%-ного спиртового раствора метилового красного).

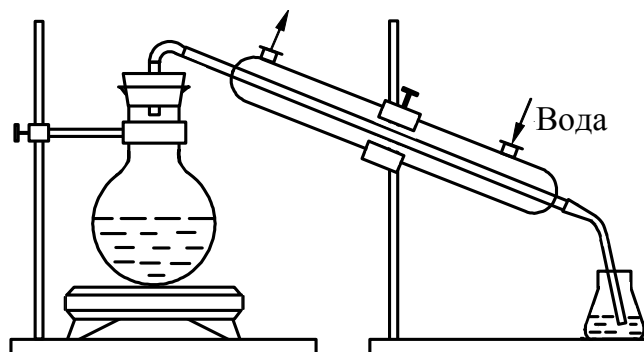


Рис. 1. Установка для определения азота

Во время отгонки аммиака нижний конец холодильника должен быть погружен в раствор кислоты в приемнике на глубину 1 см. За несколько минут до окончания отгонки опускают приемник, конец холодильника снаружи обмывают водой из промывалки (вода стекает в приемник) и розовой лакмусовой бумажкой проверяют реакцию последней капли конденсата. Если бумажка останется розовой, то отгон аммиака считают законченным. Серную кислоту, оставшуюся свободной, титруют 0,1 н. раствором гидроксида натрия до обесцвечивания раствора. Одна капля избытка раствора щелочи дает зеленое окрашивание.

Содержание истинного протеина в дрожжах $C_{\text{ип}}$, %, вычисляют по формуле

$$C_{\text{ип}} = \frac{(V_1 - V_2) \cdot 0,0014 \cdot 100 \cdot 6,25}{(1 - 0,01w)g},$$

где V_1 – объем 0,1 н. раствора серной кислоты, взятого на анализ, мл; V_2 – объем 0,1 н. раствора гидроксида натрия, израсходованного на титрование, мл; 0,0014 – количество азота, эквивалентное 1 мл 0,1 н. раствора гидроксида натрия (или серной кислоты), мг; 6,25 – эмпирический коэффициент для пересчета азота в белок; g – масса дрожжей, взятых на минерализацию, г; w – влажность анализируемых дрожжей, %.

9.2. Определение содержания белка по методу Варбурга и Христиана

Реактивы, материалы и оборудование: оксид алюминия (или кварцевый песок), 0,3%-ный раствор Na_2CO_3 в 0,6 М растворе NaCl ; центрифуга, спектрофотометр СФ-26.

Суть метода заключается в измерении оптической плотности белкового экстракта при 280 и 260 нм. Большинство белков имеет максимум поглощения при 280 нм, что обусловлено содержанием в них остатков триптофана и тирозина. Нуклеиновые кислоты, присутствующие часто в виде примесей к белкам, также обладают сильным поглощением при 280 нм, но максимум поглощения этих соединений находится при 260 нм. Экспериментально установлены коэффициенты экстинкции различных белков и нуклеиновых кислот при 260 и 280 нм и найдено соотношение этих коэффициентов, фактор F (табл. 1).

Таблица 1

Соотношение коэффициентов экстинкции

$A_{280/260}$	Нуклеиновая кислота, %	F
1,750	0,0	1,116
1,520	0,5	1,054
1,360	1,0	0,994
1,160	2,0	0,899
1,030	3,0	0,814
0,939	4,0	0,743
0,874	5,0	0,682
0,822	6,0	0,632
0,784	7,0	0,585
0,753	8,0	0,545
0,730	9,0	0,508
0,705	10,0	0,476
0,645	14,0	0,377
0,595	20,0	0,270

Для извлечения белка из дрожжевых клеток навеску влажных дрожжей (2–3 г) растирают в чашке с 1 г оксида алюминия или кварцевого песка (влажность дрожжей определяют предварительно). Пасту количественно переносят в коническую колбу вместимостью 100 мл, заливают 50 мл 0,3%-ного раствора Na_2CO_3 в 0,6 М растворе

NaCl и перемешивают на магнитной мешалке 30 мин при комнатной температуре. Суспензию центрифугируют при 5000 мин⁻¹ в течение 10 мин. Осадок отбрасывают, а супернатант используют для установления концентрации белка. Измеряют оптическую плотность раствора белка при длинах волн 260 и 280 нм.

Вычисляют соотношение полученных величин, по табл. 1 находят соответствующее значение F и рассчитывают содержание белка в биомассе X , %, по формуле

$$X = \frac{F}{ID_{280}} \cdot \frac{50 \cdot 1000}{g},$$

где I – толщина кюветы, см; $F / (I D_{280})$ – концентрация белка в экстракте, мг/мл; 50 – общий объем экстракта, мл; g – навеска биомассы, мг.

II. АМИНОКИСЛОТЫ

В состав природных белков (в том числе микробных) входят 20 аминокислот, из которых десять не синтезируются в организме животных и человека и должны поступать с кормами и продуктами питания. К незаменимым аминокислотам относятся лейцин, изолейцин, фенилаланин, валин, метионин, триптофан, треонин, лизин, аргинин, гистидин.

Основными потребителями аминокислот является пищевая и фармацевтическая промышленность. Незаменимые аминокислоты применяют для обогащения пищевых продуктов. Суточная потребность человека в незаменимых аминокислотах составляет 0,5–2,2 г в зависимости от вида аминокислоты. Цистеин и цистин в сочетании с глутаматом натрия используют для имитации запаха и вкуса мяса при создании новых видов пищи. Некоторые аминокислоты и их производные важны для диабетического питания.

Все большее внимание уделяется использованию аминокислот и их производных в фармакологии (триптофан, глутаминовая кислота, треонин, аргинин, гистидин и др.) в качестве лекарственных препаратов для профилактики и лечения различных заболеваний.

Существуют следующие способы промышленного производства аминокислот:

- кислотный, щелочной или ферментативный гидролиз природных белков (белки микробной биомассы, белоксодержащие отходы переработки растений (например, соевый шрот), отходы мясной промышленности (кератиновое сырье), казеин молока и др.);
- химический синтез;
- микробиологический синтез;
- получение аминокислот методом биотрансформации предшественника (химико-энзиматический синтез).

Первый способ пригоден для получения кормовой смеси аминокислот из белоксодержащих отходов. Выделение индивидуальных аминокислот из белковых гидролизатов – весьма сложная и дорогостоящая операция. При щелочном и кислотном гидролизе белков некоторые из аминокислот в значительной степени разрушаются, а протеолитические ферменты не обеспечивают полный гидролиз пептидных связей.

В мировой практике около 60% всего объема производимых аминокислот получают микробиологическим синтезом. Главным преимуществом этого способа является то, что микроорганизмы образуют аминокислоты в биологически активной L-форме. Образование аминокислот в D-форме является редким исключением. Это обстоятельство в значительной степени упрощает выделение и очистку аминокислот и позволяет получать кормовые препараты с низкой себестоимостью.

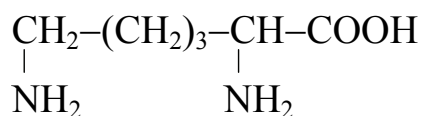
В ближайшем будущем прямому микробиологическому синтезу составит конкуренцию метод биотрансформации, который обладает рядом преимуществ:

- 1) незначительное количество побочных продуктов в ферментационной среде, что упрощает стадию выделения и очистки целевого продукта;
- 2) высокая концентрация аминокислот в ферментационной среде;
- 3) отсутствие жестких требований к стерильности процесса и возможность осуществления его в непрерывном режиме.

В отечественной практике наибольшее распространение получил метод прямого микробиологического синтеза аминокислот с использованием ауксотрофных мутантов, способных к сверхсинтезу целевой аминокислоты. У мутантов появляется дефектный ген, детерминирующий фермент, без которого не может осуществляться биосинтез определенной аминокислоты. Получение ауксотрофных мутантов, способных к сверхсинтезу аминокислот, возможно только для микроорганизмов, имеющих разветвленный путь биосинтеза, по крайней мере, двух аминокислот, образующихся из одного предшественника. Их биосинтез контролируется на уровне первого фермента общего участка ингибированием конечными продуктами. У таких ауксотрофных мутантов избыток одной аминокислоты при дефиците другой не приводит к подавлению активности первого фермента. Аминокислота, биосинтез которой блокирован в результате мутагенного воздействия, должна присутствовать в исходной ферментационной среде в ограниченном количестве.

Технология микробиологического синтеза различных аминокислот имеет много общего. В отечественной практике в крупных масштабах планируется производство препаратов лизина, метионина и треонина. В лабораторном практикуме внимание будет уделено получению лизина.

Лизин (α , ϵ -диаминокапроновая кислота) имеет структурную формулу



В организме животных и человека лизин увеличивает коэффициент использования белка, способствует секреции пищеварительных ферментов, транспорту кальция в клетки.

Существует два принципиально различных пути биосинтеза лизина у микроорганизмов. Грибы, микроводоросли, дрожжи и актиномицеты осуществляют синтез лизина по аминокадипиновому пути из α -кетоглутаровой кислоты через аминокадипиновую кислоту. Регуляция активности ферментов этого пути исследована недостаточно, и среди указанных групп микроорганизмов еще не получены мутанты, способные к сверхпродукции лизина. В клетках бактерий (и в высших растениях) биосинтез лизина начинается с аспарагиновой кислоты и протекает через диаминопимелиновую кислоту (диаминопимелиновый путь).

Аспарагиновая кислота под действием фермента аспараткиназы превращается в аспарат-3-полуальдегид. От этого важнейшего промежуточного соединения один путь биосинтетических превращений ведет к синтезу лизина, другой – к синтезу гомосерина, который является промежуточным продуктом для синтеза треонина и изолейцина, с одной стороны, и метионина – с другой.

При нарушении биосинтеза гомосерина (например, облучение γ -лучами (^{60}Co) приводит к потере способности синтезировать фермент гомосериндегидрогеназу) ход реакций превращения аспарагиновой кислоты сдвигается в сторону образования лизина. Регуляция биосинтеза L-лизина у промышленных продуцентов этой аминокислоты осуществляется по первому ферменту – аспараткиназе. Этот фермент ингибируется только при совместном действии двух метаболитов: лизина и треонина. Указанное обстоятельство обеспечивает получение ауксотрофных мутантов, у которых нет факторов, предотвращающих сверхсинтез L-лизина.

Таким образом, продуцентами L-лизина для его промышленного получения являются ауксотрофные мутанты с нарушенным синтезом гомосериндегидрогеназы, относящиеся к группе коринебактерий и способные образовывать в оптимальных условиях до 70 г/л лизина.

В производственных условиях используют штаммы *Corynebacterium glutamicum* 95, Т-3; *Brevibacterium flavum* 22L, 531Е.

Ауксотрофные мутанты, продуцирующие лизин, дефицитны по гомосерину. Для обеспечения нормального развития микроорганизмов требуется введение в состав ферментационной среды гомосерина. Результаты исследований показали, что гомосерин может быть заменен совместным присутствием в среде двух аминокислот: треонина и метионина. При этом концентрация треонина в среде должна быть строго регламентирована в связи с тем, что, как указывалось выше, треонин совместно с лизином при их определенном соотношении ингибируют аспараткиназу.

Таким образом, недостаточное количество треонина тормозит рост микроорганизмов, а его избыток снижает продуктивность культуры по выходу лизина. Экспериментальным путем установлено, что концентрация L-треонина в питательной среде для различных мутантов должна находиться в пределах 0,2–0,8 г/л. Метионин также влияет на рост микроорганизмов, но не участвует в процессе регуляции биосинтеза лизина. Оптимальная концентрация его в среде составляет 0,15–0,25 г/л.

Продуценты лизина являются биотинзависимыми микроорганизмами. Оптимальная концентрация биотина в среде составляет 10–20 мкг/л, что значительно выше концентрации, необходимой для нормального роста и развития микробной клетки (4–5 мкг/л). При низкой концентрации биотина (1–2 мкг/л) уровень продукции лизина снижается в 20–30 раз, и процесс смещается в сторону накопления глютаминовой кислоты (до 30 г/л).

При высокой концентрации в среде биотин обуславливает образование цитоплазматической мембраны, легко проницаемой для основных аминокислот (в частности, лизина) и трудно проницаемой для кислых и нейтральных аминокислот. Это создает благоприятные условия для накопления внеклеточного лизина. Продуценты лизина рода *Brevibacterium* требуют обязательного присутствия в питательной среде витамина В₁ (тиамина). При отсутствии тиамина бактерии плохо развиваются и синтезируют вместо лизина преимущественно α-аланин. В промышленных питательных средах источником биотина и тиамина являются кукурузный экстракт и свекловичная меласса.

Необходимым компонентом питательной среды является источник углерода. Для продуцентов лизина в качестве источников углерода

могут быть использованы моно- и дисахариды: глюкоза, сахароза, мальтоза, фруктоза. Практически не усваиваются продуцентами лизина пентозы и лактоза. Максимальный биосинтез лизина достигается на средах с сахарозой. Важное значение имеет концентрация источника углерода в ферментационной среде. С увеличением его концентрации содержание лизина в среде возрастает, но степень потребления источника углерода снижается. Экономически целесообразно проводить ферментацию при концентрации углевода 6–12%. Предпочтительно осуществлять подачу углевода в ферментатор дробно, по мере его потребления микроорганизмами.

В промышленных условиях в качестве источников углеводов используют чаще всего свекловичную мелассу. Выход лизина составляет 25–33% от углеводов мелассы.

Для обеспечения нормальной жизнедеятельности продуцентов лизина в составе среды должны присутствовать соединения азота и фосфора. Источником азота могут быть соли аммония или мочевины. Выбор источника азота осуществляется экспериментально для каждого промышленного штамма. Например, для *Brevibacterium flavum* 22L максимальный выход лизина наблюдается при использовании NH_4Cl или $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ в количестве 1,5–2,0%. Высокий уровень биосинтеза лизина обеспечивает применение полностью ассимилируемого источника азота – мочевины. Для каждой культуры выдерживается определенное соотношение углерод : азот (для *Corynebacterium glutamicum* 95 C : N = 11 : 1). Недостаток азота приводит к снижению выхода лизина, а избыток его изменяет направление биосинтеза в сторону накопления аланина.

Источником фосфора являются калиевые соли фосфорной кислоты (дигидрофосфат в большей степени, чем гидрофосфат калия). Содержание соединений фосфора в среде строго регламентируется (0,08–0,20%), в связи с чем нельзя использовать фосфорнокислый аммоний в качестве источника азота.

Потребность продуцентов лизина в макро- и микроэлементах (Mg, Fe, Cu, Mn и др.) удовлетворяется за счет последних, содержащихся в достаточном количестве в кукурузном экстракте и мелассе. При необходимости (для ацетатных сред) эти элементы вводят в питательную среду, как правило, в виде сульфатов.

Существенное влияние на биосинтез лизина оказывают условия культивирования продуцентов: pH среды, длительность и температура

ферментации, степень аэрации среды, возраст и доза посевного материала.

Продуценты лизина относятся к мезофильным микроорганизмам, имеющим оптимальную температуру роста и биосинтеза 28...33°C. Понижение температуры резко увеличивает продолжительность биосинтеза (при практически неизменном выходе), повышение температуры снижает выход лизина и приводит к автолизу культуры.

Оптимальное значение рН среды различается по отдельным стадиям культивирования: 6,8–7,2 – для накопления биомассы, 7,6–8,2 – для биосинтеза лизина, а также при использовании различных источников углерода и азота. Применяемые в отечественной промышленности продуценты обеспечивают наилучшие результаты по биосинтезу лизина при рН среды 7,0–7,6.

Посевной материал обычно используется в возрасте 16–24 ч и имеет титр $(2-4) \cdot 10^9$ клеток на 1 мл. Доза посевного материала, как правило, составляет 5–8% от объема засеваемой среды.

Очень важное значение имеет устойчивость культуры к поражению фагами. В производственных условиях целесообразно использовать фагоустойчивые культуры. На территории заводов, производящих лизин, выделено более 50 различных фагов, способных подвергнуть лизису клетки продуцентов лизина. Все выделенные фаги поражают клетки бактерий рода *Brevibacterium*. Продуценты лизина рода *Corynebacterium* отличаются фагоустойчивостью, но менее продуктивны по выходу лизина.

При периодическом культивировании продуцента концентрация лизина в культуральной жидкости составляет 40–48 г/л при содержании биомассы 10–15 г/л по сухому веществу. Содержание лизина в культуральной жидкости можно значительно повысить, если по мере истощения среды вводить в ферментатор небольшие порции свежей питательной среды (дробная подпитка). Подпитка активизирует биосинтетическую деятельность продуцентов лизина, и концентрация его в культуральной жидкости может достигать 60 г/л.

На основе культуральной жидкости получают кормовые препараты лизина с различным содержанием целевого компонента: кристаллический лизин (70–72%); высококонцентрированный кормовой кристаллический лизин (92–95%).

Кристаллические препараты получают ионообменным выделением лизина из культуральной жидкости на сульфокатионите КУ-2-8

в NH_4^+ -форме. Сорбционная емкость катионита – около 100 кг лизина на 1 м³ влажного ионита. Эффективная сорбция лизина на катионите обеспечивается предварительным переводом молекулы в форму двухзарядного катиона за счет подкисления культуральной жидкости серной кислотой до рН 1,6–2,0.

Ионообменное выделение лизина осуществляют без предварительного удаления биомассы продуцента из культуральной жидкости с последующей промывкой катионита теплой водой и использованием промывной воды, содержащей клеточную массу, для производства побочного продукта – аминокислотина. Элюируют лизин 3–5%-ным раствором аммиака, элюат упаривают под вакуумом до 40–45% сухих веществ, подкисляют соляной кислотой до рН 4,5–5,0 для перевода лизина в форму монохлоргидрата. Концентрат сушат в распылительной сушилке. Технический кристаллический лизин содержит не менее 70% основного вещества.

Высококонцентрированные кристаллические препараты лизина также получают на основе элюата, который после упаривания и подкисления соляной кислотой подвергают кристаллизации при температуре 10...12°C и рН 4,5–5,0. Высушенные кристаллы содержат 92–95% лизина монохлоргидрата.

Для получения высокоочищенного препарата кристаллы растворяют в воде, раствор обрабатывают активированным углем для удаления красящих веществ, упаривают под вакуумом и кристаллизуют лизин из водно-спиртового раствора. Этиловый спирт добавляют к концентрату в соотношении 3 : 1 по объему. Кристаллы промывают деионизированной водой и сушат под вакуумом при температуре до 60°C. Продукт содержит 97–98% монохлоргидрата лизина. Выход лизина на стадии выделения его из культуральной жидкости составляет 75%.

Лабораторная работа № 2

МИКРОБНЫЙ СИНТЕЗ ЛИЗИНА

Цель работы: выращивание продуцента лизина и выделение аминокислоты из культуральной жидкости, оценка влияния состава питательной среды на выход лизина.

