

**В.С. Колодязная, Е.И. Кипрушкина, Д.А. Бараненко,  
И.А. Шестопалова, Ю.В. Бройко**

## **МЕТОДОЛОГИЯ НАУЧНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ В ПИЩЕВОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ**



**Санкт-Петербург  
2019**

**МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**УНИВЕРСИТЕТ ИТМО**

**В.С. Колодязная, Е.И. Кипрушкина, Д.А. Бараненко,  
И.А. Шестопалова, Ю.В. Бройко**

# **МЕТОДОЛОГИЯ НАУЧНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ В ПИЩЕВОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ**

**Учебное пособие**

РЕКОМЕНДОВАНО К ИСПОЛЬЗОВАНИЮ В УНИВЕРСИТЕТЕ ИТМО  
по направлениям подготовки 19.04.01 «Биотехнология», 19.04.02 «Продукты  
питания из растительного сырья» и 19.04.03 «Продукты питания животного  
происхождения» очной формы обучения  
в качестве учебного пособия для реализации основных профессиональных  
образовательных программ высшего образования магистратуры

 **УНИВЕРСИТЕТ ИТМО**

**Санкт-Петербург**

**2019**

В.С. Колодязная, Е.И. Кипрушкина, Д.А. Бараненко, И.А. Шестопалова, Ю.В. Бройко. Методология научных исследований в пищевой биотехнологии: Учеб. пособие. - СПб.: Университет ИТМО, 2019. - 143 с.

Рецензент: Овсюк Е.А., канд. техн. наук, генеральный директор ООО «Нордена».

Учебное пособие содержит основные сведения об организации научно-исследовательской работы и её этапах, методологии научных исследований и оформлении научных результатов, об информационном обеспечении научных исследований. Приведены основы корреляционного и регрессионного анализа, планирования и постановки одно- и многофакторных экспериментов, методы составления математических моделей, оптимизации технологических параметров в биотехнологии пищевых продуктов. Рассмотрена стационарная и нестационарная кинетика ферментативных реакций, кинетические особенности роста клеточных культур и микробных популяций.

Учебное пособие предназначено для подготовки магистрантов по направлениям 19.04.01 «Биотехнология»; 19.04.02 «Продукты питания из растительного сырья» и 19.04.03 «Продукты питания животного происхождения».



**Университет ИТМО** - ведущий вуз России в области информационных и фотонных технологий, один из немногих российских вузов, получивших в 2009 году статус национального исследовательского университета. С 2013 года Университет ИТМО - участник программы повышения конкурентоспособности российских университетов среди ведущих мировых научно-образовательных центров, известной как проект «5 в 100». Цель Университета ИТМО - становление исследовательского университета мирового уровня, предпринимательского по типу, ориентированного на интернационализацию всех направлений деятельности.

© Университет ИТМО, 2019

© Колодязная В.С., Кипрушкина Е.И., Бараненко Д.А., Шестопалова И.А., Бройко Ю.В., 2019

## ВВЕДЕНИЕ

Одним из важнейших средств подготовки квалифицированных специалистов, способных к самостоятельной творческой работе, является научно-исследовательская работа (НИР) магистрантов. Выполнение исследований, обязательных для всех магистрантов, способствует расширению и углублению знаний, творческому усвоению учебной программы, овладению практическими навыками и методами исследования.

Основными задачами НИР являются развитие навыков работы с научно-технической литературой по специальности, изучение основ методик, постановки, планирования и проведения научного эксперимента, обработки и обобщения научных данных и оформления результатов работы в форме статей, тезисов, докладов на научных конференциях и выпускной квалификационной работы. С помощью НИР магистранты вносят существенный вклад в выполнение госбюджетных и хоздоговорных научно-исследовательских работ факультета, в решение конкретных научно-технических проблем, имеющих важное значение для пищевой промышленности и агропромышленного комплекса АПК.

В первой главе рассмотрено понятие «научное исследование», этапы научно-исследовательской работы, выбор научного направления, научные проблемы и темы исследования, постановка цели и задач НИР.

Во второй главе изложены основы методологии научных исследований, понятие метода и методологии, методы эмпирических исследований, абстрагирование, анализ, синтез, индукция и дедукция, моделирование, идеализация, формализация, аксиоматический метод, гипотеза, теория, системный анализ и методы решения.

В третьей главе описан подготовительный этап НИР, включающий выбор конкретной темы, методику планирования НИР, определение объекта и предмета исследования, формулировку рабочей гипотезы, методику изучения состояния вопроса и написания литературно-аналитического обзора по теме исследования, основные источники научной информации по биотехнологии пищевых продуктов, их изучение и анализ.

В четвертой главе рассмотрены корреляция двух и трех переменных, составление уравнения регрессии, определение коэффициентов линейной корреляции, множественная регрессии, определение коэффициентов множественной регрессии, частные коэффициенты корреляции, оценка их достоверности.

В пятой главе приведены сведения, касающиеся планирования, составления матрицы и постановки многофакторных экспериментов, проверки воспроизводимости опытов, определения их погрешности. Показана методология составления уравнений регрессии, расчета коэффициентов уравнений и проверки

их значимости, а также проверки адекватности полученных уравнений с помощью критерия Фишера. Рассмотрены различные методы оптимизации технологических параметров применительно к различным процессам обработки или переработки пищевого сырья.

В шестой главе представлены кинетические схемы и механизмы ферментативных реакций, последовательные и параллельные реакции, типичные зависимости начальной стационарной скорости реакции от концентрации субстрата, ингибирование и активация избытком субстрата. Обсуждены: нестационарная кинетика ферментативных реакций, образование лабильных промежуточных соединений в механизме катализа, определение кинетических параметров, предстационарная кинетика многостадийной ферментативной реакции, ингибирование ферментативных реакций, инактивация ферментов, кинетическое описание и дискриминация механизмов инактивации.

В седьмой главе описаны кинетические особенности роста клеточной культуры, определение параметров роста микробной популяции, многосубстратные процессы, ингибирование и активация клеточного роста, влияние pH и температуры на кинетику клеточного роста, интегральная форма уравнения роста микробной популяции, ингибирование роста популяции избытком субстрата и продуктами ферментации. Рассмотрены периоды индукции на кинетических кривых роста микроорганизмов, трансформация пресубстрата в субстрат, адаптационный процесс, расходуемый ингибитор роста, дискриминация механизмов и определение кинетических параметров.

Дисциплина «Методология научных исследований в пищевой биотехнологии» относится к профессиональному циклу дисциплин подготовки магистров по направлениям 19.04.02 «Продукты питания из растительного сырья», 19.04.03 «Продукты питания животного происхождения». Дисциплина реализуется на факультете «Пищевых биотехнологий и инженерии» Университета ИТМО.

## 1. НАУЧНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Понятие «наука» имеет несколько основных значений, из которых основными являются следующие:

- наука - это сфера человеческой деятельности, направленная на выработку и систематизацию новых знаний о природе, обществе, мышлении и познании окружающего мира;

- наука - это одна из форм общественного сознания, социальный институт; она представляет собой систему взаимосвязей между научными организациями и членами научного сообщества, а также включает системы научной информации, норм и ценностей науки и т.п.

Непосредственные цели науки - получение знаний об объективном и о субъективном мире, постижение объективной истины.

Задачами науки являются:

- сбор, описание, анализ, обобщение и объяснение фактов;
- выявление законов движения природы, общества, мышления и познания;
- систематизация полученных знаний;
- объяснение сущности явлений и процессов;
- прогнозирование событий, явлений и процессов;
- выбор направлений и форм практического использования полученных знаний.

В настоящее время в зависимости от сферы, предмета и метода познания различают науки:

- о природе – естественные;
- об обществе – гуманитарные и социальные;
- о мышлении и познании.

Научная или научно-исследовательская деятельность направлена на получение новых знаний. Научное исследование является формой существования и развития науки. Оно включает всестороннее изучение объекта, процесса или явления, их структуры и связей, взаимодействие элементов, различные свойства, закономерности развития, а также получение и внедрение в практику полезных для человека результатов. В нормативных правовых актах о науке научные исследования делят по целевому назначению на фундаментальные, прикладные, поисковые и разработки.

Фундаментальные научные исследования - это экспериментальная или теоретическая деятельность, направленная на получение новых знаний об основных закономерностях строения, функционирования и развития человека, общества, окружающей природной среды. Например, к числу фундаменталь-

ных можно отнести исследования о закономерностях функционирования биологических систем, их взаимодействии между собой и с окружающей средой.

Прикладные научные исследования - это исследования, направленные преимущественно на применение новых знаний для достижения практических целей и решения конкретных задач. Иными словами, они направлены на решение проблем использования в практической деятельности людей научных знаний, полученных в результате фундаментальных исследований. Например, как прикладные можно рассматривать работы о технологическом использовании закономерностей биогенеза организмов в различных отраслях промышленности. Научные исследования в сфере биотехнологии зачастую представляют собой сочетание двух названных видов, и поэтому их следует именовать теоретико-прикладными.

Поисковыми называют научные исследования, направленные на определение перспективности работы над темой, отыскание путей решения научных задач.

Разработкой называют исследование, которое направлено на внедрение в практику результатов конкретных фундаментальных и прикладных исследований.

По длительности научные исследования можно разделить на долгосрочные, краткосрочные и экспресс-исследования. В зависимости от форм и методов исследования выделяют экспериментальное, методическое, описательное, историко-биографическое, экспериментально-аналитическое исследования и исследования смешанного типа.

В теории познания выделяют два уровня исследования: теоретический и эмпирический. Теоретический уровень исследования характеризуется преобладанием логических методов познания. На этом уровне полученные факты исследуются, обрабатываются с помощью логических понятий, умозаключений, законов и других форм мышления. Здесь исследуемые объекты мысленно анализируются, обобщаются, постигается их сущность, внутренние связи, законы развития. На этом уровне познание с помощью органов чувств (эмпирия) может присутствовать, но оно является подчиненным.

Структурными компонентами теоретического познания являются проблема, гипотеза и теория. Проблема - это сложная теоретическая или практическая задача, способы решения которой неизвестны или известны не полностью. Различают проблемы неразвитые (предпроблемы) и развитые [7, 10].

Неразвитые проблемы характеризуются следующими чертами:

- они возникли на базе определенной теории, концепции;
- это трудные, нестандартные задачи;

- их решение направлено на устранение возникшего в познании противоречия;

- пути решения проблемы не известны.

Развитые проблемы имеют более или менее конкретные указания на пути их решения.

Гипотеза - это требующее проверки и доказательства предположение о причине, которая вызывает определенное следствие, о структуре исследуемых объектов и характере внутренних и внешних связей структурных элементов.

Научная гипотеза имеет следующие характерные свойства:

- релевантность, т.е. относимость к фактам, на которые она опирается;

- проверяемость опытным путем, сопоставляемость с данными наблюдения или эксперимента (исключение составляют непроверяемые гипотезы);

- совместимость с существующим научным знанием;

- гипотеза должна обладать объяснительной силой - из гипотезы должно выводиться некоторое количество подтверждающих ее фактов, следствий;

- большей объяснительной силой будет обладать та гипотеза, из которой выводится наибольшее количество фактов;

- простота - гипотеза не должна содержать никаких произвольных допущений, субъективистских наслоений.

Различают гипотезы описательные, объяснительные и прогнозные. Описательная гипотеза - это предположение о существенных свойствах объектов, характере между отдельными элементами изучаемого объекта. Объяснительная гипотеза - это предположение о причинно-следственных зависимостях. Прогнозная гипотеза - это предположение о тенденциях и закономерностях развития объекта исследования.

Теория - это логически организованное знание, концептуальная система знаний, которая адекватно и целостно отражает определенную область действительности. Она обладает следующими свойствами:

- теория представляет собой одну из форм рациональной мыслительной деятельности;

- теория - это целостная система достоверных знаний;

- теория не только описывает совокупность фактов, но и объясняет их, выявляет происхождение и развитие явлений и процессов, их внутренние и внешние связи, причинные и иные зависимости;

- все содержащиеся в теории положения и выводы обоснованы, доказаны.

Теории классифицируют по предмету исследования. Различают социальные, математические, физические, химические, психологические, этические и прочие теории. Существуют и другие классификации теорий [1, 11].

В современной методологии науки выделяют следующие структурные элементы теории:

- исходные основания - понятия, законы, аксиомы, принципы и т.д.;
- идеализированный объект - теоретическая модель какой-то части действительности, существенных свойств и связей изучаемых явлений и предметов;
- логика теории - совокупность определенных правил и способов доказывания;
- философские установки и социальные ценности;
- совокупность законов и положений, выведенных в качестве следствий из данной теории.

Структуру теории образуют понятия, суждения, законы, научные положения, учения, идеи и другие элементы.

Понятие - это мысль, отражающая существенные и необходимые признаки определенного множества предметов или явлений.

Категория - это общее, фундаментальное понятие, отражающее наиболее существенные свойства и отношения предметов и явлений. Категории бывают философскими, общенаучными и относящимися к отдельной отрасли науки.

Научный термин - это слово или сочетание слов, обозначающее понятие, применяемое в науке.

Суждение - это мысль, в которой утверждается или отрицается что-либо.

Принцип - это руководящая идея, основное исходное положение теории. Принципы бывают теоретическими и методологическими.

Аксиома - это положение, которое является исходным, недоказываемым и из которого по установленным правилам выводятся другие положения.

Закон - это объективная, существенная, внутренняя, необходимая и устойчивая связь между явлениями, процессами. Законы могут быть классифицированы по различным основаниям. Так, по основным сферам реальности можно выделить законы природы, общества, мышления и познания: по объему действия - всеобщие, общие и частные.

Закономерность - это:

- совокупность действия многих законов;
- система существенных, необходимых общих связей, каждая из которых составляет отдельный закон.

Положение - это научное утверждение, сформулированная мысль. Учение - это совокупность теоретических положений о какой-либо области явлений действительности.

Идея - это:

- новое интуитивное объяснение события или явления;
- определяющее стержневое положение в теории.

Концепция - это система теоретических взглядов, объединенных научной идеей (научными идеями). Теоретические концепции обуславливают существование и содержание многих правовых норм и институтов.

Эмпирический уровень исследования характеризуется преобладанием чувственного познания (изучения внешнего мира посредством органов чувств). На этом уровне формы теоретического познания присутствуют, но имеют подчиненное значение. Взаимодействие эмпирического и теоретического уровней исследования заключается в том, что:

- совокупность фактов составляет практическую основу теории или гипотезы;
- факты могут подтверждать теорию или опровергать ее;
- научный факт всегда пронизан теорией, поскольку он не может быть сформулирован без системы понятий, истолкован без теоретических представлений;
- эмпирическое исследование в современной науке предопределяется, направляется теорией.

Структуру эмпирического уровня исследования составляют факты, эмпирические обобщения и законы (зависимости).

Понятие «факт» употребляется в нескольких значениях:

- объективное событие, результат, относящийся к объективной реальности (факт действительности) либо к сфере сознания и познания (факт сознания);
- знание о каком-либо событии, явлении, достоверность которого доказана (истина);
- предложение, фиксирующее знание, полученное в ходе наблюдений и экспериментов.

Эмпирическое обобщение - это система определенных научных фактов. Эмпирические законы отражают регулярность в явлениях, устойчивость в отношениях между наблюдаемыми явлениями. Эти законы теоретическим знанием не являются. В отличие от теоретических законов, которые раскрывают существенные связи действительности, эмпирические законы отражают более поверхностный уровень зависимости.

### **Формула специальности биотехнология**

Отрасль науки и техники, которая занимается направленным получением целевых продуктов промышленного и медицинского назначения, а также обезвреживанием и утилизацией отходов производства с помощью биологических агентов: микроорганизмов, вирусов, клеток животных и растений, клеточных структур, отдельных биомолекул, использованием биотехнологических процессов для решения актуальных социально-экономических проблем.

Задачами исследований является раскрытие механизмов кинетических зависимостей превращения сырья под действием биологических агентов, изучение взаимосвязей между строением, составом, количеством и свойствами составляющих сырья и продуктов их превращения, научное обоснование новых и совершенствование традиционных биотехнологий, расширение ассортимента биотехнологической продукции.

Области исследований:

- разработка новых биотехнологий и биопрепаратов для использования в пищевой, микробиологической, фармацевтической промышленности, сельском хозяйстве, медицине и т. п.;

- создание биотехнологических процессов с участием биологических агентов разного происхождения, пищевых продуктов и добавок на основе биотехнологической модификации биополимеров растительного сырья, получение новых продуктов повышенного качества, очищенных от экотоксикатов, которые наряду с высокими потребительскими показателями имеют профилактические свойства;

- разработка методов биотестирования качества и безопасности пищевого сырья и продуктов на основе достижения молекулярной биологии, генетической и клеточной инженерии;

- разработка новых и интенсивных традиционных биотехнологических процессов получения первичных и вторичных метаболитов;

- создание биосенсорных систем для контроля качества и безопасности сырья, пищевых продуктов, объектов окружающей среды, а также мониторинга окружающей среды;

- разработка биотехнологических методов очистки окружающей среды и утилизации отходов разных промышленных производств, конструирования экосистем, получения новых источников энергии;

- разработка и совершенствование методов инженерной энзимологии - выделения ферментов, их стабилизации и иммобилизации, конструирования катализаторов с новыми прогнозируемыми свойствами, направлений их использования [5, 9, 13].

### **Формула специальности холодильная технология пищевых продуктов**

Искусственный холод является одним из основных средств консервирования пищевого сырья и продуктов питания. Значительные достижения в различных областях физики, химии, биологии оказывают существенное влияние на повышение уровня прикладных исследований по пищевым биотехнологиям и использованию искусственного холода в народном хозяйстве.

Основными направлениями в холодильной технологии являются:

- адаптация и устойчивость биологических объектов к низким температурам;
- анабиоз в сохранении жизнедеятельности микроорганизмов и других биологических объектов;
- влияние низких положительных и отрицательных температур на состав и свойства белков, углеводов, липидов, витаминов, минеральных элементов пищевого сырья и продуктов питания;
- теплофизические процессы при охлаждении и замораживании пищевых продуктов;
- влияние скорости охлаждения и замораживания на кинетику роста микроорганизмов, вызывающих микробиальную порчу пищевого сырья и продуктов питания при хранении;
- исследование активности ферментов при холодильной обработке и хранении пищевой продукции;
- изучение фазовых превращений воды при различных условиях переработки и хранения пищевой продукции;
- применение искусственного холода и дополнительных к нему физико-химических и биологических средств защиты продукции от фитопатологических и физиологических заболеваний при хранении.

### **1.1 Этапы научно-исследовательской работы**

Для успеха научного исследования его необходимо правильно организовать, спланировать и выполнять в определенной последовательности. Эти планы и последовательность действий зависят от вида, объекта и целей научного исследования. Так, если исследование проводится на технические темы, то вначале разрабатывается основной предплановый документ - технико-экономическое обоснование, а затем осуществляются теоретические и экспериментальные исследования, составляется научно-технический отчет, и результаты работы внедряются в производство. Применительно к прикладным научно-исследовательским работам выделяют шесть этапов [9, 15].

Формулировка темы:

- общее ознакомление с проблемой, по которой следует выполнить исследование;
- предварительное ознакомление с литературой и классификация важнейших направлений;
- формулирование темы исследования;

- составление краткого (предварительного) плана исследований (черновик, набросок);

- разработка научно-технического задания;
- составление календарного плана научных исследований;
- формулировка гипотезы, описывающей ожидаемые результаты;
- предварительная оценка ожидаемых результатов.

Формулирование цели и задачи исследования:

- подбор и составление библиографических списков отечественной и зарубежной литературы;

- изучение научно-технических отчетов по теме различных организаций соответствующего профиля;

- составление аннотаций источников;
- составление рефератов по теме;
- анализ, сопоставление, критика прорабатываемой информации;
- обобщение, критика, составление собственного суждения по проработанным вопросам;

- формулирование методических выводов по обзору информации;

- формулирование цели и задач исследования.

Моделирование:

- изучение физической сущности (природы) процессов и явлений, определяющих основные качества исследуемого объекта;

- выполнение предварительных (поисковых) экспериментов;
- формулирование гипотезы, выбор и обоснование физической модели;
- математизация модели;
- получение аналитических выражений;
- теоретический анализ полученных закономерностей.

Экспериментальные исследования:

- разработка цели и задач эксперимента;
- планирование эксперимента;
- разработка методики программы исследований;
- выборы средств измерений;
- конструирование приборов, макетов, аппаратов, моделей, стендов, установок и других средств эксперимента;

- обоснование способов измерений;

- проведение эксперимента в лаборатории, на опытных участках, на заводах, в фирмах;

- обработка результатов измерений.

Анализ и оформление результатов научных исследований:

- общий анализ теоретико-экспериментальных исследований;

- сопоставление экспериментов с теорией;
- анализ расхождений;
- уточнение теоретических моделей;
- повторение дополнительных экспериментов и их анализ до тех пор, пока не будет достигнута цель исследования;
- переформулировка предварительной гипотезы в утверждения;
- научный результат проведенного исследования;
- формулирование научных и производственных выводов;
- написание выпускной квалификационной работы и магистерской диссертации;
- рецензирование;
- составление доклада.

Внедрение результатов и определение экономической эффективности:

- внедрение результатов исследования на производстве;
- определение экономического эффекта.

Затем следует опытно-технологические или опытно-конструкторские разработки, включающие:

- а) формирование темы, цели и задач разработки;
- б) изучение литературы, проведение исследований (в случае необходимости) и подготовка к техническому проектированию экспериментального образца;
- в) техническое проектирование:
  - расчеты;
  - разработка чертежей;
  - изготовление отдельных узлов, блоков и анализ их работы;
  - разработка и согласование технического проекта;
  - технико-экономическое обоснование проекта.
- г) рабочее проектирование - разработка со всеми деталями рабочего проекта;
- д) изготовление опытного образца:
  - анализ и контроль технической документации;
  - проектирование технологических процессов;
  - разработка карт;
  - составление проекта организации работ;
  - изготовление деталей, блоков и узлов опытного образца, их сборка;
  - апробирование, доводка и регулировка образца;
  - стендовые и производственные испытания.
- е) доработка опытного образца:
  - анализ работы узлов образца после производственных испытаний;

- замена отдельных узлов.

ж) государственные испытания - передача образца специальной комиссии на государственные испытания.

## **1.2 Научное направление, научная проблема и тема научного исследования**

В научно-исследовательской работе различают направления, проблемы и темы. Научное направление - это сфера научных исследований научного коллектива, посвященных решению каких-либо крупных, фундаментальных теоретически-экспериментальных задач в определенной отрасли науки. Проблема представляет собой сложную научную задачу, которая охватывает значительную область исследования и имеет перспективное значение. Более узкую область исследований выполняется по какой-либо конкретной теме. Проблема состоит из ряда тем. Тема - это научная задача, охватывающая определенную область научного исследования. Она базируется на определенных научных вопросах. Под научными вопросами понимают более мелкие научные задачи, относящиеся к конкретной области научного исследования. Постановка (выбор) проблем или тем является трудной, ответственной задачей и включает в себя ряд моментов [11].

Формулирование проблемы:

- проблема возникает тогда, когда старое знание уже не способно, а новое не развилось настолько, чтобы давать ответы на возникающие вопросы;

- проблема в науке - это спорная ситуация, которая требует своего разрешения;

- правильная формулировка проблемы - это половина успеха, поскольку это означает умение отделить главное от второстепенного и разделить то, что известно, от того, что неизвестно по теме исследования, а это определяет стратегию поиска;

- на основе анализа противоречий исследуемого направления формулируют основной вопрос - проблему и определяют в общих чертах ожидаемый результат.

Разработка структуры проблемы:

- разделяют проблему на темы, подтемы, вопросы;

- по каждому из этих компонентов определяют ориентировочную область и объем предстоящих исследований.

Определение актуальности тем - их ценность на данный момент для прогресса науки и техники. Актуальность исследования - это ответ на вопрос, почему данное исследование необходимо проводить именно сейчас, а не потом.

Тема должна иметь научную новизну:

- тема в такой постановке никогда не разрабатывалась;
- тема в настоящее время не разрабатывается, т.е. дублирование исключается.

При выборе темы научного исследования новизна должна быть не инженерной, а научной, т.е. принципиально новой. Если разрабатывается пусть даже новая задача, но на основе уже открытых закономерностей, то это область инженерных, а не научных разработок.

Тема должна быть экономически эффективной. Это означает, что предложенные в результате научного исследования решения должны быть эффективнее уже существующих решений.

Тема должна иметь практическую значимость. Практическая значимость определяется возможностью использования результатов научного исследования для решения актуальных проблем и задач как на производстве, так и в смежных или междисциплинарных исследованиях. Так, например, расшифровка аминокислотной последовательности и пространственной структуры белка методами молекулярной биологии имеет практическую значимость для использования этой информации в технологии продуктов функционального назначения.

### **1.3 Методическая схема построения научно-исследовательской работы магистрантов**

Магистранты в течение двух лет занимаются НИР. Каждый магистрант выбирает одно из научных направлений, знакомится с работами по выбранной проблеме, с помощью своего научного руководителя уточняет тему исследования и составляет план научно-исследовательской работы. Далее проводится патентно-библиографический поиск, пишется литературный аналитический обзор по интересующим вопросам и четко формулируется задача исследования. Затем магистранты разрабатывают и осваивают методы анализа, проводят научный эксперимент, обрабатывают и обобщают результаты исследования, формулируют выводы, пишут отчет.

Магистранты оформляют результаты работы в виде статей, заявок на патент, а также подготавливают доклады и сообщения для представления на научных конференциях в университете и других вузах, конкурсы и выставки научных работ. Научно-исследовательская работа выполняется магистрантами индивидуально. Научными руководителями НИР являются профессора, доценты, преподаватели, а также научные сотрудники и аспиранты факультета. На научных руководителей НИР возлагаются следующие функции:

- составление задания по НИР;

- рекомендация основной литературы по теме исследования;
- оказание помощи магистрантам в разработке плана, методики исследования и проведения эксперимента;
- контроль за работой магистрантов и консультации;
- оказание помощи в подготовке докладов на конференциях, в оформлении результатов НИР в виде статей, заявок на патенты, а также в подготовке материала для представления на конкурсы и выставки научных работ;
- проверка отчетов по НИР.

#### **1.4 Постановка цели и задач научно-исследовательской работы**

Цель научной работы - это заранее намеченный результат общественной деятельности человека. В частности, целью научно-исследовательской работы является приобретение новых знаний об исследуемом объекте, установление некоторых его характеристик или характера явления в целом. Как показывает практика, научно-исследовательская работа на факультете по технологии пищевых продуктов носит главным образом прикладной характер. Это означает, что результаты такой работы непосредственно направлены на их практическое воплощение в промышленности.

Современная научно-исследовательская работа выступает как часть единой научно-технической проблемы, решаемой рядом научных институтов, деятельность которых координируют специальные межведомственные научные советы. Разработка проблемы обычно предусматривает ее разделение на темы, в которых формулируются определенные задачи исследования. Решение проблемы планируется обычно на несколько лет, тогда как темы научно-исследовательских работ разрабатываются чаще всего в течение одного-двух лет.

Темы, в свою очередь, разделяются на этапы, в каждом из которых ставится конкретная, узкая цель исследования, рассчитанная на решение в течение 1-2 кварталов, иногда - года. Работа каждого этапа распределяется между отдельными магистрантами или исследовательскими группами, которые решают данную цель исследования в определенном аспекте. По окончании работы проводится обобщение и сравнительный анализ результатов, полученных исследователями, и формулируются общие выводы.

Эффективность решения проблемы во многом определяется четкой постановкой задач и целей исследования, решаемых в ходе выполнения научно-исследовательских тем и их этапов. При этом необходимо помнить, что процесс исследования бесконечен. Следовательно, построение, содержание и количество тех и других задач должно быть таким, чтобы в рамках поставленной цели и

в пределах отведенного срока обеспечить отыскание решения, приемлемого на данном этапе развития науки.

Отметим важнейшие направления научно-исследовательской работы факультета. Большое значение в нашей стране придается сохранению сельскохозяйственной продукции, потери которой доходят до 30 и более процентов. На факультете проводятся исследования длительного холодильного хранения плодовоовощной продукции с применением дополнительных к холоду физико-химических, биологических средств защиты, защитных пленкообразующих покрытий. Разрабатываются эффективные способы и режимы хранения, системы охлаждения, экспрессные методы анализа.

В обеспечении рационального питания большую роль играют замороженные плоды и овощи, производство которых позволяет ликвидировать острый дефицит в растительных продуктах в межсезонный период. На факультете разрабатывается технология производства быстрозамороженных блюд и полуфабрикатов. Определяются сорта картофеля плодов и овощей, произрастающих в Ленинградской области, пригодные для замораживания. Изучается влияние скорости и конечной температуры замораживания, температуры и длительности холодильного хранения на изменения в растительных тканях, качество и пищевую ценность продуктов.

Холодильной обработке в настоящее время подвергаются миллионы тонн пищевых продуктов, что обуславливает актуальность проблемы снижения их потерь, сохранения качества как важного резерва продовольственных ресурсов. Одной из причин потерь продуктов является микробиальная порча, влияющая на качество и сокращающая длительность холодильного хранения. На факультете проводятся работы по выявлению и устранению причин значительных потерь при хранении пищевого сырья и продуктов питания.

Мясная и молочная отрасль, как часть продовольственного комплекса призвана эффективно перерабатывать продукцию животноводства, расширять ассортимент и повышать качество мясных и молочных продуктов. На факультете решаются вопросы повышения качества, сокращения потерь, экономии сырья и интенсификации процессов при производстве продуктов функционального и специализированного назначения. Изучается влияние состояния мяса, степени его измельчения, внесения белковых и эмульгирующих добавок на качественные показатели фарша и готовых изделий.

При решении этих и других научных проблем на факультете проводятся исследования по разработке технологий функциональных продуктов питания, оценке их качества и безопасности с использованием биохимических, биофизических, физико-химических, микробиологических и других методов исследования. При биохимических исследованиях изучают активность ферментов, изме-

нения белков, липидов, витаминов ароматических и красящих веществ, моно- и дисахаридов, крахмала, влагоудерживающей способности и другие. Биофизические исследования охватывают изучение изменения структуры ткани методами диэлектродуктометрии, с помощью ультразвуковых и структурно-механических методов анализа; содержания макро- и микроэлементов методами спектрографического анализа и пламенной фотометрии. При теплофизических исследованиях определяются теплофизические характеристики продуктов, доля вымороженной воды при различных температурах, криоскопическая температура, выполняются соответствующие расчеты при выборе рациональных режимов и условий холодильной и тепловой обработки и др. Микробиологические исследования позволяют определить безопасность пищевых продуктов при их производстве и хранении.

Выбрав одно из интересующих направлений исследования, магистранты включаются в работу какой-либо исследовательской группы и выполняют небольшую, но строгую определенную часть одного из этапов темы, решая при этом конкретные задачи и имея перед собой четко очерченную цель, связанную с написанием ВКР.

## **2. ОСНОВЫ МЕТОДОЛОГИИ НАУЧНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ**

### **2.1 Понятие о методе и методологии исследования**

Метод научного исследования - это способ познания объективной действительности. Способ представляет собой определенную последовательность действий, приемов, операций.

В зависимости от содержания изучаемых объектов различают методы социально-гуманитарного исследования и методы естествознания. Методы исследований классифицируют по отраслям науки: математические, физические, химические, социально-экономические, биологические, медицинские, биохимические, и т.д.

В зависимости от уровня познания выделяют методы эмпирического, теоретического и метатеоретического уровней. К методам эмпирического уровня относят наблюдение, измерение, описание, счет, сравнение, анкетный опрос, собеседование, эксперимент, тестирование, моделирование и т.д. К методам теоретического уровня относят аксиоматический, гипотетический, абстрагирование, формализацию, общелогические методы (анализ, синтез, индукция, дедукция, аналогия) и другие. Методами метатеоретического уровня являются диалектический, метафизический, герменевтический и др. Некоторые ученые к этому уровню относят метод системного анализа, а другие включают его в число общелогических методов.

В зависимости от среды применения и степени общности различают методы:

- всеобщие (философские), действующие во всех науках и на всех этапах познания;
- общенаучные, которые могут применяться в гуманитарных, естественных и технических науках;
- частные (для родственных наук);
- специальные - для конкретной науки, области научного познания.

Следует различать понятие «метод», «техника», «процедура» и «методика» научного исследования. Под техникой исследования понимают совокупность специальных приемов для использования того или иного метода. Под процедурой исследования понимают определенную последовательность действий, способ организации исследования.

Методика - это совокупность способов и приемов познания. Любое научное исследование осуществляется определенными приемами и способами, по определенным правилам. Учение о системе этих приемов, способов и правил называют методологией.

Понятие «методология» в литературе употребляется в двух значениях:

- совокупность методов, применяемых в какой-либо сфере деятельности (наука о политике и т.д.);
- учение о научном методе познания.

Каждая наука имеет свою методологию. Существуют следующие уровни методологии:

- всеобщая методология, которая является универсальной по отношению ко всем наукам, и в содержание которой входят философские и общенаучные методы познания;
- частная методология научных исследований для группы родственных наук, которую образуют философские общенаучные и частные методы познания;
- методология научных исследований конкретной науки, в содержание которой включаются философские, общенаучные, частные и специальные методы познания.

Общие методы познания можно разделить на три группы:

- методы эмпирического исследования;
- методы, используемые на эмпирическом и теоретическом уровнях;
- методы теоретического исследования.

Следует отметить, что грани между этими методами определены приблизительно.

## 2.2 Методы эмпирических исследований

Наблюдение - это систематическое, целенаправленное восприятие объекта. Чтобы быть плодотворным, наблюдение должно удовлетворять следующим требованиям:

- преднамеренность (наблюдение ведется для определенной, четко поставленной задачи);
- планомерность (проводится по плану, составленному по задачам наблюдения);
- целенаправленность (наблюдаются только интересующие стороны явления);
- систематичность (наблюдение ведется непрерывно, или по определенной системе).

Наблюдение, как метод познания, позволяет получать первичную информацию в виде совокупности эмпирических утверждений. Эмпирическая совокупность дает первичную схематизацию объектов реальности, что и является исходными объектами научного исследования.

Сравнение - это процесс установления сходства или различия у предметов и явлений действительности, а также нахождения общего, что присуще двум или нескольким объектам.

Метод уравнивания будет плодотворным, если выполняются следующие требования:

- могут сравниваться только такие явления, между которыми может существовать определенная объективная общность;
- сравнение должно осуществляться по наиболее важным, существенным (в плане конкретной задачи) признакам.

Различные объекты или явления могут сравниваться непосредственно или опосредованно через их сравнение с каким-либо третьим объектом (эталоном). В первом случае обычно получают качественные результаты (больше-меньше, выше-ниже). Сравнения же объектов с эталоном дают возможность получить количественные характеристики. Такие сравнения называются измерением.