Реактивы, материалы и оборудование: меласса, уксусная кислота, кукурузный экстракт, гидролизат БВК, хлорид аммония, ди-гидрофосфат и гидрофосфат калия, карбонат кальция, нитрат натрия, сульфат магния, сульфат железа, хлорид калия, сахароза, катионит КУ-2-8, 2 н. раствор гидроксида натрия, 2 н. раствор соляной кислоты, 5%-ный раствор аммиака, 5%-ный раствор серной кислоты, 2 н. раствор аммиака, 2 н. раствор серной кислоты, нитрат натрия, сульфат магния, сульфат железа, хлорид калия, сахароза; центрифуга, качалочные колбы на 250 мл, бюретка на 25 мл.

Порядок выполнения работы

1. Приготовление питательных сред. 2. Получение посевного материала. 3. Выращивание продуцента лизина в качалочных колбах. 4. Микробиологический контроль процесса ферментации. 5. Ионообменное выделение лизина из культуральной жидкости. 6. Получение и очистка кристаллического лизина.

1. Приготовление питательных сред

Среду для качалочных колб готовят в объеме 100 мл. Студент по указанию преподавателя использует один из вариантов питательных сред, представленных в табл. 2.

Таблица 2

Состав среды для культивирования продуцентов лизина

Компоненты среды	Вариант среды и содержание компонента, г/л				
	1	2	3	4	5
Меласса	100,0	150,0	200,0	50,0	50,0
Уксусная кислота	–	–	–	10,0	20,0
Кукурузный экстракт	20,0	–	35,0	20,0	20,0
Гидролизат БВК	–	30,0	–	–	–
NH ₄ Cl	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
K ₂ HPO ₄	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
KH ₂ PO ₄	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Мел	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0

Требуемое количество мелассы заливают 75 мл водопроводной воды, кипятят полученный раствор 10 мин, затем определяют рН. В зависимости от величины рН раствор подщелачивают (5%-ным

раствором NaOH) или подкисляют (5%-ным раствором H₂SO₄) до значения 7,0–7,2. Объем доводят водопроводной водой до 100 мл.

В меласный раствор в соответствии с вариантом среды вносят питательные соли и кукурузный экстракт, после чего питательную среду кипятят 10–15 мин. Меласно-ацетатные среды (варианты 4, 5) готовят аналогично меласным.

Готовую питательную среду разливают в две качалочные колбы (по 50 мл) и стерилизуют в автоклаве при 0,07 МПа в течение 30 мин.

2. Получение посевного материала

В качестве продуцентов лизина используют один из следующих штаммов: *Corynebacterium glutamicum* T-3, *Brevibacterium flavum* 22L, 531E. Скошенную агаризованную среду (питательный агар (ПА)) в пробирках засевают густым штрихом в условиях асептики и инкубируют в течение 24 ч при температуре 30...32°C.

Питательный агар готовят из сухого ПА. Для приготовления 300 мл ПА берут 12 г сухого питательного агара и 1 г агар-агара, помещают компоненты во флакон, добавляют 300 мл дистиллированной воды, перемешивают. Стерилизуют автоклавированием при 0,12 МПа в течение 40 мин.

3. Выращивание продуцента лизина в качалочных колбах

Суточную культуру смывают в качалочные колбы стерильной питательной средой. Смывом из одной пробирки засевают одну качалочную колбу. Выращивание продуцента проводят на качалке при температуре 30...32°C в течение 52–60 ч.

После 24 ч ферментации отбирают с соблюдением правил асептики пробы (2 мл) культуральной жидкости для контроля за чистотой культуры и наличием фаговой инфекции.

4. Микробиологический контроль процесса ферментации

4.1. Контроль за чистотой культуры

Контроль осуществляют высевом бактериальной суспензии на агаризованные питательные среды: ПА (для бактериальных

микроорганизмов) и среду Чапека (для грибных микроорганизмов). Готовят по две чашки Петри с ПА и средой Чапека, имеющей следующий состав (г/л): сахара – 20,0; NaNO_3 – 2,0; KH_2PO_4 – 1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5; KCl – 0,5; CaCO_3 – 3,0; агар – 20,0.

Из отобранной пробы готовят разведения 10^{-4} и 10^{-5} в стерильной воде и высевают на приготовленные плотные среды. Чашки с ПА инкубируют при 30°C , а со средой Чапека – при 26°C в течение 2 сут. По наличию колоний на среде Чапека и нетипичных колоний на ПА делают заключение о присутствии соответственно грибных и посторонних бактериальных микроорганизмов.

4.2. Контроль наличия фаговой инфекции

В чашке Петри на агаризованной среде готовят газон культуры *Brevibacterium* следующим образом. В стерильную пробирку вносят 3 мл расплавленного и охлажденного (до 45°C) 0,7%-ного питательного агара и добавляют 0,2 мл суспензии культуры *Brevibacterium* в стерильной воде. Содержимое пробирки перемешивают, быстро выливают на поверхность подсушенного 1,5%-ного ПА в чашке Петри и равномерно распределяют по ней, осторожно покачивая чашку. Закрывают чашку и дают агару затвердеть. На поверхность приготовленного таким образом газона наносят одну каплю отобранной культуральной жидкости, чашку наклоняют для стекания капли и образования следа, дают жидкости впитаться в агар. Инкубируют при температуре 30°C в течение 24 ч. Образование на месте нанесения пробы отдельных негативных колоний или сплошных зон лизиса свидетельствует о наличии в культуральной жидкости фаговой инфекции.

5. Ионообменное выделение лизина из культуральной жидкости

5.1. Подготовка ионообменной смолы

Катионит КУ-2-8 (30 мл) просеивают через сито с размером отверстий 1,5 мм для удаления крупных частиц. Мелкие частицы устраняют отмучиванием. Для этого просеянную смолу суспендируют в 300–400 мл воды и частицы, не осевшие после отстаивания в течение 1 ч, сливают. Эту операцию повторяют до тех пор, пока раствор над смолой не станет прозрачным. После этого смолу нагревают с 2 н. раствором NaOH в течение 2 ч на водяной бане при

температуре 80°C, а затем отмывают от щелочи дистиллированной водой до нейтральной реакции по фенолфталеину.

В качестве ионообменной колонки используют бюретку объемом 25 мл. В нижнюю часть колонки помещают фильтр из стекловолокна. Смолу вносят в колонку в виде водной суспензии, заливая ее через воронку таким образом, чтобы суспензия стекала по стенке колонки, не вызывая накопления пузырьков воздуха в слое катионита. Над поверхностью слоя смолы постоянно должен находиться слой жидкости высотой 3–5 см.

Через заполненную смолой колонку пропускают 200–250 мл 2 н. раствора HCl с целью удаления примесей. Затем смолу промывают дистиллированной водой до отрицательной реакции на ионы хлора (добавление 1–2 капель 1%-ного раствора AgNO₃ в 10 мл вытекающей из колонки воды не вызывает помутнения раствора).

Для перевода смолы в рабочую NH₄⁺-форму через колонку пропускают 2 н. раствор аммиака до тех пор, пока величина рН выходящего из колонки раствора и исходного раствора не уравниваются. После этого смолу промывают дистиллированной водой до нейтральной реакции сточной воды (по фенолфталеину). Над поверхностью смолы оставляют слой жидкости.

5.2. Сорбция лизина на катионите

Сорбцию осуществляют из культуральной жидкости, освобожденной от биомассы продуцента. Культуральную жидкость из двух качалочных колб объединяют, замеряют ее объем и отделяют бактериальную биомассу центрифугированием при 5000 мин⁻¹ в течение 15 мин. Биомассу отбрасывают, а фугат подкисляют 2 н. H₂SO₄ до величины рН 1,5–2,0. Подкисленный нативный раствор вводят через капельницу в колонку со скоростью 1 об./об. смолы в час. По окончании сорбции смолу промывают теплой (50°C) дистиллированной водой в количестве 1–2 объема смолы.

5.3. Элюирование лизина

Элюирование лизина производят 2 н. раствором аммиака в количестве 2 объема со скоростью 0,5 об./об. смолы в час. Первую фракцию (0,5 об. смолы) отбрасывают. Богатую фракцию элюата (1 об. смолы) количественно отбирают в предварительно взвешенную (с точностью не менее 0,01 г) фарфоровую чашку.

6. Получение и очистка кристаллического лизина

Богатую фракцию элюата выпаривают в вытяжном шкафу на водяной бане при температуре 60°C до объема 5 мл. Концентрат охлаждают до 2...5°C в холодильнике. Через 5–6 ч образуются кристаллы лизина, которые отфильтровывают, высушивают при комнатной температуре и взвешивают.

Полученные кристаллы лизина растворяют в 5 мл дистиллированной воды и добавляют 0,2 г активированного угля для очистки раствора от примесей. После тщательного перемешивания смесь фильтруют, фильтрат собирают в предварительно взвешенную фарфоровую чашку, упаривают до объема 2 мл и охлаждают. Выпавшие кристаллы отделяют фильтрованием и высушивают в сушильном шкафу при температуре 60°C. Определяют массу полученного лизина и рассчитывают его выход от субстрата Y , %, по формуле

$$Y = \frac{m \cdot 1000 \cdot 100}{VS},$$

где m – масса лизина, г; V – объем культуральной жидкости, взятой для ионообменного выделения, мл; S – концентрация источника углерода в исходной питательной среде (меласса или меласса + уксусная кислота), г/л.

Полученный показатель сравнивают с литературными источниками.

III. ВИТАМИНЫ

Биологическая роль витаминов определяется их каталитическим, некоферментным и антимуtagenным действием. Многие витамины (практически все витамины группы В) входят в состав коферментов различных ферментов, например, витамин В₂ – в состав коферментов ФАД, ФМН, витамин В₅ – в состав НАД и НАДФ, витамин В₃ – в состав КоА и т. д.

Некоферментные функции витаминов заключаются в участии их в регуляции синтеза нуклеиновых кислот, белков, в формировании структуры клеточных мембран. Важное значение имеет антимуtagenное действие витаминов С, Е (α -токоферола) и β -каротина (провитамина А). Эти витамины могут нивелировать как спонтанные мутации, так и мутации, индуцированные ионизирующими излучениями и канцерогенами.

В природе источником витаминов являются главным образом растения и микроорганизмы. Животные получают витамины с пищей, а также в результате жизнедеятельности микроорганизмов кишечника. Организм человека многих витаминов не синтезирует.

Большая часть витаминов производится химическим синтезом. Микробиологическим путем получают витамины В₂, В₁₂, D₂, С (стадия биотрансформации D-сорбита в L-сорбозу), β -каротин.

Витамин В₁₂ имеет самое сложное строение среди неполимерных соединений. Молекула витамина включает корриновое кольцо из четырех пятичленных азотсодержащих гетероциклов, связанных с атомом кобальта четырьмя координационными связями. Все разнообразие аналогов витамина В₁₂ обусловлено природой верхнего и нижнего лигандов атома кобальта. В истинном витамине В₁₂ (цианкобаламине) верхним лигандом является цианогруппа. Ее место могут занимать другие заместители: группа –ОН – оксикобаламин, –СН₃ – метилкобаламин, 5-дезоксаденозил – аденозилкобаламин и др. При этом образуются производные витамина, обладающие биологической активностью для животных и человека.

Нижним лигандом атома кобальта в молекуле витамина В₁₂ является специфическое азотистое основание – 5,6-диметилбензимидазол (5,6-ДМБ), которое в природе встречается только в этом

соединении. Непосредственным предшественником 5,6-ДМБ является рибофлавин. Наличие 5,6-ДМБ определяет биологическую активность корриноидов. Микроорганизмы могут синтезировать производные витамина, содержащие в качестве нижнего лиганда другие заместители: 5-оксибензимидазол (производное имеет название фактор III), 5-метоксибензимидазол (фактор III_m), метиладенин (фактор A), аденин (псевдовитамин В₁₂). Нижний лиганд может отсутствовать (фактор В). Биологической активностью обладают лишь формы, содержащие в качестве нижнего лиганда 5,6-ДМБ. В меньшей степени биологически активны фактор III и фактор III_m. Псевдовитамин В₁₂ и фактор A активностью не обладают.

Промышленным способом получения витамина В₁₂ является микробиологический синтез (химический синтез осуществлен, но отличается большой сложностью). В природе корриноиды обнаруживают в растениях, развивающихся в симбиозе с азотфиксирующими бактериями. Происхождение этих корриноидов окончательно не установлено. Организм животных и человека не способен к самостоятельному синтезу витамина В₁₂. Не образуют корриноиды дрожжи и мицелиальные грибы. Способность к биосинтезу корриноидов широко распространена среди прокариот.

Путь биосинтеза витамина В₁₂ известен. Общим интермедиатом на начальном этапе биосинтеза корриноидов является аминолевулиновая кислота, которая образуется у большинства микроорганизмов в результате конденсации глицина и янтарной кислоты в виде сукцинил-КоА.

Препараты витамина В₁₂ широко применяются в медицине (лечение лучевой болезни, злокачественного малокровия, болезни Боткина, дистрофии, язвы желудка и т. д.).

Мировое производство витамина В₁₂ составляет около 10 т в год, из которых 6,5 т – на медицинские цели. В промышленном производстве в качестве продуцентов витамина В₁₂ используют пропионовокислые бактерии (*Propionibacterium shermanii*), актиномицеты (*Nocardia rugosa*), термофильные (реже мезофильные) метаногенные бактерии.

Технический препарат витамина В₁₂ получают термофильным метановым сбразиванием жидких отходов микробиологического производства органических растворителей – ацетоно-бутиловой и спиртовой барды, содержащей сухих веществ 2,2–2,6% и 5,0–5,9%

соответственно. В состав сухих веществ барды входят белки, аминокислоты, углеводы, летучие жирные кислоты, витамины, неорганические соединения.

Для метанового брожения применяют декантат ацетоно-бутиловой барды. Осадок взвешенных веществ, содержащий мертвые клетки продуцентов ацетона и бутанола, используют в качестве кормовой добавки. Декантированную барду охлаждают со снижением температуры от 100 до 55...57°C (температура метанового сбраживания). Выход корриноидов значительно увеличивается при добавлении к барде метанола (5 кг/м³) и хлорида кобальта (5 г/м³). Непрерывное сбраживание барды осуществляют в железобетонных метантенках объемом 2000–4000 м³ по одно- или двухступенчатому режиму. При термофильном метановом брожении в анаэробных условиях развивается биоценоз бактерий, осуществляющих сложный взаимосвязанный процесс расщепления органических веществ до CO₂ и CH₄.

В производственных условиях метановое брожение целесообразно осуществлять в двух последовательно соединенных метантенках (по двухступенчатому режиму), что приводит к специализации бактерий, развивающихся в аппаратах первой и второй ступеней, в соответствии с фазами брожения и сокращению продолжительности процесса с 3,0–3,5 сут (сбраживание в одну ступень) до 2,5–3,0 сут (две ступени сбраживания). Процесс метанового брожения протекает устойчиво и не нуждается в условиях асептики.

В сброженном растворе накапливается 4–5 г/м³ корриноидов, из которых в среднем 50% приходится на истинный витамин B₁₂, 30% – на фактор III. Установлено, что группа метанобразующих бактерий синтезирует около 75% витамина B₁₂ от общего количества.

Изучается видовая принадлежность продуцентов витамина B₁₂ при метановом сбраживании. Подтверждена продукция корриноидов метанобразующими бактериями *Methanosarcina barkeri*, *Methanobacterium formicum*.

Установлено, что кокковые формы, составляющие 8–10% от всех бактерий, синтезируют примерно 65% корриноидов, а палочки (90–92%) продуцируют остальные 35% корриноидов.

В процессе брожения образуется биогаз (в среднем 20 м³ на 1 м³ жидкой среды) со следующим усредненным составом (%): CH₄ – 65, CO₂ – 30, H₂ и H₂S – 5.

Сброженная барда имеет величину рН 7,5–8,0. В щелочной среде витамин B₁₂ неустойчив, поэтому для стабилизации витамина мета-

новую бражку подкисляют до рН 5,5–6,0 и вводят 0,2–0,3% сульфита натрия. Перед подачей на упаривание бражку подвергают дегазации нагреванием в теплообменнике до 90...95°C с последующим отделением газов в объемном сепараторе. Дегазированную бражку сгущают до 20% сухих веществ упариванием в трех- или четырехкорпусных вакуум-выпарных установках. Концентрат высушивают в распылительной сушилке при температуре теплоносителя на входе в сушилку 280°C. Продукт – кормовой препарат витамина – представляет собой порошок коричневого цвета и содержит витамин В₁₂ в количестве не менее 100 мг/кг, а также сырой протеин – не менее 25%.

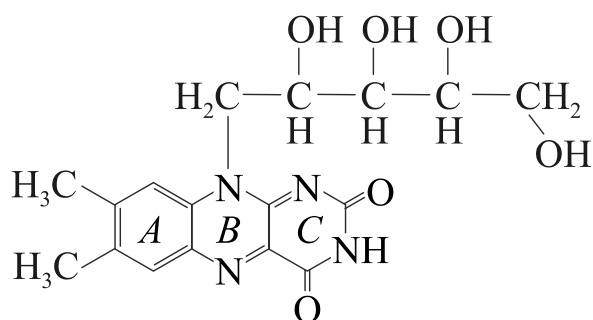
Витамин В₁₂ для медицинских целей можно получать культивированием бактерий *Propionibacterium shermanii* периодическим методом при температуре 28...30°C в анаэробных условиях с соблюдением правил асептики на питательной среде, содержащей глюкозу (40 г/л), кукурузный экстракт (40 г/л), сульфат аммония (2 г/л) и хлорид кобальта (0,005 г/л); рН среды 6,8–7,0. Ферментация протекает в две фазы. В первой фазе продолжительностью 65–70 ч бактерии интенсивно размножаются с накоплением пропионовой и уксусной кислот, подлежащих нейтрализации, и предшественника витамина В₁₂ – фактора В (без нижнего лиганда). На долю фактора В приходится более 80% от всех синтезированных корриноидов (остальное – цианкобаламин (8–10%), псевдовитамин В₁₂ и фактор А).

Вторая фаза ферментации начинается с момента внесения в среду 5,6-ДМБ в количестве 10–20 г/м³, в результате чего происходит трансформация неактивных аналогов в истинный витамин В₁₂. Продолжительность второй фазы 24 ч. К концу процесса культуральная жидкость содержит около 30 мг/л витамина В₁₂, накопленного в клетках бактерий.