С помощью сравнения информацию об объекте можно получить двумя путями:

- непосредственный результат сравнения (первичная информация);
- результат обработки первичных данных (вторичная или производная информация).

Измерение - это определение численного значения некоторой величины посредством единицы измерения. Измерение предполагает наличие следующих основных элементов: объекта измерения, эталона, измерительных приборов,

метода измерения. Измерение развилось из операции сравнения, тем не менее оно является более мощным и универсальным познавательным средством.

Эксперимент - это такой метод изучения объекта, когда исследователь активно и целенаправленно воздействует на него путем создания искусственных условий или использования, естественных условий, необходимых для выявления соответствующих свойств. Преимущества экспериментального изучения объекта по сравнению с наблюдением следующие:

- в процессе эксперимента можно изучить явление в чистом виде, устранив побочные факторы, затемняющие основной процесс;
- в экспериментальных условиях можно исследовать свойства объектов;
- повторяемость эксперимента можно проводить испытания столько раз, сколько это необходимо.

Эксперимент проводят в следующих случаях:

- при попытке обнаружения у объекта ранее неизвестных свойств;
- при проверке правильности теоретических построений;
- при демонстрации явления.

В научном исследовании эксперимент и теория связаны теснейшим образом. Всякое игнорирование эксперимента неизбежно ведет к ошибкам, поэтому всемирное развертывание экспериментальных исследований представляет собой один из наиболее важных путей развития всей современной науки.

### **2.3 Абстрагирование, анализ, синтез**

Абстрагирование - это мысленное отвлечение от несущественных свойств, связей, отношений предметов и выделение нескольких сторон, интересующих исследователя. Процесс абстрагирования проходит две ступени. Первая ступень: выделение наиболее важного в явлениях и установление независимости или пренебрежимо слабой зависимости изучаемых явлений от определенных факторов (если объект А не зависит непосредственно от фактора Б, то можно отвлечься от последнего, как несущественного). Вторая ступень: реализация возможностей абстрагирования. Суть его заключается в том, что один объект занимается другим, более простым, который выступает в качестве «модели» первого. Абстрагирование может применяться к реальным и абстрактным объектам (прошедшим ранее абстрагирование). Многоступенчатое абстрагирование ведет к абстракциям все возрастающей степени общности. Абстрагирование позволяет заменить в познании сложное простым, но таким простым, которое выражает основное в этом сложном.

Существуют следующие основные виды абстракции:

- отождествление - образование понятий путем объединения предметов, связанных отношениями типа равенства в особый класс (отвлечение от некоторых индивидуальных свойств предметов);

- изолирование - выделение свойств и отношений, неразрывно связанных с предметами, и обозначения их определенными «именами», что придает абстракции статус самостоятельных предметов («надежность», «технологичность»).

Различие между этими двумя абстракциями состоит в том, что в первом случае изолируется комплекс свойств объекта, а во втором - единственное его свойство:

- конструктивизация - отвлечение от неопределенности границ реальных объектов (непрерывное движение останавливаем и т.д.);

- актуальная бесконечность - отвлечение от незавершенности (и незавершимости) процесса образования бесконечного множества, от невозможности задать его полным списком всех элементов (такое множество рассматривается как существующее);

- потенциальная осуществимость - отвлечение от реальных границ человеческих возможностей, обусловленных ограниченностью жизни во времени и пространстве (бесконечность выступает как потенциально осуществимое).

Результат абстрагирования выступает как специфический метод исследования, а также в качестве элемента более сложных по своей структуре методов эксперимента - анализа и моделирование. Анализ - это метод познания, который позволяет разделить предметы исследования на составные части (естественные элементы объекта и на его свойства и отношения). Синтез, наоборот, позволяет осуществлять соединение отдельных частей или сторон предмета в единое целое. Анализ и синтез взаимосвязаны, они представляют собой единство противоположностей.

Анализ (и синтез) бывает:

- прямой, или эмпирический - используется для выделения отдельных частей объекта, обнаружения его свойств, простейших измерений и т.п.;

- возвратный или элементарно-теоретический - базируется на некоторых теоретических соображениях причинно-следственной связи различных явлений или действий какой-либо закономерности. При этом выделяются и соединяются явления, представляющиеся собой существенными, а второстепенные игнорируются;

- структурно-генетический - требует вычисления в сложном явлении таких элементов, которые оказывают решающее влияние на все остальные стороны объекта.

## 2.4 Индукция и дедукция. Моделирование

Дедуктивным называют такое умозаключение, в котором вывод о некотором элементе множества делается на основании знания общих свойств всего множества. Содержанием дедукции как метода познания является использование общих научных положений при исследовании конкретных явлений. Под индукцией понимается умозаключение от частного к общему, когда на основании знания о части предмета класса делается вывод о классе в целом. Дедукция и индукция - взаимнообратные методы познания. Имеется несколько методов установления причинной связи методами научной индукции:

- метод единственного сходства. Если два или более случаев исследуемого явления имеют общим лишь одно обстоятельство, а все остальные различны, то это единственное сходное обстоятельство и является причиной рассматриваемого явления;

- метод единственного различия. Если случай, в котором исследуемое явление наступает, и случай, в котором оно не наступает, во всем сходны и различны только в одном обстоятельстве, то это обстоятельство, присутствующее в одном случае и отсутствующее во втором, является причиной изучаемого явления;

- соединенный метод сходства и различия - комбинация двух первых методов;

- метод сопутствующих изменений. Если возникновение или изменение одного явления вызывает определенное изменение другого, то оба эти явления находятся в причинной связи друг с другом;

- метод остатков. Если сложное явление вызывается сложной причиной, состоящей из совокупности определенных обстоятельств, являются причиной части явлений, то остаток этого явления вызывается остальными обстоятельствами.

Моделирование - это метод, основывающийся на использовании модели в качестве средства исследования явлений и процессов природы. Под моделями понимаются системы, замещающие объект исследования (познания) и служащие источником информации о нем. Модели - это такие аналоги, сходство которых с оригиналом существенно, а различие - не существенно. Модели делят на два вида: материальные и идеальные. Материальные модели воплощаются в определенном материале: дерево, металл, стекло и другие. Идеальные модели фиксируются в таких наглядных элементах, как чертежи, рисунки, схемы и др.

Метод моделирования имеет следующую структуру:

- постановка задачи;
- создание или выбор модели;

- исследование модели;
- коррекция знаний о модели с учетом свойств объекта-оригинала.

## 2.5 Методы теоритических исследований

Идеализация, формализация, аксиоматический метод, гипотеза и предположение, теория - это методы теоретических исследований. Идеализация - это мысленное конструирование объектов, несуществующих в действительности или практически неосуществимых (например, абсолютно твердое тело, абсолютно черное тело и т.п.).

Цель идеализации - лишить реальные объекты некоторых присущих им свойств и наделить (мысленно) эти объекты определенными нереальными и гипотетическими свойствами. При этом достижение цели осуществляется:

- многоступенчатым абстрагированием (например, абстрагирование от толщины приводит к понятию «плоскость»);
- мысленным переходом к предельному случаю в развитии какого-либо свойства (абсолютно твердое тело);
- простым абстрагированием (несжимаемость - сжимаемость).

Любая идеализация правомерна лишь в определенных пределах.

Формализация - это метод изучения разнообразных объектов путем отображения их структуры в знаковой форме при помощи искусственных языков, например, в языке математики. Достоинства формализации:

- обеспечивает обобщенность подхода к решению проблем;
- символика придает краткость и четкость фиксации значений;
- однозначность символики (нет двусмысленности обычного языка);
- позволяет формировать знаковые модели объектов и заменять изучение реальных вещей и процессов изучением этих объектов.

Аксиоматический метод - это метод построения научной теории, при котором некоторые утверждения принимаются без доказательств, а все остальные знания выводятся из них по определенным логическим правилам.

Гипотеза, предположение. В становлении теории как системы научного знания важнейшую роль играет гипотеза или научное предположение. Гипотеза, как метод теоретического исследования, является формой осмысления фактического материала, формой перехода от фактов к законам. Развитие гипотезы проходит в три стадии:

- накопление фактического материала и высказывание на его основе предположений;
- формирование гипотезы, т.е. выведение следствий из сделанного предположения, развертывание на его основе предположительной теории;

- проверка полученных выводов на практике и уточнение гипотезы на основе результатов такой проверки. Если при проверке следствие соответствует действительности, то гипотеза превращается в научную теорию.

Теория, как метод теоретического исследования - это система знаний, описывающая и объясняющая совокупность явлений некоторой области действительности и сводящая открытие в этой области законы к единому объединяющему началу. Теория строится на результатах, полученных на эмпирическом уровне исследования. В теории эти результаты упорядочиваются, приводятся в стройную систему, объединенную общей идеей, уточняются на основе вводимых в теорию абстракций, идеализации и принципов.

К новой теории предъявляются следующие требования:

- научная теория должна быть адекватна описываемому объекту, что позволяет в определенных пределах заменять экспериментальные исследования теоретическими;

- теория должна удовлетворять требованию полноты описания некоторой области действительности;

- должны быть объяснены взаимосвязи между различными компонентами в рамках самой теории. Должны существовать связи между различными положениями теории, обеспечивающие переход одних утверждений к другим;

- должно выполняться требование внутренней непротиворечивости теории и соответствия ее опытным данным;

- теория должна быть эвристичной, конструктивной и простой.

Эвристичность теории отражает ее предсказывательные и объяснительные возможности. Математический аппарат теории должен позволять не только делать точные количественные предсказания, но и открывать новые явления. Конструктивность теории состоит в простой, совершаемой по определенным правилам, проверяемости основных ее положений, принципов и законов. Простота теории достигается путем введения обобщенных законов сокращения информации при помощи специальных символов.

## **2.6 Системно-структурный метод**

Системный анализ определяется как научный метод познания, представляющий собой последовательность действий по установлению структурных связей между переменными или элементами исследуемой системы. Системный анализ опирается на комплекс общенаучных, экспериментальных, естественно-научных, статистических, математических методов. В основе системного анализа лежит понятие системы, под которой понимается множество объектов (компонентов), обладающих заранее определенными свойствами с фиксиро-

ванными между ними отношениями. На базе этого понятия производится учет связей, используются количественные сравнения всех альтернатив для того, чтобы сознательно выбрать наилучшее решение, оцениваемое каким-либо критерием, например, измеримость, эффективность, надежность и т.п. Ценность системного подхода состоит в том, что рассмотрение категорий системного анализа создает основу для логического и последовательного подхода к проблеме принятия решений. Эффективность решения проблем с помощью системного анализа определяется структурой решаемых проблем. Классификация проблем. Согласно классификации, все проблемы подразделяются на три класса:

- хорошо структурирование (*well-structured*), или количественно сформулированные проблемы, в которых существенные зависимости выяснены очень хорошо;

- неструктурированные (*unstructured*), или качественно выраженные проблемы, содержащие лишь описание важнейших ресурсов, признаков и характеристик, количественные зависимости между которыми совершенно неизвестны;

- слабо структурированные (*ill-structured*), или смешанные проблемы, которые содержат как качественные элементы, так и малоизвестные, неопределенные стороны, которые имеют тенденцию доминировать.

### **Методы решения**

Для решения хорошо структурированных, количественно выражаемых проблем, используется известная методология исследования операций, которая состоит в построении адекватной математической модели (например, задачи линейного, нелинейного, динамического программирования, задачи теории массового обслуживания, теории игр и др.) и применении методов для отыскания оптимальной стратегии управления целенаправленными действиями.

Для решения слабоструктурированных проблем используется методология системного анализа, системы поддержки принятия решения. Рассмотрим технологию применения системного анализа к решению сложных задач.

Процедура принятия решений включает следующие этапы:

- формулировка проблемной ситуации;
- определение целей;
- определение критериев достижения целей;
- построение моделей для обоснования решений;
- анализ полученной модели;
- поиск оптимального (допустимого) варианта решения;
- согласование решения;

- подготовка решения к реализации;
- утверждение решения;
- управление ходом реализации решения;
- проверка эффективности решения.

Этапы формулировки проблемы и определения целей заключаются в постановке задачи - определяют объект, цели и задачи исследования, а также критерии для изучения и управления объектом. Неправильная или неполная постановка целей может свести на нет результаты всего последующего анализа.

Во время третьего этапа очерчиваются границы изучаемой системы и определяется ее структура: объекты и процессы, имеющие отношение к поставленной цели, разбиваются на собственно изучаемую систему и внешнюю среду. При этом различают замкнутые и открытые системы. При исследовании замкнутых систем влиянием внешней среды на их поведение пренебрегают. Затем выделяют отдельные составные части системы - ее элементы, устанавливают взаимодействие между ними и внешней средой. Именно так строится, например, такая фундаментальная наука, как термодинамика.

В последнее время все большее внимание в технике уделяется изучению замкнутых систем, имеющих закрытые технологические циклы, так называемую «безотходную технологию». Такие технологические процессы перспективны как с позиций экономики, так и экологии: «чем меньше отходов, тем выше уровень производства».

Четвертый (важнейший) этап системного анализа заключается в составлении математической модели исследуемой системы. Вначале производят параметризацию системы, описывают выделенные элементы системы и их взаимодействие. В зависимости от особенностей процессов используют тот или иной математический аппарат для анализа системы в целом.

Следует отметить, что аналитические методы используются для описания лишь небольших систем, поскольку невозможно не только решить, но и даже составить достаточно полную систему уравнений, которая описывала бы сложную систему. Для описания больших систем, их характеристик (не только качественных, но и количественных) используются дискретные параметры (баллы), принимающие целые значения. Например, твердость материалов оценивают баллами по шкале Мооса, энергию сейсмических волн при землетрясениях - баллами по Рихтеру и пр.

Методы операций с дискретными параметрами излагаются в теории множеств, и, прежде всего, в таких ее разделах, как в алгебре множеств и в алгебре высказываний (математической логике), составляющих основу математического обеспечения современных компьютеров. Наряду с аппаратом алгебры множеств и алгебры высказываний при исследовании сложных систем широко ис-

пользуют вероятностные методы, поскольку в них преобладают стохастические процессы. Поэтому наиболее часто исследуют развитие процессов с некоторой вероятностью или же определяют вероятность протекания изучаемых процессов.

Если исследуются сложные системы, именуемые как обобщенные динамические системы, характеризуемые большим количеством параметров различной природы, то в целях упрощения математического описания их расчленяют на подсистемы, выделяют типовые подсистемы, производят стандартизацию связей для различных уровней иерархии однотипных систем. Примерами такого подхода к изучению сложных систем, например, систем управления, являются типовые возмущения, типовые звенья системы с определенными статистическими и динамическими свойствами.

В результате четвертого этапа системного анализа формируются законченные математические модели системы, описанные на формальном, например, алгоритмическом языке. Пятый, шестой этапы системного анализа также являются важными. Это анализ полученной математической модели, определение ее экстремальных условий с целью оптимизации и формулирования выводов. Оптимизация заключается в нахождении оптимума рассматриваемой функции (математической модели исследуемой системы, процесса) и, соответственно, в нахождении оптимальных условий поведения данной системы или протекания данного процесса. Оценку оптимизации производят по критериям, принимающим в таких случаях экстремальные значения (выражающие, например, максимальный съем продукции с единицы объема аппарата, минимальную стоимость продукции при определенной производительности, минимальный расход топлива и т.д.).

На практике выбрать надлежащий критерий достаточно сложно, так как в задачах оптимизации может возникнуть необходимость во многих критериях, которые иногда оказываются взаимно противоречивыми. Поэтому наиболее часто выбирают какой-либо один основной критерий, а для других устанавливают пороговые предельно допустимые значения.

На основании выбора составляется зависимость критерия оптимизации от параметров модели исследуемого объекта (процесса). Такой результат исследования чрезвычайно важен для практических целей и определяет подготовку к последующей опытно-конструкторской проработке задачи (этапы с седьмого по одиннадцатый).

## Вопросы для самоконтроля

1. Охарактеризуйте теоретический и эмпирический уровни научного исследования. Чем они отличаются?
2. Какие вы знаете методы эмпирического исследования? Охарактеризуйте наблюдение как метод эмпирического исследования. В чем специфика этих методов по отношению к другим методам эмпирического исследования?
3. Охарактеризуйте сравнение и измерение как методы эмпирического исследования. В чем специфика этого метода по отношению к другим методам эмпирического исследования?
4. Охарактеризуйте эксперимент как метод эмпирического исследования. В чем специфика этого метода по отношению к другим методам эмпирического исследования?
5. В чем сходство и различие следующих двух видов абстракции: отождествление и изолирование?
6. В чем сходство и различие следующих двух видов абстракции: актуальная бесконечность и потенциальная осуществимость?
7. В чем сходство и различие следующих двух методов познания: анализ и синтез?
8. Какое умозаключение называется дедуктивным и индуктивным?
9. Какие вы знаете методы научной индукции? Охарактеризуйте методы единственного сходства и различия.
10. Охарактеризуйте метод сопутствующих изменений и метод остатков как методы научной индукции.
11. Что такое системный анализ? Перечислите и охарактеризуйте основные этапы принятия решений с точки зрения методологии системного анализа.

## 3. ПОДГОТОВИТЕЛЬНЫЙ ЭТАП НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЫ

### 3.1 Выбор темы исследования

Тема научно-исследовательской работы может быть отнесена к определенному научному направлению или к научной проблеме. Например, научные исследования, выполняемые студентами специальностей «Продукты питания животного происхождения», «Продукты питания из растительного сырья» можно конкретизировать применительно к видам сырья, биотехнологическим процессам, основой которых являются специальные разделы биотехнологии: биотехнология биологически активных веществ, биотехнология микроорганизмов, молекулярная биотехнология и т.д., а также к технологиям применения искусственного холода при переработке и хранении пищевой продукции.

Проблема может быть отраслевой, межотраслевой, глобальной. К примеру, проблема обеспечения населения продовольствием является не только межотраслевой, но и глобальной, так как затрагивает интересы мирового сообщества.

Научная тема - это сложная, требующая решения задача. Темы могут быть теоретическими, практическими и смешанными. Теоретические темы бакалаврами и магистрантами разрабатываются преимущественно с использованием литературных источников. Примеры таких тем: история холодильной технологии, биотехнологии, пищевой отрасли и т.д.

Практические темы разрабатываются на основе изучения, обобщения и анализа производственной и лабораторно-исследовательской практики. Например, такими темами являются: «Исследование и обоснование технологических параметров применения ферментных препаратов в процессе биомодификации пищевого сырья»; «Технология холодильного хранения растительной продукции с применением трековых мембран», «Биотехнология функциональных продуктов питания», «Биотехнология криоконсервации клеток растений и животных». Смешанные темы сочетают в себе теоретический и практический аспекты исследования.

Тема научно-исследовательской работы, в свою очередь, может охватывать некоторый круг вопросов. Считается, что правильный выбор темы работы наполовину обеспечивает успешное ее выполнение. Темы курсовых и выпускных квалификационных работ (ВКР) определяются в соответствии с научными направлениями факультета. Тематика должна соответствовать программам курсов учебных дисциплин и учебным планам. При ее составлении целесообразно учитывать сложившиеся на факультете научные направления и возможность обеспечения студентов квалифицированным научным руководством. Желательно добиваться того, чтобы темы обладали актуальностью, новизной, практической и теоретической значимостью.

Темы выпускных квалификационных работ должны доводиться до сведения студентов в начале первого года обучения, но не позднее, чем за полгода до начала итоговой аттестации. Студентам предоставляется право выбора темы вплоть до предложения своей с необходимым обоснованием ее разработки. При выборе темы рекомендуется учитывать: ее актуальность, новизну, теоретическую и практическую значимость, соответствие профилю работы после окончания ВУЗа, наличие или отсутствие литературы и практических материалов, работы самого студента по теме в виде курсовых работ и научных докладов, а также интерес студента к выбранной теме, его субъективные возможности провести необходимые исследования.

Выбор темы могут облегчить консультации с преподавателями и профессорами, ознакомление с литературой по избранной специальности, пересмотр уже известных в био- и холодильной технологиях положений и выводов под новым углом зрения. Выбрав тему работы, студенту необходимо встретиться с предполагаемым научным руководителем и получить его согласие на руководство ее выполнения. Эта тема, а также научный руководитель утверждаются приказом ректора учебного заведения. По отдельным частям работы, если, например, в ней будут рассматриваться междисциплинарные вопросы, относящиеся к различным отраслям технологии, студенту могут быть назначены научные консультанты. Научными руководителями (консультантами) назначаются, как правило, профессора и преподаватели, имеющие ученую степень или ученое звание, а в отдельных случаях опытные высококвалифицированные специалисты-работники промышленных предприятий и научно-исследовательских организаций.

Научный руководитель:

- выдает студенту задание на выполнение ВКР;
- помогает студенту составить план работы;
- рекомендует основную литературу, справочные и другие материалы;
- консультирует относительно выбора методов исследования, сбора, обобщения и анализа материалов практики, оформления работы;
- контролирует выполнение задания;
- проверяет выполненную работу, составляет на нее отзыв.

### **3.2 Методика планирования научно-исследовательской работы**

Планирование научно-исследовательской работы имеет важное значение для ее рациональной организации. Научная работа факультета учебных заведений организуется и проводится в соответствии с планами работы на учебный год. Профессора, преподаватели и аспиранты выполняют научно-исследовательские работы по индивидуальным планам. Планируется и научно-исследовательская работа студентов (НИРС). Планы работы учебных заведений и факультетов могут содержать соответствующий раздел о НИРСе. По планам работают студенческие научные кружки и проблемные группы.

Рабочая программа - это изложение общей концепции исследования в соответствии с его целями и гипотезами. Она состоит, как правило, из двух разделов: методологического и процедурного.

Методологический раздел включает:

- формулировка проблемы или темы;
- определение объекта и предмета исследования;

- определение цели и постановку задач исследования;
- интерпретацию основных понятий;
- формулировку рабочих гипотез.

Формулировка проблемы (темы) - это определение задачи, которая требует решения. Проблемы бывают технологические и научные. Технологическая проблема - это противоречие между потребностями конкретного производства и существующим технологическим уровнем на предприятии. Научная (гносеологическая) проблема - это противоречие между знаниями о потребностях данной науки, например, биотехнологии, и незнанием путей и средств их удовлетворения. Такие проблемы решаются путем создания теории, выработки практических рекомендаций. Например, научной проблемой является разработка методов иммобилизации ферментов.

### **Определение объекта и предмета исследования**

Объект исследования - это то явление (или процесс), которое содержит противоречие и порождает проблемную ситуацию. Предмет исследования - это те наиболее значимые с точки зрения практики и теории свойства, стороны, особенности объекта, которые подлежат изучению. Например, если тема работы посвящена биотехнологии растений, то объектом исследования является процесс жизнедеятельности растительной клетки, а предметом - способы и методы модификации клеточных компонентов с целью получения желаемого эффекта.

### **Определение цели и задач исследования**

Цель исследования - это общая его направленность на конечный результат. Задачи исследования - это то, что требует решения в процессе исследования; вопросы, на которые должен быть получен ответ. Интерпретация основных понятий - это истолкование, разъяснение значения основных понятий.

Существуют теоретическая и эмпирическая интерпретация понятий. Теоретическое истолкование представляет собой логический анализ существенных свойств и отношений интерпретируемых понятий путем раскрытия их связей с другими понятиями. Эмпирическая интерпретация - это определение эмпирических значений основных теоретических понятий, перевод их на язык наблюдаемых фактов. Эмпирически интерпретировать понятие - это значит найти такой показатель (индикатор, фактор), который отражал бы определенный важный признак содержания понятия и который можно было бы измерить.

## Формулировка рабочих гипотез

Гипотеза как научное предположение, выдвигаемое для объяснения каких-либо фактов, явлений и процессов, является важным инструментом успешного решения исследовательских задач.

Программа исследования может быть ориентирована на одну или несколько гипотез. Различают гипотезы: описательные, объяснительные и прогнозные, основные и неосновные, первичные и вторичные, гипотезы - основания и гипотезы - следствия.

Процедурный раздел рабочей программы включает:

- 1) принципиальный план исследования;
- 2) изложение основных процедур сбора и анализа эмпирического материала.

Конкретное научное исследование осуществляется по принципиальному плану, который строится в зависимости от количества информации об объекте исследования. Планы бывают поисковые, аналитические (описательные) и экспериментальные. Поисковый план применяется, если об объекте и предмете исследования нет ясных представлений и трудно выдвинуть рабочую гипотезу. Цель составления такого плана - уточнение темы (проблемы) и формулировка гипотезы. Обычно он применяется, когда по теме отсутствует литература или ее очень мало. Описательный план используется тогда, когда можно выделить объект и предмет исследования и сформулировать описательную гипотезу. Цель плана - проверить эту гипотезу, описать факты, характеризующие объект исследования. Экспериментальный план включает проведение биотехнологического эксперимента. Он применяется тогда, когда сформулированы научная проблема и объяснительная гипотеза. Цель плана - определение причинно-следственных связей в исследуемом объекте. В процедурной части программы обосновывается выбор методов исследования, показывается связь данных методов с целями, задачами и гипотезами исследования. При выборе того или иного метода следует учитывать, что он должен быть:

- эффективным, т.е. обеспечивающим достижение поставленной цели и необходимую степень точности исследования;
- экономичным, т.е. позволяющим сэкономить время, силы и средства исследования;
- простым, т.е. доступным исследователю соответствующей квалификации;
- безопасным для здоровья и жизни людей;
- допустимым с точки зрения морали и норм права;
- научным, т.е. имеющим прочную научную основу.

Студенты ВУЗов не разрабатывают рабочие программы научных исследований, но они обязаны составлять планы подготовки учебных работ. План магистерской, дипломной или курсовой работы должен содержать введение, основную часть, разбитую на разделы и подразделены (вопросы), и заключение. План может быть простым или сложным. Простой план содержит перечень основных вопросов. В сложном плане каждый раздел разбивается на подразделы. Иногда составляют комбинированный план, где одни разделы разбиваются на подразделы, а другие оставляют без дополнительной рубрикации.

При составлении плана следует стремиться, чтобы:

- вопросы соответствовали выбранной теме и не выходили за ее пределы;
- вопросы темы располагались в логической последовательности;
- в него обязательно были включены вопросы темы, отражающие основные аспекты исследования;
- тема была исследована всесторонне.

План не является окончательным и в процессе исследования может меняться, поскольку могут быть найдены новые аспекты изучения объекта и решения научной задачи. Чтобы упорядочить основные этапы научно-исследовательской работы в соответствии с планом (программой) исследования, календарными сроками, составляется рабочий план (план-график) выполнения работ.

Студент должен уметь так выстроить логическую очередность выполнения работ, чтобы она в установленные сроки привела к достижению поставленной цели и решению научной задачи. В работе необходимо выделить главное, на чем следует сосредоточить внимание в данный момент, но вместе с тем нельзя упускать из поля зрения детали. Научиться не только смотреть, но и видеть, замечать важные частности, видеть большое в малом, не уклоняясь от намеченной главной линии исследования - это очень важное качество исследователя.

### **3.3 Методика изучения состояния вопроса и написание литературно-аналитического обзора по теме исследования**

После того, как сделан выбор темы исследования и поставлена цель научно-исследовательской работы, магистранты приступают к изучению состояния вопроса. Цель этого этапа работы - получение максимально доступного количества информации, связанной с предметом исследования. Конкретный подход к изучению состояния вопроса зависит от характера темы исследования, однако можно рекомендовать общий порядок проведения такой работы. Прежде всего, следует установить, возможно ли вообще на данном этапе развития

науки и техники решить поставленный вопрос. Это позволяет сделать заключение об обоснованности постановки цели исследования и дальнейшей работы над темой. Затем устанавливается, решался ли такой или подобный вопрос в данной или смежных областях науки и каковы результаты этих исследований. От полученных данных зависит обоснование целесообразности разработки поставленной темы, а также выбор общего направления исследования. Далее всесторонне оцениваются условия, в которых протекают подлежащие исследованию процессы, а также мера изученности влияния этих условий. Выводы, сделанные на данной стадии изучения состояния вопроса, позволяют поставить конкретные задачи исследования. Постановка задач исследования требует изыскания путей их решения, что является последней стадией изучения состояния вопроса. Пути решения поставленных задач находятся с помощью анализа приемлемых методов и средств исследования.

Таким образом, проведение патентно-библиографического поиска, т.е. ознакомление с научно-технической информацией, имеющейся по исследуемому вопросу, страхует от дублирования ранее выполненных работ, от повторения уже раскритикованных ошибок, облегчает использование опыта предшественников. Рассмотрение проблемы в динамике дает возможность проследить общие тенденции ее развития и наметить пути решения поставленных вопросов.

Как правило, руководитель указывает основную литературу: монографии, учебные пособия или обзорные статьи, необходимые для первоначального ознакомления с проблемой. Начать библиографический поиск можно и самостоятельно, пользуясь систематическими каталогами библиотеки, интернет-ресурсами. Далее необходимо по литературным ссылкам, имеющимся в монографиях и обзорах, ознакомиться с первоисточниками. С помощью реферативных журналов проводят поиск литературы последних десяти лет, не охваченной монографиями и обзорами. Составляемые по изучаемому литературному источнику выписки могут быть полными (цитаты) и сокращенными (существо вопроса). И в том, и в другом случае необходимо указывать фамилию автора (авторов), название, причем если эта статья из сборника или журнала, то указывается название статьи, а затем название и номер сборника или журнала, место издания, издательство, год издания и количество страниц. Краткие записи удобно производить на специальных карточках из тонкого картона. Выписывая сведения из первоисточников, необходимо правильно оформлять литературные ссылки, чтобы ими можно было воспользоваться впоследствии при написании отчета, дипломной работы или подготовке статьи, заявки на авторское свидетельство. Распространенная ошибка студентов, начинающих исследование - неполное оформление литературных ссылок, в результате чего приходится по-

вторно разыскивать необходимые книги или статьи при составлении библиографии. Список использованной литературы приводится в конце работы. Литературные источники указываются в алфавитном порядке вначале на русском, а потом - на иностранных языках.

### **Составление рабочего плана исследования**

Активный критический анализ литературных источников, сопоставление идей различных авторов, известных экспериментальных фактов способствуют возникновению собственных соображений и решений, формированию рабочей гипотезы - направляющей научной идеи, требующей дальнейшей проверки. Иногда, например, при выполнении поисковых тем, выдвигаются не одна, а несколько гипотез и в процессе дальнейшего исследования та или иная гипотеза либо подтверждается, либо опровергается.

Желательно, чтобы студенты выступали не только как технические исполнители предложенной научным руководителем идеи, но и сами принимали участие в творческом процессе разработки гипотез. Гипотеза - отправная точка для всей работы, для составления рабочего плана исследования. Конечно, в науке ценны, прежде всего, неожиданные результаты, однако возможность их получения не снижает важности планирования: план организует работу, делает ее более целеустремленной.

Составление рабочего плана исследования следует начинать с конкретизации темы, уточнения ее формулировки и цели исследования, надо определить, какие методы анализа необходимы для проведения работы. Если известные методы не позволяют полностью решить поставленные задачи, то в плане необходимо выделить как этап работы совершенствование или самостоятельную разработку методик исследования. Затем формулируются этапы работы и определяются сроки их исполнения. Необходимо составить календарный план исследования на семестр, сформулировав конкретные задачи на каждый месяц работы. В плане необходимо предусмотреть время на составление отчета по научно-исследовательской работе. На протяжении всего дальнейшего исследования магистранты руководствуются календарным планом, а научные руководители контролируют по нему ход работы. Если в процессе выполнения исследования получены неожиданные результаты, то магистрант может внести необходимые уточнения и изменения в рабочий план, согласовав их с руководителем.

## Планирование эксперимента

Под экспериментом понимают строгую последовательность заранее определенных действий, ведущих к получению одной или множества величин, представляющих результат эксперимента. Если назвать результат эксперимента выходным параметром, то эксперимент можно определить как совокупность опытов, позволяющих установить влияние на выходной параметр воздействующих на него факторов. Фактором называется измеряемая величина, принимающая в некоторый момент времени определенное значение. Факторы, не изменяющие своего значения в пределах всего эксперимента, называют постоянными. Конкретное числовое значение, принимаемое фактором в опыте, называют уровнем фактора. Постоянные факторы закрепляют на определенных уровнях в дальнейшем оставляют неизменными. Переменные факторы варьируют в интересующем исследователя диапазоне.

На объект исследования влияет также и целый ряд факторов, которые трудно или невозможно учесть. Такие факторы называют неконтролируемыми, а совокупное их воздействие на выходной параметр - уровнем шума. Наличие шума в эксперименте снижает точность и надежность получаемых данных и затрудняет их обработку. Следует отметить, что для экспериментов, проводимых в области пищевой науки и технологии, характерно наличие высокого уровня шума, обусловленного большой индивидуальностью пищевых продуктов как объектов исследования.

Различают следующие эксперименты: активный и пассивный, однофакторный и многофакторный. Активный эксперимент - тот, условия, проведения которого можно целенаправленно менять, т.е. управлять изучаемым процессом. Достоинством такого метода эксперимента является возможность обеспечить высокую точность проведения каждого опыта и воспроизвести их в одних и тех же условиях. Недостатком - относительная сложность его постановки. Пассивным называют эксперимент, условия, проведения которого не могут быть управляемы. Они могут меняться в некоторой степени в связи с изменением условий наблюдаемого процесса. Исследователь регистрирует значения изменяющихся факторов, обрабатывает результаты и дает рекомендации. Очевидным достоинством пассивного эксперимента является простота его постановки, недостатком - высокая погрешность результатов.

Активный эксперимент может быть однофакторным и многофакторным, пассивный - только многофакторным. Однофакторным называют такой эксперимент, когда изучается воздействие на объект исследования только одного управляемого переменного фактора. Многофакторным называется эксперимент, при котором на исследуемый объект одновременно действует несколько

переменных факторов. Методы обоих видов экспериментов имеют свои достоинства и недостатки.

Достоинствами однофакторного метода эксперимента являются простота выполнения и обработки каждого опыта, наглядность результата, позволяющая оперативно его проанализировать. Недостатком - необходимость проведения большого количества экспериментов при изучении влияния на процесс многих переменных факторов: кроме того, этот метод не позволяет установить результат совместного влияния некоторых факторов на исследуемый опыт, что обычно имеет место в реальных процессах. Многофакторный метод эксперимента обладает рядом достоинств: позволяет изучить одновременное воздействие на процесс нескольких факторов при проведении сравнительно небольшого числа опытов; обнаружить эффект взаимодействия факторов при совместном их влиянии; построить математическое описание изучаемого процесса (математическую модель), позволяющее оптимизировать выходной параметр без проведения дополнительных опытов. Однако такой метод исключает оперативный анализ получаемых результатов ввиду их ненаглядности и требует тщательного выполнения опытов, так как трудно обнаружить ошибку, если она вдруг возникнет. Недостатком является также трудоемкость последующей обработки полученных результатов. Метод однофакторного эксперимента широко распространен. Многофакторные эксперименты требуют математического планирования и решаются, как правило, с применением компьютерного моделирования.

На первом этапе планирования эксперимента необходимо выбрать параметр оптимизации - количественный критерий, однозначно характеризующий цель исследования. Далее выбирают факторы, влияющие на параметр оптимизации, при этом важно не пропустить какие-то существенные факторы. Затем следует стадия получения математической модели процесса, при этом используются методы регрессивного и факторного анализов.

Например, при исследовании производства и хранения быстрозамороженных овощей в качестве переменного фактора последовательно выбираются: температура замораживания, температура холодильного хранения, вид и сорт овощей. Пассивный эксперимент используется часто при масштабировании лабораторных результатов до промышленного уровня.

### **Оформление рабочего журнала**

В рабочем журнале систематически фиксируются: дата проведения эксперимента, условия опыта и все первичные экспериментальные данные и наблюдения. В нем отмечают также все отступления от намеченного режима. Записи в рабочем журнале должны вестись аккуратно, в определенном порядке,

чтобы в них было легко разобраться при оформлении результатов работы. Желательно проводить обработку экспериментальных данных сразу после окончания опыта - это позволяет своевременно обнаружить ошибки и внести коррективы в план и методику дальнейших исследований.

При проведении серии опытов фиксация хода исследования упрощается при использовании табличной формы, в которой для каждого показателя отводится отдельная графа, а описание отдельного эксперимента занимает только одну строчку. Табличная форма ускоряет запись, облегчает сводку данных, установление определенных закономерностей в изменении показателей. В рабочем журнале необходимо также приводить схемы установок, описание методик отдельных опытов, методов анализа. Рабочий журнал служит основой для обработки данных и написания диссертации. Диссертация должна содержать, как правило, следующие разделы и элементы:

- титульный лист;
- реферат (0,5-1 с.);
- оглавление;
- введение (1-3 с.);
- литературный обзор (10-15 с.);
- обоснование выбранного направления работы (2-3 с.);
- методику эксперимента (5-7 с.);
- результаты исследования и их обсуждение (10-20 с.);
- заключение (1 с.);
- приложения.

В реферате отражают: основное содержание проведенной научно-исследовательской работы; сущность работы и методы исследования; конкретные сведения, раскрывающие содержание работы; краткие выводы относительно ее результатов, особенностей и области применения.

Оглавление должно включать последовательное перечисление заголовков всех разделов, подразделов и приложений с указанием номеров страниц, на которых они помещены. Нумерация страниц диссертации должна быть сквозной, включающей все разделы, в том числе титульный лист (первая страница, номер которой не проставляется), рисунки, список литературы и приложения. Номера страниц ставятся в верхнем поле посередине.

Введение должно «ввести» читателя в круг рассматриваемых вопросов, показать их актуальность. Во введении необходимо также четко сформулировать цель работы.

Литературный обзор должен содержать достаточно полное и систематизированное критическое изложение современного состояния вопроса, которому посвящена выполняемая работа. Обзор не должен напоминать сводку кратких

конспектов ранее опубликованных работ по рассматриваемой проблеме. В нем необходимо провести сопоставление результатов исследований различных авторов, выявить противоречивые данные, проанализировать и объективно оценить их. С учетом небольшого объема обзора в отчете необходимо анализировать только материалы, имеющие непосредственное отношение к теме работы.

Обоснование выбранного направления должно вытекать из выводов по литературному обзору. В нем конкретизируется задача исследования, обосновывается целесообразность выбора используемых далее объектов и методов анализа.

Методика эксперимента излагается подробно, если она оригинальна, разработана самим автором диссертации или нигде не опубликована. Если в работе применялись известные методы исследования, описанные другими авторами, то достаточно брать ссылки на соответствующие литературные источники. Необходимо отмечать все отклонения от известных методик, их усовершенствования, внесенные автором. В этом же разделе следует привести расчеты погрешности определений и перечислить применяемые реактивы и материалы. Необходимо подробно описать объект исследования и постановку опытов.

В разделе «Результаты исследования и их обсуждение» должны быть последовательно изложены и проанализированы полученные результаты. Экспериментальные данные необходимо сопоставить с теоретическими результатами и предположениями или аналогичными данными, полученные ранее другими исследователями и указанными в литературном обзоре. Желательно рассмотреть границы применимости вытекающих из работы положений, выводов и указать области возможного практического использования полученных результатов. Не следует перегружать этот раздел второстепенными деталями, черновыми записями из рабочего журнала. В то же время из диссертации должны быть понятны исходные положения, логика рассуждений и аргументация автора, приводящего к тому или иному утверждению или рекомендации. Экспериментальные результаты представляются в диссертации в виде таблиц и графиков, которые приводятся в тексте по возможности сразу после первого упоминания о них.

Все таблицы обязательно должны иметь заголовки, а рисунки (графики, схемы, фотографии) - подрисуночные подписи.

В диссертации необходимо включать, как правило, не первичные графики, отражающие результаты того или иного измерения, а обобщенные, наглядно иллюстрирующие найденные закономерности. При оформлении графиков надписи, обозначающие величины, отложенные по осям, и единицы измерений располагают параллельно соответствующим осям. На графиках экспериментальных кривых обязательно наносят точки, соответствующие эксперименталь-

ным данным. На график расчетных (теоретических) кривых и усредненных значений экспериментальных результатов точки не ставят. Надписи, относящиеся к кривым и точкам, оставляют на графике только в тех случаях, когда их немного и они кратки; многословные записи заменяют цифрами, а расшифровку приводят в подрисуночной подписи.

При написании диссертации необходимо учитывать такие традиционные особенности научного языка, как тенденции к стандартизации, употреблению устойчивых оборотов, частое использование неопределенно-личных предложений. Не следует для обозначения одного и того же понятия применять различные термины, по-разному называть одно и то же вещество, так как это вносит путаницу. Описание экспериментов должно быть выдержанно в одном времени, лучше всего в прошедшем. Недопустим профессиональный жаргон. Фамилии иностранных авторов приводятся в тексте без инициалов, как правило, в русском написании, а фамилии отечественных авторов - с инициалами.

Заключение или выводы должны содержать оценку результатов работы, характеризовать ее теоретическое или практическое значение. Следует избегать выводов - констатаций, перечисления того, что исследовалось в работе. Выводы должны отражать научную новизну работы, установленные автором закономерности, новые положения, рекомендации. Не следует умалчивать об отрицательных результатах - они также указываются в заключении и часто не менее важны, чем положительные, так как помогают другим исследователям избежать повторения ошибочных путей. Выводы должны быть многочисленны и обоснованны. Рекомендуется формулировать их возможно более тщательно, не перегружая цифровыми данными, частностями, обоснованиями - все это должно содержаться в предыдущем разделе.

Библиографию к отчету, как и к любой научной работе, необходимо оформлять в соответствии с ГОСТом. При описании книг указываются: фамилия и инициалы автора, полное название книги, место издания, издательство, год издания, количество страниц в книге. Наименование места издания необходимо приводить полностью, допускается сокращение названия только двух городов: Москвы (М) и Санкт-Петербурга (СПб).

Библиографическое описание журнальных статей включает: фамилию и инициалы автора, заглавие статьи, наименование журнала, наименование серии (если таковая имеется), год, номер тома, номер выпуска, страницы, на которых помещена статья. При описании статей в сборниках перед сведениями об издании приводят сокращенные слова «В кн.» или «In» - при ссылках на зарубежные издания.

Приложения содержат второстепенные материалы, представляющие определенную ценность, но не помещенные в основной текст из-за громоздкости,

вспомогательного характера, однотипности информации и т.п. К ним относятся громоздкие таблицы, на основании которых в разделе «Результаты исследования и их обсуждение» построены графики, иллюстрации, подобные приведенным в основном тексте, промежуточные математические доказательства и расчеты, описания приборов, методик, акты испытаний и т.п.

### **3.4 Источники научной информации**

Под источником информации понимается документ, содержащий какие-либо сведения. К документам относят различного рода издания, являющиеся основным источником научной информации. Издание - это документ, предназначенный для распространения содержащейся в нем информации, прошедший редакционно-издательскую обработку, полученный печатанием или тиснением, полиграфически самостоятельно оформленный, имеющий выходные сведения.

Источниками научной информации служат непубликуемые документы: диссертации, депонированные рукописи, отчеты о научно-исследовательских работах и опытно-конструкторских разработках, научные переводы, обзорно-аналитические материалы. В отличие от изданий эти документы не рассчитаны на широкое и многократное использование, находятся в виде рукописей либо тиражируются в небольшом количестве экземпляров на принтерах и ксероксах. Все документальные источники научной информации делятся на первичные и вторичные. Первичные документы содержат исходную информацию, непосредственные результаты научных исследований (монографии, сборники научных трудов, авторефераты диссертаций и т.д.), а вторичные документы являются результатом аналитической и логической переработки первичных документов (справочные, информационные, библиографические и другие тому подобные издания).

Издания классифицируются по различным основаниям:

- по целевому назначению (официальное, научное, учебное, справочное и др.);
- по степени аналитико-синтетической переработки информации (информационное, библиографическое, реферативное, обзорное);
- по материальной конструкции (книжное, журнальное, листовое, газетное и т.д.);
- по знаковой природе информации (текстовое, нотное, картографическое, изоиздание);
- по объему (книга, брошюра, листовка);
- по периодичности (непериодическое, сериальное, периодическое, продолжающееся);

- по составу основного текста (моноиздание, сборник);
- по структуре (серия, однотомное, многотомное, собрание сочинений, избранные сочинения).

Для научных исследований наибольший интерес представляют издания, из которых может быть почерпнута необходимая для научно-исследовательской работы информация. Это научные, учебные, справочные и информационные издания.

### **Виды научных изданий**

Научным считается издание, содержащее результаты теоретических и (или) экспериментальных исследований, а также научно подготовленные к публикации памятники культуры и исторические документы. Научные издания делятся на следующие виды: монография, автореферат диссертации, препринт, сборник научных трудов, материалы научной конференции, тезисы докладов научной конференции, научно-популярное издание.

Монография - это научное или научно-популярное книжное издание, содержащее полное и всестороннее исследование одной проблемы или темы и принадлежащее одному или нескольким авторам.

Автореферат диссертации - это научное издание в виде брошюры, содержащее составленный автором реферат проведенного им исследования, представляемого на соискание ученой степени.

Препринт - это научное издание, содержащее материалы предварительного характера, опубликованные до выхода в свет издания, в котором они могут быть помещены.

Сборник научных трудов - это сборник, содержащий исследовательские материалы научных учреждений, учебных заведений или обществ.

Материалы научной конференции - это научный непериодический сборник, содержащий итоги научной конференции (программы, доклады, рекомендации, решения).

Тезисы докладов (сообщений) научной конференции - это научный непериодический сборник, содержащий опубликованные до начала конференции материалы предварительного характера (аннотации, рефераты докладов и сообщений).

Научно-популярное издание - это издание, содержащее сведения о теоретических и экспериментальных исследованиях в области науки, культуры и техники, изложенные в форме, доступной читателю - неспециалисту.

## **Виды учебных изданий**

Учебное издание - это издание, содержащее систематизированные сведения научного или прикладного характера, изложенные в форме, удобной для преподавания и изучения, и рассчитанное на учащихся разного возраста и степени обучения. Виды учебных изданий: учебник, учебное пособие, учебно-методическое пособие и другие.

Учебник - это учебное издание, содержащее систематическое изложение учебной дисциплины (ее раздела, части), соответствующее учебной программе и официально утвержденное в качестве данного вида издания.

Учебное пособие - это учебное издание, дополняющее или частично (полностью) заменяющее учебник, официально утвержденное в качестве данного вида издания.

Учебно-методическое пособие - это учебное издание, содержащее как изложение дисциплины, так и методические материалы к проведению практических и самостоятельных индивидуальных работ, материалы по методике преподавания учебной дисциплины (ее раздела, части) или по методике воспитания.

### **Периодические издания. Справочно-информационные издания**

Справочное издание - это издание, содержащее краткие сведения научного или прикладного характера, расположенные в порядке, удобном для их быстрого отыскания, не предназначенное для сплошного чтения. Это - словари, энциклопедии, справочники и другие.

Информационное издание - это издание, содержащее систематизированные сведения о документах (опубликованных, неопубликованных, непубликуемых) либо результат анализа и обобщения сведений, представленных в первоисточниках, выпускаемое организацией, осуществляющей научно-информационную деятельность, в том числе органами научно-технической информации. Эти издания могут быть библиографическими, реферативными, обзорными.

Библиографическое издание - это информационное издание, содержащее упорядоченную совокупность библиографических записей (описаний).

Реферативное издание - это информационное издание, содержащее упорядоченную совокупность библиографических записей, включающих рефераты. К ним относятся реферативные журналы, реферативные сборники, информационные листки и экспресс - информация.

Обзорное издание - это информационное издание, содержащее публикации одного или нескольких обзоров, включающих результаты анализа и обобщения представленных в источниках сведений.

Издания могут быть непериодическими, периодическими и продолжающимися. Непериодическое издание выходит однократно, и его продолжение заранее не предусмотрено. Это книги, брошюры, листовки.

Книга - это книжное издание объемом свыше 48 страниц.

Брошюра - это книжное издание объемом свыше четырех, но не более 48 страниц.

Текстовое листовое издание объемом от одной до четырех страниц называется листовкой.

Периодические издания выходят через определенные промежутки времени, постоянным для каждого года числом номеров (выпусков), не повторяющимися по содержанию, однотипно оформленными, нумерованными и (или) датированными выпусками, имеющими одинаковое заглавие. Это газеты, журналы, бюллетени, вестники.

Газета - это периодическое газетное издание, выходящее через краткие промежутки времени, содержащее официальные материалы, оперативную информацию и статьи по актуальным общественно-политическим, научным, производственным и другим вопросам, а также литературные произведения и рекламу.

Журнал - это периодическое текстовое издание, содержащее статьи или рефераты по различным общественно-политическим, научным, производственным и другим вопросам, литературно-художественные произведения, имеющие постоянную рубрику, официально утвержденное в качестве данного вида издания.

Бюллетени и вестники могут быть периодическими или продолжающимися изданиями. Продолжающиеся издания выходят через неопределенные промежутки времени, по мере накопления материала, не повторяющимися по содержанию, однотипно оформленными и (или) датированными выпусками, имеющими общее заглавие. Бюллетень (вестник) - это периодическое или продолжающееся издание, выпускаемое оперативно, содержащее краткие официальные материалы по вопросам, входящим в круг ведения выпускающей его организации.

В завершение краткой характеристики основных источников научной информации следует упомянуть небумажные, нетрадиционные источники: кинофильмы, видеофильмы, микрофильмы, магнитные и оптические диски и др.

## Электронные источники научной информации

Отдельно следует отметить Интернет-ресурсы, как особо важный и наиболее оперативный источник информации для исследований в направлении «Биотехнология». Подробно Интернет-ресурсы будут охарактеризованы в разделе 4, ниже приведены некоторые наиболее «общеобразовательные» ресурсы.

1. Новости генетической инженерии и биотехнологии - Genetic Engineering & Biotechnology News - <http://www.cato.com/biotch/>

2. Интернет-каталог DMOZ, раздел «Биотехнология» - <http://dmoz.org/Science/Biotechnology/>

3. Биоматериаловедение - Biomaterials Network - <http://www.biomat.net>

4. Каталог биотехнологических ресурсов - BUBL-LINK - <http://bubl.ac.uk/link/b/biotechnology.htm>

5. Ежедневный Интернет-монитор биотехнологии - FierceBiotech - <http://www.fiercebiotech.com>

6. Информационный центр - Chemistry, Biology and related disciplines in the WWW - <http://www.infochembio.ethz.ch/links/en/biotech-intemet.html>

7. Наглядная биотехнология - Graphics Gallery - <http://www.accessexcellence.org/RG/VL/GG/>

8. Интернет-ресурсы биотехнологии университета Делавра (США) - <http://www2.lib.udel.edu/subj/biotech/internet.htm>

9. Обзорные журналы «Nature» - Nature Reviews - <http://www.nature.com/reviews/index.html>

10. Журнал «Nature Biotechnology» - <http://www.nature.com/nbt/index.html>

11. Международный каталог ферментов - Enzyme Nomenclature - <http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/enzyme/>

12. Факультет молекулярной физики и биофизики МФТИ (Россия) - <http://bio.fizteh.ru/resource/biotech-news.esp>

13. Российские биотехнологии и биоинформатика (Россия) - <http://www.rusbiotech.ru/>

14. Биотехнология геновая инженерия, промышленная биотехнология, клеточная инженерия. Учебное - Интернет-пособие (Россия) - <http://www.biotechnolog.ru/>

16. Общество биотехнологов России - <http://www.biorosinfo.ru/>

17. Интернет - каталог - Bio compare - <http://biocompare.com>

18. Интернет - каталог - Bioscience Technology - <http://www.biosciencetechnology.com>

19. Интернет-каталог Galaxy, раздел «Биотехнология» - <http://www.galaxy.com/galaxy/Science/Biology/Biotechnology.html>

20. Национальный центр биотехнологической информации (США) - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
  21. Интернет-раздел биотехнологических ресурсов - MVS Solutions - <http://www.mvssolutions.com/biotech.html>
  22. Биофизическое общество (США) - <http://www.biophysics.org>
  23. Электронные версии научных и технических журналов - <http://www.sciencedirect.com/>
  24. Поисковая система информации о научных исследованиях Scirus - <http://www.scirus.com/srsapp/>
  25. Каталог Биотехнология Yahoo - <http://dir.yahoo.com/Science/Biology/Biotechnology/>
  26. Универсальный поисковый сервер Google - <http://www.google.com>
- Сайт автора, с которого можно скачать учебники, в том числе и данное пособие - Prof. A.N. Ogurtsov - <http://sites.google.com/site/anogurtsov/>

### **Изучение источников научной информации**

Изучение источников информации начинается с подбора и составления списка (картотеки) Интернет-источников, учебников, учебных пособий, монографий, журнальных и газетных статей, технологических регламентов биотехнологических предприятий.

Необходимо просмотреть в библиотеках систематические, алфавитные и предметные каталоги, каталоги авторефератов диссертаций, журнальных и газетных статей. В алфавитном каталоге название книг (карточки) расположены в алфавитном порядке, который определяется по первому слову библиографического описания издания (фамилии автора или названию издания, автор которого не указан). В систематическом каталоге карточки расположены по отдельным отраслям знаний в порядке, определяемом библиографической классификацией. Разновидностью такого каталога является каталог новых поступлений, в котором содержатся названия книг, поступивших в библиотеку в течение последних месяцев. В предметном каталоге названия книг размещены по определенным предметам (темам) исследования, отраженным в рубриках. Сами рубрики и названия книг в этом каталоге следуют друг за другом в алфавитном порядке.

Для подбора литературы полезно воспользоваться библиографическими и реферативными изданиями. Необходимо просмотреть библиографические журналы, в частности, последние номера за тот или иной год, в которых даны указатели материалов, опубликованных в журнале за этот год. Можно просмотреть постраничные ссылки на использованную литературу в монографиях, учебных

пособиях и журнальных статьях. Нельзя упускать из вида сборники трудов ВУ-Зов и научно-исследовательских учреждений, тезисы и материалы научно-практических конференций.

Ценную информацию, особенно при изучении спорных вопросов темы, студент может получить из рецензий на работы ученых и преподавателей. Некоторые учебники, учебные пособия, учебные программы, планы семинаров и практических занятий по дисциплине, к которой имеет отношение выбранная студентом тема исследования, содержат списки основной и дополнительной литературы.

Изучение специальной литературы (монографий, учебников, учебных пособий, сборников научных трудов и др.) рекомендуется проводить в определенной последовательности. Сначала следует ознакомиться с книгой в общих чертах. Необходимость этого этапа определяется тем, что вовсе не обязательно тратить время на прочтение каждой книги, возможно, вам понадобится лишь отдельная ее часть или даже просто конкретная информация. В этих целях может оказаться достаточным прочитать справочный аппарат издания, который включает: выходные сведения (заглавие, автор, издающая организация, год издания, аннотация, выпускные данные и т.д.); оглавление или содержание; библиографические ссылки и списки; предисловие, вступительную статью, послесловие или заключение. Такое ознакомление с книгой поможет установить, целесообразно ли дальнейшее ее изучение.

Существует два способа чтения книги: беглый просмотр ее содержания и тщательная проработка текста. Путем беглого просмотра можно ознакомиться с книгой в общих чертах. В результате такого «поискового» чтения может оказаться, что в ней содержится нужная информация и требуется скрупулезно ее изучить. Тщательная проработка текста заключается не только в полном его прочтении, но и в усвоении, осмыслении, детальном анализе прочитанного.

При чтении специальной литературы важно уточнить все те понятия и термины, которые могут быть неправильно или неоднозначно истолкованы. Для этого необходимо обратиться к словарям и справочникам, в которых может быть дано их толкование. Вместе с тем в тексте следует выделить основные положения и выводы автора и доказательства, их обосновывающие. Если изучается нужная, интересная публикация и требуется тщательная проработка текста, то при отсутствии возможности его скопировать составляется конспект. Конспект представляет собой сжатое изложение существенных положений и выводов автора без излишних подробностей. Кратко и точно записываются определения, новые сведения, точки зрения автора публикации по спорным вопросам, приведенные им аргументы, цифровые данные, а также все то, что может быть использовано для научной работы. При этом рекомендуется в конспект указы-

вать номера страниц издания, на которых содержится необходимая вам информация, чтобы впоследствии при наличии курсовой и дипломной работы, доклада или статьи можно было сделать ссылку на использованный источник.

Чтобы на конспектирование затратить меньше времени, прибегают к различного рода сокращениям:

- стандартным (например, гос., ж.д., обл. и т.д.);
- аббревиатурам (например, НАДН, ДНК, АТФ и пр.);
- знака-символам (например, к математическим: =, >, <, + и др.);
- указывают начальную букву слова (энциклопедический метод);
- вводят свои знаки.

Выписки из книг должны быть точными. Если требуется без искажений передать мысль автора, то прибегают к дословным выпискам-цитатам. В случае использования студентом в своей научной работе этих выписок необходимо точно записать источник заимствования, т.е. дать его библиографическое описание по ГОСТу и указать номера страниц, с которых они сделаны. Если нет необходимости в тщательной проработке публикации, то можно составить ее план или реферат. Планом книги является ее оглавление. При реферировании в малом по объему тексте кратко излагаются основные положения и выводы, содержащиеся в публикации.

Некоторые читатели при работе с книгой делают всякого рода пометки на полях и выделения в тексте, обращая внимание на важные или спорные положения, выводы и аргументы. Однако «черкать» можно только свою книгу, а не библиотечную. Поэтому, работая с библиотечным изданием, прибегают к закладкам с надписями, которые помогают быстро найти нужную информацию.

Одним из способов сбора информации являются вырезки из газет и журналов. На каждой вырезке необходимо указать источник (название газеты или журнала, год, номер, дату выпуска), чтобы впоследствии можно было сделать ссылку на использованную публикацию. Для систематизации вырезок можно составить картотеку, список или просто разложить их по тематическим папкам.

Один из эффективных способов поиска научной информации, особенно на первых этапах накопления знаний по определенной теме - это прямые контакты с более опытными коллегами. Например, если тема исследований молодого ученого вытекает или перекликается с темой деятельности научного руководителя, то, приступая к поиску информации по дипломной работе или диссертации, прежде всего, просмотрите его основные труды: это даст значительный список источников, с которыми следует познакомиться в первую очередь. Посмотрите монографии, диссертации и авторефераты диссертаций по теме исследования, если таковые имеются, в списках литературы этих источников можно найти много полезного для себя. Расспросите коллег о последних обзо-

рах по теме исследования и об основных журналах (других периодических изданиях), публикующих статьи интересующего профиля.

Существует относительно мало журналов, аккумулирующих основную информацию по определенной теме, и очень много журналов, в которых статьи по данной теме сильно рассеяны. Таким образом, задача поиска информации в значительной степени сводится к тому, чтобы как можно раньше выявить ключевые журналы или другие источники, и сосредоточить свое внимание на анализе публикаций в них. Надо, однако, учитывать, что в науке существует конкуренция между исследователями, группами, школами и направлениями, что может отражаться на тематике курируемых ими журналов и сборников.

Очень полезным с точки зрения поиска научной информации может быть участие в работе профильных конференций и других мероприятий. На них предоставляется возможность услышать авторское изложение материала, завязать знакомства и получить консультации от специалистов.

Существует еще один достаточно эффективный, хотя и непростой способ получения научной информации. И обычные журналы (как бумажные, так и электронные варианты), и реферативные печатают информацию о месте работы авторов публикаций. При этом часто приводятся адреса электронной почты авторов. Если невозможно получить полнотекстовый вариант статьи, попробуйте написать непосредственно авторам с просьбой ее прислать. Хотя возможны и осложнения, например, связанные с тем, что авторское право на публикацию принадлежит обычно редакции журнала, а автор располагает всего лишь несколькими копиями, которые он имеет право распространить. Если адрес электронной почты в публикации отсутствует, попытайтесь найти его с помощью поисковых систем Интернета.

### **Вопросы для самоконтроля**

1. Охарактеризуйте значение выбора темы научного исследования в процессе подготовительного этапа научно-исследовательской работы.
2. Каковы основные функции научного руководителя НИР студента?
3. Охарактеризуйте методологический раздел рабочей программы научно-исследовательской работы. В чем его отличие от процедурного раздела?
4. Охарактеризуйте процедурный раздел рабочей программы научно-исследовательской работы. В чем его отличие от методологического раздела?
5. В чем сходство и различие первичных и вторичных документов? Приведите примеры таких документов в биотехнологии.
6. В чем сходство и различие опубликованных и неопубликованных документов?

7. В чем сходство и различие периодических и продолжающихся изданий?
8. В чем сходство и различие научной и научно-популярной литературы?
9. В чем сходство и различие научной и производственно-технической литературы?
10. В чем сходство и различие справочно-информационных изданий и учебных изданий?
11. В чем сходство и различие периодических и непериодических изданий?
12. В чем состоит информационная значимость в био- и холодильной технологиях таких непубликуемых документов, как научно-технические отчеты и диссертации?
13. В чем состоит информационная значимость и специфика патентной информации в био- и холодильной технологиях по сравнению с другими видами научно-технической информации?
14. Перечислите три основных вида каталогов. В чем специфика каждого из видов каталогов?
15. В чем состоят достоинства и недостатки Интернет-ресурсов по био- и холодильной технологиях?
16. Опишите методику и последовательность изучения источников информации на подготовительном этапе научного исследования.

#### **4. КОРРЕЛЯЦИЯ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КАЧЕСТВА И БЕЗОПАСНОСТИ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ**

Пищевые продукты представляют собой сложные многокомпонентные системы. В процессе исследования влияния различных факторов (температуры, влажности, давления, газовых сред и т.п.) на физико-химические, биохимические, микробиологические, органолептические показатели качества и безопасности продукции устанавливается некая зависимость между переменными величинами, но она не является вполне определенной: каждому значению одной из величин (например  $X$ ), соответствует некоторая совокупность значений другой (например  $Y$ ). Причем распределение  $Y$  меняется определенным образом при изменении  $X$ . В этом случае связь, существующая между переменными  $X$  и  $Y$  называется корреляционной [1, 4, 8].

Корреляция величин заключается в том, что при задании одной из них устанавливается не одно точное значение, а вероятности различных значений; то есть зависимость обнаруживается не между самими величинами, а между каждой из них и соответствующим ей математическим ожиданием другой. Корре-

ляционная связь устанавливается на основе статистических методов анализа. Она является промежуточной между точной зависимостью, даваемой функциональной связью, и совершенной независимостью переменных.

При установлении зависимости между переменными  $X$  и  $Y$  мы имеем парные значения соответствующих друг другу величин:  $(X_1, Y_1), (X_2, Y_2), \dots (X_n, Y_n)$ . Если изобразить их на диаграмме в координатах  $X - Y$ , то получится система точек, например, такая, как приведена на рисунке 4.1.

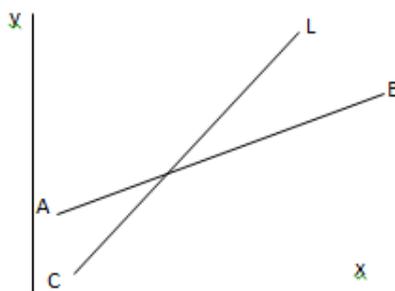


Рисунок 4.1 - Зависимость изменения функции  $Y$  от  $X$

Здесь каждому значению  $X$  не соответствует вполне определенное значение  $Y$ , но очевидна тенденция к расположению точек определенным образом, полосой, что дает возможность установить некоторую связь, а именно корреляцию  $X$  и  $Y$ .

Если нанести на диаграмму средние значения  $\bar{y}_i$  (обозначены крестиками), соответствующие каждому значению  $X_i$ , и провести прямую  $AB$ , «наилучшим» образом выравнивающую систему этих средних значений, то будет получена корреляционная зависимость

$$\bar{Y} = aX + b \quad (4.1)$$

являющаяся уравнением прямой  $AB$  и приближенно отражающая связь между  $X$  и  $\bar{y}_i$ . Линия  $AB$  называется линией регрессии  $Y$  по  $X$ . В данном случае линия регрессии оказалась прямой.

Для того, чтобы прямая  $AB$  «наилучшим» образом выравнивала средние значения  $\bar{y}_i$  ее необходимо провести так, чтобы сумма квадратов расстояний от нее (измеренных параллельно оси  $Y$ ) всех точек была наименьшей, т.е. меньше, чем от любой другой прямой. Все значения  $Y$ , полученные из проведенной таким способом линии регрессии, имеют наибольшую корреляцию с действительно наблюдавшимися.

Аналогичным путем находится линия регрессии  $X$  по  $Y$ , приближенное уравнение которой будет:

$$\bar{X} = cY + d \quad (4.2)$$

На диаграмме эта линия  $CD$  выравнивает средние значения  $X_i$  (отмечены точками).

В общем случае уравнения регрессии имеют вид  $\bar{Y} = f(X)$  и  $\bar{X} = \varphi(Y)$  и линии регрессии изображаются кривыми. При этом наиболее удобным является отыскание корреляционной зависимости в виде многочлена  $n$ -ой степени, например:

$$\bar{Y} = a + bX + cX^2 + \dots + dX^n$$

Уравнения (4.1) и (4.2) соответствуют наиболее распространенному, но частному случаю линейной корреляционной связи, когда линии регрессии прямые. Если между  $X$  и  $Y$  существует не функциональная, а корреляционная связь, то понятие о «наилучшем» значении  $Y$ , соответствующем данному значению  $X$ , теряет смысл и заменяется понятием о наиболее вероятном значении  $Y$  из совокупности наблюдаемых его значений. Чем «теснее» расположены эти значения  $Y$ , тем ближе они к наиболее вероятному значению, тем определеннее связь между  $X$  и  $Y$ . Наиболее важным показателем этой связи служит коэффициент парной линейной корреляции  $r$ , характеризующий степень линейной связанности  $X$  и  $Y$ .

Абсолютная величина  $r$  всегда меньше единицы; когда она равна единице,  $X$  и  $Y$  связаны функциональной линейной связью (прямые регрессии  $Y$  по  $X$  и  $X$  по  $Y$  совпадают); когда  $r = 0$ , между  $X$  и  $Y$  линейной корреляционной связи не существует. В этом случае прямые, выраженные уравнениями (4.1) и (4.2), идут соответственно параллельно осям  $OX$  и  $OY$ . Однако, здесь может существовать нелинейная зависимость.

Если имеется ряд значений  $X_i$  и соответствующий ему ряд  $Y_i$ , а  $\bar{X}$  и  $\bar{Y}$  средние арифметические значения, то

$$x_i = X_i - \bar{X}; \quad y_i = Y_i - \bar{Y}$$

являются отклонениями от средних, а средние квадратические отклонения  $\sigma$  будут равны:

$$\sigma_x = \sqrt{\frac{\sum x_i^2}{n}} = \sqrt{\frac{\sum X_i^2}{n} - \bar{X}^2} \quad (4.3)$$

$$\sigma_y = \sqrt{\frac{\sum Y_i^2}{n} - \bar{Y}^2} \quad (4.4)$$

Коэффициент корреляции выражается следующими формулами, легко выводимыми одна из другой:

$$r = \frac{\sum x_i y_i}{n \sigma_x \sigma_y} = \frac{\sum x_i y_i}{\sqrt{\sum x_i^2} \sqrt{\sum y_i^2}} \quad (4.5)$$

$$r = \frac{\sum (X_i - \bar{X})(Y_i - \bar{Y})}{n\sigma_x\sigma_y} \quad (4.6)$$

$$r = \frac{\left[ \frac{1}{n} \sum (Y_i X_i) \right] - \bar{X} \bar{Y}}{\sigma_x \sigma_y} \quad (4.7)$$

Представленные выше в общей форме линейные уравнения регрессии (4.1) и (4.2) приводятся к следующему виду:

$$Y - \bar{Y} = r \frac{\sigma_y}{\sigma_x} (X - \bar{X}) \quad \text{или} \quad y = r \frac{\sigma_y}{\sigma_x} x \quad (4.8)$$

$$X - \bar{X} = r \frac{\sigma_x}{\sigma_y} (Y - \bar{Y}) \quad \text{или} \quad x = r \frac{\sigma_x}{\sigma_y} y \quad (4.9)$$

Уравнение (4.8) является уравнением прямой регрессии  $Y$  по  $X$ , а (4.9) уравнением прямой регрессии  $X$  по  $Y$ .

Уравнение (4.8) определяет наиболее вероятное значение  $Y$  по заданному  $X$ , а уравнение (4.9) - наиболее вероятное значение  $X$  по заданному  $Y$ .

Важно отметить, что значение  $Y$  в (4.8) не может быть получено путем решения (4.9) относительно  $Y$ . Нельзя также получить  $X$  из уравнения (4.9).

Угловые коэффициенты  $r \frac{\sigma_y}{\sigma_x}$  и  $r \frac{\sigma_x}{\sigma_y}$  прямых (4.8) и (4.9) определяют наклон линий регрессии на диаграмме в координатах  $x - y$  и называются коэффициентами регрессии  $Y$  по  $X$  и  $X$  по  $Y$ . Произведение этих коэффициентов равно  $r^2$ . Очевидно, что прямые регрессии  $Y$  по  $X$  и  $X$  по  $Y$  совпадают лишь в том случае, когда  $r = \pm 1$ .