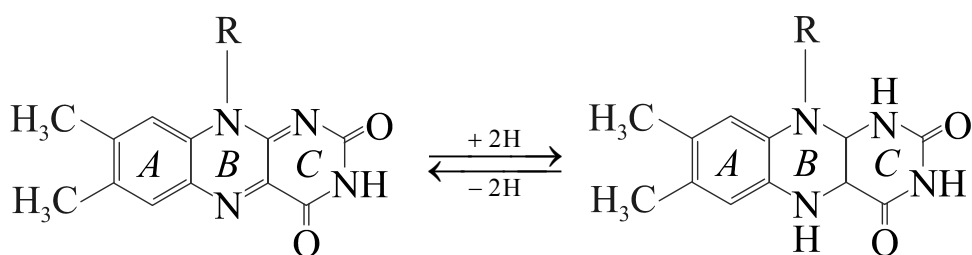
Биомассу отделяют сепарацией и экстрагируют из нее витамин водой, подкисленной до рН 4,5–5,0, при температуре 85...90°C в течение часа. После отделения остатка биомассы раствор охлаждают, доводят рН до 6,8–7,0 и осаждают белки коагуляцией в присутствии Al₂(SO₄)₃ или FeCl₃. Осадок отделяют фильтрованием, а раствор витамина очищают на ионообменной смоле СГ-1, с которой витамин В₁₂ элюируют водным раствором аммиака. Элюат упаривают и дополнительно очищают на колонке с окисью алюминия (очистка кобаламинов от аналогов). Элюируют витамин В₁₂ водным ацетоном и кристаллизуют из раствора при температуре 3...4°C в течение 24–48 ч.

Кристаллы промывают ацетоном, затем диэтиловым эфиром и сушат под вакуумом.

Витамин В₂ (рибофлавин) в промышленных условиях производят для пищевых целей. Продуцентами рибофлавина в природе являются высшие растения, дрожжи, мицелиальные грибы и бактерии. Большинство микроорганизмов образуют свободный рибофлавин и две его коферментные формы – ФМН и ФАД. Основной формой флавинов, синтезируемых микроорганизмами, является рибофлавин. Гетероциклическая система рибофлавина представлена тремя конденсированными циклами: ароматическим (A), пиразинным (B) и пиридиновым (C). К пиразинному кольцу присоединен спирт рибит:



Рибофлавин – светочувствительное оранжево-желтое красящее вещество. Водные растворы рибофлавина флуоресцируют на свету, давая желто-зеленое окрашивание. Флуоресцирующая способность витамина используется при его количественном определении. Окислительно-восстановительные свойства флавинов обусловлены наличием в составе молекулы системы, способной к обратимому окислению и восстановлению.



С этим связана биологическая роль витамина В₂, которую в клетках выполняют моно- и динуклеотидные формы рибофлавина.

Путь синтеза рибофлавина в микробных клетках установлен. Предшественником рибофлавина является гуанозинтрифосфат.

Микроорганизмы, как правило, синтезируют рибофлавин в больших количествах, чем необходимо для удовлетворения потреб-

ности клетки. Например, дрожжеподобные грибы синтезируют до 6 г/л рибофлавина, в то время как потребность в нем не превышает 0,1 мг/л. Высокой рибофлавинпродуцирующей способностью отличаются дрожжеподобные грибы *Eremothecium ashbyii* (до 2,5 г/л витамина В₂) и *Ashbya gossypii* (до 6 г/л), применяемые в промышленном производстве витамина В₂.

Для большинства микроорганизмов выход рибофлавина увеличивается при дефиците железа в среде. Предполагают, что ионы железа участвуют в регуляции синтеза рибофлавина. Однако для штаммов-сверхсинтетиков *E. ashbyii* и *A. gossypii* дефицит железа не влияет на рибофлавинсинтетическую активность. Считают, что указанные продуценты рибофлавина являются природными мутантами с нарушенной регуляцией синтеза витамина.

Получены мутантные штаммы бактерий *Bacillus subtilis*, способные синтезировать витамин В₂ в количестве до 6 г/л. В отечественной практике используют гриб *Eremothecium ashbyii*. Колонии гриба имеют оранжевый цвет. Интенсивность окраски колоний коррелирует с рибофлавинсинтетической способностью. Недостаток культуры – нестабильность при хранении. Гриб легко теряет способность к сверхсинтезу витамина, поэтому осуществляют систематический отбор наиболее интенсивно окрашенных колоний. Культура *A. gossypii* (применяется за рубежом) более стабильна, хорошо развивается, используя в качестве источника углерода углеводы (глюкозу, сахарозу), но лучше всего – соевое и кукурузное масло.

Рибофлавин накапливается в мицелии в виде желтых кристаллов, к концу ферментации около 80% рибофлавина выходит из клеток в результате автолиза.

Гриб *E. ashbyii* образует на дрожжевой агаризованной среде с пептоном на шестой день роста ярко-оранжевые колонии диаметром 5–8 мм. На соевой агаризованной среде колонии гриба имеют диаметр 17–25 мм. Для получения посевного материала отбирают типичные колонии с интенсивной окраской. Субстрат для получения спорового материала – подготовленное пшено высшего качества. Флаконы со стерильным пшеном засевают суспензией (смыв культуры с агаризованной среды) и инкубируют при температуре 30°С в течение 8–9 сут. Пшено после прорастания гриба приобретает ярко-желтый цвет. Полученный посевной материал хранят в темноте при комнатной температуре.

Материалом из флакона засевают качалочные колбы и выращивают культуру 10–14 ч. В качалочных колбах и посевных аппаратах используется среда, содержащая кукурузный экстракт, сахарозу, фосфат калия и технический жир. Продолжительность ферментации в посевных аппаратах 24–27 ч.

Среда для производственной ферментации содержит соевую муку, кукурузный экстракт, мел, технический жир. В первые сутки культивирования гриб накапливает биомассу, а затем переходит к спорообразованию. В этот период интенсивно синтезируется рибофлавин. Примерно с 60-го часа ферментации начинается автолиз культуры и переход рибофлавина в среду.

Культуральную жидкость стабилизируют подкислением до значения pH 4,5–5,0, упаривают под вакуумом до содержания сухого вещества 18–20%, концентрат высушивают распылением в мягких условиях (температура сушильного агента на входе в сушилку 150...160°C). Продукт содержит 20–40 г витамина на 1 кг препарата.

Примерно 70% рибофлавина, произведенного в мире, получают путем химического синтеза из рибозы.

Лабораторная работа № 3

МИКРОБНЫЙ СИНТЕЗ ВИТАМИНА В₁₂ НА ПОСЛЕСПИРТОВОЙ БАРДЕ

Цель работы: ознакомление с технологическим процессом термофильного сбраживания жидких отходов, освоение метода определения витамина В₁₂ в сброженном растворе.

Реактивы, материалы и оборудование: послеспиртовая барда, хлорид кобальта, мочевины, метиловый спирт, гидрофосфат аммония, 0,1 н. раствор соляной кислоты; колбы вместимостью 250 мл, круглодонная колба вместимостью 500 мл, мерный цилиндр, обратный холодильник, центрифуга, суховоздушный термостат, лампа, спектрофотометр.

Порядок выполнения работы

1. Подготовка и термофильное сбраживание послеспиртовой барды. 2. Определение содержания витамина В₁₂ в сброженной барде.

1. Подготовка и термофильное сбраживание послеспиртовой барды

Для сбраживания используют 80 мл послеспиртовой барды с содержанием сухих веществ 4–6%. Барду помещают в колбу вместимостью 100 мл и добавляют в нее стимуляторы синтеза кобаламинов (г/л): хлорид кобальта – 0,004; мочевины – 0,5; гидрофосфат аммония – 0,5; метанол – 5. После тщательного перемешивания колбу со средой герметично закрывают пробкой с газоотводной трубкой, которую соединяют с гидрозатвором для вывода биогаза без нарушения анаэробности процесса. Колбу с гидрозатвором помещают в суховоздушный термостат и выдерживают при температуре 50...55°C в течение 7 сут.

2. Определение содержания витамина B₁₂ в сброженной барде

Используют спектрофотометрический метод. Сброженную барду перемешивают, измеряют ее объем и центрифугируют в течение 20 мин при 5000 мин⁻¹. Супернатант отбрасывают, а осадок промывают 3–4 объемами дистиллированной воды, отделяя промывные воды центрифугированием. Промытую биомассу взвешивают и переносят количественно в коническую колбу с 30-кратным (по отношению к биомассе) количеством кислой воды, для приготовления которой дистиллированную воду подкисляют 0,1 н. раствором соляной кислоты до pH 4,5–5,0.

Для перевода кобаламинов в водный раствор проводят гидролиз полученной суспензии на кипящей водяной бане в течение 40 мин. После охлаждения гидролизат осветляют центрифугированием, определяют величину pH фугата и замеряют его объем. Осветленный гидролизат должен иметь pH 4,6–5,0. При необходимости величину pH корректируют. Колбу с гидролизатом помещают под лампу (60 Вт) на расстоянии 25 см и освещают на протяжении 30 мин для перевода всех форм кобаламина в оксикобаламин. В случае выпадения осадка гидролизат фильтруют через бумажный фильтр.

На спектрофотометре определяют экстинкцию раствора при длине волны 530 нм относительно дистиллированной воды. Содержание кобаламина в культуральной жидкости C , мкг/мл, рассчитывают по формуле

$$C = \frac{D_{530}V_1}{56 \cdot V_2},$$

где D_{530} – экстинкция фильтрата, измеренная при длине волны 530 нм; V_1 – объем гидролизата, мл; 56 – удельный показатель (коэффициент экстинкции) для оксикобаламина при длине волны 530 нм; V_2 – объем культуральной жидкости, взятой на анализ, мл.

Лабораторная работа № 4 БИОСИНТЕЗ ВИТАМИНА В₂ (РИБОФЛАВИНА)

Цель работы: ознакомление с процессом ферментации в производстве витамина В₂, освоение метода аналитического определения витамина в растворе.

Реактивы, материалы и оборудование: глюкоза, меласса, гидролизат дрожжей, кукурузный экстракт, сульфат магния, дигидрофосфат калия, нитрат натрия, сульфат аммония, 0,1 н. раствор серной кислоты, протосубтилин ГЗх, 2,5 М раствор уксуснокислого натрия, 4%-ный раствор перманганата калия, 3%-ный раствор перекиси водорода, раствор хлористого олова, раствор гидросульфита натрия, гидрокарбонат натрия, гидросульфит натрия; колбы вместимостью 250 мл, микроскоп, центрифуга, термостат, флуориметр.

Порядок выполнения работы

1. Получение посевного материала. 2. Приготовление питательной среды и культивирование продуцента витамина. 3. Определение содержания рибофлавина в культуральной среде флуориметрическим методом. 4. Микроскопический контроль процесса выращивания культуры гриба *Eremothecium ashbyii*.

1. Получение посевного материала

В качестве продуцента витамина В₂ используют дрожжеподобный гриб *Eremothecium ashbyii*. Гриб из коллекционной пробирки засевают методом истощающего штриха на соевую агаризованную плотную среду в чашку Петри. Состав агаризованной среды (%): мука соевая – 4; сахароза – 2; агар-агар – 2.

Засеянную культуру в чашке Петри инкубируют в течение 6–7 сут при температуре 29...30°C. Из сформировавшихся в чашке Петри колоний отбирают изолированные с наиболее интенсивной оранжевой окраской и используют их для засева скошенной соевой агаризованной среды в двух пробирках. Посев инкубируют при 29...30°C в течение 5–7 сут и применяют в качестве посевного материала для засева среды в качалочных колбах.

2. Приготовление питательной среды и культивирование продуцента витамина

Основным фактором, влияющим на синтез рибофлавина, является состав питательной среды.

Биосинтез рибофлавина осуществляют на одной из питательных сред, состав которых приведен в табл. 3.

Готовят 150 мл питательной среды заданного варианта. Значение рН среды устанавливают в пределах 6,0–6,5. Питательную среду разливают по 50 мл в две качалочные колбы вместимостью 250 мл и стерилизуют в автоклаве в течение 30 мин при температуре 120°C.

Стерильную среду в колбах охлаждают до температуры 30...35°C и засевают 5–7-суточной культурой *Eremothecium ashbyii*, соблюдая правила асептики. Культуру смывают с агаризованной среды в пробирках 6–8 мл стерильной воды или питательной среды из колбы. Культивирование гриба осуществляется на качалке в течение 3–4 сут при температуре 29...30°C.

Таблица 3
Состав сред для культивирования гриба *Eremothecium ashbyii*

Компоненты среды	Вариант среды и содержание компонента, %			
	1	2	3	4
Глюкоза	3,00	1,50	–	–
Меласса	2,50	–	2,00	–
Гидрол	–	1,50	–	6,00
Автолизат дрожжей	8,00	8,00	–	8,00
Кукурузный экстракт	2,00	–	3,00	–
MgSO ₄	0,05	0,05	0,05	0,05
KH ₂ PO ₄	0,15	0,15	0,15	0,15
NaNO ₃	–	–	0,60	–
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,10	–	–	–

После 25–30 ч культивирования отмечается интенсивное накопление рибофлавина. Через трое суток в результате автолиза клеток подавляющее количество рибофлавина переходит в жидкую среду.

3. Определение содержания рибофлавина в культуральной среде флуориметрическим методом

Клетки гриба отделяют фильтрованием. В случае, если культуральная жидкость плохо фильтруется (вследствие глубокого лизиса клеток продуцента), клетки отделяют центрифугированием.

Определение витамина основано на измерении интенсивности флуоресценции рибофлавина в флуориметре. Свет от кварцевой лампы пропускается через светофильтр для удаления видимой части спектра и падает на исследуемый раствор. Возбужденный свет флуоресценции раствора через светофильтр с областью пропускания 520 нм для рибофлавина падает на фотоэлемент. Ток фотоэлемента усиливается и регистрируется гальванометром. Сравнивая флуоресценцию исследуемых образцов с флуоресценцией, которую дают стандартные растворы чистого витамина известной концентрации, определяют концентрацию витамина в образцах.

Для повышения специфичности метода определения рибофлавина с помощью окислителей и восстановителей очищают исследуемые растворы от побочных веществ, которые гасят флуоресценцию или мешают ее проявлению.

Ход анализа

К 5 мл фильтрата культуральной жидкости добавляют 25 мл 0,1 н. раствора серной кислоты. Колбу помещают в кипящую водяную баню на 45 мин, периодически колбу встряхивают. После окончания гидролиза содержимое колбы охлаждают до 35...40°C и добавляют ферментный препарат протосубтилин ГЗх из расчета 0,03 г на 1 мл опытного раствора. Ферментный препарат используют для осветления раствора. Навеску ферментного препарата предварительно растирают в ступке с 2–3 мл 2,5 М раствора уксуснокислого натрия.

Колбу помещают в термостат с температурой 37°C на 12 ч. Затем объем раствора в колбе доводят водой до 100 мл и фильтруют. Из фильтрата отбирают две пробы – от 1 до 8 мл в зависимости от

содержания рибофлавина в культуральной жидкости. Объем пробы доводят до 8 мл дистиллированной водой.

В первой пробе измеряют флуоресценцию после необратимого окисления и восстановления побочных флуоресцирующих или гасящих флуоресценцию веществ. Для этого поступают следующим образом. К 8 мл пробы прибавляют по каплям 4%-ный раствор перманганата калия (обычно не более 1 мл) до появления окраски, которая не исчезает в течение 1 мин, и выдерживают 10 мин. После этого прибавляют по каплям 3%-ный раствор перекиси водорода для удаления избытка перманганата. Затем добавляют 0,2 мл 1%-ного раствора хлористого олова и 0,1 мл 1%-ного раствора бисульфита натрия для восстановления побочных флуоресцирующих веществ, раствор энергично встряхивают в течение 20 мин. Объем раствора доводят до 10 мл и проводят измерение флуоресценции.

Вторая проба (8 мл раствора доводят водой до 10 мл) используется непосредственно для определения флуоресценции и служит контролем. Одновременно измеряют флуоресценцию стандартного раствора рибофлавина. Затем во все три пробирки добавляют по 0,1 г гидрокарбоната и гидросульфита натрия для гашения флуоресценции рибофлавина: флуоресценция стандартного раствора гасится до нуля, в исследуемых пробах гасится только флуоресценция рибофлавина и остается флуоресценция побочных веществ, которая не гасится ни окислением, ни восстановлением.

Проба, обработанная окислителями и восстановителями, должна давать результаты анализа равные или более высокие, чем контрольная. Если флуоресценция ниже контрольной, операцию окисления и последующую обработку повторяют, избегая избытка перманганата калия.

Содержание рибофлавина в растворе X , г/л, рассчитывают по формуле

$$X = \frac{(A - B) \cdot 0,4VV_2}{CaV_1},$$

где A – показание флуориметра для исследуемого раствора; B – показание флуориметра для исследуемого раствора после гашения флуоресценции; 0,4 – содержание рибофлавина в растворе, г; V – объем, до которого доведен исходный раствор, мл (100 мл); V_2 – объем раствора, в котором проводилось определение флуоресценции, мл (10 мл);

C – показание флуориметра для стандартного раствора рибофлавина; a – количество раствора, взятого на анализ, мл; V_1 – объем раствора, взятого на окисление, мл (1–8 мл).

4. Микроскопический контроль процесса выращивания культуры гриба *Ermothecium ashbyii*

Для сравнения морфологических признаков культуры продуцента в разные периоды его развития отбирают пробы культуральной жидкости на вторые и пятые сутки роста. Готовят неокрашенные препараты двух- и пятисуточной культуры гриба для микроскопирования и, рассматривая их под микроскопом, отмечают морфологические особенности культуры (форму и размеры клеток, наличие спор, их форму и расположение).

Особое внимание необходимо обратить на содержание в клетках рибофлавина, желтые кристаллы которого хорошо видны под микроскопом. При нормальном развитии гриба в начальном периоде роста (двухсуточная культура) основная масса витамина находится в клетках, в старой культуре (пятисуточной) клетки в основной массе уже не содержат кристаллов витамина, он почти полностью переходит в культуральную жидкость.

IV. ПОЛУЧЕНИЕ ПРЕПАРАТА РНК ИЗ ДРОЖЖЕВОЙ МАССЫ

Фармацевтическая промышленность Республики Беларусь сильно зависит от закупок субстанций за рубежом. Из местных источников сырья для получения лекарственных средств используется только сырье растительного и животного происхождения, а также целевые метаболиты, получаемые путем микробного синтеза (антибиотики, ферменты, витамины и аминокислоты).

Важным сырьем для производства ряда лекарственных препаратов является РНК, полученная из дрожжевой массы. РНК – исходный материал для выделения индивидуальных рибонуклеозидов (аденозина, гуанозина, цитидина, уридина), которые в свою очередь являются исходным сырьем для синтеза более чем 20 ценных лекарственных препаратов, а также пищевых добавок. В первую очередь, это препараты сердечно-сосудистого действия – АТФ, фосфаден (АМФ), рибоксин, уридин.

Аденозин является исходным материалом для получения противовирусных препаратов (аденинарабинозид – против вируса герпеса), препаратов с антигипертензивной активностью (производные аденозин-5-карбоновой кислоты), противовоспалительных и обезболивающих препаратов.