#### 4.1 Корреляция трех переменных

При изучении связи между тремя переменными две из них принимаются независимыми, а третья - за функцию, тогда находят уравнения парных регрессий  $Y$  и  $X_1$ ,  $Y$  и  $X_2$ ,  $X_1$  и  $X_2$ .

С этой целью определяют разницу между математическим ожиданием и результатом измерения

$$1) Y - \bar{Y} = y; \quad X_1 - \bar{X}_1 = x_1; \quad X_2 - \bar{X}_2 = x_2 \quad (4.10)$$

2) Находят среднеквадратическое отклонение среднего арифметического значения

$$\sigma_{x_1} = \sqrt{\frac{\sum x_i^2}{n}}; \quad \sigma_{x_2} = \sqrt{\frac{\sum x_{2i}^2}{n}}; \quad \sigma_y = \sqrt{\frac{\sum y_i^2}{n}} \quad (4.11)$$

3) Находят линейный коэффициент корреляции

$$r_{yx_1} = \frac{\sum y \cdot x_1}{n\sigma_y \cdot \sigma_{x_1}}; \quad r_{yx_2} = \frac{\sum y \cdot x_2}{n\sigma_y \cdot \sigma_{x_2}}; \quad r_{x_1 \cdot x_2} = \frac{\sum x_1 \cdot x_2}{n\sigma_{x_1} \cdot \sigma_{x_2}} \quad (4.12)$$

4) Записывают уравнения регрессии

$$Y - \bar{Y} = r_{yx_1} \frac{\sigma_y}{\sigma_{x_1}} (X_1 - \bar{X}_1); \quad y = r_{yx_1} \frac{\sigma_y}{\sigma_{x_1}} x_1 \quad (4.13)$$

$$Y - \bar{Y} = r_{yx_2} \frac{\sigma_y}{\sigma_{x_2}} (X_2 - \bar{X}_2); \quad y = r_{yx_2} \frac{\sigma_y}{\sigma_{x_2}} x_2 \quad (4.14)$$

$$X_1 - \bar{X}_1 = r_{x_1 x_2} \frac{\sigma_{x_1}}{\sigma_{x_2}} (X_2 - \bar{X}_2) \quad (4.15)$$

Однако, эти уравнения не дают полного представления о взаимной связи между изучаемыми переменными.

Для полного анализа линейной зависимости между  $X_1$ ,  $X_2$  и  $Y$  нужно составить такое уравнение регрессии, которое позволило бы исключить влияние фактора  $X_2$ , корреляционно связанного с  $X_1$ . Это позволяет сделать теория множественной регрессии.

## 4.2 Множественная регрессия

Предположим, что множественная регрессия линейная и определяется зависимостью

$$Y = a + b_1 X_1 + b_2 X_2 \quad (4.16)$$

Для определения коэффициентов  $a$ ,  $b_1$  и  $b_2$  применим способ наименьших квадратов. Требуется, чтобы

$$f = \sum_{i=1}^n (y_i - y_p)^2 = \min, \quad (4.17)$$

где  $y_i$  - экспериментальные значения;  $y_p$  - вычисленные по уравнению регрессии (расчетные).

Функция « $f$ » будет иметь минимум, если  $a$ ,  $b_1$  и  $b_2$  удовлетворяют системе уравнений:

$$\frac{\partial f}{\partial a} = 0; \quad \frac{\partial f}{\partial b_1} = 0; \quad \frac{\partial f}{\partial b_2} = 0$$

Дифференцируя функцию  $f$  по переменным  $a$ ,  $b_1$ ,  $b_2$  получим

$$\sum y = na + b_1 \sum X_1 + b_2 \sum X_2 \quad (4.18)$$

$$\sum yX_1 = a \sum X_1 + b_1 \sum X_1^2 + b_2 \sum X_1 X_2 \quad (4.19)$$

$$\sum yX_2 = a \sum X_2 + b_1 \sum X_1 X_2 + b_2 \sum X_2^2 \quad (4.20)$$

Для решения этой системы разделим уравнение 4.18 на « $n$ », получим:

$$a = \bar{Y} - b_1 \bar{X}_1 - b_2 \bar{X}_2$$

Подставим это значение « $a$ » в формулу  $Y = a + b_1 X_1 + b_2 X_2$  и в уравнения (4.16) и (4.17), тогда формула множественной регрессии с тремя переменными имеет вид:

$$Y - \bar{Y} = b_1 (X_1 - \bar{X}_1) + b_2 (X_2 - \bar{X}_2) \quad (4.21)$$

Коэффициенты  $b_1$  и  $b_2$  множественной регрессии находятся из следующей системы линейных уравнений

$$\begin{cases} \sum yx_1 = b_1 \sum x_1^2 + b_2 \sum x_1 x_2 \\ \sum yx_2 = b_1 \sum x_1 x_2 + b_2 \sum x_2^2 \end{cases} \quad (4.22)$$

где  $\sum x_1^2 = \sum (X_1 - \bar{X}_1)^2$ ;  $\sum x_2^2 = \sum (X_2 - \bar{X}_2)^2$

$$\sum x_1 x_2 = \sum (X_1 - \bar{X}_1)(X_2 - \bar{X}_2); \quad \sum y = \sum (Y - \bar{Y})$$

Для оценки тесноты связи между переменными в случае множественной регрессии вводится коэффициент множественной корреляции  $R$ .

$$R^2 = \frac{b_1^2 \sum x_1^2 + b_2^2 \sum x_2^2 + 2b_1 b_2 \sum x_1 x_2}{\sum y^2} \quad (4.23)$$

$R$  оценивает тесноту связи между  $Y$  и переменными  $X_1$  и  $X_2$ .

$R$  можно определить через коэффициенты парных корреляций

$$R = \sqrt{\frac{r_{yx_1}^2 + r_{yx_2}^2 - 2r_{yx_1} \cdot r_{yx_2} \cdot r_{x_1 x_2}}{1 - r_{x_1 x_2}^2}} \quad (4.24)$$

Значение  $R$  всегда положительное и изменяется в пределах  $0 \leq R \leq 1$ ; причем  $R \geq r_{yx_1}$ ,  $R \geq r_{yx_2}$ .

### 4.3 Частные коэффициенты корреляции

При исследовании зависимости переменной  $Y$  от переменных  $X_1$  и  $X_2$  иногда бывает необходимо установить степень влияния каждой из переменных  $X_1$  и  $X_2$  на переменную  $Y$ . Для оценки этого влияния в статистике применяют частные коэффициенты корреляции.

$$r_{yx_1}^2(x_2) = \frac{(r_{yx_1} - r_{yx_2} \cdot r_{x_1 x_2})^2}{(1 - r_{yx_2}^2)(1 - r_{x_1 x_2}^2)} \quad (4.25)$$

$$r_{yx_2}^2(x_1) = \frac{(r_{yx_2} - r_{yx_1} \cdot r_{x_2 x_1})^2}{(1 - r_{yx_1}^2)(1 - r_{x_2 x_1}^2)} \quad (4.26)$$

Заключение ( $x_2$ ) в скобках означает, что признак, обозначенный этим знаком, исключен при вычислении коэффициента корреляции между признаками  $Y$  и  $X$ .

Соответственно частный коэффициент корреляции между признаками  $X_1$  и  $X_2$  при исключении влияния на эту связь признака  $Y$  равен

$$r_{x_1x_2}^2(y) = \frac{(r_{x_1x_2} - r_{x_1y} \cdot r_{x_2y})^2}{(1 - r_{x_1y}^2)(1 - r_{x_2y}^2)} \quad (4.27)$$

Частные коэффициенты корреляции имеют такой же смысл и обладают теми же свойствами, что и обыкновенный парный коэффициент корреляции.

Для проверки гипотезы о независимом варьировании двух признаков при исключении влияния 3-го признака определяется фактический критерий  $t_\phi$  формуле

$$t_\phi = \frac{r_{\text{фак}} \sqrt{n - m}}{\sqrt{1 - r_{\text{фак}}^2}}, \quad (4.28)$$

где  $n$  - число опытов (объем выборки);  $m$  - число зависимых признаков, для которых вычисляется  $r_{\text{факт}}$ .

Фактический критерий сравнивается с критерием Стьюдента  $t_{\text{стюд}}$ , который находится при  $p = 0,95$  и числе степеней свободы  $K = n - 3$ .

Если  $t_\phi \geq t_{\text{стюд}}$ , то коэффициент корреляции считается существенным, а связь между  $Y$  и  $X$  достоверной  $t_{\text{стюд}}$ .

#### 4.4 Оценка достоверности коэффициента корреляции

Эмпирический коэффициент корреляции  $r$  служит оценкой генерального параметра  $\rho$  и как случайная величина сопровождается ошибкой  $S_r$ . Последняя определяется по формуле

$$S_r = \frac{1 - r^2}{\sqrt{n}} \quad n < 100$$

или когда объем выборки не превышает 100 наблюдений

$$S_r = \sqrt{\frac{1 - r^2}{n - 2}} \quad n > 100$$

Отношение выборочного коэффициента корреляции  $r$  к своей ошибке служит критерием для проверки нулевой гипотезы - предположения о том, что в генеральной совокупности этот показатель равен нулю, т.е.  $\rho = 0$ . Нулевая гипотеза опровергается, если

$$t_\phi = \frac{r\sqrt{n}}{1 - r^2} \geq t_{st} \quad \text{или} \quad t_\phi = r\sqrt{\frac{n - 2}{1 - r^2}}$$

Нулевая гипотеза ( $H_0$ ) - предположение о том, что между генеральными параметрами сравниваемых групп разница равна нулю и различия, наблюдаемые между выборочными, носят не систематический характер, а исключительно случайный. Так, если одна выборка взята из совокупности с параметрами  $\bar{X}_1$  и  $\sigma_1$ , а другая - из совокупности, характерной параметрам  $\bar{X}_2$  и  $\sigma_2$ , то нулевая гипотеза предполагает, что  $\bar{X}_1 = \bar{X}_2$  и  $\sigma_1 = \sigma_2$  и  $X_1 - X_2 = 0$ , а  $\sigma_1 - \sigma_2$ .

### **Вопросы для самоконтроля**

1. Особенности планирования и постановки экспериментов в био- и холодильной технологиях при использовании корреляционно-регрессионного анализа.
2. Определение коэффициентов парной корреляции и множественной регрессии.
3. Определение частных критериев корреляции.
4. Достоверность коэффициентов парной корреляции

### **5. ПЛАНИРОВАНИЕ И ПОСТАНОВКА МНОГОФАКТОРНЫХ ЭКСПЕРИМЕНТОВ. СОСТАВЛЕНИЕ МАТЕМАТИЧЕСКИХ МОДЕЛЕЙ**

Решение большинства проблем в пищевой холодильной технологии связано с проведением сложных и дорогостоящих экспериментов. Поэтому большое значение имеет применение методов оптимального планирования экспериментов, позволяющего существенно сократить затраты времени и материальных средств на выполнение научно-исследовательских работ.

Фундаментальные работы Р. Фишера, Д. Бокса, Ю. Адлера и других исследователей по математическому планированию экспериментов позволили применять высокоэффективные схемы планирования, такие как метод крутого восхождения и планы высших порядков. Эти методы нашли применение при решении задач оптимизации химико-технологических процессов и в последнее время начали использоваться в пищевых технологиях [3, 4].

В современной математической теории оптимального планирования экспериментов существует два основных направления:

- планирование экспериментов для изучения механизмов сложных процессов и свойств многокомпонентных систем, в том числе пищевых продуктов;
- планирование экспериментов для оптимизации технологических процессов и свойств многокомпонентных систем.

Важным преимуществом математического планирования по сравнению с классическими методами исследования является возможность одновременного влияния на технологический процесс большого числа факторов. Кроме того,

этот метод позволяет наряду с количественным учетом каждого отдельного фактора установить наличие в системе межфакторных взаимодействий и оценить влияние последних, а также определить значение параметров при оптимальной эффективности процессов.

Применение математических методов оптимального планирования экспериментов для решения задач холодильной технологии пищевых продуктов позволяет оптимизировать процессы охлаждения, замораживания, хранения и оценки качества различных видов продуктов растительного и животного происхождения на качественно новом уровне.

### **5.1 Постановка задачи оптимизации и планирование многофакторных экспериментов**

Основной задачей холодильной технологии пищевых продуктов является выбор оптимальных технологических условий охлаждения, замораживания и хранения, обеспечивающих максимальное сохранение качества, пищевой и биологической ценности, снижение потерь от микробиальной порчи и физиологических заболеваний продукции.

Протекание различных технологических процессов зависит от большого числа факторов, из которых необходимо выделить наиболее существенные и управляемые, т.е. такие, которые можно изменять в определенном диапазоне значений, например, температура, влажность и давление воздуха, концентрация препаратов и другие. Эффективность протекания процесса холодильной обработки и хранения при выбранном соотношении факторов внешней среды может оцениваться критерием оптимальности. При планировании эксперимента и проведении исследований важное значение имеет выбор этого критерия. Критерии оптимальности при комплексной постановке вопроса включают экономические показатели и должны иметь числовое выражение. Если ставится задача оптимизировать какую-либо часть технологического процесса, то в качестве частного критерия оптимальности выбирается тот или иной технологический параметр.

В холодильной технологии такими частными критериями могут быть количество биологически ценных компонентов пищевых продуктов (витамины, белки, липиды и т.п.), убыль массы, потери от инфекционных и физиологических заболеваний, себестоимость продукта, зависящие от условий технологической обработки, хранения и других факторов.

Большое значение имеет нахождение максимальной или минимальной величины выбранного критерия оптимальности путем использования методов

планирования многофакторных экспериментов при различных сочетаниях уровней факторов.

### 5.1.1 Методы построения экспериментально-статистических моделей процесса

Математические модели, получаемые с помощью методов планирования экспериментов, называют экспериментально-статистическими (ЭСМ). Ценность ЭСМ процесса заключается в том, что она дает информацию о влиянии факторов; позволяет количественно определить значения функций при заданном режиме ведения процесса; может служить основой для оптимизации технологических процессов.

С помощью математических методов оптимального планирования экспериментов можно получить ЭСМ процесса даже при отсутствии сведений его механизма. Под математическим описанием процесса или ЭСМ понимают систему уравнений, связывающих функцию отклика с влияющими факторами. В простейшем случае это может быть одно уравнение. Изучение любой системы можно представить, как нахождение зависимости вида

$$y_j = f(x_1, \dots, x_n), \quad (5.1)$$

где  $x_1, \dots, x_n$  - независимые переменные величины, влияющие на протекание процесса;  $y_j$  - функция отклика;  $j = 1, 2, \dots, n$ .

Это уравнение описывает гиперповерхность в многомерном пространстве и, следовательно, изучение многофакторных систем можно представить как исследование формы этой поверхности. Геометрический образ, соответствующий функции отклика, называют поверхностью отклика. Координатное пространство, по осям которого отложены факторы, называют факторным пространством. В простейших случаях, когда на процесс влияют 1-3 фактора, поверхность отклика легко представить наглядно. Если число факторов  $x$  больше трех, то поверхность отклика не имеет наглядного восприятия. При выборе факторов, влияющих на изучаемый технологический процесс, необходимо учитывать следующие требования:

- факторы должны быть управляемыми, т.е. установлены на выбранных уровнях;
- факторы должны быть однозначными и непосредственно воздействовать на объект исследования;
- точность измерения факторов должна отвечать поставленной задаче;
- факторы должны быть совместимы, это означает, что все их комбинации должны быть осуществимы и безопасны;

- факторы должны быть независимы, т.е. каждый из факторов может быть установлен на любом уровне вне зависимости от уровней других факторов.

Для функции  $y = f(x_1, x_2, x_3, \dots, x_n)$  используют уравнение, представляющее собой разложение этой функции в виде отрезка ряда Тейлора

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \dots + \beta_n x_n + \beta_{12} x_1 x_2 + \dots + \beta_{(n-1)n} x_{n-1} x_n + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{22} x_2^2 + \dots + \beta_{nn} x_n^2, \quad (5.2)$$

где  $\beta_0 \dots \beta_n$  - коэффициенты регрессии при соответствующих переменных, значения которых определяют форму поверхности отклика в изучаемой области.

Присутствие в уравнении членов  $(x_i \cdot x_j)$  и  $x_i^2, x_j^2$  показывает, что данная зависимость является криволинейной.

С целью сокращения числа экспериментов, необходимых для нахождения оптимальной величины функции, а также упрощения расчетов, стремятся ограничиться линейной ЭСМ, проводя эксперименты в узкой области поверхности отклика.

Коэффициенты регрессии определяются экспериментально и, следовательно, они имеют погрешность. Это обстоятельство учитывается тем, что в уравнении (5.2) вместо  $\beta$ , обозначающих истинные значения коэффициентов, пишут  $b$ , подразумевая под этим соответствующие выборочные оценки. Таким образом, с помощью полного факторного эксперимента математическое описание процесса представляется уравнением регрессии вида

$$y = b_0 + b_1 x_1 + b_2 x_2 + \dots + b_n x_n + b_{12} x_1 x_2 + \dots + b_{(n-1)n} x_{n-1} x_n \quad (5.3)$$

Следует иметь в виду, что чем больше в уравнении регрессии членов в степени выше единицы, а, следовательно, и коэффициентов регрессии, тем больше необходимо провести опытов для нахождения этих коэффициентов.

Прежде чем приступить к математическому планированию эксперимента и нахождению ЭСМ, необходимо проверить воспроизводимость опытов.

### 5.1.2 Проверка воспроизводимости опытов

Для проверки воспроизводимости опытов проводят несколько серий параллельных опытов в рассматриваемой области изменения влияющих факторов. Результаты этих опытов сводят в таблицу 5.1.

Для каждой серии параллельных опытов вычисляют среднее арифметическое значение функции отклика

$$\bar{y}_j = \frac{1}{K} \sum_{i=1}^K y_{ji}, \quad (5.4)$$

где  $K$  - число параллельных опытов, проведенных при одинаковых условиях;  $j = 1, 2, \dots, N$ ;  $N$  - число серий опытов.

Обычно значения  $N$  и  $K$  принимаются равными 2...4. Затем вычисляют оценку дисперсии для каждой серии параллельных опытов:

$$S_j^2 = \frac{1}{K-1} \sum_{i=1}^K \left( y_{ji} - \bar{y}_j \right)^2 \quad (5.5)$$

Таблица 5.1

**Результаты экспериментов для проверки воспроизводимости опытов**

Номер серии опытов	Результаты параллельных опытов	$\bar{y}_j$	$S_j^2$
1	$y_{11} y_{12}, \dots, y_{1k}$	$\bar{y}_1$	$S_1^2$
2	$y_{21} y_{22}, \dots, y_{2k}$	$\bar{y}_2$	$S_2^2$
3	$y_{31} y_{32}, \dots, y_{3k}$	$\bar{y}_3$	$S_3^2$
...	...	...	...
$j$	$y_{j1} y_{j2}, \dots, y_{jk}$	$\bar{y}_j$	$S_j^2$
...	...	...	...
$N$	$y_{N1} y_{N2}, \dots, y_{Nk}$	$\bar{y}_N$	$S_N^2$

Для проверки воспроизводимости опытов находят отношение наибольшей из оценок дисперсий к сумме всех оценок дисперсий:

$$G_p = \frac{\max S_j^2}{\sum_{j=1}^N S_j^2}, \quad (5.6)$$

где  $G_p$  - расчетное значение критерия Кохрена.

В приложении 1 приводятся значения критерия Кохрена  $G_{табл.}$  при доверительной вероятности  $P = 0,95$ , с которой принимается гипотеза о воспроизводимости опытов.

Для нахождения  $G_{табл.}$  необходимо знать общее количество оценок дисперсий  $N$  и число степеней свободы  $f$ , связанных с каждой из них  $f = K - 1$ .

Если выполняется условие  $G_p \leq G_{табл.}$ , то опыты считаются воспроизводимыми, а оценки дисперсий - однородными. Если никакими способами невозможно достигнуть воспроизводимости, то математические методы планирования к такому эксперименту применять нельзя.

## Вычисление погрешности эксперимента

Оценки однородных дисперсий нескольких серий параллельных опытов следует усреднить и найти величину

$$s_y^2 = \frac{1}{N} \sum_{j=1}^N S_j^2, \quad (5.7)$$

где  $s_y^2$  - оценка дисперсии воспроизводимости.

С ней связано число степеней свободы  $f = N(K - 1)$ .

Оценку дисперсии среднего значения рассчитывают по формуле

$$S_{\bar{y}}^2 = \frac{S_y^2}{K} \quad (5.8)$$

С ней также связано число степеней свободы  $f = N(K - 1)$ .

Если при проведении эксперимента опыты дублируют и пользуются средними значениями функции отклика  $y$ , то при обработке экспериментальных данных следует использовать  $s_{\bar{y}}^2$ . В тех случаях, когда из-за недостатка времени, трудоемкости или высокой стоимости эксперимента опыты не дублируются, при обработке экспериментальных данных используют  $s_y^2$ .

## Рандомизация

С целью компенсации систематической погрешности эксперимента используют прием, называемый рандомизацией. Он заключается в том, что опыты проводят в случайной последовательности, которая устанавливается с помощью таблицы случайных чисел. Если требуется рандомизировать во времени 4 опыта, обозначенных цифрами I, II, III, IV, то им в соответствие ставят любые 4 последовательных числа, взятых в любой строке или в любом столбце таблицы. Если при этом встретятся повторяющиеся числа, то их следует отбросить. Например, взята следующая случайная последовательность чисел:

I-60

II- 12

III- 05

IV- 15

Расположив случайные цифры в порядке возрастания (или убывания), получаем искомую последовательность реализации опытов. Например, при возрастании чисел получаем следующую последовательность опытов: III, II, IV, I.

Установив воспроизводимость опытов и последовательность их проведения, приступают к планированию факторного эксперимента.

### 5.1.3 Методы планирования многофакторных экспериментов

Планированию эксперимента предшествует анализ результатов предыдущих исследований (собственных и приведенных в литературе). На основании этого анализа выбирается основной (нулевой) уровень, т.е. такие значения факторов, в области которых значения параметров оптимизации наилучшие. Например, это может быть известная температура нагревания, охлаждения, замораживания или размораживания продукта. Значения факторов на нулевом уровне обозначаются  $x_{0i}$ .

Метод полного факторного эксперимента дает возможность получить математическое описание исследуемого процесса в некоторой локальной области факторного пространства, лежащей в окрестности выбранной точки с координатами  $x_{01}, x_{02}, \dots, x_{0i}$ . Для упрощения расчетов коэффициентов регрессии производится кодирование (преобразование) переменных факторов. С этой целью начало координат факторного пространства переносится в эту точку (рисунок 5.1) и вводятся новые кодированные переменные  $X_i$ , которые определяются по формуле

$$X = \frac{x_i - x_{0i}}{\Delta x_i}, \quad (5.9)$$

где  $\Delta x_i$  - интервал варьирования значений  $i$ -го фактора.

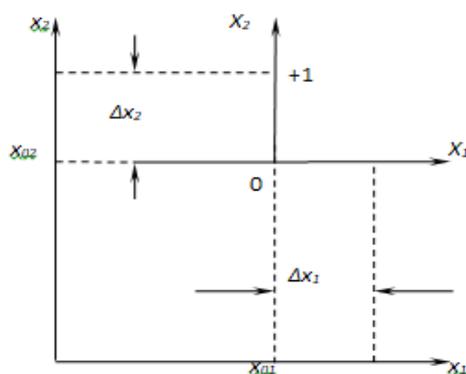


Рисунок 5.1 - Введение кодированных переменных

Количество вариантов опытов, которое необходимо поставить в исходной серии, зависит от количества факторов. Общее количество опытов в матрице планирования

$$N = 2^n, \quad (5.10)$$

где  $n$  - количество факторов.

Например, для  $n = 2N = 4$ ; для  $n = 4N = 16$ ; для  $n = 8N = 256$ .

Для удобства вычислений коэффициентов регрессии все факторы в ходе полного факторного эксперимента варьируют на двух уровнях, соответствующих значениям кодированных переменных  $+1$  и  $-1$ . При полном факторном

эксперименте проводится серия опытов, содержащая все возможные неповторяющиеся комбинации уровней варьирования факторов.

В табл. 5.2 - 5.5 приведены условия опытов полных двух-пяти-факторных экспериментов, варьируемых на двух уровнях - верхнем (+1) и нижнем (-1).

Таблица 5.2

**Полный двухфакторный эксперимент**

Номер опыта	Факторы		Функция отклика
	$X_1$	$X_2$	
1	-1	-1	$Y_{11}$
2	+1	-1	$Y_{22}$
3	-1	+1	$Y_{33}$
4	+1	+1	$Y_{44}$

Таблица 5.3

**Полный трехфакторный эксперимент**

Номер опыта	Факторы			Функция отклика
	$X_1$	$X_2$	$X_3$	
1	-1	-1	-1	$y_1$
2	+1	-1	-1	$y_2$
3	-1	+1	-1	$y_3$
4	+1	+1	-1	$y_4$
5	-1	-1	+1	$y_5$
6	+1	-1	+1	$y_6$
7	-1	+1	+1	$y_7$
8	+1	+1	+1	$y_8$

Таблица 5.4

**Матрица планирования для четырех факторов на двух уровнях**

Номер опыта	$x_1$	$x_2$	$x_3$	$x_4$	$y$
1	-	-	-	-	$y_1$
2	+	-	-	+	$y_2$
3	-	+	-	+	$y_3$
4	+	+	-	-	$y_4$
5	-	-	+	+	$y_5$
6	+	-	+	-	$y_6$
7	-	+	+	-	$y_7$
8	+	+	+	+	$y_8$

**Расширенная матрица планирования для пяти факторов на двух уровнях**

Номер опыта	$x_1$	$x_2$	$x_3$	$x_4$	$x_5$	$y$
1	-	-	-	-	-	$y_1$
2	-	-	+	+	-	$y_2$
3	+	-	+	-	+	$y_3$
4	-	-	-	+	+	$y_4$
5	-	+	+	+	-	$y_5$
6	-	+	+	-	+	$y_6$
7	+	+	-	+	-	$y_7$
8	+	-	+	-	-	$y_8$
9	+	+	-	-	-	$y_9$
10	-	+	-	-	+	$y_{10}$
11	+	-	-	+	+	$y_{11}$
12	+	+	+	+	+	$y_{12}$

Из табл. 5.2 - 5.5 видны основные принципы построения матриц планирования полного факторного эксперимента:

- уровни варьирования первого фактора чередуются от опыта к опыту;
- частота смены уровней варьирования каждого последующего фактора вдвое меньше, чем у предыдущего.

Матрица планирования полного факторного эксперимента обладает следующими свойствами:

$$\sum_{j=1}^N X_{ji} = 0 \quad (5.11)$$

$$\sum_{j=1}^N X_{ji}^2 = N \quad (5.12)$$

$$\sum_{j=1}^N X_{jl} X_{jm} = 0 \quad (l \neq m), \quad (5.13)$$

где  $N$  - число опытов полного факторного эксперимента;  $j$  - номер опыта;  $i, l, m$  - номер фактора.

Свойство, выраженное уравнением 5.13, называется ортогональностью. Это свойство позволяет вычислять коэффициенты уравнения регрессии по простым формулам независимо друг от друга.

Коэффициенты регрессии определяются по следующим формулам:

$$b_0 = \frac{1}{N} \sum_{j=1}^N y_j \quad (5.14)$$

$$b_j = \frac{1}{N} \sum_{j=1}^N X_{ji} y_j \quad (5.15)$$

$$b_{lm} = \frac{1}{N} \sum_{j=1}^N X_{jl} X_{jm} y_j \quad (5.16)$$

Коэффициенты регрессии могут быть со знаком плюс или минус, в зависимости от того, увеличивает данный фактор параметр или уменьшает.

Поскольку определение функции отклика неточно, то и коэффициенты регрессии также определяются с ошибками.

Для подтверждения адекватности полученного уравнения изучаемому процессу необходимо провести статистический анализ значимости коэффициентов регрессии  $b$  и проверку адекватности уравнения регрессии.

### 5.1.4 Определение значимости коэффициентов регрессии

Для установления значимости коэффициентов регрессии необходимо вычислить оценку дисперсии, с которой он определяется:

$$S_b = \sqrt{\frac{S_y^2}{N}} \quad (5.17)$$

Коэффициент регрессии значим, если

$$|b| \geq S_b t_s,$$

где  $t_s$  - значение критерия Стьюдента.

Если коэффициент регрессии незначим, то соответствующий член исключается из уравнения.

Незначимость коэффициентов регрессии может быть вызвана следующими причинами:

- взяты слишком малые интервалы варьирования факторов;
- плохая воспроизводимость процесса, т.е. все различия в величине критериев оптимизации нивелируются ошибкой опыта;
- данный фактор находится на уровне, близком к оптимальному;
- данный фактор не влияет на процесс.

Если большинство коэффициентов значимо, а один-два незначимы, то, очевидно, плохо выбраны интервалы варьирования для этих факторов.

В этом случае можно провести крутое восхождение по остальным факторам, а для этих двух факторов изменить интервалы варьирования.

### 5.1.5 Проверка гипотезы адекватности

Получив уравнение регрессии, необходимо проверить его адекватность, т.е. способность достаточно хорошо описывать поверхность отклика.

С этой целью необходимо выполнить следующее:

1. Найти расчетные значения функции отклика. Например, для уравнения регрессии вида

$$y = b_0 + b_1 X_1 + b_2 X_2 \quad (5.18)$$

находим

$$Y_1^P = b_o + |b_1|(-1) + |b_2|(-1) \quad (5.19)$$

или

$$Y_2^P = b_o + |b_1|( +1) + |b_2|(-1) \quad (5.20)$$

2. Определить разницу между экспериментальным значением функции отклика и расчетным значением  $Y_j^P, Y_j^э$ .

3. Рассчитать оценку дисперсии адекватности  $S_{ад}^2$

$$S_{ад}^2 = \frac{1}{N - B} \sum_{j=1}^N (Y_j^э - Y_j^P)^2, \quad (5.21)$$

где  $B$  - число коэффициентов регрессии искомого уравнения, включая и свободный член;  $Y_j^э, Y_j^P$  - экспериментальное и расчетное значение функции отклика в  $j$ -м опыте;  $N$  - число опытов полного факторного эксперимента.

4. Определить число степеней свободы

для числителя  $f_1 = N - B$

для знаменателя  $f_2 = N(K - 1)$  (5.22)

5. Найти расчетное значение критерия Фишера по формуле

$$F_P = \frac{\max S_{ад}^2}{S_y^2}; \quad F_P = \frac{\max S_{ад}^2}{S_y^2} \quad (5.23)$$

6. Полученное значение критерия Фишера сравнивается с его табличным значением,  $F_{табл.}$ , которое зависит от  $f_1$  и  $f_2$ .

Табличные значения критерия Фишера  $F_{табл.}$  приведены в приложении 2 при  $P = 0,95$ .

Если  $F_{табл.} \geq F_P$ , то уравнение адекватно и можно оптимизировать изучаемый процесс.

### 5.1.6 Метод дробных реплик

С увеличением количества факторов резко возрастает количество опытов полного факторного эксперимента. Это видно из уравнения (5.10). Однако, для нахождения коэффициентов регрессии не всегда требуется много опытов. В таких случаях можно уменьшить объем экспериментальных работ, воспользовавшись методом дробных реплик.

Рассматриваемый метод заключается в том, что для нахождения математического описания процесса используется определенная часть полного факторного эксперимента:  $1/2, 1/4$  и т.д.

Расчет коэффициентов регрессии, проверка значимости коэффициентов и адекватности математического описания в данном случае производятся так же, как и при полном факторном эксперименте.

При полном трехфакторном эксперименте необходимо провести 8 опытов, и уравнение регрессии имеет вид

$$Y = b_0 + b_1 X_1 + b_2 X_2 + b_3 X_3 + b_{12} X_1 X_2 + b_{13} X_1 X_3 + b_{23} X_2 X_3 + b_{123} X_1 X_2 X_3 \quad (5.24)$$

Однако эту задачу можно решить и с помощью меньшего количества опытов методом дробных реплик и планирования типа  $2^{3-1}$ . При этом произведение кодированных переменных  $X_1 X_2$  приравнивается к фактору  $X_3$  (таблица 5.6).

Таблица 5.6

### Планирование эксперимента типа $2^{3-1}$

Номер опыта	$X_1$	$X_2$	$X_1 X_2$	$X_3$	Функция отклика
1	-1	-1	+1	+1	$y_1$
2	+1	-1	-1	-1	$y_2$
3	-1	+1	-1	-1	$y_3$
4	+1	+1	+1	+1	$y_4$
5	-1	-1	+1	+1	$Y_5$
6	+1	-1	-1	-1	$Y_6$
7	-1	+1	-1	-1	$Y_7$
8	+1	+1	+1	+1	$Y_8$

Как следует из табл. 5.6, столбцы для произведения  $X_1 X_2$  и фактора  $X_3$  полностью совпадают. Поэтому коэффициенты  $b_{12}$  и  $b_3$  не могут быть определены отдельно.

Коэффициенты регрессии можно определить по формулам

$$b_0 = \frac{1}{4}(y_1 + y_2 + y_3 + y_4) \quad (5.25)$$

$$b_1 = \frac{1}{4}(-y_1 + y_2 - y_3 + y_4) \quad (5.26)$$

$$b_2 = \frac{1}{4}(-y_1 - y_2 + y_3 + y_4) \quad (5.27)$$

$$b_{12} = \frac{1}{4}(y_1 - y_2 - y_3 + y_4) \quad (5.28)$$

Такое планирование экспериментов, когда некоторые из факторов приравниваются к произведениям нескольких факторов, называется планирование со смешиванием. Его обозначают символом  $2^{n-p}$  ( $n$  - общее число факторов,  $p$  - число факторов, приравниваемых к произведениям).

#### 5.1.7 Устранение влияния временного дрейфа

Планирование со смешиванием иногда применяют в тех случаях, когда необходимо устранить влияние неуправляемых временных изменений некото-

рых влияющих факторов, называемое временным дрейфом. При проведении большой серии опытов, требующих длительного времени, всегда приходится опасаться нежелательных изменений исходных свойств продуктов, некоторых характеристик приборов, оборудования и т.п. Влияние этого временного дрейфа на параметры технологического процесса можно практически устранить, разбивая серию опытов на отдельные блоки так, чтобы эффект от временного дрейфа оказался совмещенным с произведениями факторов, для которых коэффициенты регрессии достаточно малы.

Пусть необходимо устранить влияние временного дрейфа на параметры уравнения регрессии, получаемого в результате полного трехфакторного эксперимента. С этой целью разобьем эксперимент на два блока и введем новую переменную  $X_\delta$ , характеризующую дрейф. Пусть  $X_\delta = X_1X_2X_3$ . В один блок отберем опыты, для которых  $X_\delta = +1$ , в другой -  $X_\delta = -1$ . Формально это планирование можно рассматривать как эксперимент типа  $2^{4-1}$  с генерирующим соотношением  $X_\delta = X_1X_2X_3$  (таблица 5.7).

Таблица 5.7

### Планирование в условиях временного дрейфа

Номер опыта	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$X_\delta = X_1X_2X_3$	Функция отклика
1	-1	-1	+1	+1	$y_1 + \beta_\delta$
	+1	-1	-1	+1	$y_2 + \beta_\delta$
	-1	+1	-1	+1	$y_3 + \beta_\delta$
	+1	+1	+1	+1	$y_4 + \beta_\delta$
2	-1	-1	-1	-1	$y_5 - \beta_\delta$
	+1	-1	+1	-1	$y_6 - \beta_\delta$
	-1	+1	+1	-1	$y_7 - \beta_\delta$
	+1	+1	-1	-1	$y_8 - \beta_\delta$

Исходя из матрицы планирования, будем считать, что в первом блоке все результаты опытов вследствие временного дрейфа завышены на  $\beta_\delta$ , а во втором - занижены на ту же величину.

Если уравнение регрессии имеет вид (5.24), то коэффициенты регрессии будут оцениваться следующим образом:

$$b_0 \rightarrow \beta_0; b_1 \rightarrow \beta_1; b_2 \rightarrow \beta_2; b_{12} \rightarrow \beta_{12}; b_{13} \rightarrow \beta_{13}; b_{23} \rightarrow \beta_{23}; b_{123} \rightarrow \beta_{123} + \beta_\delta$$

Таким образом, все коэффициенты регрессии, кроме  $b_{123}$ , не содержат погрешностей, обусловленных временным дрейфом.

## Пример составления уравнений регрессии при постановке полного двух- и трехфакторных экспериментов

При решении задач по составлению математических моделей в виде уравнений регрессии, выражающих зависимость функции отклика  $y$  от нескольких переменных и полученных на основе математических методов планирования многофакторных экспериментов, необходимо выполнить следующее:

- проверить воспроизводимость опытов с помощью критерия Кохрена  $G_p$  (если необходимо по условию задачи);
- рассчитать коэффициенты регрессии  $b_0; b_1; b_2; b_{12}$  (для двух переменных);
- определить значимость этих коэффициентов, если коэффициент незначим, то член уравнения регрессии с этим коэффициентом исключить;
- составить уравнение регрессии и, зная коэффициенты, найти расчетные значения функции отклика;
- найти отклонения между расчетными и экспериментальными значениями функции отклика;
- проверить адекватность полученного уравнения регрессии, с этой целью рассчитать оценку дисперсии адекватности  $S_{2ad}$ ;
- найти расчетное значение критерия Фишера  $F_p$  и сравнить с табличным  $F_m[2]$ , если  $F_p < F_{табл.}$ , то уравнение считается адекватным.

Рассмотрим примеры решения задач по проверке воспроизводимости опытов и составлению уравнений регрессии на основании табличных данных, полученных при постановке полного двухфакторного эксперимента с использованием математических методов планирования.

Пример: В процессе хранения мяса цыплят бройлеров в течение 15 суток определено содержание летучих жирных кислот  $y$  в зависимости от температуры  $t$  (кодированная переменная  $X_1$ ) и концентрации бактерицидного препарата  $C$  (кодированная переменная  $X_2$ ). Проведено четыре серии опытов, в каждой по два параллельных опыта. Требуется проверить воспроизводимость опытов и с помощью полного двухфакторного эксперимента найти математическое описание процесса в окрестности точки факторного пространства с координатами  $t_0 = 50^\circ\text{C}$  и  $C_0 = 1,8\%$ .

Интервалы варьирования температуры  $\Delta t = 30^\circ\text{C}$  и концентрации фунгицидного препарата  $\Delta C = 0,4\%$ .

Верхний уровень (+1) для  $t = 80^\circ\text{C}$ ,  $C = 2,2\%$ . Нижний уровень (-1) для  $t = 20^\circ\text{C}$ ,  $C = 1,4\%$ .

Изменение содержания летучих жирных кислот (ЛЖК) в зависимости от  $t$  и  $C$  в указанных пределах приведены в таблице 5.8.

### Матрица планирования ПДЭ и результаты опытов

№серии опытов	Условия опыта				Результаты парал- лельных опытов, $y_{ji}, \%$		$\bar{y}_j, \%$	$S_j^2$
	$t, \text{ }^\circ\text{C}$	$X_1$	$C, \%$	$X_2$	$y_1$	$y_2$		
1	2	-1	1,4	-1	6,00	6,60	6,30	0,18
2	8	+1	1,4	-1	11,40	11,00	11,20	0,08
3	2	-1	2,2	+1	4,60	4,40	4,50	0,02
4	8	+1	2,2	+1	9,30	10,10	9,70	0,32

### Определение воспроизводимости опытов

1. Вычисляем среднее арифметическое значение содержания ЛЖК для четырех серий опытов:

$$y_j = \frac{1}{k} \sum_{i=1}^k y_{ji}, \quad (5.29)$$

где  $k$  - число параллельных опытов, проведенных при одинаковых условиях,  $k = 2$ .

Для первой серии опытов:

$$y_1 = \frac{1}{2} (6,0 + 6,6) = 6,3; \quad y_2 = 11,2; \quad y_3 = 4,5; \quad y_4 = 9,7$$

Данные записываем в таблицу 5.8 (графа  $\bar{y}_j, \%$ ).

2. Находим оценку дисперсии для каждой серии параллельных опытов  $S_j^2$

$$S_j^2 = \frac{1}{k-1} \sum_{i=1}^k (y_{ji} - y_j)^2 \quad (5.30)$$

Для первой серии опытов  $S_1^2 = (6,60 - 6,3)^2 + (6,0 - 6,3)^2 = 0,18$ ; аналогично рассчитываем  $S_2^2 = 0,08$ ;  $S_3^2 = 0,02$ ;  $S_4^2 = 0,32$ . Данные записываем в таблицу 5.8 (графа  $S_j^2$ ).

3. Определяем расчетное значение критерия Кохрена  $G_p$

$$G_p = \frac{\max S_j^2}{\sum S_j^2}, \quad (5.31)$$

где  $\max S_j^2$  - максимальное значение дисперсии,  $\max S_j^2 = 0,32$ .

Тогда

$$G_p = \frac{0,32}{(0,18 + 0,08 + 0,02 + 0,32)} = 0,53$$

4. Находим табличное значение критерия Кохрена при доверительной вероятности 0,95 и степеней свободы  $f = k - 1 = 2 - 1 = 1$

$$G_m = 0,99$$

5. Если выполняется условие  $G_p < G_m$ , то опыты считаются воспроизводимыми, а оценка дисперсии - однородными.

Таким образом, в данном примере опыты являются воспроизводимыми.

6. Вычисляем погрешность экспериментов. С этой целью определяем оценку дисперсии воспроизводимости

$$S_y^2 = \frac{1}{N} \sum S_j^2 = \frac{1}{4} 0,60 = 0,15$$

и оценку дисперсии среднего значения

$$S_y^2 = \frac{S_y^2}{k} = \frac{0,15}{2} = 0,075$$

С  $S_y^2$  связано число степеней свободы

$$f = N(k-1) = 4(2-1) = 4$$

### Построение уравнения регрессии

1. Математическое описание процесса хранения будем искать в виде уравнения регрессии

$$y = b_0 + b_1 X_1 + b_2 X_2 + b_{12} X_1 X_2, \quad (5.32)$$

где  $y$  - функция отклика, в данном случае содержание ЛЖК, %;  $b_0$ ;  $b_1$ ;  $b_2$ ;  $b_{12}$  - коэффициенты регрессии;  $X_1$ ,  $X_2$  - кодированные переменные, связанные с  $t$  и  $C$  следующими соотношениями:

$$X_1 = \frac{t-t_0}{\Delta t}; \quad X_2 = \frac{C-C_0}{\Delta C} \quad (5.33)$$

2. Находим коэффициенты регрессии

$$b_0 = \frac{1}{N} \sum \bar{y}_i = \frac{1}{4} (6,3 + 11,2 + 4,5 + 9,7) = 7,92$$

$$b_1 = \frac{1}{N} \sum X_1 \bar{y}_i = \frac{1}{4} (-6,3 + 11,2 - 4,5 + 9,7) = 2,52$$

$$b_2 = \frac{1}{N} \sum X_2 \bar{y}_i = \frac{1}{4} (-6,3 - 11,2 + 4,5 + 9,7) = -0,82$$

$$b_{lm} = \frac{1}{N} \sum_{j=1}^N X_{ji} X_{lm} y_i$$

$$b_{12} = \frac{1}{4} [(+1)(-1)6,3] + [(-1)(-1)11,2] + [(+1)(+1)4,5] + [(-1)(+1)9,7] = 0,075$$

Определяем значимость коэффициентов регрессии; с этой целью находим оценку дисперсии  $S_b$ , с которой они определялись

$$S_b = \sqrt{\frac{S_y^2}{N}} = \sqrt{\frac{0,15}{4}} = 0,193$$

Коэффициенты регрессии значимы, если  $|b| \geq S_b t_s$ ,

где  $t_s$  - критерий Стьюдента, при  $P = 95\%$  и  $N = 4$ ,  $t_s = 3,18$  [1].

Тогда

$$|b| \geq 0,193 \cdot 3,18 = 0,613$$

Таким образом, коэффициенты  $b_0$ ;  $b_1$ ;  $b_2$  значимы, а  $b_{12}$  не значим, тогда уравнение регрессии записываем в виде

$$y = 7,92 + 2,52X_1 - 0,82X_2$$

3. Находим расчетные значения  $y_j^p$ :

$$y_1^p = 7,92 + 2,52(-1) - 0,82(-1) = 6,22$$

$$y_2^p = 7,92 + 2,52(+1) - 0,82(-1) = 11,26$$

$$y_3^p = 7,92 + 2,52(-1) - 0,82(+1) = 4,58$$

$$y_4^p = 7,92 + 2,52(+1) - 0,82(+1) = 9,62$$

4. Определим оценку дисперсии адекватности

$$S_{a\partial}^2 = \frac{1}{N - B} \sum_{j=1}^N (y_j^{\text{э}} - y_j^p)^2, \quad (5.34)$$

где  $B$  - число коэффициентов регрессии искомого уравнения, включая свободный член;  $B = 3$ ;  $y_j^{\text{э}}$ ;  $y_j^p$  - табличные (экспериментальные) и расчетные значения функции отклика.

$$S_{1a\partial}^2 = \frac{1}{4-3} [(6,00 - 6,22)^2 + (6,60 - 6,22)^2] = 0,19$$

Аналогично рассчитываются  $S_{a\partial}^2$  для остальных серий опытов ( $S_{2a\partial}^2 = 0,08$ ;  $S_{3a\partial}^2 = 0,03$ ;  $S_{4a\partial}^2 = 0,33$ ).

В данном случае  $\max S_{a\partial}^2 = S_{4a\partial}^2 = 0,33$ .

5. Находим расчетные значения критерия Фишера

$$F_p = \frac{\max S_{a\partial}^2}{S^2 y} = \frac{0,33}{0,075} = 4,4$$

$F_p$  сравниваем с табличным значением критерия Фишера  $F_m[2]$  при  $P = 0,95$  и числе степеней свободы  $f_2 = N(k - 1) = 4(2 - 1)$  (для знаменателя).

$$f_1 = N - B = 4 - 3 = 1 \text{ (для числителя); } F_m = 7,71.$$

Так как  $F_m > F_p$  ( $7,71 > 4,4$ ), то уравнение адекватно описывает изучаемый процесс.

Таким образом, окончательно уравнение регрессии записывается в виде:

$$y = 7,92 + 2,52X_1 - 0,82X_2$$

## Оптимизация технологических параметров методом крутого восхождения (наискорейшего спуска)

Используем данное уравнение для оптимизации технологических параметров хранения мяса цыплят бройлеров  $t$  и  $C$  при следующих ограничениях на исследуемые факторы

$$t_{кр} \leq t \leq 5^{\circ}\text{C}$$

$$1,4 \leq C \leq 3,0\%$$

Принимаем, что  $y \rightarrow \min$

Характеристики эксперимента по оптимизации технологических параметров методов наискорейшего спуска ( $t$ , °C) и крутого восхождения ( $C$ , %) приведены в таблице 5.9.

Таблица 5.9

### Характеристики эксперимента

Характеристика и № опыта	$t$ , °C	$C$ , %	$X_1$	$X_2$	$y^p$	$y^3$
Основной уровень	5	1,8	0	0	–	–
Интервал варьирования $\Delta x_i$	3	0,4	–	–	–	–
Шаг движения $\Delta x_i^*$	1	0,1				
Крутое восхождение (наискорейший спуск)						
Опыт						
1	4	1,9	–0,33	0,25	6,9	6,84
2	3	2,0	–0,66	0,50	5,9	5,78
3	2	2,1	–1,00	0,75	4,8	4,71
4	1	2,3	–1,33	1,00	3,8	3,70
5	0	2,3	–1,66	1,25	2,5	2,36
6	–1	2,4	–2,00	1,50	1,7	1,61

Значения кодированных переменных рассчитываются по формулам

$$X_1 = \frac{t - t_0}{\Delta t} \quad \text{и} \quad X_2 = \frac{C - C_0}{\Delta C} \quad (5.35)$$

Оптимизация заканчивается при значении  $t_{кр} = -10^{\circ}\text{C}$ ,  $C = 2,4\%$ ; при этом достигается минимальное значение  $y = 1,7\%$ .

## 5.2 Оптимизация параметров исследуемых технологических процессов

### 5.2.1 Метод крутого восхождения (наискорейшего спуска)

Полученные экспериментально-статистические модели в виде уравнений регрессии можно использовать для оптимизации исследуемого процесса или свойств многокомпонентных систем, в том числе пищевых продуктов. Оптимизи-

зацию процессов, как правило, осуществляют в условиях ограничений на влияющие факторы и функции отклика.

Величина, характеризующая уровень оптимизация процесса, называется критерием оптимальности. Оптимизации процесса представляет собой целенаправленный поиск значений влияющих факторов, при которых достигается максимум или минимум критерия оптимальности.

Д. Бокс и К. Уилсон предложили использовать для оптимизации результаты полного факторного эксперимента или эксперимента по методу дробных реплик. Сущность такой оптимизации состоит в следующем. Пусть критерием оптимальности служит функция отклика  $y$ , представленная в виде (5.18). Один из влияющих факторов принимают за базовый и для него вычисляют произведение соответствующего коэффициента регрессии на шаг варьирования. Например, для первого фактора это произведение имеет вид  $b_1\Delta x_1$ . Затем для базового фактора выбирают шаг движения  $\Delta x_1^*$ , с которым будет осуществляться оптимизация.

Обычно  $\Delta x_1^* \leq \Delta x_1$ . Затем вычисляют отношение

$$\gamma = \frac{\Delta x_1^*}{b_1\Delta x_1} \quad (5.36)$$

Для всех остальных факторов шаги движения к оптимальным значениям рассчитывают по формуле:

$$\Delta x_i^* = \gamma b_i \Delta x_i \quad (5.37)$$

Движение к оптимуму начинают из центра плана, который использовался для получения математического описания функции отклика. Значения факторов на каждом новом шаге находятся путем прибавления  $\Delta x_i^*$  к соответствующим предыдущим значениям. Так осуществляется оптимизация по методу крутого восхождения.

Если ищется минимум функции  $y$ , то новые значения факторов находят из предыдущих путем вычитания  $\Delta x_i^*$ . Такой способ оптимизации называют методом наискорейшего спуска.

Движение к оптимуму прекращают в следующих случаях:

- значения одного или нескольких факторов или функций отклика вышли на границы допустимых значений;
- достигнут экстремум критерия оптимальности  $y$ .

В первом случае на этом оптимизация заканчивается, а во втором в области экстремума функции  $y$  ищут ее новое математическое описание, используя полный факторный эксперимент или метод дробных реплик. Если не удастся получить адекватное описание этой функции в виде (5.18), то переходят к

планированию эксперимента для получения математического описания функции  $y$  в виде многочлена второй степени.

### 5.2.2 Симплексный метод оптимизации (СМО)

СМО в практику научных исследований был введен Ф. Хамсвортом в 1962 г. Симплексом называется правильный многогранник, имеющий  $n + 1$  вершину, где  $n$  - число факторов, влияющих на процесс. Так, если факторов два, то симплексом является правильный треугольник. Сущность симплексного метода оптимизации показана на рисунке 5.2. Начальная серия опытов соответствует вершинам исходного симплекса (точки 1, 2, 3). Условия этих первых опытов берутся из области значений факторов, соответствующих наиболее благоприятным из известных режимов оптимизируемого процесса. Сравнивая между собой результаты опытов в точках 1, 2 и 3, находят среди них самый «плохой» с точки зрения выбранного критерия оптимальности. Пусть, например, самым «неудачным» оказался опыт в точке 1. Этот опыт не рассматривают, а вместо него в состав симплекса вводят опыт в точке 4, которая симметрична точке 1 относительно противоположной стороны треугольника, соединяющей точки 2 и 3.

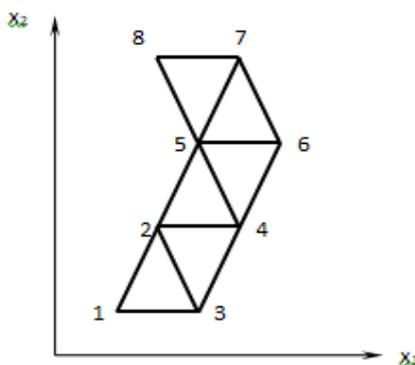


Рисунок 5.2 - Оптимизация по симплексному методу

Далее сравнивают между собой результаты опытов в вершинах нового симплекса, отбрасывают самый «неудачный» из них и переносят соответствующую вершину симплекса в точку 5. Затем рассмотренная процедура повторяется в течение всего процесса оптимизации. Если достигнут экстремум критерия оптимальности, то дальнейшее движение симплекса прекращается. Это значит, что новый шаг возвращает исследователя в предыдущую точку факторного пространства.

Симплексный метод, как и метод крутого восхождения, является локальным методом поиска экстремума. Если существует несколько экстремумов критерия оптимальности, то этот метод позволяет найти тот из них, который расположен ближе к точкам исходного симплекса. При оптимизации необходимо

принимать во внимание ограничения, наложенные на влияющие факторы и функции отклика. При использовании симплексного метода необязательно дублировать опыты. Матрица опытов исходного симплекса в кодированных переменных приведена в таблице 5.10.

Таблица 5.10

### Матрица исходного симплекса

Номер опыта	$X_1$	$X_2$	$X_{n-1}$	$X_n$	Функция отклика
1	$K_1$	$K_2$	$K_{n-1}$	$K_n$	$y_1$
2	$-R_1$	$K_2$	$K_{n-1}$	$K_n$	$y_2$
3	0	$R_2$	$K_{n-1}$	$K_n$	$y_3$
...	...	...	...	...	...
$n-1$	0	0	$K_{n-1}$	$K_n$	$y_{n-1}$
$n$	0	0	$-R_{n-1}$	$K_n$	$y_n$
$n+1$	0	0	0	$-R_n$	$y_{n+1}$

Величины, входящие в эту таблицу, рассчитываются по следующим формулам:

$$K_i = \sqrt{\frac{1}{2i(i+1)}} \quad (5.38)$$

$$R_i = iK_i, \quad (5.39)$$

где  $i$  - номер фактора в матрице планирования.

Опыты, представленные в таблице 5.11, соответствуют вершинам симплекса, сторона которого равна 1, а центр совпадает с началом координат (в кодированных переменных). Наибольшее количество опытов приходится ставить в начале эксперимента. Затем на каждом шаге оптимизации выполняется только один опыт.

Результаты расчетов, выполненных на основании таблицы 5.10 и формул (5.38) и (5.39), приведены в таблице 5.11.

Таблица 5.11

### Условия начальной серии опытов

Номер опыта	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$X_4$
1	0,5	0,289	0,204	0,158
2	-0,5	0,289	0,204	0,158
3	0	-0,578	0,204	0,158
4	0	0	-0,612	0,158
5	0	0	0	-0,632

Приступая к оптимизации, необходимо с помощью табл. 5.10 или 5.11 рассчитывать матрицу исходной серии опытов в физических переменных, пользуясь формулой

$$x_i = x_{0i} + \Delta x_i X_i \quad (5.40)$$

В дальнейшем все операции производятся только с физическими переменными. Условия каждого нового опыта рассчитываются по формуле:

$$x_i = \frac{2}{n} \left[ \sum_{j=1}^{n+1} (x_{ji}) \right] - x_i^*, \quad (5.41)$$

где  $n$  - число факторов в матрице планирования;  $j$  - номер опыта;  $i$  - номер фактора;  $x_i^*$  - значение  $i$ -го фактора в самом «неудачном» опыте предыдущего симплекса.

На любом шаге оптимизации, осуществляемом симплексным методом, можно включить в программу исследований новый фактор, который до этого не принимался во внимание, но оставался на постоянном уровне. При этом значения всех ранее рассматриваемых факторов рассчитываются по формуле (5.42)

$$x_i = \frac{1}{n+1} \sum_{j=1}^{n+1} x_{ji}, \quad (5.42)$$

где  $i = 1, 2, \dots, n$  является средним арифметическим значением соответствующих координат предыдущего симплекса.

Значение вновь вводимого фактора определяется по формуле

$$x_{n+1} = x_{0(n+1)} + \Delta x_{n+1} (R_{n+1} + K_{n+1}), \quad (5.43)$$

где  $x_{0(n+1)}$  - основной уровень этого фактора;  $\Delta x_{n+1}$  - выбранный шаг варьирования для данного фактора;  $R_{n+1}, K_{n+1}$  - величины, рассматриваемые по формуле 5.38 и 5.39.

Добавление нового фактора в состав полного факторного эксперимента сопровождается увеличением количества опытов вдвое.

### **Пример симплексного метода оптимизации технологических параметров процесса**

Задача: С помощью симплексного метода оптимизировать выход пектиновых веществ ( $y = 80\%$ ) из яблочных выжимок ( $y, \%$ ) в зависимости от количества ферментного препарата  $x_1$ , количества соляной кислоты  $x_2$ , температуры процесса  $x_3$  и числа оборотов мешалки  $x_4$ .

Основные характеристики эксперимента приведены в таблице 5.12.

**Значения уровней факторов и интервалов варьирования**

Фактор	Основной уровень $x_{0i}$	Интервал Варьирования $\Delta x_i$
$x_1$ , моль/л	1,0	0,1
$x_2$ , %	1,5	0,2
$x_3$ , С	60	5
$x_4$ , об/мин	500	100

Рассчитываем матрицу исходной серии опытов, т.е. условия проведения первых четырех опытов по формуле  $x_i = x_{0i} + \Delta x_i X_i$

$$I x_{11}, x_{12}, x_{13}$$

$$II x_{21}, x_{22}, x_{23}$$

$$III x_{31}, x_{32}, x_{33}$$

$$IV x_{41}, x_{42}, x_{43}$$

Значения кодированных переменных  $X_i$  приведены в таблице 5.13.

Таблица 5.13

**Значения кодированных переменных**

№	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$X_4$
1	0,5	0,289	0,204	0,158
2	-0,5	0,289	0,204	0,158
3	0	-0,578	0,204	0,158
4	0	0	-0,612	0,158
5	0	0	0	-0,632

Значения факторов для четырех опытов:

I опыт

$$x_{11} = 1,0 + 0,1 \cdot 0,5 = 1,05$$

$$x_{12} = 1,50 + 0,2 \cdot 0,289 = 1,56$$

$$x_{13} = 60 + 5 \cdot 0,204 = 61$$

II опыт

$$x_{21} = 1,0 + 0,1 \cdot (-0,5) = 0,95$$

$$x_{22} = 1,5 + 0,2 \cdot 0,289 = 1,56$$

$$x_{23} = 60 + 5 \cdot 0,204 = 61$$

III опыт

$$x_{31} = 1 + 0,1 \cdot 0 = 1,0$$

$$x_{32} = 1,5 + 0,2 \cdot (-0,578) = 1,38$$

$$x_{33} = 60 + 5 \cdot 0,204 = 61$$

IV опыт

$$x_{41} = 1,0 + 0,1 \cdot 0 = 1,0$$

$$x_{42} = 1,5 + 0,2 \cdot 0 = 1,5$$

$$x_{43} = 60 + 5 \cdot (-0,612) = 57^{\circ}\text{C}$$

В таблице 5.14 приведены условия и результаты проведения эксперимента.

Таблица 5.14

### Условия и результаты проведения эксперимента

№ опыта	$x_1$	$x_2$	$x_3$	$y$
1	1,05	1,56	61	72,3
2	0,95	1,56	61	70,1
3	1,00	1,38	61	65,4
4	1,00	1,50	57	68,2

Сравнивая между собой результаты первых четырех опытов видим, что самый низкий выход пектиновых веществ получился в третьем опыте. Этот опыт исключаем из дальнейшего рассмотрения. Заменяем его опытом 5, условия проведения которого рассчитаем по формуле

$$x_i = \left[ \frac{2}{n} \sum_{j=1}^n (x_{ji}) \right] - x_i^* \quad (5.44)$$

Тогда

$$x_{51} = \left[ \frac{2}{3} (1,05 + 0,95 + 1,00) \right] - 1,00 = 1,00$$

$$x_{52} = \left[ \frac{2}{3} (1,56 + 1,56 + 1,50) \right] - 1,38 = 1,70$$

$$x_{53} = \left[ \frac{2}{3} (2 \cdot 61 + 57) \right] - 61 = 58$$

В новом симплексе, образованном опытами № 1, 2, 4, 5 самым неудачным является опыт №4. Его заменим опытом №6, условия которого найдем, пользуясь формулой

$$x_{61} = \left[ \frac{2}{3} (1,05 + 0,95 + 1,0) \right] - 1,0 = 1,0$$

$$x_{62} = \left[ \frac{2}{3} (1,56 + 1,56 + 1,70) \right] - 1,5 = 1,72$$

$$x_{63} = \left[ \frac{2}{3} (61 + 61 + 58) \right] - 57 = 63$$

Введен в программу исследований еще один фактор, скорость вращения мешалки; в начальной серии опытов  $x_4 = const$  и составляла 500 об/мин.

Для получения нового симплекса добавим опыт №7.

В таблице 5.15 приведен симплексный план эксперимента для четырех факторов .

**Симплексный план эксперимента для четырех факторов**

Номер опыта	$x_1$	$x_2$	$x_3$	$x_4$	$y$
1	1,05	1,56	61	500	72,3
2	0,95	1,56	61	500	70,1
5	1,00	1,70	58	500	73,9
6	1,00	1,72	63	500	76,5
7	1,00	1,64	61	453	79,8

Условия проведения опыта №7 найдем по формуле (5.42)

$$x_i = \frac{1}{n+1} \sum_{j=1}^{n+1} x_{ji}$$

$$x_{n+1} = x_o(n+1) + \Delta x_{(n+1)}(R_{n+1} + K_{n+1})$$

$$x_{71} = \frac{1}{4}(1,05 + 0,95 + 1,00 + 1,00) = 1,0$$

$$x_{72} = \frac{1}{4}(2 \cdot 1,56 + 1,70 + 1,72) = 1,64$$

$$x_{73} = \frac{1}{4}(61 + 61 + 58 + 63) = 61$$

$$x_{74} = 500 + 100(-0,632 + 0,158) = 453$$

Оптимизацию можно закончить с учетом всех четырех факторов, так как достигнут максимум критерия оптимизации - выхода пектиновых веществ  $y_{max} = 79,8$  при  $x_1 = 1,00$  моль/л,  $x_2 = 1,64\%$ ,  $t = 61^\circ\text{C}$  и  $x_4 = 453$  об/мин.

**5.2.3 Ортогональное центральное композиционное планирование**

В процессе оптимизации можно установить, что поверхность отклика имеет большую кривизну и не может быть описана многочленом 1-й степени. Для адекватного математического описания - требуется многочлен более высокой степени, например, отрезок ряда Тейлора, содержащий члены с квадратами переменных. С этой целью используют центральное композиционное планирование эксперимента (ЦКП). Различают два вида ЦКП – ортогональное и ротатабельное.

Общее число опытов при ЦКП будет равно:

$$N = 2^n + 2n + 1, \quad (5.45)$$

где  $2^n$  - количество опытов, образующих полный факторный эксперимент;  $2n$  - число «звездных» точек в факторном пространстве, имеющих координаты  $(\pm \alpha, 0, 0, \dots, 0)$ ;  $(0, \pm \alpha, 0, \dots, 0), \dots, (0, 0, \dots, \pm \alpha)$ ;  $\alpha$  - звездное плечо; 1 - опыт в центре планирования, т.е. в точке факторного пространства с координатами  $x_{oi}$ .

Если с помощью полного факторного эксперимента не удастся получить адекватного математического описания в виде многочлена 1-й степени, то к

нему добавляют в «звездных» точках и в центре плана, а полученную при этом композицию используют для получения математического описания процесса в виде многочлена 2-й степени.

Значения звездного плеча  $\alpha$  для ЦКП с различным числом факторов  $n$  представлены в таблице 5.16.

Таблица 5.16

**Значения  $\alpha$  для ЦКП с различным числом факторов  $n$**

$n...$	2	3	4	5
$\alpha ...$	1,000	1,215	1,414	1,547

Эти значения  $\alpha$  выбраны из условия ортогональности матрицы планирования.

Уравнение регрессии при ортогональном ЦКП имеет следующий вид:

$$y = b_o^* + b_1 X_1 + b_2 X_2 + \dots + b_n X_n + b_{12} X_1 X_2 + \dots + b_{(n-1)n} X_{n-1} X_n + b_{11} X_1^* + \dots + b_{nn} X_n^* \quad (5.46)$$

Переменные величины

$$X_{ji}^* = X_{ji}^2 - \frac{1}{N} \sum_{j=0}^N X_{ji}^2, \quad (5.47)$$

где  $j$  - номер опыта;  $i$  - номер фактора, введены для того, чтобы матрица планирования была ортогональна и коэффициенты регрессии определялись независимо друг от друга по результатам опытов (таблица 5.17).

Для того, чтобы получить уравнение регрессии в обычной форме, находят величину

$$b_o = b_o^* - \frac{b_{11}}{N} \sum_{j=1}^N X_{ji}^2 - \dots - \frac{b_{nn}}{N} \sum_{j=1}^N X_{jn}^2 \quad (5.48)$$

Таблица 5.17

**Матрица центрального композиционного планирования двухфакторного эксперимента**

Системы опытов	Номер опыта	$X_1$	$X_2$	$X_1 X_2$	$X_1^*$	$X_2^*$
Полный факторный эксперимент	1	-1	-1	+1	+0,33	+0,33
	2	+1	-1	-1	+0,33	+0,33
	3	-1	+1	-1	+0,33	+0,33
	4	+1	+1	+1	+0,33	+0,33
Опыты в звездных точках	5	+1	0	0	+0,33	-0,67
	6	-1	0	0	+0,33	-0,67
	7	0	+1	0	-0,67	+0,33
	8	0	-1	0	-0,67	+0,33
Опыт в центре плана	9	0	0	0	-0,67	-0,67

Коэффициенты регрессии при ортогональном ЦКП рассчитываются по следующим формулам:

$$b_o^* = \frac{1}{N} \sum_{j=1}^N y_j \quad (5.49)$$

$$b_i = \frac{\sum_{j=1}^N X_{ji} y_j}{\sum_{j=1}^N (X_{ji})^2} \quad (i \neq 0) \quad (5.50)$$

$$b_{iK} = \frac{\sum_{j=1}^N X_{ji} X_{jK} y_j}{\sum_{j=1}^N (X_{ji} X_{jK})^2} \quad (i \neq K) \quad (5.51)$$

$$b_{ii} = \frac{\sum_{j=1}^N X_{ji}^* y_j}{\sum_{j=1}^N (X_{ji}^*)^2} \quad (5.52)$$

Для расчета оценок дисперсий в определении коэффициентов регрессии используют выражения:

$$S_{b_o^*}^2 = \frac{S_y^2}{N} \quad (5.53)$$

$$S_{b_o}^2 = S_{b_o^*}^2 + \frac{n S_{b_i}^2}{N} \sum_{j=1}^N X_{ji}^2 \quad (5.54)$$

$$S_{t_i}^2 = \frac{S_y^2}{\sum_{j=1}^N (X_{ji})^2} \quad (i \neq 0) \quad (5.55)$$

$$S_{b_{iK}}^2 = \frac{S_y^2}{\sum_{j=1}^N (X_{ji} X_{jK})^2} \quad (i \neq K) \quad (5.56)$$

$$S_{b_{ii}}^2 = \frac{S_y^2}{\sum_{j=1}^N (X_{ji}^*)^2} \quad (5.57)$$

После определения коэффициентов регрессии определяют их значимость. Если  $|b_i| > S_{bit_s}$  - коэффициент значим. Адекватность уравнения регрессии определяется с помощью критерия Фишера.

Метод ротатабельного планирования эксперимента позволяет получать более точное математическое описание поверхности отклика по сравнению с ортогональным ЦКП, что достигается увеличением числа опытов в центре плана и специальным выбором величины звездного плеча  $\alpha$ . Подробно с этим сложным методом можно ознакомиться в специальной литературе.

## Уравнение регрессии

$$y = 4,80 + 0,30X_1 - 0,48X_2 - 0,025X_1X_2 + 0,83X_1^* - 0,23X_2^*$$

Проверка значимости коэффициентов уравнения регрессии.

Определим оценку дисперсии, с которой определялись коэффициенты  $S_{bi}$

$$S_{b_0}^2 = \frac{1S_y^2}{NN} = \frac{0,02}{9} = 0,0022 \quad S_{b_0}^* = 0,047$$

$$S_{b_1}^2 = \frac{S_y^2}{\sum(X_1)^2} = \frac{0,02}{6} = 0,0033 \quad S_{b_1} = 0,057$$

$$S_{b_2}^2 = \frac{S_y^2}{\sum(X_2)^2} = \frac{0,02}{6} = 0,0033 \quad S_{b_2} = 0,057$$

$$S_{b_{12}}^2 = \frac{S_y^2}{\sum(X_1X_2)^2} = \frac{0,02}{4} = 0,005 \quad S_{b_{12}} = 0,070$$

$$S_{b_{11}}^2 = \frac{S_y^2}{\sum(X_1^*)^2} = \frac{0,02}{6} = 0,01 \quad S_{b_{11}} = 0,10$$

$$S_{b_{22}}^2 = \frac{S_y^2}{\sum(X_2^*)^2} = \frac{0,02}{6} = 0,003 \quad S_{b_{22}} = 0,10$$

Находим критерий Стьюдента при доверительной вероятности  $P = 95\%$  и числе степеней свободы  $f = N - 1 = 9 - 1 = 8$ ;  $t_{cm} = 2,26$ .