На основе цитидина получают цитозинарабинозид и циклоцитидин (для лечения лейкозов), 5-фторциклоцитидин (противоопухолевое средство), циклоцитидинмонофосфат (противовирусный препарат).

Производные гуанозина применяются в качестве иммуностимуляторов. На основе гуанозина производятся тиогуанин (противолейкозный препарат), ацикловир (противовирусный).

Уридин используется как безвредный стимулятор физических сил организма при напряженной работе, после длительной болезни, для лечения депрессивных состояний, сосудистых заболеваний мозга. Производные 5-фторуридина являются противоопухолевыми средствами.

Известны следующие основные способы получения нуклеозидов:

1) экстракция нуклеиновых компонентов из мышц млекопитающих и птиц;

- 2) химический синтез;
- 3) микробиологический синтез;
- 4) гидролиз нуклеиновых кислот.

Экстракционный метод требует большого количества ценных пищевых продуктов: из 1 кг мышц минтая получают всего 25 мг АТФ, 40 мг АДФ и 35 мг АМФ.

Химический синтез сложен, но некоторые синтетические нуклеозиды коммерчески доступны. Например, химическим аминированием инозина (рибоксина) получают аденозин. Разработан метод ферментативного синтеза нуклеозидов с помощью фермента нуклеозидфосфорилаза, образующего N-гликозидную связь между азотистым основанием и пентозным остатком.

Перспективен микробиологический способ синтеза нуклеозидов. Например, *Bacillus subtilis* синтезирует 12–13 г/л инозина (рибоксина); получен мутантный штамм *Bacillus subtilis* 556, образующий до 55 г/л инозина. Бактерии *Bacillus pumilus* способны накапливать в среде 29,6 г/л инозина и (или) 4,2 г/л гуанозина. В Японии получен мутантный штамм *Bacillus subtilis*, накапливающий 10,4 г/л цитидина в культуральной жидкости.

Самым технологичным и доступным методом промышленного получения всех четырех нуклеозидов риборяда является гидролиз РНК.

Применение различных методов дает возможность получить гидролиз:

- ферментативный;
- кислотный;
- щелочной.

Кислотный гидролиз РНК в мягких условиях (рН 4) приводит к получению сложной смеси из-за сопутствующего разрыва гликозидной связи в пуриновых нуклеотидах. Гидролиз формиатом аммония осуществляют в жестких условиях (230°C). В щелочной среде образуется смесь нуклеотидов, нуклеозидов и олигонуклеотидов.

Наиболее приемлема разработанная в Республике Беларусь технология гидролиза РНК оксидом кальция. Процесс гидролиза РНК оксидом кальция осуществляют при температуре 130...135°C, давлении 0,2–0,3 МПа в течение 3 ч. В этих условиях РНК гидролизуются на 80–90%. При гидролизе образуется фосфат кальция, который выпадает в осадок и легко отделяется фильтрованием. Из полученного

гидролизата выделяют индивидуальные нуклеозиды. Гуанозин легко кристаллизуется при охлаждении гидролизатов и отделяется фильтрованием, затем гидролизат концентрируют упариванием под вакуумом при температуре не более 70°C и разделяют оставшиеся нуклеозиды ионообменной хроматографией на сильноосновном анионите АВ-17 в OH^- -форме.

Сорбированные на ионите нуклеозиды элюируются в виде фракций в такой последовательности: цитидин, аденозин, уридин. Цитидин легко элюируется дистиллированной водой. Аденозин также элюируется дистиллированной водой, но с очень малой скоростью: фракция имеет низкую концентрацию аденозина, и ее концентрируют на колонке с катионитом КУ-2-8. Цитидин элюируют 0,5 н. раствором уксусной кислоты. Каждую фракцию очищают обработкой активированным углем, кристаллизацией и перекристаллизацией с получением препаратов нуклеозидов марки «ч».

Расход технической РНК для получения 1 кг препарата аденозина составляет 8,45 кг; гуанозина – 6,00 кг; цитидина – 11,55 кг; уридина – 9,23 кг.

Технические препараты РНК производят из дрожжевой массы. Основная задача при этом – достичь высокого выхода РНК (85–90% от РНК, содержащейся в клетках дрожжей) при высоком содержании основного вещества в техническом препарате (не менее 75%).

Существуют различные методы выделения РНК из дрожжевой массы, но наиболее экономичным считают процесс экстракции РНК 10–12%-ным раствором NaCl в щелочной среде при температуре 100...110°C.

Лабораторная работа № 5

ВЫДЕЛЕНИЕ РНК ИЗ ДРОЖЖЕВОЙ МАССЫ

Цель работы: получение РНК из хлебопекарных дрожжей.

Реактивы, материалы и оборудование: хлебопекарные дрожжи, хлорид натрия, соляная кислота, ферментный препарат «Протосубтилин ГЗх», хлорид кальция, 30%-ный раствор гидроксида натрия, этанол; водяная баня, центрифуга, холодильник, сушильный шкаф, весы аналитические.

Порядок выполнения работы

1. Экстракция РНК из дрожжевой массы. 2. Очистка экстракта от растворенных белков термокоагуляцией. 3. Высаждение РНК из раствора. 4. Получение РНК из кальциевой соли.

1. Экстракция РНК из дрожжевой массы

В колбу вместимостью 250 мл помещают 40 г хлебопекарных дрожжей (75%-ной влажности), 0,8 г хлорида натрия и заливают 50 мл воды. Суспензию перемешивают, доводят рН до нужного значения (8,5–9,0) 30%-ным раствором гидроксида натрия и выдерживают на водяной бане при температуре 85...90°C в течение 40 мин.

Охлажденную до температуры 50...55°C суспензию центрифугируют для отделения дрожжевой массы.

2. Очистка экстракта от растворенных белков термокоагуляцией

В осветленный экстракт вводят раствор коагулянта (ферментного препарата «Протосубтилин ГЗх») из расчета 1 мл раствора на 100 мл экстракта. Раствор коагулянта готовят следующим образом: 1 г сухого порошка коагулянта растворяют в 20 мл воды. Экстракт с коагулянтом выдерживают при температуре 50...55°C в течение 1 ч при перемешивании. Затем проводят термообработку экстракта для повышения степени удаления растворенных белков. Для этого рН экстракта доводят раствором соляной кислоты до 3,8–4,2, нагревают на водяной бане до 80°C и без выдерживания охлаждают до 40°C. Скоагулированные белки отделяют центрифугированием.

3. Высаждение РНК из раствора

30%-ным раствором гидроксида натрия величину рН очищенного экстракта доводят до 6,9–7,2. В экстракт добавляют хлорид кальция из расчета 2,2 г CaCl_2 на 100 мл экстракта, перемешивают до полного растворения хлорида кальция и выдерживают на водяной бане 15–20 мин при температуре 70°C для формирования осадка кальциевой соли РНК. Суспензию охлаждают до 50...55°C и центрифугируют.

4. Получение РНК из кальциевой соли

Для выделения РНК из соли готовят воду, подкисленную соляной кислотой до рН 1,8–2,0 и охлажденную до температуры 1...5°C. Кальциевую соль РНК гомогенизируют с небольшим количеством холодной (1...5°C) кислой воды при соотношении влажная паста соли : вода, равном 2 : 1 по объему, перемешивают в течение 30 мин. Затем суспензию центрифугируют с получением пасты РНК.

Пасту промывают холодной водой в объемном соотношении паста : вода, равном 1 : 5, при перемешивании в течение 30 мин, отделяют РНК центрифугированием. Пасту промывают этанолом с расходом этанола по отношению к пасте 5 : 1 по объему при перемешивании в течение 20 мин, отделяют фильтрованием через предварительно взвешенный фильтр, сушат в сушильном шкафу при температуре 45...50°C и определяют массу сухого продукта. Рассчитывают выход продукта от сухой массы хлебопекарных дрожжей X , %, по формуле

$$X = \frac{m \cdot 100}{0,25a},$$

где m – количество сухой массы РНК, г; 0,25 – коэффициент пересчета навески влажной массы дрожжей (75%) на сухую массу; a – навеска хлебопекарных дрожжей, г.

V. ФЕРМЕНТНЫЕ ПРЕПАРАТЫ

Источниками ферментов являются растительные материалы – пророщенное зерно злаков (солод); органы и ткани животных – поджелудочная железа, слизистые оболочки желудков, сычуги крупного рогатого скота; а также микроорганизмы – бактерии, грибы, дрожжи, актиномицеты.

Согласно современной классификации, идентифицировано более 2000 ферментов. В промышленных условиях производят около 250 наименований ферментных препаратов, но 99% всей продукции приходится только на 18 ферментов. В мировой практике в наибольших масштабах производятся протеиназы и амилазы, широко используемые в качестве фармацевтических средств, улучшающих пищеварение. На их долю приходится до 65% общего объема выпуска ферментных препаратов.

Ферменты применяются в ряде отраслей: в фармацевтической – препараты, улучшающие пищеварение; в пищевой промышленности – пивоварении и виноделии, хлебопечении, сыроделии, производстве соков и глюкозофруктозных сиропов; в медицине – при лечении воспалительных процессов, ожогов, тромбозов; в аналитической химии; органическом синтезе; генетической инженерии.

В международной практике за стандартную единицу активности фермента принимают количество фермента, которое катализирует превращение 1 мкмоль субстрата за 1 мин в стандартных условиях. По требованиям стандарта активность определяют при температуре 30°C по начальной скорости реакции, остальные условия реакции индивидуальны для каждого фермента. Активность ферментного препарата выражают в условных единицах активности, приходящихся на 1 мл ферментного раствора или 1 г препарата. В производственной практике пользуются понятием «условная тонна ферментного препарата», под которой понимают 1 т товарного препарата со стандартной активностью.

Наибольший интерес в качестве источника ферментов представляют микроорганизмы, поскольку для них характерна высокая интенсивность функционирования ферментных систем при большой скорости прироста биомассы. Получение ферментных препаратов

из клеток микроорганизмов, и особенно из культуральной среды, намного экономичнее, чем из растительных и животных тканей. Некоторые ферменты обнаружены только у микроорганизмов: рацемазы; кератиназы, гидролизующие белки-кератины, входящие в состав волос, перьев, рогов и копыт; нитрогеназы, участвующие в восстановлении молекулярного азота до аммиака, и др. Некоторые микроорганизмы, способные расти при повышенной температуре (45...80°C), образуют термостабильные ферменты, сохраняющие активность при температуре более 70°C.

Многие микробные ферменты уникальны по своей активности в кислых и щелочных средах: кислые протеазы стабильны при pH 1,5–3,5, а щелочные проявляют высокую активность при pH больше 8,0. И, наконец, известно, что ферменты, катализирующие одну и ту же реакцию, но полученные из разных микроорганизмов, могут существенно различаться по свойствам.

Микроорганизмы способны синтезировать самые разнообразные ферменты: амилазные, протеолитические, пектолитические, целлюлолитические, липолитические и др. Основными поставщиками ферментов микробного происхождения являются грибы (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Rhizopus*). В последнее время все более широкое применение находят ферменты бактерий (*Bacillus*, *Escherichia*), дрожжей и дрожжеподобных грибов (*Candida*, *Endomycopsis*, *Saccharomyces*). Для промышленного получения ферментных препаратов используют как природные штаммы, так и мутанты. Микроорганизмы синтезируют комплекс ферментов с преимущественным накоплением какого-либо фермента, но среди мутантных штаммов имеются «моноферментные» продуценты, способные продуцировать преимущественно один определенный фермент.

В производственных условиях продуценты ферментов культивируют как глубинным, так и поверхностным методом. Независимо от способа культивирования продуцента характерным свойством многих ферментов является их индуцибельность. Индуктором биосинтеза ферментов чаще всего является субстрат, на который данный фермент действует, а также продукты частичного гидролиза или некоторые аналоги субстрата. Например, индуктором биосинтеза амилаз является крахмал, пектиназ – пектиновые вещества.

Ферментацию осуществляют в строго асептических условиях. Основными компонентами питательных сред при глубинном

культивировании продуцентов ферментов являются картофельный и кукурузный крахмал, кукурузная мука, кукурузный экстракт, макро- и микроэлементы. Одним из важнейших микроэлементов, стимулирующих образование протеиназ мицелиальными грибами, является цинк. При глубинном культивировании более отчетливо проявляется индуцибельность синтеза ферментов. Большинство ферментов являются экстрацеллюлярными продуктами и выделяются в окружающую жидкую среду. В мицелии остается, как правило, не более 10–15% от всех ферментов.

Оптимальное значение рН среды для биосинтеза ферментов зависит от особенностей продуцента, но имеются и общие закономерности. Грибы и дрожжи хорошо растут и образуют ферменты при рН среды 3,8–5,6, бактерии лучше всего развиваются при рН, близком к нейтральному (6,2–7,4). В зависимости от состава среды и продуктов метаболизма рН среды при ферментации может понижаться или повышаться. Уровень и скорость образования ферментов зависит от интенсивности аэрации ферментационной среды. В целом увеличение степени аэрирования среды приводит, как правило, к интенсификации биосинтеза ферментов и сокращению длительности культивирования.

Получение технических очищенных препаратов ферментов. Поверхностная культура содержит большое количество балластных веществ, поэтому из глубинных культур легче получить очищенные препараты ферментов. Но в этом случае выделять ферменты приходится из очень разбавленных растворов. Доля собственно ферментов составляет около 1% в поверхностных и не более 0,1% в глубинных культурах. На рис. 2 представлена принципиальная схема выделения и очистки ферментов из поверхностной и глубинной культур. В некоторых отраслях возможно использование неочищенных препаратов ферментов. Поверхностная культура нестабильна при хранении из-за повышенной влажности. Ее измельчают в дробилках до частиц размером 5–6 мм и высушивают в барабанных или конвейерных сушилках до влажности 10–12% при температуре теплоносителя 80...85°C. При этом материал не должен разогреваться до температуры более 40...42°C. Глубинная культура может быть использована в виде культуральной жидкости, освобожденной или неосвобожденной от взвешенных веществ. Такие простейшие препараты имеют марку Пх и Гх соответственно.

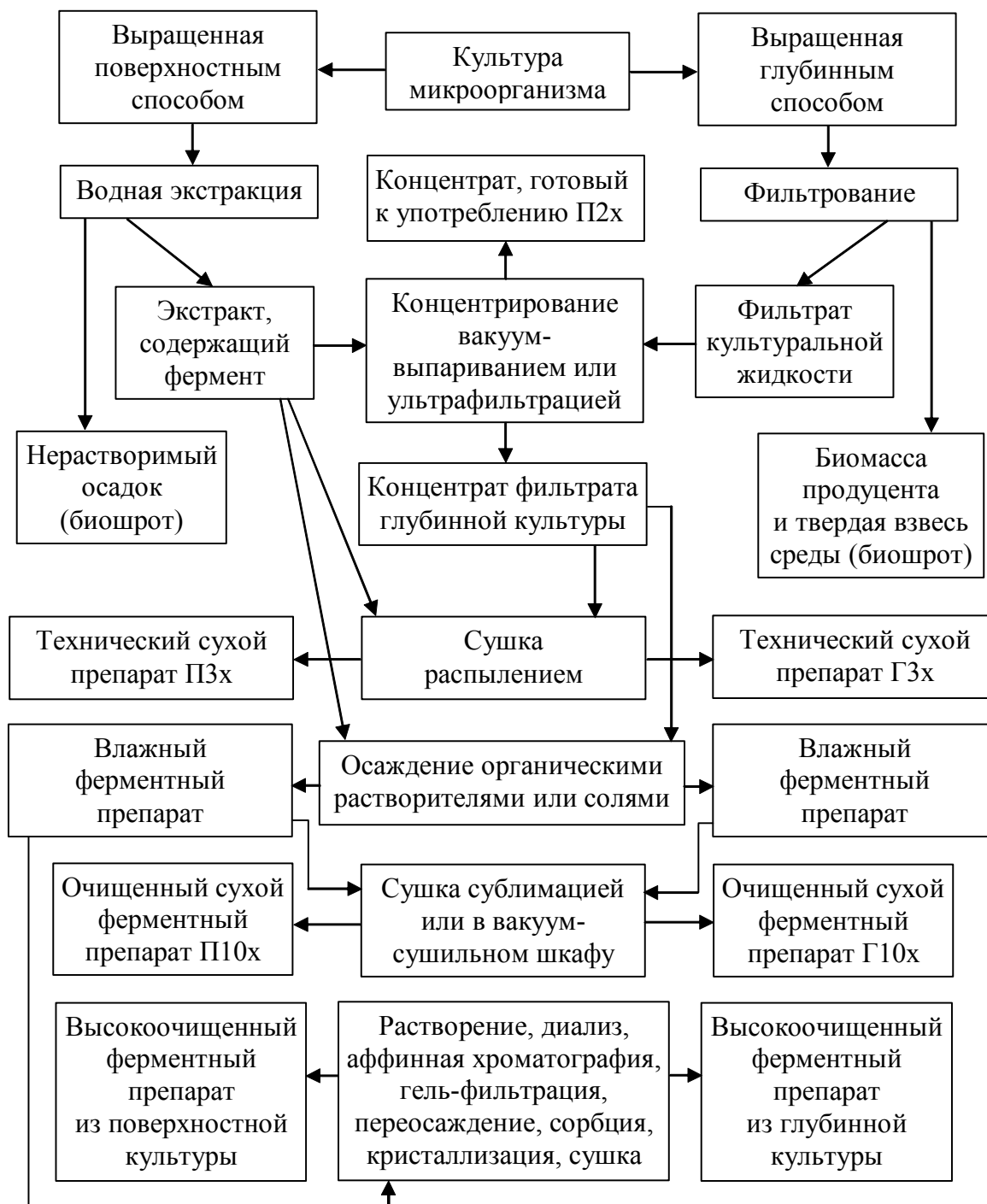


Рис. 2. Принципиальная схема получения технических и очищенных ферментных препаратов из культур микроорганизмов

Очищенные ферментные препараты получают из экстракта поверхностной культуры и фильтрата культуральной жидкости. Ферменты являются водорастворимыми белками и экстрагируются водой.

Для извлечения ферментов из дрожжей или бактерий необходимо предварительное разрушение клеточных стенок. Диффузионное сопротивление оболочек мицелия намного меньше, и дезинтеграция культур грибов не требуется.

Экстракт из поверхностной культуры грибов и фильтрат глубокой культуры нестабильны при хранении. Ферментные препараты для получения их товарных форм необходимо сконцентрировать.

Наиболее перспективный метод концентрирования ферментных растворов – ультрафильтрация, которую проводят при комнатной температуре, с малыми энергетическими затратами и при отсутствии тепловой инактивации фермента. Таким образом, ультрафильтрация позволяет сконцентрировать ферментный раствор и одновременно очистить его.

В производстве очищенных ферментных препаратов широко применяется метод осаждения ферментов из растворов органическими растворителями или (реже) высококонцентрированными растворами солей (высаливание). Эффект осаждения белков связан с тем, что органические растворители и ионы солей нарушают гидратную оболочку молекулы белка. При этом растворимость белков падает, происходит агрегирование и осаждение белковых молекул. Агрегирование белков осуществляется за счет электростатических и ван-дер-ваальсовых взаимодействий между белковыми молекулами.

В производстве для осаждения ферментов используют этанол, ацетон, изопропанол. Наиболее эффективен изопропанол. Белки осаждаются при сравнительно низкой концентрации изопропанола (52–53%), а препараты содержат меньше балластных веществ. Последовательным увеличением концентрации растворителя в растворе можно осуществить фракционирование ферментного комплекса. Например, при концентрации этанола 48–52% осаждается протеаза из раствора комплекса ферментов *Aspergillus oryzae*. После отделения осадка протеазы концентрацию этанола повышают до 70–74%, и в осадок выпадает амилаза.

При смешивании растворителя и водного раствора фермента выделяется тепло, и температура смеси повышается на 5...10°C. При температуре смеси 10...15°C наблюдается инактивация фермента. Причем имеет место не только термоинактивация. Повышение

температуры в присутствии растворителя приводит к нарушению структуры фермента и часто к изменению конформации активного центра с потерей ферментом каталитической активности. В связи с этим длительность контакта фермента с растворителем должна быть сведена до минимума. Оптимальная температура осаждения, равная 3...5°C, достигается охлаждением раствора фермента до 1...3°C, а растворителя – до –8...–10°C. Наиболее полно ферменты осаждаются при величине рН, близкой к изоэлектрической точке. Отклонение величины рН от данной точки снижает выход осадка и активность фермента.

Для высаливания ферментов часто используют сульфат аммония, реже хлорид натрия, сульфат цинка и другие соли. Осаждение проводят раствором с концентрацией соли 0,5–0,9 от полного насыщения. Осажденные ферментные препараты содержат 20–80% соли от массы осадка, что не всегда удовлетворяет потребителя. В отличие от растворителей, которые легко регенерируют ректификацией, регенерация соли представляет сложную задачу. Положительным фактором является то, что осадки, полученные при высаливании, содержат меньше балластных веществ и лучше растворяются в воде, что важно для их дальнейшей обработки.

В лабораторной практике при получении высокоочищенных ферментов применяют ряд других методов, перспективных для промышленного использования: ионообменную хроматографию, аффинную адсорбционную хроматографию, хроматографию на окрашенных адсорбентах (фермент проявляет сродство к красителю) и пр. Весьма эффективен для разделения и очистки ферментов в производственных условиях метод гель-фильтрации.

Завершает стадии выделения и очистки процесс сушки ферментных препаратов. Жидкие полупродукты сушат в распылительных сушилках в мягких условиях: температура теплоносителя на входе в сушилку не должна превышать 130°C, на выходе – 50...70°C. Снижает потери ферментативной активности при сушке введение в жидкий полупродукт наполнителя (например, NaCl). Влажные осадки высушивают в вакуумных сушильных камерах или в барабанных вакуум-сушилках, обогреваемых водой с температурой 50...60°C. Продолжительность сушки в этих аппаратах 10–14 ч.

Лабораторная работа № 6

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ – ПРОДУЦЕНТОВ ФЕРМЕНТОВ ПОВЕРХНОСТНЫМ СПОСОБОМ НА ТВЕРДЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ

Цель работы: изучение технологии получения ферментных препаратов поверхностным культивированием продуцентов и освоение методов определения активности ферментов.

Реактивы, материалы и оборудование: пшеничные отруби, древесные опилки, подсолнечная лузга, рисовая шелуха, свекловичный жом, солодовые ростки, ацетатный буфер (рН 4,7), фосфатный буфер (рН 7,3), оксид алюминия (или кварцевый песок); спектрофотометр.

Порядок выполнения работы

1. Получение посевного материала.
2. Стерилизация посуды.
3. Приготовление питательных сред.
4. Определение исходной влажности среды и расчет количества воды для увлажнения.
5. Засев питательной среды.
6. Культивирование продуцентов ферментов.
7. Определение выхода поверхностной культуры.
8. Экстракция ферментов из культуры.
9. Определение амилолитической активности.
10. Определение протеолитической активности.

1. Получение посевного материала

В качестве продуцентов ферментов применяют мицелиальные грибы *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus awamori* и др. Используют один из видов по указанию преподавателя.

Скошенную агаризованную среду (сусло-агар) в пробирках засевают густым штрихом, соблюдая правила асептики. Посевы инкубируют при температуре 30°C в течение 3–4 сут до обильного спорообразования. Полученная культура является посевным материалом для засева кювет. Качественный посевной материал не должен содержать посторонних микроорганизмов.

2. Стерилизация посуды

Вся посуда перед стерилизацией должна быть тщательно вымыта и высушена. Кювету в собранном виде вместе с крышкой и листом непроклеенной бумаги взвешивают. Для стерилизации необходимо завернуть в бумагу, не нарушив ее целостности, и аккуратно перевязать шпагатом следующие предметы: кювету, крышку для кюветы вместе с вырезанным по размерам крышки листом непроклеенной бумаги, низкий широкий сосуд вместимостью 1,5–2,0 л для увлажнения среды и ее засева, мерный цилиндр на 250 мл, стеклянную палочку или лопатку. Стерилизуют также 250 мл водопроводной воды.

Стерилизацию проводят в автоклаве при 120°C в течение 0,5 ч. После автоклавирования стерильную посуду подсушивают в сушильном шкафу при температуре 105°C.

3. Приготовление питательных сред

Питательную среду готовят на основе пшеничных отрубей с различными добавками: древесными опилками (до 30%), подсолнечной лузгой (до 30%), рисовой шелухой (30–50%) и др. Если компонент среды имеет крупные частицы, перед внесением в среду его измельчают. Вид добавки к пшеничным отрубям определяет преподаватель.

Среду заданного варианта готовят в количестве 40–50 г по воздушно-сухой массе. Компоненты среды взвешивают на технических весах и тщательно перемешивают.

30–40 г подготовленной среды (оставшаяся среда используется для дальнейших анализов) помещают в бумажный пакет и взвешивают с точностью до 0,1 г. Пакет со средой помещают в бикс и стерилизуют в автоклаве при температуре 120°C в течение 1 ч. Вследствие конденсации паров среда увлажняется. После стерилизации пакет с питательной средой взвешивают и определяют массу питательной среды после стерилизации (влажностью пакета пренебрегают).

4. Определение исходной влажности среды и расчет количества воды для ее увлажнения

Влажность приготовленной среды $w_{и}$, %, определяют в трех параллельных пробах после высушивания их до постоянной массы при температуре 105°C.

Для нормального развития продуцента и интенсивного образования ферментов среда должна иметь влажность 60%. Количество воды, которое необходимо добавить для увлажнения среды M , г, рассчитывают по формуле

$$M = \frac{m_{с.в} \cdot 100}{100 - 60} - m,$$

где $m_{с.в}$ – содержание абсолютно сухого вещества в исходной пробе, г; m – масса влажной питательной среды после стерилизации, г.

5. Засев питательной среды

Питательную среду засевают в боксе, который предварительно и после окончания работы стерилизуют ультрафиолетовым светом бактерицидных ламп в течение 2,5–3,0 ч. Работу выполняют с соблюдением правил асептики.

На столе, протертом спиртом, размещают всю необходимую стерильную посуду: кювету и крышку, обернутые в бумагу, сосуд для увлажнения, мерный цилиндр, стеклянную палочку, колбы с посевной культурой гриба и стерильной водой, пакет с питательной средой. Руки работающих должны быть защищены резиновыми перчатками, которые предварительно протирают этиловым спиртом (эту операцию выполняют вдвоем).

Увлажнение и засев среды осуществляют в следующем порядке. Осторожно, не до конца, разворачивают сосуд большого объема и высыпают в него питательную среду. Открытый край сосуда прикрывают стерильной бумагой. Разворачивают цилиндр и в непосредственной близости от пламени наливают в него рассчитанное количество воды. В пробирку с посевным материалом добавляют из цилиндра 6–8 мл стерильной воды, бактериологической петлей тщательно суспендируют конидии продуцента и вносят полученную суспензию в сосуд с питательной средой. Для более полного переноса конидиального материала из пробирки операцию повторяют. Затем содержимое сосуда тщательно перемешивают рукой в резиновой перчатке для равномерного увлажнения и распределения посевного материала по всей массе среды.

Засеянную среду переносят в предварительно взвешенную (вместе с крышкой и бумагой) стерильную кювету, равномерно распределяют в ней (не уплотняя) и закрывают кювету бумагой, затем крышкой.

6. Культивирование продуцентов ферментов

Культивирование гриба осуществляют при относительной влажности воздуха 95–100% и температуре $(28 \pm 2)^\circ\text{C}$ в течение 24 ч (до начала спороношения культуры). По истечении требуемого времени накопление ферментов в основном завершается. Готовую культуру помещают в целлофановый пакет и хранят в холодильнике при температуре $0\dots 2^\circ\text{C}$.

7. Определение выхода поверхностной культуры

По разности массы кюветы с готовой культурой и массы пустой кюветы и бумаги находят массу сырой готовой культуры m_k , г.

Культуру из кюветы переносят в широкий сосуд, тщательно измельчают и перемешивают рукой, защищенной резиновой перчаткой. Отбирают пробу для определения влажности культуры w_k , %, и высушивают в сушильном шкафу при температуре 105°C до постоянной массы.

Содержание сухого вещества в готовой культуре $m_{с.в.к}$, %, рассчитывают по формуле

$$M = \frac{m_k(100 - w_k)}{100},$$

где m_k – масса влажной культуры после выращивания, г; w_k – влажность выращенной культуры, %.

Выход культуры Y , %, рассчитывают по отношению к содержанию сухого вещества в исходной среде $m_{с.в}$:

$$Y = \frac{m_{с.в.к} \cdot 100}{m_{с.в}}.$$

8. Экстракция ферментов из культуры

Экстракцию ферментов осуществляют следующим образом. 10 г сырой культуры (влажностью 40–50%) или 5 г воздушно-сухой культуры (влажностью не более 12–14%) помещают в фарфоровую ступку. Отдельно в мерном цилиндре готовят 10%-ный буферный

раствор (10 мл соответствующего буфера и 90 мл дистиллированной воды). При определении активности амилолитического комплекса ферментов используют ацетатный буфер (рН 4,7), при определении активности протеолитического комплекса – фосфатный (рН 7,3).

Навеску культуры тщательно растирают пестиком с оксидом алюминия или кварцевым песком с 10–20 мл забуференной воды (10 мл буферного раствора и 90 мл дистиллированной воды) в течение 10–15 мин, затем выливают оставшуюся забуференную воду и перемешивают. Смесь выдерживают в термостате в течение 30 мин при температуре 30°C для более полной экстракции ферментов из культуры. По окончании экстракции смесь фильтруют через складчатый бумажный фильтр. Фильтрат является основным раствором, который применяют для определения ферментов.

9. Определение амилолитической активности

За единицу активности амилолитических ферментов принимают такое их количество, которое в точно установленных условиях температуры (30°C), рН (4,7 для грибных препаратов) и продолжительности действия (60 мин), катализирует гидролиз до декстринов 1 г растворимого крахмала. Амилолитическую активность определяют колориметрическим методом.

Реактивы: 1%-ный раствор крахмала (субстрат), ацетатный буферный раствор с рН 4,7; 0,1 н. раствор соляной кислоты, основной и рабочий растворы йода, основной и рабочий растворы культуры гриба.

Приготовление реактивов

1. *1%-ный раствор крахмала.* 1 г крахмала помещают в мерную колбу емкостью 100 мл, прибавляют 25 мл воды и перемешивают. Потом добавляют в колбу еще 25 мл воды, помещают колбу в кипящую водяную баню, непрерывно помешивая до полного растворения крахмала. Содержимое колбы охлаждают, добавляют 10 мл ацетатного буферного раствора с рН 4,7, объем жидкости доводят до метки дистиллированной водой и перемешивают содержимое колбы. Раствор крахмала готовят в день проведения опыта.

2. *Основной раствор йода.* 0,5 г йода и 5 г йодида калия растворяют в бюксе с притертой крышкой в малом количестве воды.

Содержимое осторожно перемешивают. После полного растворения йода раствор переносят в мерную колбу вместимостью 200 мл и доводят дистиллированной водой до метки. Основной раствор хранят в темноте и используют в течение месяца.

3. *Рабочий раствор йода.* 2 мл основного раствора разводят 0,1 н. раствором соляной кислоты в мерной колбе емкостью 100 мл. Перед применением рабочего раствора проверяют его экстинкцию (при длине волны 440 нм), пользуясь кюветами с толщиной поглощающего слоя 1 см. Экстинкция рабочего раствора йода должна находиться в пределах $0,22 \pm 0,01$. В случае отклонения от этой величины прибавляют несколько капель 0,1 н. раствора соляной кислоты или основного раствора йода.

4. *Рабочий раствор ферментов.* Основной раствор ферментов, полученный с использованием ацетатного буфера (рН 4,7), разбавляют дистиллированной водой для приготовления рабочего раствора в зависимости от активности культуры гриба. Требуемое количество основного раствора находят по табл. 3.

Таблица 3

Разбавление основного раствора в зависимости от активности культуры

Возможная амилолитическая активность культуры, ед./г	Требуемое количество основного раствора, мл	Общий объем разбавленного (рабочего) раствора, мл
5–15	15,0	100
16–50	4,0	100
51–100	1,0	100
101–150	1,0	200
151–300	0,5	200

Ход анализа

В две пробирки (диаметром 2 см и высотой 18 см) наливают по 10 мл 1%-ного раствора крахмала и выдерживают их в термостате при температуре 30°C в течение 5–10 мин. Затем, не вынимая пробирок из термостата, добавляют в первую 5 мл дистиллированной воды (контроль), в другую – 5 мл рабочего ферментного раствора (опыт). Содержимое пробирок перемешивают и выдерживают в термостате 10 мин.

Из контрольной и опытной реакционных смесей отбирают пробы по 0,5 мл и переносят их в отдельные колбы с 50 мл рабочего

раствора йода. После перемешивания содержимое контрольной колбы приобретает синюю окраску, опытной – фиолетовую. Интенсивность окраски зависит от количества негидролизованного крахмала.

Определяют экстинкцию растворов при длине волны 600 нм. В качестве раствора сравнения применяют дистиллированную воду. Разница между значениями экстинкции контрольного и опытного растворов соответствует количеству гидролизованного крахмала X , г, которое рассчитывают по формуле

$$X = \frac{0,1(D_1 - D_2)}{D_1},$$

где 0,1 – количество крахмала (субстрата), г; D_1 – экстинкция контрольного раствора; D_2 – экстинкция опытного раствора.

Если количество гидролизованного крахмала меньше 0,02 г или больше 0,07 г, то анализ повторяют. При этом для приготовления рабочего раствора фермента берут большее или меньшее количество основного раствора. Если количество гидролизованного крахмала находится в указанных пределах, полученные данные используют для расчета амилолитической активности E_a , ед./г:

$$E_a = \frac{(7,264X - 0,03766) \cdot 1000}{n},$$

где 7,264 и 0,03766 – эмпирические коэффициенты, полученные при математической обработке экспериментальных данных. В коэффициенты введен множитель для пересчета на 1 ч действия фермента; n – количество ферментного препарата, взятого для анализа, г.

Для получения статистически достоверных данных определение ферментативной активности в каждом эксперименте проводят не менее трех раз. По полученным значениям рассчитывают среднюю арифметическую величину активности.

10. Определение протеолитической активности

Применяют метод Лейлян – Фольгарда, основанный на гидролизе ферментами щелочных растворов казеина. Протеолитическая активность по этому методу выражается количеством миллилитров 0,1 н. раствора NaOH, который пошел на титрование соляной кислоты,

не связанной казеином в результате воздействия на него 1 г (или 1 мл) ферментного препарата в течение 1 ч при температуре 37...40°C.

Реактивы: 0,2 н. раствор HCl, 15%-ный раствор Na₂SO₄, 0,1 н. раствор NaOH; 1%-ный раствор крезолрота (индикатор), 5%-ный щелочной раствор казеина.

Приготовление реактивов

5%-ный щелочной раствор казеина. 5 г сухого казеина заливают в чашке небольшим количеством (30–40 мл) теплой воды и оставляют на 30 мин для набухания. Потом чашку помещают в водяную баню с температурой 60...70°C и при перемешивании добавляют небольшими порциями 5 мл 1 н. раствора NaOH, перемешивают до полного растворения казеина. Растворенный казеин количественно переносят в мерную колбу на 100 мл и доводят объем раствора до метки дистиллированной водой. Раствором казеина можно пользоваться на протяжении 2–3 дней при условии хранения его при температуре не выше 2...3°C.

Ход анализа

В две колбы вместимостью по 100 мл наливают по 20 мл 5%-ного раствора казеина, предварительно нагретого до температуры 37°C. В колбы добавляют по 10 мл ферментного экстракта, полученного с использованием фосфатного буфера. Из контрольной колбы быстро осаждают казеин 10 мл 0,2 н. раствора HCl и 10 мл 15%-ного раствора Na₂SO₄. В опытной колбе осаждение казеина проводят после выдержки его в термостате при температуре 37°C в течение 1 ч. Осадок отфильтровывают и отбрасывают.

Отбирают по 10 мл фильтрата, добавляют по 2 капли крезолрота и титруют 0,1 н. раствором NaOH до появления ярко-малиновой окраски.

Величину протеолитической активности $E_{\text{п}}$, ед./мл, рассчитывают по формуле

$$E_{\text{п}} = (a - a_{\text{к}})kP,$$

где a – количество 0,1 н. раствора NaOH, пошедшего на титрование опытной пробы, мл; $a_{\text{к}}$ – количество 0,1 н. раствора NaOH, пошедшего на титрование контрольной пробы, мл; k – поправка к титру щелочи; P – коэффициент, учитывающий разбавление и пересчет на 1 мл ферментной вытяжки (для данных условий опыта $P = 0,5$).

Лабораторная работа № 7

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ – ПРОДУЦЕНТОВ ФЕРМЕНТОВ ГЛУБИННЫМ СПОСОБОМ

Цель работы: освоение технологии получения ферментных препаратов глубинным культивированием продуцентов и методов определения активности ферментов в культуральной жидкости.

Реактивы, материалы и оборудование: свекловичный жом, свекловичный пектин, солодовые ростки, сульфат аммония, сульфат магния, кукурузный экстракт, соевая мука, кукурузная мука, кормовые дрожжи, карбонат кальция; качалка, центрифуга.