Находим произведение  $S_{bi}t_{cm}$

$$S_{b_0}t_{cm} = 0,047 \times 2,26 = 0,106$$

$$S_{b_1}t_{cm} = 0,057 \times 2,26 = 0,128$$

$$S_{b_2}t_{cm} = 0,057 \times 2,26 = 0,128$$

$$S_{b_{12}}t_{cm} = 0,07 \times 2,26 = 0,158$$

$$S_{b_{11}}t_{cm} = 0,10 \times 2,26 = 0,226$$

$$S_{b_{22}}t_{cm} = 0,10 \times 2,26 = 0,226$$

В данном уравнении коэффициент  $b_{12}$  не значим, так как

$$(b) \leq S_{b_{12}}t_{cm}$$

Исключаем коэффициент  $b_{12}$  из уравнения и проверяем гипотезу адекватности полученного уравнения.

Определим оценку дисперсии адекватности

$$S_{ad}^2 = \frac{1}{N - B} \sum (y^3 - y^p)^2$$

Найдем расчетные значения выходного параметра  $y$

$$y_1 = 4,80 + 0,30(-1) - 0,48(-1) + 0,83(0,33) - 0,23(0,33) = 5,20$$

$$y_2 = 4,80 + 0,30(+1) - 0,48(-1) + 0,83(0,33) - 0,23(0,33) = 5,78$$

$$y_3 = 4,80 + 0,30(-1) - 0,48(+1) + 0,83(0,33) - 0,23(0,33) = 4,22$$

$$y_4 = 4,80 + 0,30(+1) - 0,48(+1) + 0,83(0,33) - 0,23(0,33) = 4,82$$

$$y_5 = 4,80 + 0,30(+1) - 0,48(0) + 0,83(0,33) - 0,23(-0,67) = 5,14$$

$$y_6 = 4,80 + 0,30(-1) - 0,48(0) + 0,83(0,33) - 0,23(-0,67) = 4,92$$

$$y_7 = 4,80 + 0,30(0) - 0,48(-1) + 0,83(-0,67) - 0,23(+0,33) = 3,71$$

$$y_8 = 4,80 + 0,30(0) - 0,48(-1) + 0,83(-0,67) - 0,23(+0,33) = 4,65$$

$$y_9 = 4,80 + 0,30(0) - 0,48(0) + 0,83(-0,67) - 0,23(-0,67) = 4,17$$

$$S_{1ad}^2 = \frac{1}{9-5} (5,30 - 5,2)^2 = 0,0025$$

$$S_{2ad}^2 = \frac{1}{9-5} (5,78 - 6,0)^2 = 0,012$$

$$S_{3ad}^2 = \frac{1}{9-5} (4,10 - 4,22)^2 = 0,0036$$

$$S_{4ad}^2 = \frac{1}{9-5} (4,82 - 4,70)^2 = 0,0036$$

$$S_{5ad}^2 = \frac{1}{9-5} (5,14 - 5,5)^2 = 0,032$$

$$S_{6ad}^2 = \frac{1}{9-5} (4,92 - 5,0)^2 = 0,0016$$

$$S_{7ad}^2 = \frac{1}{9-5} (3,70 - 4,0) = 0,0225$$

$$S_{8ad}^2 = \frac{1}{9-5} (4,65 - 4,40) = 0,0156$$

$$S_{9ad}^2 = \frac{1}{9-5} (4,17 - 4,20) = 0,00022$$

Для расчета критерия Фишера по формуле:

$$F_p = \frac{\max S_{ad}^2}{S_y^2}$$

Принимаем  $S_{ad}^2$  для опыта №5  $\max S_{ad}^2 = 0,0323$

$$\text{Тогда } F_p = \frac{0,032}{0,02} = 1,6$$

Найдем табличное значение критерия Фишера  $F_m$  при числе степеней свободы для числителя  $f_1 = N - B = 9 - 5 = 4$  и числе степеней свободы для знаменателя  $f_2 = N(k - 1) = 9(2 - 1) = 9$  при доверительной вероятности  $P = 95\%$ ,  $F_m = 5,1$ .

Так как  $F_p < F_m$ , что полученное уравнение адекватно описывает изучаемый процесс выделения клеточного сока при размораживании ягод земляники садовой.

Запишем уравнение регрессии в окончательном виде

$$y = 4,80X_1 + 0,30X_2 - 0,48X_2 + 0,83X_1^* - 0,22X_2^*$$

## **6. ИССЛЕДОВАНИЕ КИНЕТИЧЕСКИХ ЗАКОНОМЕРНОСТЕЙ В БИО- И ХОЛОДИЛЬНЫХ ТЕХНОЛОГИЯХ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ**

При переработке и хранении продовольственного сырья и пищевых продуктов протекают сложные химические и биохимические процессы, влияющие на формирование качества, структуры и функционально-технологических свойств продукции.

Изучением механизмов и закономерностей протекания химических реакций во времени в зависимости от концентрации реагирующих веществ и условий проведения экспериментов (температуры, реакции среды, газового состава и т.д.) занимается химическая кинетика. Исследованием кинетики биологических реакций, протекающих с участием ферментов, занимается биокинетика [2].

### **6.1 Постановка кинетического эксперимента**

С целью определения механизма химической реакции необходимо провести кинетический эксперимент, который заключается в измерении концентрации исследуемого вещества в зависимости от времени изучаемого процесса и варьируемых параметров. Под параметрами кинетического эксперимента понимают:

- начальную концентрацию веществ, вступающих в реакцию;
- условия проведения эксперимента (температура, рН, газовый состав, влажность, давление и т.д.).

Для проведения адекватного кинетического эксперимента полагают один параметр измеряемым, один параметр - переменным, а все остальные параметры - фиксированными. Задачей кинетического эксперимента является определение характеристик измеряемого параметра в зависимости от значений переменного при низменных значениях фиксированных параметров. Обычно кинетические эксперименты начинают с изучения изменения концентрации веществ от времени их взаимодействия. От точности проведения этих экспериментов зависит определение механизма химической реакции. После того, как проведены кинетические эксперименты, в которых время химической реакции является переменной величиной, обычно приступают к определению зависимости концентрации веществ, вступающих в реакцию и от температуры реакции.

### **6.2 Кинетические кривые. Основные участки кинетических кривых**

В результате кинетического эксперимента получают кинетические кривые. Обычно, это графики зависимости концентраций изучаемых веществ от времени химической реакции. Известно множество кинетических кривых, од-

нако среди них можно выделить наиболее характерные для тех или иных химических реакций. Основные виды кинетических кривых приведены на рисунке 6.1.

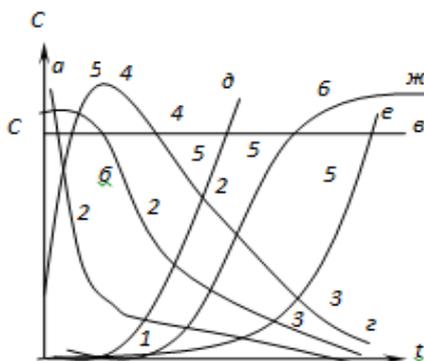


Рисунок 6.1- Кинетические кривые, характеризующие изменение концентрации веществ от времени

а, б - вещество субстрат реакции; в - вещество, не участвующее в реакции; д, ж, е - вещества образующие.

Основные участки: 1 - стадия индукции; 2 - стадия уменьшения концентрации вещества; 3 - стадия прекращения изменения; 4 - стадия постоянной концентрации; 5 - стадия увеличения концентрации; 6 - стадия выхода на плато (равновесия).

### Скорость химической реакции

Дифференциальная кинетическая кривая описывает скорость химической реакции

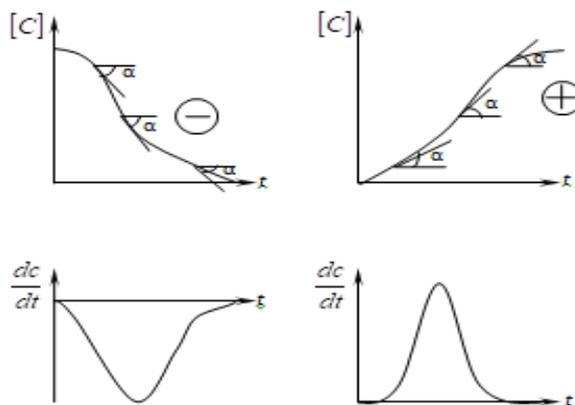


Рисунок 6.2 - Дифференциальные кинетические кривые

**Дифференциальные кинетические кривые. Скорость образования веществ**

$$v = \frac{dC}{d\tau}; C - \text{продукт реакции}$$

$$-v = \frac{dC}{d\tau}; C - \text{субстрат реакции}$$

Скорость химической реакции определяется как количество вещества, образующееся (распадающееся) в единицу времени. Размерность скорости химической реакции: концентрация / время (моль/(л·с)). Скорость химической реакции в начальный момент времени, когда существенные изменения концентрации реагирующих веществ не успели произойти, называется начальной скоростью химической реакции и обозначается  $v_0$ . Скорость химической реакции, наблюдающаяся в любой другой момент времени, называется просто скоростью.

При изучении зависимости скорости химической реакции от концентрации реагирующих веществ могут быть получены линейные и нелинейные зависимости. В простейшем случае скорость химической реакции линейным образом зависит от концентрации реагирующих веществ (для реакций распада)

$$v = -\frac{dC}{d\tau} = K_1 C, \quad (6.1)$$

где  $K$  - коэффициент пропорциональности.

Реакции, скорость которых линейно зависит от концентрации веществ, вступающих в реакцию, являются реакциями первого порядка ( $A \rightarrow B$ ). Эти реакции самые распространенные в природе. Простые реакции первого порядка являются мономолекулярными. Сложные реакции, описываемые уравнением 6.1 называются реакциями псевдопервого порядка. В более сложных случаях скорость реакции нелинейным образом зависит от концентрации реагирующих веществ. В случае распада вещества это могут быть зависимости типа:

$$1. v = -\frac{dC}{d\tau} = K_2 C^2 - \text{реакции второго (псевдвторого порядка)}$$

Простым примером реакции второго порядка может быть следующая схема:  $A + B \rightarrow C$

$$2. v = -\frac{dC}{d\tau} = K_3 C^3 - \text{реакции третьего (псевдотретьего) порядка}$$

Реакции третьего порядка встречаются крайне редко.

Есть реакции нулевого порядка, скорость которых не зависит от концентрации вещества, вступающего в реакцию:

$$v = -\frac{dC}{d\tau} = K_0 C^0 = \text{const}$$

Обычно это реакции, протекающие при избытке концентрации вещества  $C$ .

В обобщенном виде можно записать

$$v = -\frac{dC}{d\tau} = KC^m,$$

где  $K$  - константа скорости реакции;  $m$  - показатель степени (порядка реакции).

Если  $m = 0, 1, 2, 3$ , говорят о реакциях псевдонулевого, псевдовторого, псевдотретьего порядков. « $m$ » может принимать дробные значения только для сложных реакций. Если в реакции вступает несколько веществ  $C_1, C_2, \dots, C_m$ , то формально скорость реакции зависит от их концентраций следующим образом:

$$v = KC_1^{m_1} C_2^{m_2} \dots C_n^{m_n}, \quad (6.2)$$

где  $K$  - константа скорости коэффициент пропорциональности;  $m$  - порядок реакции.

Уравнение 6.2 характеризует кинетический закон действующих масс.

### 6.3 Константа скорости и порядок химической реакции

Величину  $K$  в уравнении 6.1 называют константой скорости химической реакции, которая тем больше, чем быстрее протекает химическая реакция. Она постоянна при одних и тех же условиях проведения эксперимента и не зависит от концентрации веществ, вступающих в реакцию. Константа скорости может изменяться при изменении условий проведения реакции.

Константа  $K$  отражает число активных соударений между молекулами веществ, вступающих в химическую реакцию, приводящих к образованию продуктов реакции. Если субстратом является только одно вещество (например, для реакций распада), то константа скорости отражает вероятность химической трансформации молекул исходного вещества. Поэтому константа скорости реакции является одной из важнейших кинетических характеристик.

Определение константы скорости реакции - одна из основных задач кинетического эксперимента. Размерность константы скорости реакции зависит от порядка реакции. Для реакций первого порядка размерность константы скорости  $[1/\text{время}]$  ( $^{-1}$ ,  $\text{мин}^{-1}$ ,  $\text{ч}^{-1}$ ). Для реакций второго порядка размерность константы скорости - произведение обратных концентраций и времени.

Порядок реакции является одной из важнейших характеристик механизма протекания химической реакции. Величины в уравнении  $*m_1, m_2, \dots, m_n$  называют порядком реакции. Их сумму называют суммарным порядком реакции. Величины  $m$  могут принимать целочисленные и дробные значения, могут быть равны нулю. Величины  $m$  всегда положительны. Для реакций, протекающих без промежуточных соединений (простых реакций) величина  $m$  никогда не превышает 3. Важно отметить, что величина  $m$  отображает механизм протекания химической реакции, в отличие от стехиометрических коэффициентов, отражающих пропорции между реагирующими веществами.

Порядок реакции обычно не равен сумме стехиометрических коэффициентов веществ, вступающих в реакцию. Для простых реакций порядок отражает

число активных соударений между молекулами, вступающими в химическую реакцию. Если порядок реакции дробный, то это сложная реакция, если порядок реакции целый, то ничего нельзя сказать о степени сложности механизма химической реакции. Порядок элементарной реакции всегда целочисленный.

### Определение константы скорости и порядка реакции

Определение порядка реакции и константы скорости на основании результатов кинетических экспериментов является одной из важнейших задач химической кинетики. Для того, чтобы определить эти величины используют различные методические приемы. Большинство из них основаны на поиске спрямляющих координат, в которых порядок реакции и константа скорости определяются по тангенсу угла наклона экспериментальной прямой или по точке пересечения с одной из осей.

Для реакции произвольного порядка константу скорости реакции можно найти, логарифмируя уравнение 6.3

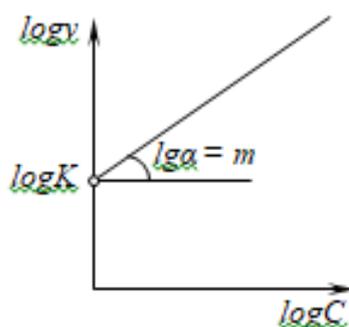


Рисунок 6.3- Зависимость скорости реакции от концентрации вещества в логарифмических координатах

$$v = KC^m \quad (6.3)$$

$$\log v = \log K + m \log C$$

Тангенс угла наклона в логарифмических координатах ( $\log v$ ,  $\log x$ ) равен порядку реакции по веществу  $C$ , пересечение с осью ординат равно логарифму константы скорости реакции. Для того, чтобы определять порядок реакции рассмотренным способом, необходимо провести серию опытов, что трудоемко и занимает много времени. Можно упростить задачу.

В кинетике показано, что наиболее информативным является определение в исследовании начальных скоростей реакции или тех скоростей реакции, которые наблюдаются при начальной концентрации веществ.

## Определение порядка реакции по начальным скоростям

Чтобы определить порядок реакции по начальным скоростям реакции, используют следующие уравнения:

$$m = \frac{\log(V_o^{(1)} / V_o^{(2)})}{\log(X_o^{(1)} / X_o^{(2)})}, \quad (6.4)$$

где нижний индекс «0» означает начальные величины для концентрации реагирующих веществ и их скоростей, а верхний индекс - номер опыта.

### 6.4 Влияние температуры на скорость химических реакций

Скорость химических реакций существенно зависит от температуры.

В общем виде скорость реакции определяется из выражения

$$V = K(t)C^m, \quad (6.5)$$

где  $K(t)$  - константа скорости реакции;  $C$  - концентрация вещества;  $m$  - порядок реакции.

Влияние температуры на скорость процесса проявляется через постоянную скорости  $K(t)$ . На основании экспериментальных данных Я. Ванг-Гофф, а затем С. Аррениус нашли эмпирическую зависимость (уравнение Аррениуса)

$$K = Ae^{-\frac{E_a}{RT}}, \quad (6.6)$$

где  $E_a$  - энергия активации;  $T$  - температура, К;  $A$  - предэкспоненциальный множитель (представляет собой частоту столкновений реагирующих молекул;  $R$  - универсальная газовая постоянная, Дж/моль.

Экспоненциальный множитель  $e^{-\frac{E_a}{RT}}$  (множитель Больцмана) определяет долю молекул, имеющих энергию выше  $E_a$  и эффективно участвующих в реакциях.

Для определения энергии активации  $E_a$  экспериментальные данные строятся в координатах Аррениуса (рисунок 6.4)

$$\ln K = \ln A - \frac{E_a}{RT} \quad (6.7)$$

Получают линейную зависимость  $\ln K = f\left(\frac{1}{T}\right)$ . Из наклона прямой находят  $E_a$ :

$$\operatorname{tg} \alpha = \frac{\ln K_2 - \ln K_1}{\frac{1}{T_2} - \frac{1}{T_1}} = -\frac{E_a}{R} \quad (6.8)$$

Для определения энергии активации необходимо:

- поставить эксперимент по измерению концентрации вещества и её изменению в зависимости от времени при фиксированных параметрах процесса, например, температуры;

- определить скорость реакции и константы скорости этой реакции;
- провести эксперимент для определения зависимости константы скорости реакции от температуры при прочих фиксированных параметрах.

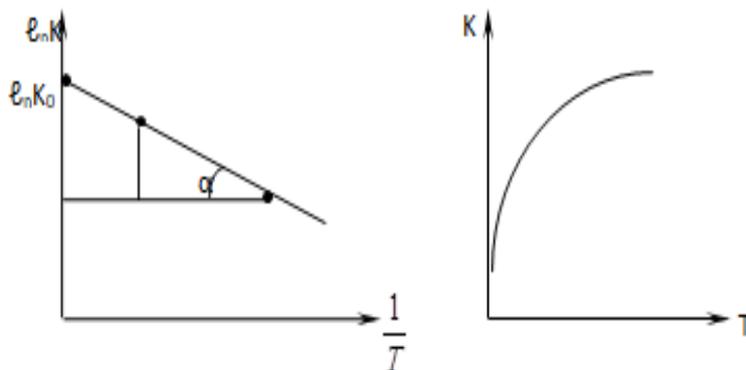


Рисунок 6.4 - Зависимость константы скорости реакции от температуры

В био- и холодильной технологиях пищевых продуктов протекают, как правило, сложные реакции различных типов, из которых преобладают последовательные и параллельные реакции синтеза и распада веществ.

### 6.5 Кинетика сложных реакций

#### 1) Кинетика последовательных реакций

Пусть последовательная реакция протекает по схеме:



Дифференциальные уравнения закона действующих масс для данной схемы запишем в следующем виде:

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dA}{d\tau} = -K_1 A \end{array} \right. \quad (6.9)$$

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dB}{d\tau} = K_1 A - K_2 B \end{array} \right. \quad (6.10)$$

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dC}{d\tau} = K_2 C \end{array} \right. \quad (6.11)$$

Одно из уравнений полученной системы можно исключить, используя закон материального баланса:

$$A_0 = A + B + C,$$

где  $A_0$  - начальная концентрация вещества ( $T = 0$ );  $A$ ,  $B$  и  $C$  - концентрации веществ в любой момент времени  $T$ .

Подставим  $A = A_0 - B - C$  в уравнение 6.10, тогда

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dB}{d\tau} = K_1 A_0 - (K_1 + K_2) B - K_1 C \\ \frac{dC}{d\tau} = K_2 C \end{array} \right. \quad (6.12)$$

Полученная система дифференциальных уравнений является линейной. Следовательно, её можно решить с помощью метода неопределенных коэффициентов или преобразований Лапласа.

В результате решения этих уравнений концентрации веществ определяются следующими соотношениями:

$$\left[ \begin{array}{l} B = \frac{K_1 A_0}{K_2 - K_1} (\exp[-K_1 \tau] - \exp[-K_2 \tau]) \\ C = \frac{A_0 K_2}{K_2 - K_1} [(K_1 - K_2) + (K_2 \exp[-K_1 \tau]) - (K_1 \exp[-K_2 \tau])] \\ A = A_0 - B - C \end{array} \right] \quad (6.13)$$

Следует отметить, что в процессе последовательной реакции происходит постепенное расходование веществ  $A$  и накопление вещества  $C$ . Вещество  $B$  в процессе последовательной реакции вначале накапливается, а затем расходуется (рисунок 6.5).

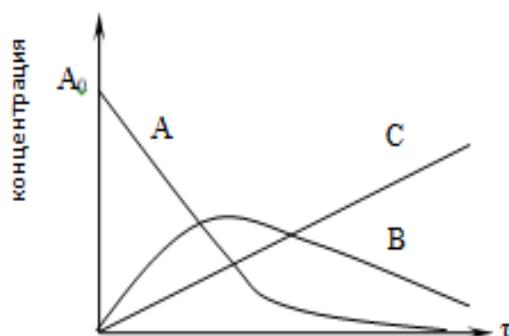
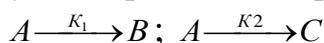


Рисунок 6.5 - Изменение концентрации веществ в процессе последовательной реакции

#### в) Кинетика параллельных реакций

Пусть параллельная реакция протекает по схеме:



Закон действующих масс для данной схемы можно выразить в виде системы уравнений:

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dA}{d\tau} = -(K_1 + K_2)A \\ \frac{dB}{d\tau} = K_1 A \\ \frac{dC}{d\tau} = K_2 A \end{array} \right. \quad (6.14)$$

Закон сохранения вещества  $A_0 = A + B + C$  позволяет сократить на одно уравнение данную систему дифференциальных уравнений:

$$\frac{dB}{d\tau} = K_1 A_0 - K_1 B - K_1 C = K_1 (A_0 - B - C) \quad (6.15)$$

$$\frac{dC}{d\tau} = K_2 A_0 - K_2 B - K_2 C = K_2 (A_0 - B - C) \quad (6.16)$$

Решаем данную систему уравнений с помощью преобразований Лапласа и используя метод Крамера.

Получим уравнения, с помощью которых можно определить концентрации веществ  $B$  и  $C$  в любой момент времени  $\tau$

$$B = \frac{K_1 A_0}{K_1 + K_2} (1 - \exp[-(K_1 + K_2)\tau]) \quad (6.17)$$

$$C = \frac{K_2 A_0}{K_1 + K_2} (1 - \exp[-(K_1 + K_2)\tau]) \quad (6.18)$$

Из уравнения материального баланса найдем значение  $A$  из выражения

$$A = A_0 - B - C$$

## 6.6 Кинетика ферментативных реакций

В био- и холодильных технологиях пищевых продуктов многие процессы, связанные с формированием сенсорных показателей качества, функционально-технологических свойств, структурно-механических характеристик продуктов, протекают с участием различных ферментативных систем. Исследование кинетики ферментативных реакций позволяет получить информацию для выяснения молекулярного механизма действия различных классов ферментов [12, 16].

Ферментативная кинетика занимается изучением закономерностей влияния химической природы реагирующих веществ (ферментов, субстратов) и условий их взаимодействия (температура, pH, концентрации реагирующих веществ, присутствие активаторов и ингибиторов) на скорость ферментативных реакций. Общие принципы кинетики химических реакций характерны и для ферментативных реакций. Любая реакция характеризуется константой термодинамического равновесия  $K_p$ .

Для кинетической схемы



$$K_p = \frac{[C][D]}{[A][B]} \quad (6.20)$$

Скорости прямой реакции  $V_I$  и обратной  $V_{-I}$  определяются по формулам:

$$V_I = K_{+I} [A] [B] \quad (6.21)$$

$$V_{-I} = K_{-I} [C] [D] \quad (6.22)$$

Значение  $K_p = \frac{K_{+1}}{K_{-1}}$

Величина, обратная  $K_p$  называется субстратной константой или в случае ферментативной реакции - константой диссоциации фермент - субстратного комплекса и обозначается символом  $K_s$ .

В ферментативной реакции, протекающей по схеме:



$$K_s = \frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{K_{-1}}{R+1} \quad (6.24)$$

Константа  $K_s$  зависит от химической природы субстрата и фермента и определяет степень их сродства. Чем меньше значение  $K_s$ , тем выше сродство ферментов к субстрату.

В процессе изучения кинетики ферментативных реакций необходимо учитывать явление насыщения фермента субстратом. При низкой концентрации субстрата зависимость  $V = f(S)$  подчиняется кинетике первого порядка, т.е.  $V = KS$ ,

где  $[S]$  - молярная концентрация субстрата  $S$ ;

$-\frac{d[S]}{d\tau}$  - скорость убыли субстрата.

При высокой концентрации субстрата скорость реакции максимальна ( $V_{max}$ ) становится постоянной и не зависит от концентрации субстрата. В этом случае реакция подчиняется кинетике нулевого порядка  $V = K_o$  (полное насыщение фермента субстратом) и определяется только концентрацией фермента  $[E]$ . При этом возможны такие реакции второго порядка, скорость которых пропорциональна произведению концентраций двух реагирующих веществ. В определенных условиях протекают реакции смешанного порядка.

Одним из фундаментальных представлений о механизмах ферментативных реакций является представление о фермент-субстратном комплексе, образующимся по пути трансформации субстрата в продукт под действием ферментов. Механизм ферментативной реакции заключается в том, что субстрат образует комплекс с активным центром фермента. В комплексе происходят фермент-субстратные изменения, образуются продукты реакции, которые уходят из активного центра, освобождая его для взаимодействия с новой молекулой субстрата.

Для объяснения экспериментально наблюдаемых зависимостей рассматриваются два основных механизма, различающихся по физической картине явления. Первая модель: ферментативные реакции протекают по схеме Михаэлиса, в соответствии с которой в процессе каталитического действия активный центр фермента с субстратом образует промежуточный фермент-

субстратный комплекс, внутримолекулярное превращение которого приводят к образованию продуктов с регенерацией активного центра:



где  $K_1$ ,  $K_{-1}$  - константы скорости образования и диссоциации фермент-субстратного комплекса; константа  $K_2$  скорости мономолекулярного превращения комплекса.

Вторая модель: ферментативные реакции протекают по схеме Анри; при этом также образуется комплекс при взаимодействии субстрата с активным центром фермента:



где  $K_A$  - константа скорости реакции второго порядка взаимодействия активного центра фермента с субстратом.

Обе схемы описывают экспериментально наблюдаемые зависимости начальной стационарной скорости реакции от концентрации субстрата и фермента. Следует отметить, что в настоящее время неизвестны ферменты, которые бы действовали по простым схемам 6.25 или 6.26. Как правило, реальные механизмы включают большое число промежуточных соединений фермента с субстратом; их идентификация, исследование структуры, скоростей образования и расхода и составляет предмет изучения механизмов ферментативных реакций. В тоже время использование уравнения Михаэлиса получило широкое распространение. Это одно из фундаментальных уравнений ферментативной кинетики феноменологически описывает практически все ферментативные реакции, а наблюдаемые отклонения, как правило, связаны с усложнением простейшей схемы. Уравнение Михаэлиса отражает фундаментальную особенность ферментативных реакций - участие в механизме процессов образования лабильных промежуточных соединений субстрата и активного центра фермента.

Все кинетические схемы, включающие стадии образования и расхода промежуточных соединений, приводят к зависимости скорости реакции от концентрации субстрата типа уравнения Михаэлиса.

В таблице 6.1 приведены некоторые кинетические схемы, приводящие к уравнению начальной стационарной скорости, формально эквивалентному уравнению Михаэлиса.

### Некоторые кинетические схемы, приводящие к уравнению стационарной скорости, эквивалентному уравнению Михаэлиса

Схема	$K_{кам}$	$K_m$
$E + S \xrightarrow{K_1} X \xrightarrow{K_2} E + P$	$K_2$	$K_2 / K_1$
$E + S \xrightleftharpoons[K_1]{K_s} X \xrightarrow{K_2} E + P$	$K_2$	$K_s$
$E + S \xrightleftharpoons[k_A]{K_A} X ; E + S \xrightarrow{K_A} E + P$	$k_A K_A$	$K_A$
$E + S \xrightleftharpoons[k_1]{K_s} X_1 \xrightarrow{k_2} X_2 \xrightarrow{k_3} E + P$	$\frac{k_2 k_3}{k_2 + k_3}$	$\frac{k_2 k_3}{k_2 + k_3}$
$E + S_1 \xrightarrow{k_1} X + P_1$ $X + S_2 \xrightarrow{k_2} E + P_2$	$k_2 [S_2]$	$\frac{k_2 [S_2]}{k_1}$

Для схемы  $E + S \xrightleftharpoons[k_{-1}]{K_{+1}} X \xrightarrow{K_2} P + E$  схема Михаэлиса-Ментена при избытке субстрата приводит к следующей системе уравнений:

$$\frac{dx}{d\tau} = K_1 E \cdot S_o - (K_{-1} + K_2) X \quad (6.27)$$

$$V_o = \frac{dp}{d\tau} = k_2 X \quad (6.28)$$

$$E_o = E + X \quad (6.29)$$

Для схемы Михаэлиса с промежуточным реакционноспособным комплексом концентрация промежуточного соединения при начальных условиях  $\tau = 0, x = 0$  определяется из уравнения:

$$X = \frac{E_o S_o}{K_m + S_o} \left[ 1 - e^{-(K_1 S_o + K_{-1} + K_{+1})\tau} \right] \quad (6.30)$$

концентрация продукта

$$P(\tau) = \frac{K_2 E_o S_o}{K_m + S_o} + \frac{K_2 E_o S_o}{(K_m + S_o)(K_1 S_o + K_{-1} + K_{+1})} \cdot (e^{[-(K_1 S_o + K_{-1} + K_{+1})\tau]} - 1) \quad (6.31)$$

В условиях стационарности по промежуточному соединению  $\left(\frac{dx}{d\tau} = 0\right)$  уравнение начальной стационарной скорости реакции имеет вид:

$$V_o = \frac{K_2 E_o S_o}{K_m + S_o}, \quad (6.32)$$

где  $K_m$  - Константа Михаэлиса.

$$K_m = \frac{K_{-1} + K_{+1}}{K_{-1}} \quad \text{или} \quad K_m = K_s + \frac{K_{+2}}{K_{-1}} \quad (6.33)$$

т.е.  $K_m$  всегда больше  $K_s$  ферментно-субстратного комплекса на величину  $\frac{K_{+2}}{K_{-1}}$

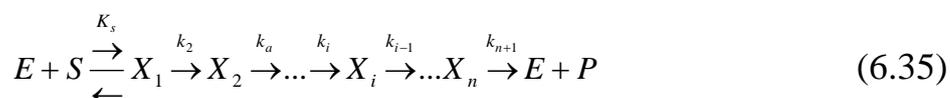
В уравнении 6.32, называемом уравнением Михаэлиса, произведение  $K_2 E_o$  равно максимальной скорости реакции  $V_m$ , тогда

$$V_o = \frac{V_m S_o}{K_m + S_o} \quad (6.34)$$

Несмотря на кажущуюся сложность реакции, вне зависимости от числа и природы интермедиатов, принимающих участие в механизме реакции, стационарная кинетика процесса будет описываться уравнением Михаэлиса. Для характеристики ферментативных реакций обычно определяют оба параметра, входящие в уравнения Михаэлиса-Ментена максимальную скорость  $V_m$  и константу Михаэлиса  $K_m$ .

Важно отметить, что без детального знания механизма реакции интерпретация  $K$  и  $K_m$ , как констант связывания фермента субстратом и константы скорости превращения фермент-субстратного комплекса неправильна, поскольку для разных кинетических схем константы  $K$  и  $K_m$  могут отражать совершенно различные процессы (таблица 6.1), тем не менее эти характеристики легко определяются экспериментально и в ряде случаев несут весьма важную информацию о свойствах каталитической реакции.

В качестве иллюстрации положения о существовании множества кинетических схем, приводящих к уравнению Михаэлиса рассмотрим стационарную кинетику фермент-субстратного превращения в более общем случае - для системы с участием произвольного числа  $n$ -промежуточных соединений



В стационарном состоянии по промежуточным соединениям ( $dX/dt = 0$ ,  $i = 2, n$ ) и при избытке субстрата ( $S_o \gg E_o$ ) кинетику процесса описывает система уравнений:

$$V_o = \left( \frac{dP}{dt} \right)_{cm} = k_{n+1} X_n = k_2 X_1,$$

$$E_o = E + \sum_{i=1}^n X_i,$$

$$X_i = X_{i-1} \left( \frac{k_i}{k_{i+1}} \right) = X_1 \left( \frac{k_2}{k_{i+1}} \right), \quad i = 2 \dots, n,$$

$$X_I = E \left( \frac{S_o}{K_s} \right) \quad (6.36)$$

Для реакции 6.35 зависимость начальной стационарности скорости процесса от концентрации субстрата будет иметь вид уравнения Михаэлиса (6.32).

Значения  $K_m$  имеют эффективный характер и заданы уравнениями:

$$K_m = \frac{K_s}{K_2} \cdot \frac{1}{\sum_{i=2}^{n+1} \frac{1}{k_i}}$$

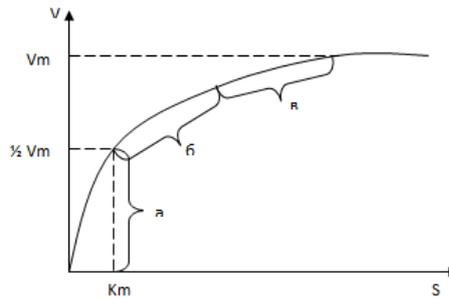


Рисунок 6.6 - Теоретический график зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации  $S$  субстрата

$K_m$  - это концентрация субстрата при которой ферментативная реакция протекают со скоростью равной  $\frac{1}{2} V_m$  и имеет размерность концентрации субстрата.

На кривой выделены три участка:

а - реакция первого порядка при  $[S] < K_m$ ; скорость реакции пропорциональна концентрации субстрата;

б - реакция смешанного порядка;

в - реакция нулевого порядка, когда  $V = V_m$  и скорость реакции не зависит от  $[S]$ .

На рисунке 6.7 приведены типичные зависимости начальной стационарной скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата.

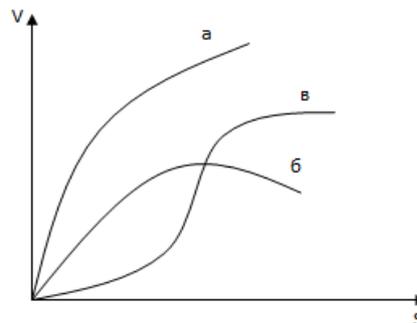


Рисунок 6.7- Различные виды зависимости начальной скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата

Типичная кривая  $V = f(S)$  описывается уравнением Михаэлиса (кривая а) и является отражением участка интермедиатов в процессе конверсии субстрата в активном центре фермента. Экспериментально полученные зависимости с экстремумом (кривая б), или сигмоидального типа (кривая в).

Определение параметров  $V_m$  и  $K_m$  из экспериментальных данных. На основании экспериментальных данных по стационарной кинетике значение  $V_m$  и  $K_m$  определяют из линеаризованного уравнения Михаэлиса.

На основании линеаризации этого уравнения (6.32) методом двойных обратных координат получено уравнение Г. Лайнуивера и Д. Бэрка:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_m} + \frac{K_m}{V_m} \frac{1}{S_o} \quad (6.37)$$

Значение  $V_m$  и  $K_m$  из данного уравнения определяется графическим методом (рисунок 6.8).

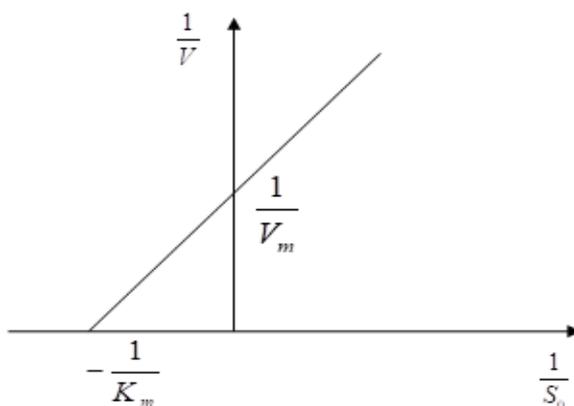


Рисунок 6.8 - Определение параметров  $V_m$  и  $K_m$

Эти параметры можно определить также методом Скэтчарда (Иди-Хофсти):

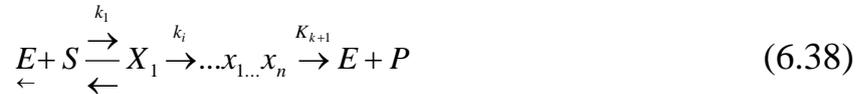
$$\frac{v}{S_o} = \frac{1}{K_m} V_m - \frac{1}{K_m} v$$

## 6.7 Нестационарная кинетика ферментативных реакций

В пищевых технологиях очень часто необходимо исследовать механизмы последовательных реакций, основанных на изучении нестационарных процессов. Как правило, нестационарная кинетика позволяет детально проанализировать стадийность процесса превращения субстрата в промежуточные продукты реакций гидролиза и окисления пищевых веществ. Стадия, предшествующая стационарной, характеризуется протеканием реакции в переходной фазе и называется предстационарной.

### 6.7.1 Предстаационарная кинетика многостадийной ферментативной реакции

Рассмотрим кинетику и методологию такого рода исследования на примере реакций превращения субстрата в продукт с участием произвольного числа  $n$  промежуточных соединений



Существенно упрощает анализ кинетики реакции использование большого избытка субстрата по сравнению с концентрацией активных центров фермента  $S_o \gg E_o$ . Это условие переводит бимолекулярный нелинейный член  $k_1ES$  в псевдомономолекулярный  $k_1ES_o$ , линейно зависящий только от одной переменной концентрации.

В этом случае кинетику процесса описывает система уравнений

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dx_1}{dt} = k_1 S_o E + k_{-2} X_{-2} - (k_{-1} + k_2) X_1 \\ \frac{dX_i}{dt} = k_1 X_{i-1} + k_{-(i+1)} X_{i+1} - (k_{-i} + k_{i+1}) X_i \\ \frac{dX_n}{dt} = k_{n-1} - (k_{-n} + k_{n+1}) X_n \\ E_o = E + \sum_{i=1}^n X_i \\ \frac{dP}{dt} = k_{n+1} X_n \end{array} \right. \quad (6.39)$$

Система (6.39) представляет собой линейную систему  $(n+1)$  - уравнений. Исключением переменной  $E$  с помощью уравнения материального баланса эта система сводится к системе  $n$  - линейных дифференциальных уравнений, которые могут быть трансформированы в линейное дифференциальное уравнение с постоянными коэффициентами вида

$$\frac{d^n X_n}{dt^n} + a_1 \frac{d^{n-1} X_n}{dt^{n-1}} + \dots + a_n X_n = b \quad (6.40)$$

Общим решением этого уравнения является сумма экспоненциальных членов

$$X_n(t) = \sum_{i=1}^n A_i e^{\lambda_i t} + \frac{b}{a_n}, \quad (6.41)$$

где  $\lambda_i$  - однократные корни характеристического уравнения

$$\lambda^n + a_1 \lambda^{n-1} + \dots + a_n = 0$$

Корни характеристического уравнения имеют размерность обратного времени

$$\tau^{-1} = -\frac{1}{\lambda_i} \quad (6.42)$$

После подстановки уравнения (6.44) в (6.43) и интегрирования получаем

$$P_n(t) = \sum_{i=1}^n k_{n+1} \frac{A_i}{\lambda_i} (e^{\lambda_i t} - 1) + \frac{k_{n+1} b}{a_n} t \quad (6.43)$$

Следует отметить две особенности изменения во времени концентрации продукта реакции.

1. После протекания реакции в предстационарном режиме по истечении времени « $\tau$ »  $\tau_i$ ,  $i = 1, \dots, n$ , реакция переходит в стационарный режим, характеризуемый стационарной скоростью

$$V_{cm} = \frac{k_{n+1} b}{a_n} t, \quad (6.44)$$

где величины  $b$  и  $a_n$  являются функциями элементарных констант и начальных концентраций фермента и субстрата и в каждом конкретном случае определяются как коэффициенты уравнения (6.43).

2. Зависимость концентрации конечного промежуточного соединения описывается суммой экспоненциальных членов, а концентрация конечного продукта - суммой экспонент и линейным членом, причем число экспонент соответствует числу промежуточных соединений в механизме реакции. Таким образом, для реакции, протекающей с участием  $n$  - промежуточных соединений, в идеальном случае можно получить набор  $n$  - характеристических времен.

Реально в эксперименте может наблюдаться меньшее число экспоненциальных членов. Это связано с методическими особенностями регистрации кинетической кривой. Так, при использовании спектрометрического метода регистрации необходимы заметные спектральные различия компонентов реакции. Существенные ограничения накладывает также временная разрешающая способность установки. Экспериментально определить характеристическое время можно, если оно превышает «мертвое» время используемой аппаратуры. Эти ограничения приводят к тому, что наблюдаемое число экспоненциальных членов позволяет оценить лишь минимальное число промежуточных соединений, принимающих участие в реакции.

### **6.7.2 Нестационарная кинетика ферментативных реакций при переменной концентрации субстрата**

В процессе хранения пищевых продуктов под действием ферментов происходит изменение концентрации субстрата (белков, углеводов и т.д.) с образо-

ванием промежуточных соединений. Для механизма реакции с участием одного промежуточного соединения в условиях, при которых концентрация субстрата является переменной величиной и в процессе реакции происходит полное расходование субстрата



Система уравнений, описывающая изменение во времени всех компонентов реакции, имеет вид

$$\begin{cases} \frac{d[S]}{d\tau} = k_{-1}[X] - k_1[E][S] \\ \frac{d[X]}{d\tau} = k_1[E][S] - (k_2 + k_{-1})[X] \\ \frac{d[p]}{d\tau} = k_2[X] \\ [E_o] = [E] + [X] \end{cases} \quad (6.46)$$

Эта система уравнений нелинейна вследствие наличия члена, содержащего произведение переменных  $k_1 [E] [S]$ , и решение ее в большинстве случаев сопряжено с приближенным численным интегрированием. В частном случае при условии  $[E_o] \gg [S_o]$  система уравнений трансформируется в линейную систему, и ее решение детально анализируется ниже. При условии  $[E_o] \gg [S_o]$  концентрация фермента в процессе реакции не изменяется. Из уравнения 6.49 следует, что  $[E] = [E_o]$  и уравнения 6.46 принимают вид системы линейных уравнений с постоянными коэффициентами

$$\begin{aligned} \frac{d[S]}{d\tau} &= k_{-1}[X] - k_1[E_o][S] \\ \frac{d[X]}{d\tau} &= k_1[E_o][S] - (k_2 + k_{-1})[X] \end{aligned} \quad (6.47)$$

Эта система двух уравнений может быть сведена к одному дифференциальному уравнению второго порядка. Используя уравнение (6.47), выражаем величину  $[S]$  через  $[X]$ :

$$[S] = \frac{1}{k_{-1}[E_o]} \left\{ \frac{d[X]}{dt} + (k_2 + k_{-1})[X] \right\} \quad (6.48)$$

$$\frac{d[S]}{dt} = \frac{1}{k_{-1}[E_o]} \left\{ \frac{d^2[X]}{dt^2} + (k_2 + k_{-1}) \frac{d[X]}{dt} \right\} \quad (6.49)$$

Подставляя величины  $[S]$  и  $\left(\frac{d[S]}{dt}\right)$  (из 6.49) в дифференциальное уравнение (6.47), получаем линейное дифференциальное уравнение второго порядка

$$\frac{d^2[X]}{dt^2} + (k_2 + k_{-1} + k_1[E_o]) \frac{d[X]}{dt} + k_1 k_2 [E_o] [X] = 0 \quad (6.50)$$

Соответствующее характеристическое уравнение

$$\lambda^2 + (k_2 + k_{-1} + k_1[E_o])\lambda + k_1k_2[E_o][X] = 0$$

имеет два действительных корня

$$\lambda_{1,2} = \frac{k_2 + k_{-1} + k_1[E_o]}{2} \pm \sqrt{\frac{(k_2 + k_{-1} + k_1[E_o])^2}{4} - k_1k_2[E_o]} \quad (6.51)$$

поскольку

$$(k_2 + k_{-1} + k_1[E_o])^2 > 4k_1k_2[E_o]$$

В соответствии с теорией линейных дифференциальных уравнений решение уравнения (6.54) в этом случае имеет вид

$$[X] = C_1 e^{\lambda_1 t} + C_2 e^{\lambda_2 t} \quad (6.52)$$

где  $\lambda_1, \lambda_2$  - корни характеристического уравнения;  $C_1, C_2$  - постоянные интегрирования, определяемые из начальных условий.

Для нахождения постоянных  $C_1$  и  $C_2$  используем условия  $t = 0$ :

$$[X] = 0, \quad \frac{dX}{dt} = k_1[E_o][S_o]$$

Подстановка этих условий в уравнение (6.52) приводит к системе алгебраических уравнений

$$C_1 + C_2 = 0$$

$$\lambda_1 C_1 + \lambda_2 C_2 = k_1[E_o][S_o]$$

решение, которой дает постоянные интегрирования

$$C_1 = \frac{k_1[E_o][S_o]}{\lambda_1 - \lambda_2}, \quad C_2 = \frac{k_2[E_o][S_o]}{\lambda_2 - \lambda_1}$$

Таким образом, изменение во времени концентрации промежуточного соединения описывает функция

$$[X(t)] = k_1[E_o][S_o] \left\{ \frac{1}{\lambda_1 - \lambda_2} \right\} \exp[\lambda_1 t] - \frac{1}{\lambda_1 - \lambda_2} \exp[\lambda_2 t] \quad (6.53)$$

Изменение во времени концентрации субстрата определяется с использованием уравнения (6.56) при подстановке  $[X]$  и  $\left(\frac{d[X]}{dt}\right)$  в уравнении (6.52):

$$[S(t)] = [S_o] \left\{ \frac{\lambda_1 + k_{-1} + k_2}{\lambda_1 - \lambda_2} \exp[\lambda_1 t] - \frac{\lambda_1 + k_{-1} + k_2}{\lambda_1 - \lambda_2} \exp[\lambda_2 t] \right\} \quad (6.54)$$

Соответственно функция  $[P](t)$  определяется подстановкой уравнения (6.57) в уравнение (6.49) и интегрированием полученного дифференциального уравнения с разделяющимися переменными

$$[P(t)] = k_1k_2[E_o][S_o] \left\{ \frac{1}{\lambda_1 - \lambda_2} (\exp[\lambda_1 t] - 1) - \frac{1}{\lambda_1 - \lambda_2} - (\exp[\lambda_2 t] - 1) \right\} \quad (6.55)$$

Графический вид функции  $[S](t)$ ,  $[X](t)$  и  $[P](t)$  дан на рисунке 6.9.

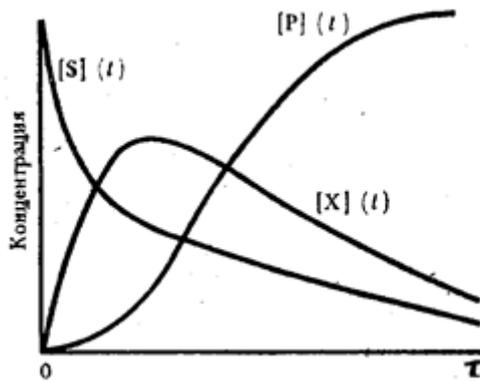


Рисунок 6.9 - Зависимость от времени концентрации субстрата, промежуточного соединения и продукта при переменной концентрации субстрата

Характерной особенностью  $[S](t)$ ,  $[X](t)$  и  $[P](t)$  является то, что они представляют собой суммы одних и тех же экспоненциальных членов, различающихся лишь предэкспонентами. Величины  $\lambda_1$  и  $\lambda_2$  имеют размерности обратного времени и связаны с характеристическими временами регистрируемых кинетических процессов соотношениями

$$\lambda_1 = -\frac{-1}{\tau_1 \lambda_2} = \frac{-1}{\tau_2} \quad (6.56)$$

Величины  $\tau_1$  и  $\tau_2$  могут быть найдены из любой экспериментальной зависимости  $[S](t)$ ,  $[X](t)$  или  $[P](t)$ . Из анализа найденных величин  $\tau_1$  и  $\tau_2$  или  $\lambda_1$  и  $\lambda_2$  определяют все константы скорости, описывающие механизм реакции (6.45).

Величины  $\tau_1$  и  $\tau_2$  (или  $\lambda_1$  и  $\lambda_2$ ) определяются из анаморфоз функций  $[S](t)$ ,  $[X](t)$  или  $[P](t)$  в полулогарифмических координатах. Действительно, с точностью до постоянных уравнения 6.53 и 6.54 могут быть представлены в виде

$$y = a \exp[\lambda_1 t] + b \exp[\lambda_2 t] \quad (6.57)$$

уравнение (6.57) - в виде

$$y = a \exp[\lambda_1 t] + b \exp[\lambda_2 t] + C \quad (6.58)$$

Можно показать, что в уравнении 6.58  $C = -[S]_0$

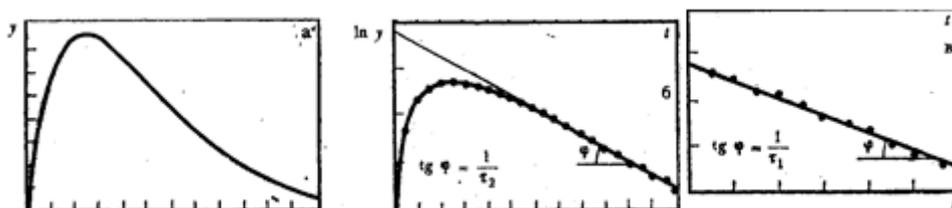


Рисунок 6.10 - Определение показателей экспонент из кинетической кривой, описываемой суммой двух экспоненциальных членов

На рисунке 6.10 представлен вид функций 6.57 или 6.58:  $[S_o] - y = a \exp[\lambda_1 t] + b \exp[\lambda_2 t]$  в полулогарифмических координатах. Из линейной части кривой в условиях, когда первым, более «быстрым» экспоненциальным членом можно практически пренебречь, по тангенсу угла наклона определяют величину  $\lambda_2$ , по отрезку, отсекаемому на оси ординат, - величину  $b$ .

Показатель второй экспоненты находят по тангенсу угла наклона зависимости  $\ln(y - b \exp[\lambda_2 t])$  или  $\ln([S_o] - y - b \exp[\lambda_1 t])$  для функции  $[P](t)$  в соответствии с уравнением

$$\ln(y - b e^{\lambda_2 t}) = \ln a + \lambda_1 t \quad (6.59)$$

Величины  $\lambda_1$  и  $\lambda_2$  связаны с элементарными константами скорости реакции 6.45 достаточно сложным соотношением 6.51, и непосредственное определение констант скоростей из величин  $\lambda_1$  и  $\lambda_2$  затруднено (за исключением частного случая, рассмотренного ниже). Однако функция  $\lambda_1 \cdot \lambda_2$ ,  $\lambda_1 + \lambda_2$  связаны, как корни характеристического уравнения (6.50) с константами скоростей  $k_1$ ,  $k_{-1}$  и  $k_2$  следующими уравнениями:

$$\lambda_1 \lambda_2 = k_2 k_1 [E]_o; \quad (\lambda_1 + \lambda_2) = k_1 [E]_o + k_{-1} + k_2 \quad (6.60)$$

При условии, что величины  $\lambda_1$  и  $\lambda_2$  (или  $\tau_1$  и  $\tau_2$ ) найдены из эксперимента при различных концентрациях фермента (т.е. найдены зависимости  $\lambda_1$  и  $\lambda_2$  от  $[E]_o$ ), используя уравнения 6.60, можно найти все константы скорости реакции 6.45 (рисунок 6.10). Из зависимости функции  $(1/\tau_1 + 1/\tau_2)$  от концентрации фермента по тангенсу угла наклона и отрезку, отсекаемому на оси ординат, определяют величины  $k_1$  и  $k_{-1} + k_2$ . По тангенсу угла наклона зависимости  $(\tau_1 \cdot \tau_2)^{-1}$  находят величину  $k_1 \cdot k_2$ , из которой, используя найденное значение  $k_1$ , определяют константу скорости  $k_2$ . Значение  $k_{-1}$  находят из суммы  $k_{-1} + k_2$ .

Формально - кинетический анализ реакции 6.45 при переменной концентрации субстрата и при условии  $[E]_o \gg [S]_o$  существенно упрощается, если  $k_{-1} \ll k_2 + k_1 [E]_o$ .

В этом частном случае [уравнение 6.60] показатели экспонент непосредственно связаны с элементарными константами уравнений:

$$\lambda_1 = -k_1 [E]_o, \quad \lambda_2 = -k_2 \quad (6.61)$$

При этом условии концентрации субстрата, промежуточного соединения и продукта реакции описаны уравнениями:

$$\begin{cases} [S](t) = [S]_o \left\{ \frac{k_{-1}}{k_1 [E]_o - k_2} e^{-k_2 t} + \left( 1 + \frac{k_{-1}}{k_2 - k_{-1} [E]_o} \right) e^{-k_1 [E]_o t} \right\} \\ [X](t) = k_1 [E]_o [S]_o \left\{ \frac{k_{-1}}{k_1 [E]_o - k_2} e^{-k_2 t} + \frac{k_{-1}}{k_2 - k_{-1} [E]_o} e^{-k_1 [E]_o t} \right\} \\ [P](t) = [S]_o \left\{ \frac{k_1 [E]_o}{k_2 - k_1 [E]_o} (e^{-k_2 t} - 1) + \frac{k_2}{k_1 [E]_o - k_2} e^{-k_1 [E]_o t} \right\} \end{cases} \quad (6.62)$$

В случае, если экспериментальные данные получены при соизмеримых концентрациях фермента и субстрата, система уравнений 6.46 нелинейна, и при решении этой системы необходимо численно интегрировать дифференциальные уравнения. Тем не менее численные значения констант скоростей реакции 6.45 и в этих условиях могут быть определены достаточно просто.

Сложение уравнений системы 6.46 приводит к уравнению

$$d \frac{[S]}{dt} + d[X]/dt = -k_2 X$$

$$\int_{[S]_0}^0 d[S] + \int_0^{\infty} d[X] = -k_2 \int_0^{\infty} [X] dt$$

Интегрирование этого уравнения по всему диапазону времени с учетом условий  $t = 0, [S] = [S]_0, [X] = 0; t \rightarrow \infty, [S] \rightarrow 0, [X] \rightarrow 0$  приводит к уравнению

$$\lambda_1 = -k_1 [S]_0 = k_2 \int_0^{\infty} [X] dt \quad (6.63)$$

При условии, что исследование кинетики реакции проводится по концентрации промежуточного соединения, интеграл  $\int_0^{\infty} [X] dt$  достаточно просто и точно может быть найден по площади, ограниченной кривой  $[X](t)$  (интегральная кинетическая кривая).

Это позволяет определить величину  $k_2$

$$k_2 = [S]_0 \int_0^{\infty} [X] dt \quad (6.64)$$

Величина  $k_1$  может быть найдена из начальной скорости образования промежуточного соединения. Значение  $k_{-1}$  может быть найдено, если из данных по стационарной скорости реакции известна величина  $K_m = (k_2 + k_{-1})/k_1$ , поскольку значения констант  $k_1$  и  $k_2$  определены выше.

## 7. МЕТОДОЛОГИЯ ИССЛЕДОВАНИЯ РОСТА КЛЕТОЧНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ

Изучение кинетических особенностей развития клеточных популяций невозможно без понимания закономерностей развития одной клетки. Эти закономерности описываются клеточным циклом, который состоит по крайней мере из четырех фаз:

1. Митоз (М-фаза). В этой фазе происходит деление материнской клетки на две дочерние
2. G<sub>1</sub>-фаза - период времени между концом М-фазы и началом синтеза ДНК.
3. S-фаза - период синтеза ДНК

4.  $G_2$ -фаза - период между концом  $S$ -фазы и началом  $M$ -фазы

Совокупность  $C$ ,  $S$ - и  $G_2$ -фаз принято называть интерфазой.

Длительность клеточного цикла подвержена значительным вариациям и может составлять от 1-2 ч (для эмбриональных, микробных клеток) до нескольких десятков лет (гепатоциты, нейроны). В основном различия в длительности клеточных циклов связаны с различиями в длительности  $G_1$ -фазы. У однотипных клеток могут происходить случайные изменения длительности  $G_1$ -фазы, приводящие к десинхронизации процессов клеточного деления, даже если изначально процессы клеточного деления были синхронизированы [2, 16].

### Типичная кривая роста клеточной культуры

Механизмы, обеспечивающие пролиферацию клеток при прохождении клеточного цикла, слабо доступны для изучения *in vivo*. Эта проблема была изучена лишь с развитием техники длительного поддержания клеточных культур *in vitro*. Культура клеток представляет собой популяцию генотипически однотипных клеток, которые функционируют и делятся *in vitro*. Культуры клеток, полученные путем целенаправленных или случайных мутаций, называются клеточными линиями.

Рост клеточных культур *in vitro* имеет сложный характер (рисунок 7.1) В целом можно выделить следующие фазы:

1. Индукционный период (лаг-фаза). В течение лаг-фазы не происходит сколько-нибудь заметного увеличения числа клеток или образования продуктов. Данная фаза обычно наблюдается после пересева клеточной культуры. В ней происходит адаптация микробных клеток к новой культуральной среде, перестраивается метаболизм микробной клетки.

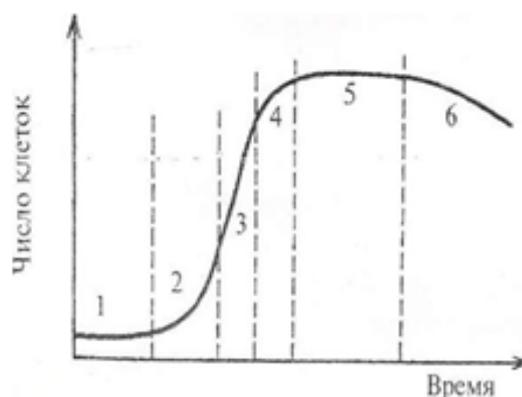


Рисунок 7.1- Типичная кинетическая кривая роста клеточной культуры

1 - индукционный период; 2 - фаза экспоненциального роста; 3 - фаза линейного роста; 4 - фаза замедления роста; 5 - стационарная фаза; 6 - фаза отмирания культуры.

2. Фаза экспоненциального роста. Характеризуется быстрым накоплением биомассы и продуктов жизнедеятельности клеточных культур. В данной фазе наиболее часто встречаются митозы по сравнению с остальными фазами роста клеточной культуры.

3. В замкнутой культуре фаза экспоненциального роста не может продолжаться бесконечно долго. Она переходит в фазу линейного роста, характеризующуюся уменьшением числа митозов. В этой фазе наблюдается линейное увеличение числа микробных клеток в зависимости от времени культивирования.

4. Фаза замедления роста. В этой фазе уменьшается рост клеточной культуры за счет уменьшения числа митозов.

5. Стационарная фаза. Наблюдается вслед за фазой замедления роста, при этом число клеток практически не меняется. В этой фазе или происходит прекращение митотического деления клеток, или же число делящихся клеток равно числу умирающих клеток.

6. Фаза отмирания культуры, в которой преобладают процессы гибели клеток и практически не наблюдаются митотические деления.

Последовательные переходы от фазы 1 к фазе 6 наблюдаются в значительной степени за счет истощения субстратов, необходимых для роста популяции клеток, или же за счет накопления токсичных продуктов их жизнедеятельности.

Впервые на лимитирование процессов роста культур клеток субстратами ферментативных реакций обратил внимание Ж. Моно. Субстраты, ограничивающие рост микробных популяций, получили название лимитирующих.

Было показано, что зависимость скорости роста клеточной культуры от концентрации лимитирующего субстрата можно представить в следующем виде:

$$\frac{dN}{dt} = \frac{\mu_m S}{K_s + S} N, \quad (7.1)$$

где  $N$  - число микробных клеток;  $\mu_m$  - коэффициент пропорциональности, получивший название предельная максимальная удельная скорость роста;  $K_s$  - параметр, характеризующий сродство субстрата к клеткам культуры.

Достаточно часто вводят следующее обозначение:

$$\mu = \frac{\mu_m S}{K_s + S} \quad (7.2)$$

Тогда  $\mu$  является коэффициентом пропорциональности, характеризующим клеточный рост. Его принято называть удельной скоростью роста. Размерность удельной скорости роста - обратное время:  $\text{мин}^{-1}$ ,  $\text{ч}^{-1}$  и т.д. Уравнение напоминает уравнение Михаэлиса-Ментен и получило название уравнения Моно.

На практике отсутствуют клетки с  $\mu_m$  выше  $10^{-2}$  и ниже  $10^{-6} \text{ с}^{-1}$ . Верхний предел скорости роста клеточных популяций связан со скоростью процессов репликации (удвоения) ДНК в S-фазе клеточного цикла. Нижний предел скорости роста, по-видимому, связан с малой жизнеспособностью медленно растущих популяций.

### Экспоненциальная фаза роста клеточных популяций. Определение параметров роста клеточной культуры

В условиях, когда концентрация субстратов и других компонентов, необходимых для роста клеток постоянна, процесс увеличения числа клеток носит автокаталитический характер. Данный процесс описывается следующим дифференциальным уравнением:

$$\frac{dN}{dt} = \mu N, \quad (7.3)$$

где  $N$  - число клеток;  $\mu$  - удельная скорость роста.

Дифференциальное уравнение является уравнением с разделяющимися переменными. Оно легко может быть решено:

$$N = N_0 \exp[\mu t], \quad (7.4)$$

где  $N_0$  - начальное число клеток.

Уравнение описывает экспоненциальную фазу роста клеточных культур. В полулогарифмических координатах данное уравнение может быть представлено следующим образом

$$\ln N = \ln N_0 + \mu t \quad (7.5)$$

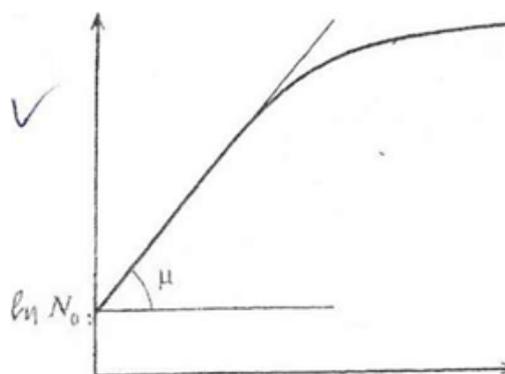


Рисунок 7.2 - Определение кинетических параметров роста клеточной культуры

Таким образом, анализ экспериментальных данных по исследованию кинетики роста клеточных популяций следует начинать в полулогарифмических координатах. Если в этих координатах наблюдается спрямление экспериментальных данных, то они описываются уравнением. Тангенс угла наклона прямой равен удельной скорости роста клеточной культуры, а ордината точки пе-

ресечения графика с осью  $Y$  равна начальному числу клеток в культуре (рисунок 7.2).

Достаточно часто удельная скорость роста клеточной культуры зависит от концентрации лимитирующего субстрата и определяется уравнением:

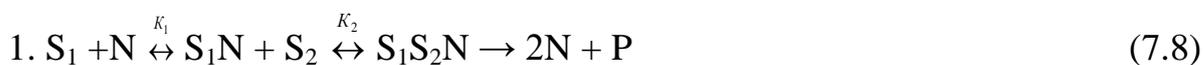
$$\mu = \frac{\mu_m S}{K_s + S} \quad (7.6)$$

В этом случае наиболее удобным представляется анализ экспериментальных данных в двойных обратных координатах, переход к которым описывается уравнением:

$$\frac{1}{\mu} = \frac{1}{\mu_m} + \frac{K_m}{\mu_m S} \quad (7.7)$$

### Многосубстратные процессы

По своей природе любой процесс роста клеточной популяции является многосубстратным. Ниже рассмотрим некоторые закономерности роста клеточных культур в экспоненциальной фазе с учетом многосубстратности роста. Из ферментативного катализа известны две принципиально различные простейшие схемы, приводящие к дискриминируемым зависимостям скорости процесса от концентрации двух субстратов. С учетом автокаталитического процесса микробного роста эти схемы могут быть представлены в следующем виде



Механизм включает две обратимые стадии присоединения субстратов (механизм тройного комплекса):



Данный механизм предполагает наличие хотя бы одной стадии необратимого превращения субстрата. В ферментной кинетике данный механизм принято называть пинг-понг механизмом.

Исходя из ферментативной кинетики удельная скорость роста клеток описывается уравнениями:

для механизма тройного комплекса

$$\mu = \frac{\mu_m}{1 + \frac{K_2}{S_2} + \frac{K_1 K_2}{S_1 S_2}} \quad (7.10)$$

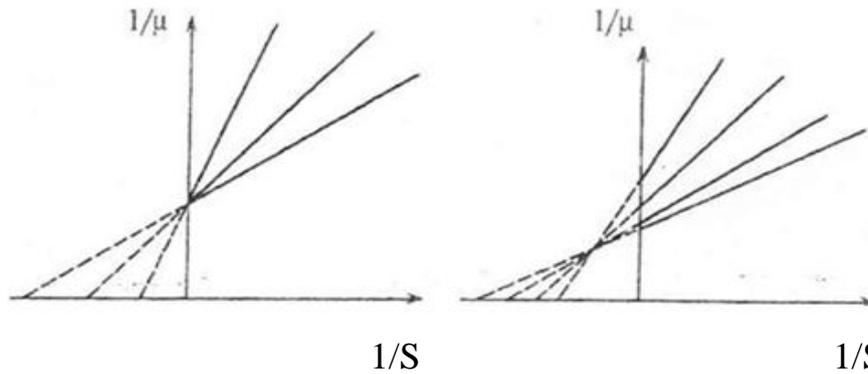


Рисунок 7.3 - Зависимость удельной скорости роста клеток от концентрации субстратов в двойных обратных координатах для механизма тройного комплекса  
для пинг-понг механизма

$$\mu = \frac{\mu_m}{1 + \frac{K_1}{S_1} + \frac{K_2}{S_2}} \quad (7.11)$$

Из уравнений (7.10) и (7.11) видно, что они отличаются друг от друга членом  $S_1 S_2$ . Следовательно, схемы (7.8) и (7.9) могут быть дискриминированы на основании уравнений (7.10) и (7.11). Дискриминацию механизмов (7.8) и (7.9) проводят в двойных обратных координатах (рисунки 7.3, 7.4). При механизме тройного комплекса в этих координатах наблюдается семейство пересекающихся прямых (рисунок 7.3). При пинг-понг-механизме все прямые в двойных обратных координатах не пересекаются (рисунок 7.4).

Заметим, что специфика роста клеточных культур с точки зрения много-субстратности заключается в том, что субстраты акцептируются и конвертируются различными ферментными системами. При этом весьма вероятно наличие хотя бы одной существенно необратимой стадии между точками ввода субстратов в каталитический цикл. Это делает случай с несвязанными формами ферментов (пинг-понг-механизм) более вероятным в кинетике развития клеточной популяции.

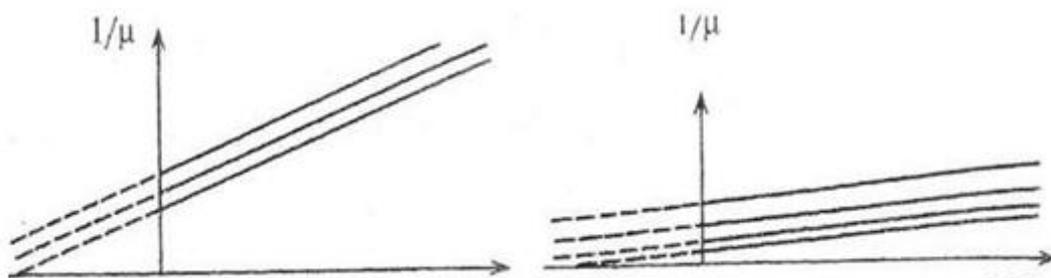


Рисунок 7.4 - Зависимость удельной скорости роста клеток от концентрации субстратов в двойных обратных координатах для пинг-понг-механизма

## Ингибирование и активация клеточного роста

Практически для всех клеточных популяций характерно изменение скорости роста под действием ингибиторов и активаторов.

Классификация ингибиторов и активаторов:

1. По «мишени», на которую действует вещество:

- а) ингибиторы, действующие на ДНК, например, налидиксоновая кислота;
- б) ингибиторы, действующие на РНК, например, актиномицин D;
- в) ингибиторы синтеза белка, например, хлорамфеникол (левомицетин), эритромицин, тетрациклин;
- г) ингибиторы синтеза клеточной стенки, например, пенициллин;
- д) мембраноактивные вещества, например, толуол, хлороформ;
- е) ингибиторы энергетических процессов, например, 2,4-динитрофенол;
- ж) ингибиторы лимитирующего фермента.

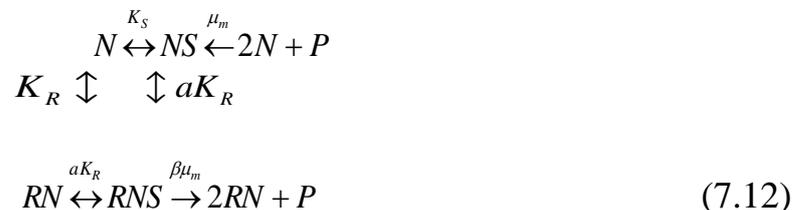
Таких веществ достаточно много. Чувствительность ферментов к их действию зависит от природы функциональных групп активного центра конкретного фермента.