Порядок выполнения работы

1. Получение посевного материала. 2. Приготовление питательных сред. 3. Определение содержания аминного азота в среде. 4. Засев питательной среды. 5. Определение количества твердой фазы среды. 6. Определение количества сухой массы мицелия гриба. 7. Определение протеолитической активности ферментов в фильтрате культуральной жидкости. 8. Определение активности ферментов в мицелиальной массе гриба. 9. Расчет продуцирующей способности гриба.

В зависимости от вида продуцента и фермента, который им синтезируется, последний может накапливаться во внешней среде, либо внутри микробной клетки, или в клетке и среде одновременно. В связи с различной локализацией фермента выделение ферментных препаратов проводят из фильтрата культуральной жидкости или из биомассы продуцента.

1. Получение посевного материала

Для получения ферментов глубинным культивированием используют мицелиальные грибы *Aspergillus awamori*, *A. niger*, *A. oryzae*, *A. batatae*, *Trichoderma viride* (один из видов по указанию преподавателя).

Культуру гриба из коллекционной пробирки засевают на свежескошенный сусло-агар в пробирках, соблюдая правила асептики. Посевы инкубируют в термостате при температуре 30°C в течение 3–4 сут до обильного спороношения.

2. Приготовление питательных сред

Преимущественное накопление продуцентом в культуральной жидкости того или иного фермента обусловлено составом питательной среды. Используют один из вариантов сред, приведенных в табл. 4.

Таблица 4

Состав питательных сред для культивирования продуцентов ферментов

Компоненты питательной среды	Варианты питательных сред и содержание компонентов, %		
	1	2	3
<i>A. awamori, A. niger</i>			
Свекловичный жом	1,0	2,0	4,0
Свекловичный пектин	1,0	0,5	–
Солодовые ростки	3,0	2,0	1,0
Сульфат аммония	0,5	0,6	0,7
Сульфат магния	0,05	0,05	0,05
<i>A. oryzae, A. awamori</i>			
Кукурузный экстракт	0,3	0,4	0,3
Соевая мука	0,5	4,0	2,0
Кукурузная мука	2,0	–	2,0
Кормовые дрожжи	–	–	0,5
Карбонат кальция	0,1	0,2	0,2

Готовят 250 мл среды. При применении муки ее смешивают в соотношении 1 : 10 с водой и при непрерывном перемешивании заваривают на кипящей водяной бане.

Приготовленную среду охлаждают до температуры 40...45°C, контролируют рН (5,5–6,5). Среду при перемешивании разливают в 4 качалочные колбы вместимостью 250 мл (по 50 мл). Одновременно со средой стерилизуют две пробирки с 10 мл водопроводной воды. Стерилизацию проводят в автоклаве в течение 30 мин при температуре 120°C. В оставшейся среде определяют содержание аминного азота.

3. Определение содержания аминного азота в среде

Способ определения основан на способности аминокислот и пептидов образовывать комплексные растворимые соединения

с медью, которую определяют йодометрически после перевода в соли уксусной кислоты.

Реактивы: раствор тимолфталейна, 0,01 н. раствор тиосульфата натрия, 1%-ный раствор крахмала, насыщенный хлористым натрием; 1 н. раствор NaOH, 80%-ный раствор уксусной кислоты, йодид калия, суспензия ортофосфата меди.

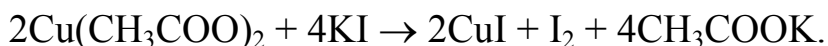
Приготовление реактивов

1. *Раствор тимолфталейна.* 0,25 г тимолфталейна растворяют в 100 мл 50%-ного этилового спирта.

2. *Суспензия ортофосфата меди.* Один объем раствора хлорида меди (27,3 г CuCl_2 в 1 л воды) добавляют к двум объемам раствора ортофосфата натрия (64,3 г Na_2HPO_4 растворяют в 500 мл воды, добавляют 7,2 г NaOH, доводят объем до 1 л) и тщательно перемешивают. Потом приливают два объема боратного буфера (57,21 г буры растворяют в 1,5 л воды, добавляют 100 мл 1 н. раствора HCl и доводят водой до 2 л). Суспензия не должна содержать свободной меди, поэтому ее нужно готовить по мере необходимости и хранить не более 2–3 дней.

Ход анализа

В мерную колбу вместимостью 25 мл вносят 1–2 мл исследуемой жидкости, добавляют 1–2 капли раствора тимолфталейна и по каплям – 1 н. раствор NaOH до слабо-голубого окрашивания. Затем в колбу приливают 10–15 мл суспензии ортофосфата меди и дистиллированную воду до метки. При этом в раствор переходят медные соли аминокислот. Колбу энергично встряхивают, после чего раствор центрифугируют или фильтруют. 5 или 10 мл прозрачного фильтрата отмеряют в колбу, подкисляют 0,25–0,50 мл 80%-ной уксусной кислоты и добавляют 0,2–0,4 г йодида калия. При этом протекает реакция



Йод оттитровывают свежеприготовленным 0,01 н. раствором тиосульфата натрия в присутствии крахмала (2–4 капли раствора) до исчезновения синей окраски.

Содержание аминного азота B , мг/л, рассчитывают по формуле

$$B = \frac{0,28V_2 \cdot 1000}{V_1},$$

где 0,28 – коэффициент, который учитывает соответствие 1 мл 0,01 н. раствора тиосульфата натрия 0,28 мг аминного азота; V_2 – количество 0,01 н. раствора тиосульфата натрия, пошедшего на титрование, мл; V_1 – количество фильтрата, взятого на титрование, мл.

4. Засев питательной среды

Засев питательной среды производят с соблюдением правил асептики в боксе, который предварительно и после окончания работы стерилизуют ультрафиолетовым светом бактерицидных ламп в течение 2,5–3,0 ч.

В пробирку с посевным материалом вносят 6–8 мл стерильной воды, бактериологической петлей тщательно суспендируют конидии продуцента и вносят полученную суспензию в колбу с питательной средой. Для более полного переноса конидиального материала из пробирки операцию повторяют. Посевным материалом из пробирок засевают питательную среду в трех колбах, четвертую применяют для определения количества твердой фазы среды. Культивирование осуществляют на качалке при температуре 30°C в течение 3 сут.

5. Определение количества твердой фазы среды

Питательную среду из четвертой колбы центрифугируют. Надосадочную жидкость декантируют, содержимое центрифужной пробирки переносят в бюкс с 10 мл 10%-ного раствора этилового спирта и высушивают до неизменной массы.

6. Определение количества сухой массы мицелия гриба

Культуральную жидкость из двух колб отдельно фильтруют под вакуумом через воронку Бюхнера, используя два высушенных до постоянной массы и взвешенных фильтра. Содержимое третьей колбы фильтруют через два слоя марли (мицелий гриба легко отделяется от марли). Во всех трех пробах фильтрата определяют значение рН.

Фильтры с осадками из первой и второй колб помещают в предварительно взвешенные чашки Петри и высушивают до постоянной

массы при температуре 105°C. Мицелий из третьей колбы будет использован в п. 8.

Количество сухой массы мицелия M , г/л культуральной жидкости, рассчитывают по формуле

$$M = [D - (a + b + c)] 20,$$

где D – масса чашки Петри с фильтром и биомассой, г; a – масса фильтра, г; b – масса чашки Петри, г; c – масса твердой фазы питательной среды (определена в п. 5), г; 20 – коэффициент пересчета на 1 л культуральной жидкости.

Рассчитывают среднее содержание биомассы мицелия из двух определений. Расчет проводят без учета влаги, которая выпаривается при стерилизации и культивировании, и предполагая, что твердые включения в среде не усваиваются в процессе роста микроорганизмов.

7. Определение протеолитической активности ферментов в фильтрате культуральной жидкости

Метод основан на определении свободных карбоксильных групп в спиртовых растворах аминокислот и полипептидов.

За единицу протеолитической активности принимают такое количество фермента, под действием которого образуется 1 мг аминного азота за 1 ч в принятых условиях опыта (субстрат – 5%-ный раствор желатина со значением рН 7,3–7,5, температура 40°C).

Реактивы: фосфатный буферный раствор со значением рН 7,3–7,5; 5%-ный раствор желатина, 1%-ный спиртовой раствор тимолфталейна, 0,1 н. раствор NaOH, 96%-ный раствор этилового спирта.

Приготовление реактивов

Раствор желатина. 5 г желатина замачивают в колбе в 20 мл дистиллированной воды в течение 20–30 мин. Набухший белок заливают 20–25 мл буферного раствора, нагретого до 70...80°C, и тщательно перемешивают стеклянной палочкой. Ту часть, которая растворилась, сливают в мерную колбу вместимостью 100 мл, к остатку снова прибавляют 20–25 мл буферного раствора и переносят полученный раствор в ту же колбу. Так повторяют до полного растворения желатина. Охлажденный раствор желатина доводят до метки

буферным раствором той же температуры. Готовый раствор желатина должен храниться в холодильнике при температуре 2...5°C и может быть использован для анализа в течение 2 сут. Перед опытом его нагревают до 40°C на водяной бане.

Ход анализа

К 10 мл 5%-ного раствора желатина со значением рН 7,3–7,5 приливают 2 мл анализируемого ферментного раствора и сразу же отбирают 1 мл реакционной смеси в коническую колбу вместимостью 50–100 мл, в которой находится 20 мл 96%-ного этилового спирта и 0,2 мл 1%-ного раствора тимолфталейна (контрольный опыт). Пробу сразу же титруют 0,1 н. раствором NaOH. После появления голубой окраски прибавляют еще 4 капли щелочи и титрование заканчивают (титруют из микробюретки с ценой деления 0,02 мл).

Остальную смесь желатина с ферментным раствором помещают в термостат с температурой 40°C для гидролиза. Через 3 ч отбирают 1 мл реакционной смеси в другую коническую колбу вместимостью 50–100 мл, в которой находится 20 мл 96%-ного этилового спирта и 0,2 мл 1%-ного раствора тимолфталейна и титруют аналогично контролю.

Расчет протеолитической активности ПС, ед./мл, проводят по формуле

$$\text{ПС} = \frac{AP}{t},$$

где A – количество аминного азота, накопленного в реакционной смеси за время опыта, мг; P – коэффициент, учитывающий разведение и пересчет на 1 мл ферментного раствора ($P = 6$ для данных условий опыта); t – время гидролиза, ч (3 ч).

Величину A рассчитывают по следующей формуле:

$$A = (a - a_k) \cdot 1,4K,$$

где a – количество 0,1 н. раствора NaOH, пошедшее на титрование 1 мл опытной пробы, мл; a_k – количество 0,1 н. раствора NaOH, пошедшее на титрование 1 мл контрольной пробы, мл; 1,4 – коэффициент пересчета количества 0,1 н. раствора щелочи в миллиграммах азота аминокислот и полипептидов; K – поправка к титру щелочи.

8. Определение активности ферментов в мицелиальной массе гриба

Готовят экстракт мицелия, в котором активность ферментов определяют так же, как и в фильтрате культуральной жидкости. Поскольку в мицелии обычно находится очень мало ферментов, для определения берут в 5–8 раз больше экстракта, чем при анализе фильтрата культуральной жидкости.

Для получения экстракта мицелий из третьей колбы (п. 6) промывают двумя порциями (по 20 мл) холодной (2...3°C) воды и переносят в фарфоровую ступку, где растирают в течение 15 мин с кварцевым песком (0,2–0,3 г) и дистиллированной водой (30 мл) с температурой 30°C. Затем содержимое ступки переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл, настаивают 15–20 мин при температуре 30°C, охлаждают до 20°C и доводят дистиллированной водой до метки. В результате этих операций извлекают ферменты из мицелия гриба. Содержимое мерной колбы тщательно перемешивают и фильтруют. Фильтрат употребляют для определения активности ферментов.

9. Расчет продуцирующей способности гриба

Продуцирующая способность (ПС) биомассы микроорганизма – это количество единиц активности ферментов, которое при данных условиях способен синтезировать 1 г биомассы микроорганизма (в пересчете на сухую массу). Для расчета ПС необходимо знать: сумму единиц ферментативной активности во всем мицелии – $\sum \Phi A_m$; сумму единиц ферментативной активности во всем объеме фильтрата культуральной жидкости – $\sum \Phi A_\phi$ с учетом потерь (объем фильтрата составляет $(50 \cdot 0,93)$ мл, где 0,93 – коэффициент, учитывающий все виды потерь); сухую массу мицелия во всем объеме культуральной жидкости – B_m , г. Тогда формула для расчета ПС гриба имеет следующий вид:

$$ПС = \frac{\sum \Phi A_m + \sum \Phi A_\phi}{B_m}$$

Кроме того, рассчитывают процентное содержание ферментативной активности в фильтрате культуральной жидкости и мицелии по отношению к общей сумме единиц ферментативной активности в культуре.

VI. ОРГАНИЧЕСКИЕ КИСЛОТЫ

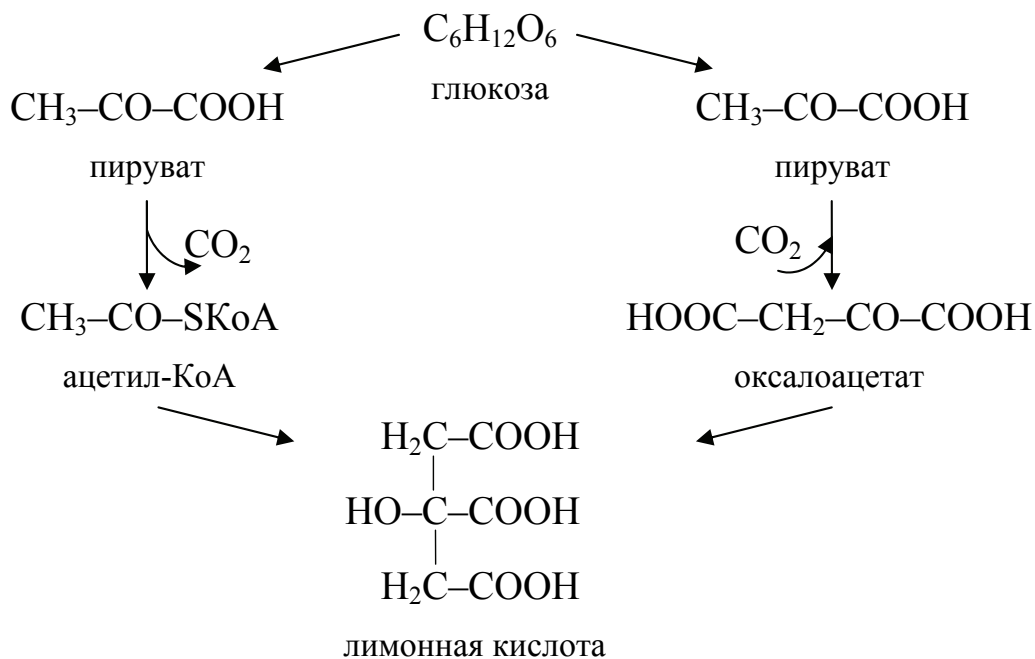
Микробиологическим синтезом получают различные органические кислоты: лимонную, уксусную, итаконовую, молочную, глюконовую, янтарную и другие, из которых в наибольших масштабах в мировой практике производят лимонную кислоту (около 400 тыс. т в год). Она широко применяется в пищевой, фармацевтической, текстильной (при окраске тканей) и химической промышленности.

В природе лимонная кислота в значительных количествах содержится в цитрусовых. Способность к образованию лимонной кислоты на углеводных средах широко распространена среди мицелиальных грибов. Чаще всего в качестве продуцента лимонной кислоты в промышленных условиях используют мутантные штаммы *Aspergillus niger*.

Биосинтез лимонной кислоты связан с функционированием цикла Кребса: лимонная кислота образуется в результате конденсации оксалоацетата и ацетил-КоА в присутствии цитратсинтазы. Необходимые для реакции оксалоацетат и ацетил-КоА образуются из двух молекул пирувата, одна из которых подвергается декарбоксилированию с образованием ацетил-КоА, вторая – карбоксилируется, образуя оксалоацетат.

Сверхсинтез лимонной кислоты мицелиальными грибами обеспечивается лимитированием роста грибов одним или несколькими минеральными компонентами среды (Fe, Mn, N, P), избыточным содержанием источника углерода и низкой величиной рН ферментационной среды. Гриб прекращает рост после полного поглощения из среды дефицитного элемента, но продолжает потреблять имеющийся в среде источник углерода. В клетках гриба накапливается лимонная кислота, которая не может метаболизироваться в цикле трикарбоновых кислот из-за ингибирования ряда ферментов (аконитазы, изоцитратдегидрогеназы и др.) и выделяется в окружающую среду.

Посевной материал *Aspergillus niger* получают в виде конидий. В производственных условиях посевной материал накапливают в кюветах площадью 10–12 дм² на агаризованной среде следующего состава: пивное сусло, разбавленное до 7% по сахарометру; 1–2% NaCl, 0,1% мочевины, 0,001 мг% CuSO₄, 2–3% агара.



При производстве лимонной кислоты применяют поверхностное или глубинное культивирование гриба-продуцента на мелассной среде. Меласса содержит большое количество микроэлементов (прежде всего железа), которые затормаживают кислотообразование. Поэтому мелассу обрабатывают желтой кровяной солью $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ при кипячении раствора в течение часа. В результате соли железа и других тяжелых элементов осаждаются и удаляются из раствора, раствор стерилизуется. При поверхностном культивировании гриба *Aspergillus niger* Р-3 используют раствор мелассы с содержанием сахарозы 13–15%.

Максимальный рост мицелия гриба достигается на четвертые сутки культивирования. Мицелий гриба в виде прочной пленки покрывает всю поверхность раствора. В процессе ферментации происходит постепенное нарастание общей кислотности. Начальное значение рН среды 6,8–7,0 снижается в течение первых трех суток до 4,5, а к концу процесса – до 3,0. Максимальная активность кислотообразования пленки гриба наблюдается на 5–6-е сут (около 100 г кислоты на 1 м² пленки в час) и далее сохраняется на высоком уровне (50–60 г/(м²·ч)).

Ферментацию прекращают при содержании сахара в растворе 1–2%. Общая кислотность ферментационного раствора достигает 20%. Кроме лимонной кислоты в культуральной жидкости присутствуют глюконовая, щавелевая и некоторые другие кислоты. На долю

лимонной кислоты приходится 90–98% от всех органических кислот в растворе. Выход лимонной кислоты от сахарозы составляет 68–80%.

После слива культуральной жидкости под пленку гриба для промывки подают горячую воду. Кислую промывную воду присоединяют к основному раствору. Мицелий после высушивания используют в качестве кормовой добавки.

При глубинном способе культивирования продуцентов лимонной кислоты применяют специально отселекционированные природные штаммы или мутанты *Aspergillus niger*. Штаммы, используемые в качестве продуцентов при поверхностном культивировании, непригодны.

Несмотря на общие преимущества глубинного способа, производство лимонной кислоты поверхностным культивированием продуцента является более экономичным: энергетические затраты и себестоимость продукта значительно ниже. На практике в промышленном производстве лимонной кислоты применяют оба метода.

С помощью микроорганизмов можно получать более 50 различных органических кислот. В промышленных масштабах микробиологическим синтезом производят в настоящее время шесть кислот: лимонную, итаконовую, глюконовую, 2-кетоглюконовую, уксусную, молочную. Микробиологические способы получения органических кислот основаны на неполном окислении соединений углерода в аэробных условиях. Исключением является молочная кислота, которую получают в результате сбраживания среды на основе мелассы с помощью термофильных бактерий *Lactobacillus delbrückii* при температуре 50°C.

Лабораторная работа № 8

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МИКРОСКОПИЧЕСКОГО ГРИБА С ЦЕЛЮ ПОЛУЧЕНИЯ ЛИМОННОЙ КИСЛОТЫ

Цель работы: выращивание продуцента лимонной кислоты поверхностным способом и анализ сброженного раствора на содержание органических кислот.

Реактивы, материалы и оборудование: меласса, сахароза, глюкоза, желтая кровяная соль, хлорид аммония, дигидрофосфат калия, сульфат цинка, оксалат аммония, карбонат кальция, 1 н. раствор NaHCO_3 , 1 н. раствор H_2SO_4 , 0,25 н. раствор NaOH , 10%-ный

раствор $K_4[Fe(CN)_6]$, 1%-ный раствор NH_4Cl , 1%-ный раствор KH_2PO_4 , 1%-ный раствор $ZnSO_4$, 11,1%-ный раствор $CaCl_2$, 1%-ный раствор $AgNO_3$, 0,1 н. раствор $KMnO_4$, 10%-ный раствор HCl , 10%-ный раствор H_2SO_4 , 5%-ный раствор NH_4Cl ; вакуум-фильтр.

Порядок выполнения работы

1. Приготовление, стерилизация и засев питательной среды.
2. Отделение сброженного раствора от пленки.
3. Определение общей титруемой кислотности в сброженном растворе и суточного съема кислоты.
4. Определение содержания лимонной, щавелевой и глюконовой кислот.
5. Определение сухой массы мицелия и расчет его продуцирующей способности по лимонной кислоте.

1. Приготовление, стерилизация и засев питательной среды

Для поверхностного выращивания гриба *Aspergillus niger* в лабораторных условиях применяют высокие цилиндрические стаканы вместимостью 700–800 мл. Размер стакана должен быть таким, чтобы среда объемом 400 мл занимала по высоте не менее 8–10 см, т. е. площадь дна стакана должна быть $0,004 \text{ м}^2$.

Для культивирования гриба *Aspergillus niger* используется один из вариантов питательной среды, представленных в табл. 5. Мелассу разбавляют в три раза кипящей водопроводной водой и кипятят раствор 10 мин. Определяют рН раствора и при необходимости корректируют до величины 6,8–7,2.

Таблица 5

Состав сред для культивирования гриба *Aspergillus niger*

№ варианта	Содержание источника углерода в среде			Количество 10%-ного раствора $K_4[Fe(CN)_6]$, мл
	сахароза мелассы, %	сахароза, %	глюкоза, %	
1	17,0	–	–	5,00
2	13,6	3,4	–	4,00
3	8,5	8,5	–	2,25
4	3,4	13,6	–	1,00
5	–	17,0	–	0,25
6	13,6	–	3,4	4,00
7	8,5	–	8,5	2,25
8	–	–	17,0	0,25

В мелассный раствор в соответствии с вариантом среды вносят навеску сахарозы или глюкозы, раствор тщательно перемешивают и доводят его объем до 400 мл. В вариантах 5 и 8 навеску сахарозы растворяют в горячей воде и объем раствора доводят до 400 мл. В приготовленный раствор вносят питательные соли: 10%-ный раствор $K_4[Fe(CN)_6]$ и 2,1 мл смеси 1%-ных растворов NH_4Cl , KH_2PO_4 и $ZnSO_4$, взятых в соотношении 1 : 1 : 1.

Готовую питательную среду кипятят в стакане 10–15 мин, затем стакан закрывают и автоклавируют при температуре $120^\circ C$ в течение 30 мин.

Стерильную питательную среду засевают спорным материалом или суспензией конидий, полученной смывом с поверхности скошенной агаризованной среды, с соблюдением условий асептики и инкубируют при температуре $32...34^\circ C$ в течение 7–8 сут.

В первые 2–3 сут культивирования на поверхности раствора образуется складчатая пленка, покрытая беловато-серым пушком. На 6–7 сут наблюдается спорообразование, и поверхность пленки покрывается конидиями черного цвета.

2. Отделение сброженного раствора от пленки

Сброженный раствор сливают из-под пленки в мерный цилиндр вместимостью 500 мл. Затем пленку переворачивают и дважды промывают 30–35 мл кипящей воды, присоединяя промывные воды к сброженному раствору. Замеряют общий объем жидкости V , мл, и применяют раствор для дальнейших анализов. Промытую пленку используют для определения сухой массы мицелия гриба (п. 5).

3. Определение общей титруемой кислотности в сброженном растворе и суточного съема кислоты

Отбирают 5 мл раствора, разбавляют дистиллированной водой до 150 мл, добавляют 3–4 капли фенолфталеина и титруют 0,25 н. раствором $NaOH$. Концентрацию кислот в пересчете на лимонную кислоту X , %, рассчитывают по следующей формуле:

$$X = \frac{FA \cdot 100}{5},$$

где F – фактор щелочи по лимонной кислоте (1 мл 0,1 н. NaOH соответствует 0,007 г лимонной кислоты); A – количество щелочи, пошедшее на титрование, мл.

Общее содержание кислот C_k , г, в пересчете на лимонную кислоту определяют по формуле

$$C_k = \frac{FAV}{5}.$$

При использовании 0,25 н. раствора NaOH фактор щелочи по лимонной кислоте F пересчитывают следующим образом:

$$F = \frac{0,007 \cdot 0,25}{0,1} = 0,0175 \text{ г},$$

т. е. 1 мл 0,25 н. раствора NaOH соответствует 0,0175 г лимонной кислоты.

Зная количество кислоты в сброженном растворе, определяют съём кислоты (г) с 1 м² площади грибной пленки за одни сутки процесса $C_{уд}$, г/(м²·сут):

$$C_{уд} = \frac{C}{sn},$$

где s – площадь дна стакана, м²; n – длительность культивирования, сут.

4. Определение содержания лимонной, щавелевой и глюконовой кислот

Отдельное определение кислот основано на различной растворимости их кальциевых солей в воде и слабокислом растворе. Цитрат кальция очень слабо растворим в горячей воде и хорошо растворим в разбавленной соляной кислоте. Оксалат кальция практически нерастворим ни в воде, ни в слабом растворе соляной кислоты. Глюконат кальция хорошо растворим в воде.

4.1. Определение суммы лимонной и щавелевой кислот

Для анализа берут такое количество раствора, чтобы в нем содержалось не менее 1 г и не более 2 г кислоты. Приливают 11,1%-ный раствор хлористого кальция так, чтобы на 1 г общего содержания кислоты приходилось 9 мл раствора хлористого кальция. Практически берут полуторный избыток хлористого кальция (13,5 мл).

Раствор нагревают до кипения, нейтрализуют 10%-ным раствором аммиака по фенолфталеину, кипятят 10 мин и оставляют на 30 мин на водяной бане. Цитрат и оксалат кальция выпадают в осадок, а глюконат кальция остается в растворе.

Горячий раствор фильтруют и осадок промывают 30–40 мл горячей воды для удаления ионов хлора. Учитывая, что растворимость цитрата кальция в горячей воде составляет 0,055% в пересчете на лимонную кислоту, объем фильтрата и промывных вод измеряют и вносят поправку при расчетах результатов анализа.

Осадок цитрата и оксалата кальция растворяют в 10%-ной соляной кислоте. Раствор количественно переносят в мерную колбу вместимостью 1 л, объем доводят до метки дистиллированной водой и после перемешивания отбирают 100 мл раствора в химический стакан. Раствор нагревают до кипения и осаждают кальций насыщенным кипящим раствором оксалата аммония (10–15 мл), нейтрализуя аммиаком по фенолфталеину. Раствор кипятят 10 мин, охлаждают и фильтруют. Осадок промывают холодной водой до отрицательной реакции на хлор, растворяют в 10%-ной серной кислоте (20–25 мл), нагревают до температуры 80°C и титруют щавелевую кислоту 0,1 н. раствором перманганата калия.

Сумму лимонной и щавелевой кислот X_1 , %, рассчитывают по формуле

$$X_1 = \frac{(0,007\Pi_1 \cdot 10 + V_1 \cdot 0,00055) \cdot 100}{Q_1},$$

где 0,007 – количество лимонной кислоты, которое соответствует 1 мл 0,1 н. раствора перманганата калия, г; Π_1 – объем раствора перманганата калия, который пошел на титрование, мл (в пересчете на 0,1 н.); V_1 – объем фильтрата и промывных вод, мл; Q_1 – объем раствора, взятого на анализ, мл.

4.2. Определение щавелевой кислоты

Количество раствора для анализа и количество хлористого кальция берут такие же, как и для определения суммы лимонной и щавелевой кислот.

К опытному раствору прибавляют 11,1%-ный раствор хлористого кальция, кипятят 10 мин и оставляют на 30 мин на водяной бане (если осадок не выпадет, выдерживают еще 1 ч). Охлажденный

раствор фильтруют. Осадок промывают холодной водой до отрицательной реакции на хлор, растворяют в 10%-ной серной кислоте, затем нагревают до температуры 80°C и титруют 0,1 н. раствором перманганата калия.

Содержание щавелевой кислоты X_2 , %, рассчитывают по формуле

$$X_2 = \frac{0,007\Pi_2 \cdot 100}{Q_2},$$

где Π_2 – объем раствора перманганата калия, который пошел на титрование, мл; Q_2 – объем раствора, взятого на анализ, мл.

Содержание лимонной кислоты X_3 , %, рассчитывают по формуле

$$X_3 = X_1 - X_2.$$

Количество лимонной кислоты во всем растворе C , г, составляет

$$C = \frac{VX_3}{100},$$

где V – общий объем культуральной жидкости, мл (п. 3).

4.3. Определение глюконовой кислоты

Для анализа берут такой же объем раствора, как и при определении суммы лимонной и щавелевой кислот. Добавляют углекислый кальций из расчета 0,78 г на 1 г лимонной кислоты, которая определяется по общей кислотности. После осаждения пены раствор кипятят 10 мин и проверяют реакцию по лакмусовой бумаге. В случае кислой реакции раствор кипятят еще несколько минут, а если этого недостаточно, то добавляют немного карбоната кальция и снова кипятят, пока раствор не станет давать нейтральную реакцию на лакмус. Потом вносят 1–2 мл 5%-ного хлорида аммония и ставят на 30 мин на водяную баню. Цитрат и оксалат кальция выпадают в осадок, вместе с которым осаждаются избыток кальция в виде мела. В растворе остается глюконовоокислый кальций и небольшое количество цитрата кальция (он слабо растворим в воде). Горячий раствор фильтруют, осадок промывают горячей водой до отрицательной реакции на хлор.

Глюконовую кислоту в отфильтрованном растворе определяют по кальцию, вычитая кальций, связанный с лимонной кислотой. Объем фильтрата и промывных вод замеряют и вносят поправки на растворимость цитрата кальция. Потом раствор нагревают до кипения и осаждают кальций кипящим насыщенным раствором щавелевокис-

лого аммония (10–15 мл). Раствор кипятят 10 мин, охлаждают, фильтруют и осадок промывают водой до отрицательной реакции на хлор. Осадок растворяют в 20–25 мл 10%-ной серной кислоты, нагревают до температуры 80°C и титруют 0,1 н. раствором перманганата калия. Содержание глюконовой кислоты X_4 , %, эквивалентное количеству лимонной кислоты, рассчитывают по формуле

$$X_4 = \frac{(0,007\Pi_3 - V_2 \cdot 0,00055) \cdot 100}{Q_3},$$

где Π_3 – объем раствора перманганата калия, который пошел на титрование, мл; V_2 – объем фильтрата и промывных вод, мл; Q_3 – объем раствора, взятого на анализ, мл.

Общее количество трех кислот (щавелевой и глюконовой в пересчете на эквивалентное количество лимонной кислоты) должно равняться общей кислотности, которая определена в сброженном растворе титрованием. Однако в сброженных мелассных растворах, кроме свободных кислот, содержатся их кальциевые соли, поэтому сумма трех кислот по анализу превышает общую титруемую кислотность.

5. Определение сухой массы мицелия и расчет его продуцирующей способности по лимонной кислоте

Пленку гриба, оставшуюся в стакане, не нарушая ее целостности, переносят на большую воронку Бюхнера с бумажным фильтром. Сверху пленку прикрывают 2–3 бумажными фильтрами и подсушивают под вакуумом 10–15 мин. Потом пленку помещают в высушенный до постоянной массы двойной бумажный пакет и высушивают в сушильном шкафу до постоянной массы.

По сухой массе мицелия B_m , г, рассчитывают его продуцирующую способность ПС, г/г:

$$ПС = \frac{C \cdot 100}{B_m}.$$

В 400 мл исходной питательной среды содержится 17%, или $0,17 \cdot 400 = 68$ г сахара. Выход лимонной кислоты от сахара среды X_4 , %, составляет

$$X_4 = \frac{C \cdot 100}{68}.$$

VII. МИКРОБНЫЕ ПОЛИСАХАРИДЫ

Полисахариды микроорганизмов чрезвычайно разнообразны, большинство из них имеет уникальную структуру, специфическую для вида или серологической группы вида. Большая часть микробных полисахаридов представлена гетерополимерами, построенными из молекул сахаров и урановых кислот. В соответствии с локализацией полисахариды микроорганизмов делят на внутриклеточные и внеклеточные (экзопалисахариды). Последние находят более широкое применение и производятся в больших масштабах.

Использование полисахаридов в медицине определяется их биологической активностью: повышают устойчивость организма к бактериальным и вирусным инфекциям, обладают противоопухолевой активностью, способствуют заживлению ран и регенерации тканей, устраняют болевой синдром, снижают побочное действие лекарственных препаратов и рентгенотерапии.

Гетерополисахаридный комплекс с липидами (продигиозан), выделенный из клеток *Serratia marcescens*, и препарат из оболочек клеток *Saccharomyces cerevisiae* (зимозан) нормализуют сдвиги в иммунобиологических реакциях, оказывают положительное действие при лечении опухолей, инфекционных заболеваний. Полисахариды, обладающие антигенной специфичностью, находят применение в качестве диагностических средств. Например, полисахаридные препараты патогенных и условно-патогенных видов дрожжей рода *Candida* облегчают диагностику заболеваний кандидозной природы. Очищенные специфические полисахариды менингококков используются для получения менингококковых вакцин.

Нейтральные декстраны, продуцируемые *Leuconostoc mesenteroides*, широко употребляются в качестве заменителей плазмы крови. Перспективны как плазмозаменители пуллулан, леваны, синтезируемые *Gluconobacter oxydans*, *Bacillus polymyxa*. Сульфаты декстрана обладают антикоагулирующим действием, заменяют гепарин и могут применяться как антитромбогенное средство. В качестве антикоагулятора перспективен также хитин.

Широкое использование микробных полисахаридов в фармацевтической, парфюмерной, пищевой и других отраслях промышленности

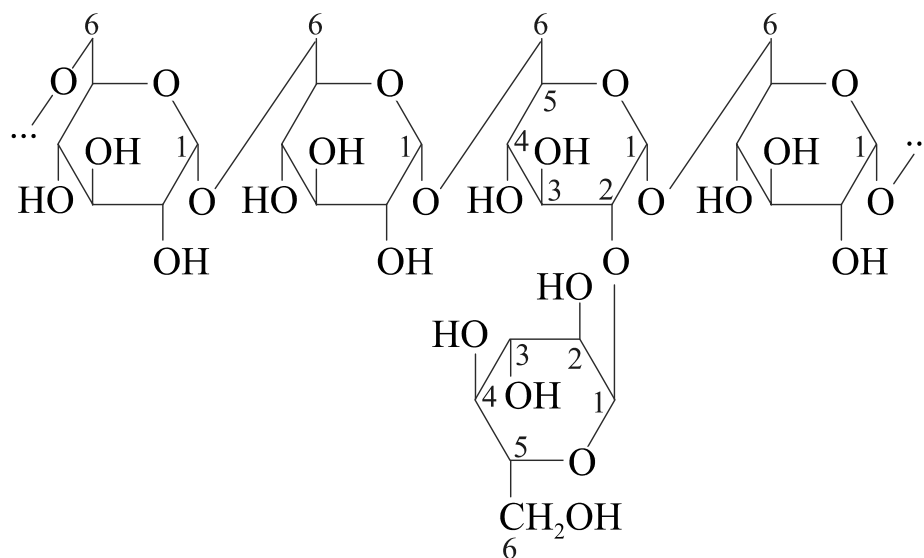
определяется их свойствами: вязкостью, реологическими характеристиками, способностью к набуханию и взаимодействию с определенными структурами. В фармацевтике они употребляются в качестве основы для изготовления лекарственных форм: как мягчители, эмульгаторы и стабилизаторы суспензий, как склеивающие агенты и разрыхлители в мазях, пилюлях, таблетках. Они обеспечивают длительную устойчивость лекарственных препаратов, стабилизируют и пролонгируют их действие. Конъюгаты модифицированных декстранов с ферментами, например, продлевают время сохранения активности ферментов и снижают их аллергизирующее действие.

На основе декстранов получают сефадексы, широко применяемые в лабораторной практике для гельфильтрации.

Производство различных полисахаридов не универсально. Для каждого гликана оно имеет свои особенности, определяемые физиологией продуцента, локализацией и физико-химическими свойствами полимера, областью его использования. Влияние кислотности среды, уровня аэрации и температуры на биосинтез полисахаридов очень разнообразно.

Большинство микроорганизмов синтезирует полисахариды из всех источников углерода, обеспечивающих их рост, – углеводов, спиртов, карбоновых кислот, аминокислот, углеводородов, C1-соединений. Некоторые микроорганизмы образуют гликаны лишь при применении определенных источников углерода. Например, *Leucostoc mesenteroides* растет, потребляя различные углеводы, но синтезирует декстран только на средах с сахарозой. Моносахаридный состав гликанов микроорганизмов не меняется в зависимости от источника углерода. В ряде случаев для максимального образования полисахарида требуется более высокая концентрация источника углерода в среде, чем для накопления биомассы. Обычно синтезу полисахаридов благоприятствует избыток углерода в среде при некотором дефиците азота и фосфора. Повышенные концентрации азота и фосфора часто отрицательно сказываются на синтезе полисахаридов.

Декстран – первый микробный экзополисахарид, полученный в промышленности. Он представляет собой гомополисахарид, построенный из α -D-глюкопиранозных остатков, соединенных главным образом α -1,6-связями.



Разветвления в молекуле декстранов образуются с помощью α -1,2-, α -1,3- и α -1,4-связей. Боковые ветви молекулы состоят обычно из одного или двух остатков глюкозы, реже встречаются более длинные боковые цепи.

Продуценты декстрана *Leuconostoc dextranicum*, *Leuconostoc mesenteroides* и другие образуют в больших количествах декстран-сахаразу, индуцируемую субстратом. Это грамположительные, неспорообразующие, неподвижные, гетероферментативные, факультативно-анаэробные бактерии. Они расщепляют сахарозу на глюкозу и фруктозу. Фруктоза сбраживается по типу гетероферментативного молочнокислого брожения с образованием молочной и уксусной кислот, маннита и CO_2 . Глюкоза полимеризуется в декстран. Образование декстрана происходит с высокой скоростью, продукт можно выделить уже через 24 ч.

Декстран образуется внеклеточно из сахарозы. Декстраны имеют молекулярную массу от 15 до 15 000 кДа. Молекулярная масса определяется концентрацией сахарозы и температурой процесса. При высокой концентрации сахара образуются низкомолекулярные декстраны. При небольшой концентрации сахара (10%), температуре 15°C и значении рН 5,0 получают декстраны с молекулярной массой около 100 кДа.

Декстран извлекают из культуральной жидкости, осаждая органическим растворителем (этанолом), что уменьшает вероятность разрушения и модификации полимера.

Лабораторная работа № 9

МИКРОБНЫЙ СИНТЕЗ ПОЛИСАХАРИДОВ

Цель работы: ознакомление с процессами микробиологического синтеза полисахарида, выделения его из КЖ, гидролиза и фракционирования полученного декстрана по молекулярной массе с оценкой выхода декстрана.

Реактивы, материалы и оборудование: сахароза (глюкоза), пептон, дигидрофосфат калия, гидрофосфат натрия, хлорид аммония, хлорид калия, сульфат магния, *n*-аминобензойная кислота, соль Мора, этанол, 2 н. раствор гидроксида натрия, 2 н. раствор соляной кислоты; качалочные колбы вместимостью 250 мл, водяная баня, центрифуга.

Порядок выполнения работы

1. Получение посевного материала продуцента декстрана. 2. Приготовление питательной среды и микробиологический синтез полисахарида. 3. Выделение нативного декстрана из культуральной среды. 4. Гидролиз декстрана. 5. Фракционирование декстрана по молекулярной массе. 6. Определение средней молекулярной массы фракций декстрана. 7. Определение выхода декстрана.

1. Получение посевного материала продуцента декстрана

В качестве продуцента декстрана применяют молочнокислые бактерии *Leuconostoc mesenteroides*. Исходную культуру засевают штрихом в две пробирки со скошенной плотной средой (ПА). Посевы инкубируют при температуре 30°C в течение 24 ч и используют для засева качалочных колб.

2. Приготовление питательной среды и микробиологический синтез полисахарида

Для биосинтеза полисахаридов используют питательную среду следующего состава (г/л): сахароза (или глюкоза) – 150; пептон – 0,3; Na₂HPO₄ – 4,5; KH₂PO₄ – 1,6; NH₄Cl – 0,5; KCl – 0,1; MgSO₄ – 0,1;

n-аминобензойная кислота – 0,05; соль Мора – 0,01. Устанавливают величину рН среды 6,8–7,2. Готовят 200 мл питательной среды.

Готовую питательную среду разливают в две качалочные колбы вместимостью 250 мл (по 100 мл) и стерилизуют в автоклаве при 120°C в течение 40 мин. После охлаждения до 25°C колбы с питательной средой засевают культурой, выращенной на плотной среде в пробирках. Культуру смывают с поверхности плотной среды в пробирке 6–8 мл физиологического раствора (или таким же количеством стерильной среды из колбы). После засева колбы со средой в течение 15 мин прокачивают на качалке, затем осуществляют накопление декстрана без перемешивания при температуре (24 ± 1)°C в течение 2 сут. Через каждые 4–6 ч включают перемешивание на качалке на 5 мин.

3. Выделение нативного декстрана из культуральной среды

Ферментационную массу в колбах подвергают пастеризации нагреванием на водяной бане до 70°C и выдержкой в течение 20 мин. Массу охлаждают до 40°C, замеряют объем, проверяют величину рН раствора (должна находиться на уровне 4,0–5,2) и отбирают пробу объемом 20 мл для определения выхода декстрана. Для осаждения декстрана основную ферментационную массу (оставшуюся после отбора пробы) смешивают с этанолом в соотношении 1 : 1 по объему. При этом не допускают повышения температуры реакционной массы более чем до 40°C. Массу в колбе перемешивают, одновременно охлаждая ее проточной водой до температуры 20...22°C. Затем осадок нативного декстрана отстаивают при температуре 20...22°C в течение 3–4 ч и осторожно сливают (или отсасывают) надосадочную жидкость до минимального количества ее над осадком.

Для очистки декстрана производят его переосаждение. Для этого полученный осадок растворяют в горячей (60 ± 10)°C дистиллированной воде при перемешивании, одновременно охлаждая раствор до (35 ± 5)°C. Количество добавляемой воды составляет 3–5 объемов растворяемого осадка. Доводят рН раствора 2 н. раствором NaOH до значения 6,0–6,4. После полного растворения осадка переосаждают декстран этанолом (1 : 1 по объему) по изложенной выше методике.

Очищенный нативный декстран растворяют в горячей дистиллированной воде при рН 6,0–6,4 (по аналогии с предыдущим

опытом), раствор нагревают на водяной бане в колбе с нисходящим холодильником до температуры $(85 \pm 5)^\circ\text{C}$ и отгоняют этанол в течение 30 мин. Полученный раствор охлаждают и подвергают гидролизу.

4. Гидролиз декстрана

Концентрация декстрана в растворе перед гидролизом должна быть в пределах 5–8%. Раствор декстрана в колбе нагревают на водяной бане до температуры $(86 \pm 1)^\circ\text{C}$ и вводят 2 н. раствор HCl из расчета 3 мл раствора кислоты на 100 мл раствора нативного декстрана. Гидролиз проводят при температуре $(86 \pm 1)^\circ\text{C}$ и непрерывном перемешивании в течение 2 ч. Для прекращения гидролиза в колбу вводят 2 н. раствор NaOH из расчета 3 мл раствора щелочи на 100 мл раствора декстрана. После этого pH раствора доводят до величины 6,4–6,8 тем же раствором щелочи.

5. Фракционирование декстрана по молекулярной массе

Осаждая этанолом, последовательно выделяют низкомолекулярную, среднемолекулярную и высокомолекулярную фракции декстрана.

5.1. Выделение низкомолекулярной фракции

Раствор прогидролизованного декстрана объемом 50–60 мл нагревают до температуры $(35 \pm 5)^\circ\text{C}$ и при перемешивании вводят этанол в таком количестве, чтобы его концентрация в растворе составляла $(52 \pm 3)\%$. Раствор при перемешивании охлаждают до температуры $(21 \pm 1)^\circ\text{C}$ и отстаивают при этой температуре в течение 3–5 ч. После отстаивания осторожно сливают (или отсасывают) надосадочную жидкость, которая содержит низкомолекулярную фракцию декстрана. Эту фракцию в дальнейшем используют для определения молекулярной массы декстрана.

5.2. Выделение среднемолекулярной фракции

Полученный на предыдущей стадии осадок декстрана растворяют в горячей ($60 \dots 70^\circ\text{C}$) дистиллированной воде до концентрации декстрана около 11%. Раствор охлаждают до $(35 \pm 5)^\circ\text{C}$ и доводят pH до значения 6,4–6,8. В колбу с раствором вводят спирт

до концентрации его в растворе 45–51% об. Раствор перемешивают в течение 30 мин, затем отстаивают при температуре 20...22°C в течение 3–4 ч. После отстаивания удаляют надосадочную жидкость. Полученный осадок среднемолекулярной фракции растворяют в горячей дистиллированной воде до получения концентрации 5–6% и используют для определения молекулярной массы декстрана.

5.3. Выделение высокомолекулярной фракции

Раствор гидролизованного декстрана (50–60 мл) нагревают в колбе на водяной бане до температуры 30...40°C и вводят этанол до концентрации его в растворе 39,5–40,5% об. Раствор после перемешивания охлаждают до 20...22°C. Сформировавшийся осадок отделяют центрифугированием при 5000 мин⁻¹ в течение 15 мин и растворяют в горячей дистиллированной воде (60...70°C) до получения концентрации 5–6%. Раствор служит для определения молекулярной массы декстрана.

6. Определение средней молекулярной массы фракций декстрана

Определение молекулярной массы полисахаридов различных фракций осуществляют методом гель-хроматографии. В качестве твердой пористой фазы используется гель акрилекса Р-100, в котором можно фракционировать биополимеры с молекулярной массой 5–100 кДа. Гель функционирует как молекулярное сито: компонент с самыми большими молекулами, которые не входят в поры геля, элюируется из хроматографической колонки первым, а затем по степени убывания молекулярной массы элюируются более низкомолекулярные компоненты. При правильном выборе пористости геля существует линейная зависимость между объемом элюции конкретных полисахаридов из колонки и их молекулярной массой.

Для определения молекулярной массы неизвестных полисахаридов хроматографическому разделению на колонке с гелем подвергают смесь маркерных полисахаридов с известной молекулярной массой M , измеряют объем элюции V и строят график зависимости $V = f(M)$. При тех же условиях анализа (растворитель, температура, объем вводимой пробы) хроматографируют раствор исследуемых полисахаридов и по калибровочному графику определяют их молекулярную массу.

Концентрация полисахаридов в анализируемом растворе должна быть высокой (5–10 г/л).

Подготовка хроматографической колонки к работе. Приготовление геля акрилекса Р-100 осуществляют следующим образом. В колбу с 700 мл элюента (0,15 М NaCl) при перемешивании вносят 15–20 г сухого акрилекса. Колбу выдерживают на кипящей водяной бане в течение 5 ч и оставляют при комнатной температуре на сутки для полного набухания геля. По истечении суток избыток элюента осторожно декантируют, приливают 200–300 мл исходного элюента, гель осторожно перемешивают и дают отстояться. Верхний слой элюента, содержащий мелкие неосевшие частицы геля, декантируют. Эту операцию (отмучивание) проводят 2–3 раза.

Подготовленный гель разбавляют элюентом до консистенции густой сметаны и заполняют им стеклянную колонку диаметром 2 см и высотой 30 см. Колонку закрепляют в штативе строго вертикально. На дно колонки укладывают горизонтально диск, вырезанный из фильтровальной бумаги по внутреннему диаметру колонки. Наливают 10–15 мл элюента, удаляют пузырьки воздуха и аккуратно по стенке вливают суспензию геля (в нем должны отсутствовать пузырьки воздуха). После заполнения колонки поверх геля укладывают диск фильтровальной бумаги, закрывают адаптером, соединенным с колбой, в которой находится элюент, и промывают элюентом (3–4 объема колонки).

Для калибровки колонки отсоединяют адаптер, удаляют через нижний спуск избыток элюента над гелем и осторожно, чтобы не разрушить гель, в центр по каплям вносят 2 мл раствора маркерных полисахаридов. После того, как раствор войдет в гель, из пипетки осторожно вносят элюент, закрывают колонку адаптером и начинают элюирование, собирая фракции объемом по 5 мл на выходе из колонки.

Раствор маркерных полисахаридов готовят следующим образом. Взвешивают по 10 мг голубого декстрана 2000, декстрана 10 000, декстрана 20 000 и декстрана 40 000, а также 2–3 мг низкомолекулярного окрашенного вещества (бромфеноловый синий). Все ингредиенты растворяют в 5 мл 0,15 М NaCl. Раствор должен быть прозрачным (при необходимости его фильтруют).

В процессе элюирования в первой (голубой) зоне двигаются молекулы голубого декстрана 2000, имеющие молекулярную массу 2000 кДа. Декстран выходит из колонки в четвертой фракции. Определяют, как можно точнее, количество миллилитров, соответствующее выходу

наиболее сильноокрашенной порции элюата. Эта величина называется свободным объемом колонки V_0 . В этом объеме элюируются все полисахариды с молекулярной массой больше 100 кДа.

Таким же образом определяют и объем элюции самого низкомолекулярного соединения бромфенолового синего (16–18 фракции). Этот объем соответствует полному объему колонки V_K . Чтобы определить объемы элюции полисахаридов V_{Π} , измеряют оптическую плотность собранных фракций (5–15 фракции) при длине волны 210 нм и строят график зависимости оптической плотности от объема элюирования (или номера фракции). Максимумы на графике будут соответствовать величине V_{Π} для каждого полисахарида. Затем для каждого полисахарида рассчитывают величину «коэффициента доступности» k :

$$k = \frac{V_{\Pi} - V_0}{V_K - V_0}.$$

График зависимости $k = f(\lg M)$ представляет собой прямую линию.

После проведения калибровки колонку промывают элюентом (2–3 объема колонки), наносят на поверхность геля в колонке 2 мл исследуемой фракции полисахаридов и проводят хроматографирование. Строят график зависимости оптической плотности от объема элюирования. Из графика находят V_{Π} для каждого полисахарида, вычисляют коэффициент k и по калибровочному графику находят молекулярную массу полисахаридов.

7. Определение выхода декстрана

Отобранную пробу ферментационной среды (20 мл) используют для определения выхода декстрана, который осаждают из пробы этанолом по методике, изложенной в п. 3. Осадок после декантации надосадочной жидкости количественно переносят в предварительно высушенный и взвешенный бюкс и высушивают до постоянной массы. Рассчитывают выход декстрана Y , %, от субстрата (сахарозы):

$$Y = \frac{m_1 \cdot 100 \cdot 100}{20m_2},$$

где m_1 – масса сухого декстрана, г; 100 – объем среды, мл; 20 – объем отобранной для анализа пробы, мл; m_2 – масса сахарозы в 100 мл питательной среды, г.

ЛИТЕРАТУРА

1. Промышленная микробиология / З. А. Аркадьева [и др.]; под ред. Н. С. Егорова. – М.: Высш. шк., 1989. – 688 с.
2. Биотехнология: учеб. пособие для вузов: в 8 кн. / под ред. Н. С. Егорова, В. Д. Самуилова. – М.: Высш. шк. – Кн. 1: Егоров Н. С., Олескин А. В., Самуилов В. Д. Проблемы и перспективы. – 1987. – 159 с.; Кн. 2: Дебабов В. Г., Лившиц В. А. Совершенные методы создания промышленных штаммов микроорганизмов. – 1988. – 208 с.; Кн. 8: Березин И. В. [и др.]. Инженерная энзимология. – 1987. – 143 с.
3. Грачева, И. М. Технология микробных белковых препаратов, аминокислот и жиров / И. М. Грачева, Н. Н. Гаврилова, Л. А. Иванова. – М.: Пищевая пром-сть, 1980. – 448 с.
4. Мосичев, М. С. Общая технология микробиологических производств / М. С. Мосичев, А. А. Складнев, В. Б. Котов. – М.: Легкая и пищевая пром-сть, 1982. – 254 с.
5. Андреев, А. А. Производство кормовых дрожжей / А. А. Андреев, А. И. Брызгалов. – М.: Лесная пром-сть, 1986. – 248 с.
6. Практическая химия белка / под ред. А. Дарбре. – М.: Мир, 1989. – 623 с.
7. Быховский, В. Я. Промышленное получение витамина В₁₂ методом метанового брожения / В. Я. Быховский, Е. С. Панцхава. – М.: АН СССР, 1983. – 15 с.
8. Быховский, В. Я. Микробиологический синтез витамина В₁₂ / В. Я. Быховский. – М.: АН СССР, 1984. – 18 с.
9. Егоров, Н. С. Основы учения об антибиотиках / Н. С. Егоров. – М.: Химия, 1994. – 346 с.
10. Лабораторный практикум по технологии ферментных препаратов / И. М. Грачева [и др.]. – М.: Легкая и пищевая пром-сть, 1982. – 240 с.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ПРЕДИСЛОВИЕ.....	3
ПРАВИЛА ТЕХНИКИ БЕЗОПАСНОСТИ.....	4
I. БЕЛОК ОДНОКЛЕТОЧНЫХ.....	7
Лабораторная работа № 1. Культивирование продуцентов белка	8
II. АМИНОКИСЛОТЫ.....	18
Лабораторная работа № 2. Микробный синтез лизина.....	24
III. ВИТАМИНЫ.....	30
Лабораторная работа № 3. Микробный синтез витамина В ₁₂ на послеспиртовой барде.....	36
Лабораторная работа № 4. Биосинтез витамина В ₂ (рибофлавина).....	38
IV. ПОЛУЧЕНИЕ ПРЕПАРАТА РНК ИЗ ДРОЖЖЕВОЙ МАССЫ	43
Лабораторная работа № 5. Выделение РНК из дрожжевой массы	45
V. ФЕРМЕНТНЫЕ ПРЕПАРАТЫ.....	48
Лабораторная работа № 6. Культивирование микроорганизмов – продуцентов ферментов поверхностным способом на твердых питательных средах.....	54
Лабораторная работа № 7. Культивирование микроорганизмов – продуцентов ферментов глубинным способом.....	62
VI. ОРГАНИЧЕСКИЕ КИСЛОТЫ.....	69
Лабораторная работа № 8. Культивирование микроскопического гриба с целью получения лимонной кислоты.....	71
VII. МИКРОБНЫЕ ПОЛИСАХАРИДЫ.....	78
Лабораторная работа № 9. Микробный синтез полисахаридов	81
ЛИТЕРАТУРА.....	87

Учебное издание

Кузнецов Илья Николаевич

**ТЕХНОЛОГИЯ МИКРОБНОГО
СИНТЕЗА АНТИБИОТИКОВ,
ВИТАМИНОВ И ФЕРМЕНТОВ
Лабораторный практикум**

Учебно-методическое пособие

Редактор *Р. М. Рябая*
Компьютерная верстка *Е. В. Ильченко*
Корректор *Р. М. Рябая*

Подписано в печать 26.04.2018. Формат 60×84¹/₁₆.
Бумага офсетная. Гарнитура Таймс. Печать ризографическая.
Усл. печ. л. 5,2. Уч.-изд. л. 5,3.
Тираж 45 экз. Заказ .

Издатель и полиграфическое исполнение:
УО «Белорусский государственный технологический университет».
Свидетельство о государственной регистрации издателя,
изготовителя, распространителя печатных изданий
№ 1/227 от 20.03.2014.
Ул. Свердлова, 13а, 220006, г. Минск.