2. По кинетике действия:

- а) необратимые ингибиторы и активаторы;
- б) обратимые ингибиторы и активаторы.

Следует заметить, что для кинетики роста клеток также характерно наличие процессов ингибирования избытком субстрата и продуктом, которые будут проанализированы позднее.

По аналогии с ферментативной кинетикой общую схему действия эффектора  $R$  на процесс роста биомассы с лимитирующим субстратом можно записать следующим образом:



Удельная скорость роста клеточной культуры в этом случае описывается следующим уравнением:

$$\mu = \frac{\mu_m \frac{aK_R + \beta R}{aK_R + R} S}{aK_s \frac{K_R + R}{aK_R + R} S} \tag{7.13}$$

Рассмотрим наиболее важные с точки зрения кинетики клеточного роста случаи ингибирования и активации.

1. Полное конкурентное ингибирование ( $\alpha \rightarrow \infty, \beta = 0$ ). В этом случае удельная скорость роста клеток описывается уравнением:

$$\mu = \frac{\mu_m S}{K_s \left(1 + \frac{R}{K_s}\right) + S} \quad (7.14)$$

В двойных обратных координатах наблюдается пучок прямых, пересекающихся на оси ординат (рисунок 7.5).

2. Полное неконкурентное ингибирование ( $\alpha = 1, \beta = 0$ ). В этом случае удельная скорость роста культуры определяется выражением

$$\mu = \frac{\mu_m S}{K \left(1 + \frac{R}{K_R}\right) + (K_s + S)} \quad (7.15)$$

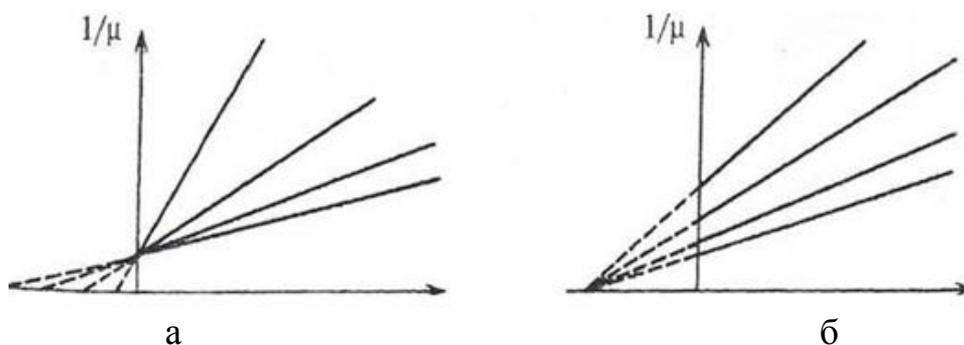


Рисунок 7.5 - Полное конкурентное (а) и неконкурентное (б) ингибирование клеточного роста

При этом в двойных обратных координатах наблюдается пучок прямых, пересекающихся на оси абсцисс.

3. Неконкурентная активация ( $\alpha = 1, \beta > 1$ ). Максимальная скорость роста в этом случае увеличивается:

$$\mu = \frac{\mu_m S \frac{K_R + \beta R}{K_R + R}}{K_s + S} \quad (7.16)$$

В двойных обратных координатах данный случай практически неотличим от случая неконкурентного ингибирования (рисунок 7.5).

4. Смешанные типы ингибирования и активации ( $\alpha \neq 1, \beta \neq 1$ ).

### Влияние рН на кинетику клеточного роста

Одним из важнейших факторов, определяющих кинетику клеточного роста, являются ионы водорода. Многие клеточные культуры растут в достаточно узком диапазоне рН; изменение рН приводит к замедлению их скорости роста

или к полному прекращению роста. Влияние концентрации ионов водорода на скорость роста клеточных культур - достаточно сложное явление. Изменение рН может затрагивать многие стороны функционирования клетки.

Прежде всего концентрация ионов водорода может изменять состояние субстрата, если субстрат содержит ионогенную группу. Например, весьма распространенная группа субстратов - аминокислоты - содержит две ионогенные группы. Поэтому присоединение ионов водорода может существенным образом менять заряд аминокислоты, ее проницаемость через клеточную мембрану. Следовательно, при анализе рН-зависимости роста клеток следует в первую очередь анализировать рН-зависимость лимитирующего субстрата. Другим фактором, определяющим рН-зависимость скорости роста клеток, является чувствительность ферментов к концентрации ионов водорода. Процессы изменения активности ферментов при изменении рН были проанализированы ранее.

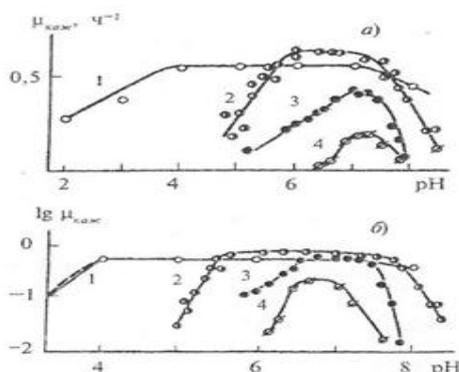


Рисунок 7.6 -Зависимость удельной скорости роста клеточных культур от рН (а), те же данные в логарифмических координатах (б)

На рисунке 7.6 приведены типичные рН-зависимости роста культуры клеток. Это - сложные, колоколообразные кривые. Характерной особенностью живых клеток является различие концентраций ионов водорода вне клетки и в клетке.

Простейшую модель, описывающую этот факт, можно представить следующим образом. Пусть мембрана микробной клетки частично проницаема для ионов водорода. Тогда кинетика переноса ионов водорода через мембрану может быть представлена следующим образом:

$$\frac{dH_{внутр}^+}{dt} = \alpha H_{внеш}^+ - \beta H_{внутр}^+,$$

где  $H_{внутр}^+$  и  $H_{внеш}^+$  - концентрация ионов водорода в клетки ивне нее;  $\alpha$  и  $\beta$  - коэффициенты пропорциональности.

В условиях равновесия

$$H_{\text{внеш}}^+ = \frac{\alpha}{\beta} H_{\text{внутр}}^+$$

Если  $\frac{\alpha}{\beta} > 1$ , то в клетке поддерживается более кислая среда, чем вне ее, иначе - в клетке среда более щелочная.

### Вопросы для самоконтроля

1. Как определяются кинетические параметры роста клеточной популяции?
2. Как определить параметры роста клеточной культуры методом двойных обратных координат.
3. Почему кинетика роста клеток может зависеть от концентрации нескольких субстратов?
4. Какие виды влияния двухсубстратов на кинетику роста клеток вы знаете? Как их дискриминировать?
5. Какие виды ингибиторов и активаторов вы знаете? Как их дискриминировать?
6. Перечислите факторы, определяющие рН-зависимость скорости клеточного роста.
7. Напишите уравнение простейшей модели, объясняющей различия концентрации ионов водорода в клетке и окружающей среде.

#### 7.1 Интегральная форма уравнения роста клеточной популяции

Поведение клеточной популяции во всем диапазоне времени развития клеточной культуры изменяется и на определенном этапе наблюдается ограничение роста. Помимо процесса размножения организмов, описываемого уравнением (7.3) происходит их гибель [2, 13]. Процесс гибели можно описать выражением  $\frac{dN}{dt} = \mu' N^2$ .

Замедление скорости роста клеточной культуры при большой плотности популяции является закономерным процессом. При этом рост популяции можно описать дифференциальным уравнением в виде:

$$\frac{dN}{dt} = \mu N - \mu' \frac{N^2}{N_m} \quad (7.17)$$

Уравнения (7.17) принято называть логическими. Интегрирование логистического уравнения с начальными условиями ( $t = 0, N = N_0$ ) приводит к следующему соотношению:

$$\ln\left(\frac{N}{N_o}\right)(N_m - N_o) \div \left(\frac{N_m}{N_o} - \frac{N}{N_o}\right) = \mu t$$

Из данного уравнения следует

$$\ln\left[\frac{N}{(N_m - N)}\right] = \mu t + C, \quad (7.18)$$

где  $C = \ln \frac{N_o}{N_m}$

Таким образом, критерием соответствия экспериментальных данных логистическому уравнению является спрямление экспериментальных данных в координатах уравнения (7.18)  $\left(\ln\left[\frac{N}{N_m - N}\right], t\right)$  фигурные скобки.

В ряде случаев логистические уравнения хорошо описывают наблюдаемую кинетику роста клеточных популяций. Однако следует отметить, что логистическое уравнение лишь с формальной точки зрения описывает поведение культуры клеток, не раскрывая молекулярно-биологических закономерностей их роста.

### **Интегральная форма уравнения роста клеточной культуры в условиях лимитирования по субстрату**

В том случае, если процесс лимитирования субстратом является единственным фактором, ограничивающим рост клеточной популяции, то его легко можно учесть. Так как субстрат  $S$  является лимитирующим для процесса роста биомассы и расходуется в процессе роста культуры клеток, то между концентрацией данного субстрата и количеством клеток существует линейная связь

$$Y_s \frac{dS}{dt} = \mu N, \quad (7.19)$$

где  $Y_s$  - коэффициент пропорциональности, называемой экономическим коэффициентом.

Предполагается, что экономический коэффициент постоянен во всем временном интервале развития клеточной культуры.

Тогда

$$Y_s dS = -dN ;$$

$$Y_s (S_o - S) = N - N_o$$

или

$$S = S_o - \frac{(N - N_o)}{Y_s} \quad (7.20)$$

Уравнения (7.19) и (7.20) справедливы для любых механизмов роста культуры клеток, если отсутствуют такие факторы, как ингибирование субстратом или продуктом, и ряд других.

Подстановка уравнения (7.19) в (7.20) с учетом соотношения (7.2)

$$\mu = \frac{\mu_m S}{K_s + S}$$

Приводит к следующему выражению

$$\frac{dN}{dt} = \frac{\mu_m N}{1 + \frac{K_s}{S_o - \frac{N - N_o}{Y_s}}}$$

Это дифференциальное уравнение первого порядка с разделяющимися переменными. Следовательно, его решение можно получить аналитическим интегрированием

$$\left[ 1 + \left( \frac{Y_s K_s}{Y_s S_o + N_o} \right) \ln \frac{N}{N_o} - \frac{Y_s K_s}{Y_o S_o + N_o} \ln \frac{Y_s S_o - N_o - N}{Y_s S_o} = \mu_m t \right] \quad (7.21)$$

Уравнение (7.21) принято называть интегральным уравнением Моно. Данное уравнение может быть переписано в более простом виде со следующими подстановками:

$$Q = \frac{Y_s K_s}{Y_s S_o + N_o} \quad - \text{ постоянная;}$$

$$a = \frac{N_o}{Y_s S_o} \quad - \text{ постоянная;}$$

$$n = \frac{N}{N_o} \quad - \text{ безразмерная переменная.}$$

Тогда

$$\ln n - \frac{Q}{1+Q} \ln(1+a-an) = \frac{\mu_m}{1+Q} t \quad (7.22)$$

Принципиально важны два следующих случая функционирования системы:

1. Условия малого накопления биомассы и небольшого расхода субстрат ( $an \ll 1$ ,  $n \ll \frac{1}{a}$ ). Тогда при  $N_o \ll Y_s S_o$  ( $a \ll 1$ )

$$\ln n = \frac{\mu_m S_o}{K_s + S_o} t$$

что соответствует экспоненциальной фазе роста культуры клеток.

2. Режим, близкий к истощению субстрата ( $an \rightarrow 1$ ).

Тогда

$$\frac{K_s}{K_s + S_o} \ln(1 - an) = -\frac{\mu_m S_o}{K_s + S_o} t,$$

$$1 - an = \exp\left[-\frac{\mu_m S_o}{K_s} t\right]$$

При бесконечно большом времени протекания процесса размножения клеток существует предел их роста, определяемый соотношением

$$N = Y_s S_o$$

Таким образом, концентрация лимитирующего субстрата ограничивает не только скорость размножения, но и численность клеточной популяции.

Итак, уравнение (7.21) описывает наиболее характерные особенности развития клеточной популяции. Форма кинетической кривой зависит от соотношения концентрации субстрата и константы Михаэлиса, т.е. от порядка «лимитирующей» ферментативной реакции по субстрату.

1. Если «лимитирующая» ферментативная реакция имеет первый порядок ( $S_o \ll K_s$ ), то уравнение (7.22) переписывается следующим образом:

$$\ln n - \ln(1 - an) = \frac{\mu_m S_o}{K_s} t$$

Пунктиром обозначены проекции кинетических кривых, полученные методом двойного зеркального отражения.

Показано, что данное уравнение является логистическим.

Спрямяющие координаты для данного уравнения определяется соотношением:

$$\ln \frac{N}{N_m - N} = \frac{\mu_m S_o}{K_s} t + C$$

2. Если «лимитирующая» ферментативная реакция имеет нулевой порядок по субстрату, то уравнение (7.22) переписывается следующим образом:

$$\ln n - \frac{K_s}{S_o} \ln(1 + an) = \mu_m t$$

Данная кривая не является логистической.

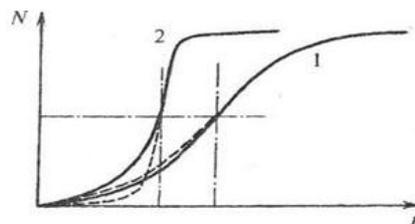


Рисунок 7.7 - Сравнение кинетических кривых роста клеточных популяций в режиме первого (1) и нулевого (2) порядков «лимитирующих» ферментных реакций

Сравнение кривых роста клеточных популяций для лимитирующих ферментативных реакций различных порядков приведено на (рисунке 7.7). Как следует из рисунка, логистическая кривая роста, соответствующая случаю ферментативной реакции первого порядка, является симметричной относительно точки своего перегиба. Для определения симметричности кривых на рисунке использован метод двойного зеркального отражения кинетических кривых относительно точек перегиба.

### Приближенный анализ интегральной кривой роста клеточной популяции

Интегральное уравнение роста популяции клеток при  $N_o \ll N_m$  можно переписать следующим образом

$$\ln \frac{N}{N_o} - \Phi \ln \left(1 - \frac{N}{N_m}\right) = \mu t, \quad (7.23)$$

где  $\Phi = \frac{K_s}{K_s + S_o}$

Второй логарифмический член уравнения (7.23) может быть представлен в виде разложения в ряд Тейлора; при этом приближенное описание кинетики роста клеток будет тем полнее, чем меньше степень конверсии субстрата:

$$\frac{S_o - S}{S_o} = \frac{N}{N_m} = \varepsilon$$

$$\ln(1 - \varepsilon) = \varepsilon - \frac{\varepsilon^2}{2} - \frac{\varepsilon^3}{3} - \dots - \frac{\varepsilon^n}{n}$$

В простейшем случае можно ограничиться только одним членом разложения

$$\ln \frac{N}{N_o} + \Phi \varepsilon = \mu t \quad (7.24)$$

Линеаризация всей кинетической кривой в координатах интегрального уравнения роста с истощением субстрата. Уравнение (7.21) можно преобразовать к следующему виду:

$$\frac{\ln \left( \frac{M}{N_o} \right)}{\ln \left( 1 - \frac{M}{M_m} \right)} = \Phi \frac{\mu_m S_o}{S_o + K_s} + \frac{K_s}{S_o + K_s} \left[ \frac{\ln \left( 1 - \frac{M}{M_m} \right)}{t} \right] \quad (7.25)$$

Таким образом, определив экспериментальные значения  $N_o$  и  $M_m$ , можно вычислить функции  $\left[ \ln \left( \frac{M}{M_o} \right) \right]_{\div t}$  и  $\left[ \ln \left( 1 - \frac{M}{M_o} \right) \right]_{\div t}$  и построить зависимость одной экспериментальной величины от другой.

Если экспериментальные данные соответствуют интегральной кривой роста клеточной популяции, то эта зависимость должна иметь линейный характер, при этом можно определить два параметра прямой:

$$\mu = \frac{\mu_m S_o}{K_s + S_o}; \quad \Phi = \frac{K_s}{S_o + K_s}$$

Важно обратить внимание на следующее обстоятельство. Наибольшей статистической ошибке в координатах уравнения (7.25) подвержены точки, лежащие вблизи  $M \rightarrow 0$  и  $M \rightarrow M_m$ . Поэтому при обработке экспериментальных данных в координатах уравнения (7.25) эти точки не учитываются.

Для анализа экспериментальных данных можно воспользоваться и другими линейными анаморфозами уравнения (7.21), например

$$\frac{\ln\left(\frac{M}{N_o}\right)}{\ln\left(1 - \frac{M}{M_m}\right)} = \Phi + \mu \frac{t}{\ln\left(1 - \frac{M}{M_m}\right)} \quad (7.25)$$

Значения  $\mu$  достаточно надежно можно определить по тангенсу угла наклона, а  $\Phi$ , равное точке пересечения графика с осью ординат, определяется с большой ошибкой.

Можно воспользоваться также уравнением

$$\frac{\ln\left(1 - \frac{M}{M_m}\right)}{\ln\left(\frac{M}{N_o}\right)} = \frac{1}{\Phi} - \frac{\mu}{\Phi} \frac{t}{\ln\left(\frac{M}{N_o}\right)} \quad (7.26)$$

В этих координатах параметр  $\Phi$  определяется с заметной ошибкой, а параметр  $\mu$  - практически без ошибок.

Следует отметить, что все рассмотренные методы преобразования координат приводят к согласующимся значениям  $\mu$  и  $\Phi$ .

### Вопросы для самоконтроля

1. Перечислите основные факторы, приводящие к замедлению скорости роста клеточной культуры.
2. Напишите логистическое уравнение.
3. Выведите интегральное уравнение Моно.
4. Сравните закономерности роста клеточных культур в условиях различий порядков ферментативных реакций по лимитирующему субстрату.
5. Как приближенно можно анализировать кинетическую кривую роста клеточной популяции? От каких факторов зависит точность приближения?
6. В каких координатах можно линеаризовать уравнение Моно?

7. Опишите процедуру получения параметров роста клеточной культуры разностным методом.

## 7.2 Ингибирование роста клеточных популяций продуктами ферментации

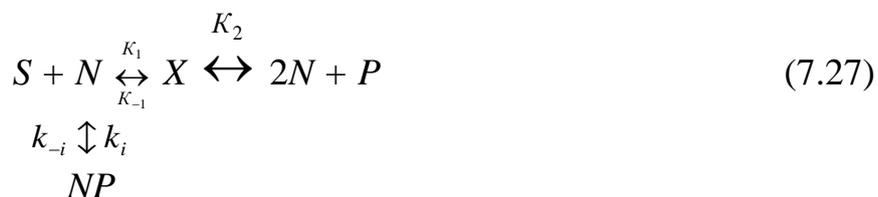
Один из наиболее часто встречающихся эффектов, приводящих к отклонению кинетики роста клеточных популяций от экспоненциальной кривой, связан с ингибированием их роста продуктами жизнедеятельности (ферментации). Накопление какого-либо продукта превращения субстрата или их совокупности способно приводить к заметному уменьшению скорости роста клеточной популяции, переходу экспоненциальной фазы роста в стадию стационарного роста и даже к полной остановке процесса [2,5].

В качестве иллюстрации можно указать, что наиболее типичным случаем ингибирования роста клеток продуктами жизнедеятельности является случай накопления в культуре органических кислот, приводящих к снижению значений pH среды культивирования. Как известно, скорость ферментативных процессов, следовательно, и скорость роста клеточных популяций чрезвычайно pH-чувствительны (см. предыдущий параграф). Если протоны, взаимодействуя с функционально значимыми компонентами клетки, блокируют клеточный рост, это означает, что они выступают в качестве ингибиторов роста.

Другим характерным примером могут быть процессы, протекающие с накоплением органических продуктов, в частности спиртов. Как правило, спиртовое брожение останавливается при накоплении определенной концентрации спиртового продукта.

### Простейшая кинетическая схема ингибирования роста клеточных популяций продуктами их жизнедеятельности

Если продукт реакции  $P$  образуется на второй стадии, а процесс ингибирования заключается в обратимом взаимодействии продукта с кинетической формой  $N$ , то схему данного процесса можно представить в виде



Качественно ингибирование заключается в том, что образуется потерявший способность к делению комплекс продукта и кинетической формы  $NP$ . При развитии процесса все большая и большая доля клеток должна уводиться из реакционно-способного состояния, что должно тормозить рост культуры.

В режиме постоянства концентрации субстрата схема (7.27) описывается следующими дифференциальными уравнениями:

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dN}{dt} = 2k_2X - k_1S_oN - k_iPN + k_{-i}(NP) \\ \frac{dX}{dt} = k_1S_oN - k_2X ; \quad \frac{1}{k_2} \frac{dX}{dt} + X = \frac{k_1S_oN}{k_2} \\ \frac{d(NP)}{dt} = k_iPN - k_{-i}(NP) \\ \frac{dM}{dt} = \frac{dN}{dt} + \frac{dX}{dt} + \frac{d(NP)}{dt} = k_2X \end{array} \right. \quad (7.28)$$

$$\quad \quad \quad (7.29)$$

Если продукт  $P$  выступает в качестве быстрого обратимого ингибитора, то процесс образования комплекса активного центра фермента с продуктом может быть охарактеризован константой равновесия

$$K_i = \frac{k_{-i}}{k_i} = \frac{PN}{(NP)}$$

В этом режиме накопление продукта описывается уравнением

$$\frac{1}{Y_p} \frac{dP}{dt} = k_2X , \quad (7.30)$$

где  $Y_p$  - стехиометрический коэффициент, характеризующий количество продукта на единицу биомассы.

Из этих уравнений следует важное соотношение

$$Y_p dP = dM \quad (7.31)$$

Это означает, что продукт реакции и биомасса связаны линейной связью

$$Y_p(P - P_o) = M - N_o \quad (7.32)$$

Для дальнейшего анализа воспользуемся условиями малости параметра при производной в уравнении (7.28). Если значение константы скорости  $k_2$  достаточно велико, то членом  $\frac{1}{k_2} \cdot \frac{dX}{dt}$  можно пренебречь по сравнению с  $X$ .

Тогда

$$N = \frac{k_2X}{k_1S_o}$$

Следовательно

$$M = X \left( 1 + \frac{k_2}{k_1S_o} + \frac{k_2P}{k_1S_oK_i} \right) \quad (7.33)$$

Если учесть, что биомасса и количество продукта связаны линейно уравнением (7.32), то

$$X = \frac{M}{1 + \frac{k_2}{k_1 S_o} \left( 1 + \frac{M}{Y_p K_i} \right)} \quad (7.34)$$

Подставляя выражение (7.32) в (7.29), получим следующее дифференциальное уравнение:

$$\frac{dM}{dt} = \frac{k_2 M}{1 + \frac{k_2}{k_1 S_o} \left( 1 + \frac{M}{Y_p K_i} \right)}$$

Это уравнение может быть записано в виде:

$$\frac{dM}{dt} = \mu_p M, \quad \mu_p = \frac{\mu_m S_o}{K_s \left( 1 + \frac{P}{K_i} \right) + S_o}$$

где  $\mu_m = k_2$ ,  $K_s = \frac{k_2}{k_1}$ ,  $P = \frac{M}{Y_p}$  (7.35)

Данное уравнение является дифференциальным с разделяющимися переменными.

Оно легко может быть проинтегрировано

$$\ln \frac{M}{N_o} + \frac{1}{Y_p K_i} \frac{k_2}{k_2 + k_1 S_o} (M - N_o) = \frac{k_2 k_1 S_o}{k_2 + k_1 S_o} t \quad (7.36)$$

Если процесс протекает достаточно глубоко, то в уравнении (7.36) можно пренебречь  $N_o$  по сравнению с  $M$ . Тогда данное уравнение переписется следующим образом:

$$\ln \frac{M}{N_o} + \frac{1}{Y_p K_i} \frac{k_2}{k_2 + k_1 S_o} M = \frac{k_2 k_1 S_o}{k_2 + k_1 S_o} t \quad (7.37)$$

Следует обратить внимание на то, что множитель, стоящий перед  $t$  в правой части этого уравнения, представляет собой удельную скорость роста клеточной популяции.

Тогда

$$\ln \frac{M}{N_o} + \frac{1}{Y_p K_i} \frac{k_2}{k_2 + k_1 S_o} M = \mu t$$

$$\mu = \frac{k_2 k_1 S_o}{k_2 + k_1 S_o} \quad (7.38)$$

Система может функционировать в двух принципиально разных режимах:

1.  $\ln \frac{M}{N_o} \gg \frac{\mu M}{Y_p K_i k_1 S_o}$  (7.39)

В этом случае  $M(t) = \exp(\mu t)$ , и процесс ингибирования продуктами жизнедеятельности клеточной культуры не сказывается на процессе ее роста. Эффекты ингибирования пренебрежимо малы.

$$2. \ln \frac{M}{N_o} \ll \frac{\mu M}{Y_p K_i k_1 S_o} \quad (7.40)$$

Тогда  $M(t) = k_1 S_o Y_p K_i t$ .

Для выявления необходимых соотношений между параметрами, регулирующими направление неравенств (7.39) и (7.40), запишем (7.41) в следующем виде:

$$\frac{M}{N_o} \gg \exp \left[ \frac{\mu M}{Y_p K_i k_1 S_o} \right] \quad (7.41)$$

Поскольку сравнивать эти функции достаточно сложно, сравним их производные в точке  $M = 0$ , т. к. неравенство производных в этой точке приводит к неравенству функций при произвольном значении  $M$ . Дифференцирование (7.41) и подстановка  $M = 0$  приводят к соотношению

$$\frac{\mu N_o}{Y_p K_i k_1 S_o} \ll 1 \quad (7.42)$$

Уравнение (7.42) может быть переписано как

$$\frac{k_2 N_o}{Y_p K_i (k_2 + k_1 S_o)} \ll 1 \quad (7.43)$$

или

$$\frac{N_o}{Y_p K_i \left( 1 + \frac{S_o}{K_s} \right)} \ll 1 \quad (7.44)$$

Из этих неравенств следует, что экспоненциальный или линейный рост клеток определяется многими параметрами: начальным числом клеток, концентрацией субстрата, сродством клеточной культуры к субстрату. Но наибольшее значение имеет константа ингибирования. Можно утверждать, что чем меньше  $K_i$ , тем больше значение коэффициента перед линейным членом уравнения (7.44) и тем более сильно проявляются эффекты ингибирования продуктом.

Введем безразмерную переменную  $\frac{M}{N_o}$ . Тогда уравнение (7.44) переписывается следующим образом:

$$\ln \frac{M}{N_o} + \varphi \left( \frac{M}{N_o} - 1 \right) = \mu t, \quad \varphi = \frac{N_o \mu}{K_i k_1 Y_p} \quad (7.45)$$

Это уравнение может быть представлено рядом линейных модификаций:

$$\frac{1}{t} \ln \frac{M}{N_o} = \mu - \varphi \frac{\frac{M}{N_o} - 1}{t} \quad (7.46)$$

$$\mu \frac{t}{\ln \frac{M}{N_o} - 1} = 1 + \varphi \frac{\frac{M}{N_o} - 1}{\ln \frac{M}{N_o}} \quad (7.47)$$

$$\frac{\ln \frac{M}{N_o}}{\frac{M}{N_o} - 1} = \mu \frac{t}{\frac{M}{N_o} - 1} - \varphi \quad (7.48)$$

Если наблюдается процесс ингибирования продуктом, то экспериментальные данные должны спрямляться в координатах уравнений (7.46) - (7.48).

Величина  $\varphi$  является безразмерным параметром, характеризующим эффекты ингибирования продуктом. Если  $\varphi \approx 0$ , то процесс ингибирования отсутствует.

### 7.3 Определение механизма ингибирования из вида кинетической кривой роста клеточной популяции

Как правило, кинетические исследования клеточного роста заключаются в изучении кривых роста клеточных популяций. При этом важно получить максимальную информацию из такого рода кривых. Проведенный анализ позволяет исходя из вида изменений кинетической кривой роста ответить на вопрос, имеет ли место неосложненный рост культуры или развитие клеток сопряжено с процессами ингибирования продуктами или субстратами [2, 5].

Сравнение кинетических уравнений для процессов без ингибирования с уравнением для процессов с ингибированием показывает, что в рамках приближенного рассмотрения при глубинах процесса, не превышающих 0,5-0,6, кинетика роста популяции может быть формально описана одними и теми же уравнениями:

$$\ln \frac{M}{N_o} + \Phi \frac{M - N_o}{M_m} = \mu t \quad (7.49)$$

$$\ln \frac{M}{N_o} + \varphi \frac{M - N_o}{N_o} = \mu t, \quad (7.50)$$

где  $\Phi$  и  $\varphi$  - параметры, отражающие механизм процесса.

Различие между данными параметрами заключается в использовании нормировочного множителя для перевода переменной  $(M - N_o)$  к безразмерному виду. Если экспериментальные данные получены в условиях, когда лучше определяется максимальная плотность культуры, то использование формулы (7.46) является более правильным. Если более точно определяется начальное число клеток, то предпочтительнее формула (7.47).

Неосложненный рост, процессы ингибирования продуктом или субстратом могут быть разграничены, как только найдены  $\Phi$  или  $\phi$ . Уже на основании значения  $\Phi$  можно определить условия роста популяции:

1.  $0 < \Phi < 1$  - неосложненный рост (нет процесса ингибирования клеточного роста продуктами жизнедеятельности).
2.  $\Phi > 1$  - процесс ингибирования продуктами жизнедеятельности клеток.
3.  $\Phi < 0$  - процесс ингибирования субстратом.

Таким образом, при сильном проявлении осложняющих эффектов механизм роста клеточной культуры может быть идентифицирован весьма точно.

Для определения значения  $\Phi$  или  $\phi$  необходимо воспользоваться одной из линейных анаморфоз (7.46) - (7.48). Важно отметить еще раз, что значение  $\Phi$  или  $\phi$  определяется из всех экспериментальных данных для всех условий развития процесса по одному и тому же уравнению, например из зависимости

$$\frac{1}{t} \ln \frac{M}{N_o} = \mu - \Phi \frac{\frac{M}{N_o} - 1}{t} \quad (7.51)$$

Возможно также использование разностного уравнения:

$$\frac{\ln \frac{M_i}{M_j}}{t_i - t_j} = \mu - \Phi \frac{M_i - M_j}{t_i - t_j} \frac{1}{M_m} \quad (7.52)$$

Возможен и более глубокий анализ экспериментальных данных. Например, теоретически можно отличить конкурентное ингибирование от неконкурентного и определить параметры ингибирования. При этом следует иметь в виду, что с усложнением методов анализа экспериментальных данных должна возрастать точность их получения.

Однако обычно в кинетических экспериментах по изучению закономерностей клеточного роста точность экспериментальных данных недостаточна для их углубленного анализа. Тем не менее интересно рассмотреть принципиальные возможности метода.

Чтобы выявить тип ингибирования продуктом реакции, необходимо изучение закономерностей развития клеточных популяций в широком диапазоне концентраций субстрата при нескольких его концентрациях. При этом для определения механизма ингибирования предлагается следующая процедура. Из анализа кинетической кривой определяют параметры  $\mu$  и  $\Phi$ . На их основе вычисляются параметры  $\mu_m$  и  $K_s$ . Для каждой концентрации субстрата вычисляется функция  $\frac{K_s}{K_s + S_o}$ , тогда можно записать

1.  $\Phi \frac{K_s + S_o}{K_s} = 1$  - неосложненный рост;

$$2. \Phi \frac{K_s + S_o}{K_s} = 1 + \frac{Y_s S_o}{Y_p K_i} \text{ - конкурентное ингибирование;}$$

$$3. \Phi \frac{K_s + S_o}{K_s} = 1 + \frac{Y_s S_o}{Y_p K_i} \left( 1 + \frac{S_o}{K_s} \right) \text{ - неконкурентное ингибирование.}$$

Видно, что указанные механизмы могут быть дискриминированы исходя из вида правых частей приведенных уравнений. Если наблюдается линейная зависимость левой части уравнения от правой с тангенсом угла наклона равным единице, то имеет место неосложненный рост. Если наблюдается линейная зависимость с тангенсом угла наклона, превышающим единицу, то имеет место процесс конкурентного ингибирования продуктом. Если наблюдается квадратичная зависимость, то имеет место неконкурентное ингибирование.

Таким образом, кинетический анализ позволяет интерпретировать достаточно сложные кривые роста клеточных популяций и определять количественные характеристики процесса. Появляется общий подход к анализу клеточных популяций. Важно подчеркнуть, что наличие ингибирования и его механизм можно определить по одной единственной кинетической кривой роста популяции. Для этого необходимо определить параметр  $\Phi$ , используя экспериментальные данные, полученные конверсии субстрата до 50 - 60%. Данный параметр может быть найден исходя из уравнений (7.51) или (7.52). Вычислив его и используя данные таблицы, можно определить механизм протекания процесса.

Идентификация процесса дает исследователю или практику мощный механизм управления ростом клеточной популяции. Если развитие процесса протекает в условиях неусложненного роста, то интенсифицировать процесс роста клеток можно путем увеличения концентрации субстрата. Если присутствует процесс ингибирования избытком субстрата, то можно подобрать условия, оптимальные для протекания процесса роста клеточной популяции с максимальной скоростью. Если обнаружено ингибирование продуктами ферментации, то скорость роста клеток можно повысить, выводя продукты их жизнедеятельности из инкубационной среды.

### Вопросы для самоконтроля

1. Опишите простейшие кинетические схемы ингибирования роста популяции избытком субстрата и продукта.

2. Как механизм ингибирования избытком субстрата объясняет феномен роста ряда популяций в узком диапазоне концентраций субстрата? Приведите кинетические уравнения роста популяции в условиях ингибирования их роста избытком субстрата.

3. Запишите уравнения роста клеточной культуры при глубине конверсии субстрата до 0,5-0,6 для неосложненного роста, для случая ингибирования избытком субстрата, ингибирования продуктами жизнедеятельности клеток.

4. Приведите основные уравнения разностного метода.

5. Перечислите основные методы анализа кинетических кривых роста клеточных популяций в условиях осложнения процесса клеточного роста ингибированием избытком субстрата или продуктами ферментации. Как определяются кинетические параметры в этих случаях?

### Периоды индукции на кинетических кривых роста

Часто наблюдаемые периоды индукции (лаг-фаза) на кинетических кривых роста клеточных популяций могут иметь различную природу. Можно представить по крайней мере три механизма, которые приводят к появлению на кинетической кривой роста популяции периода, в течение которого не происходит увеличения числа клеток или заметного образования продуктов реакции. Следует подчеркнуть, что период индукции трудно обнаружить из зависимости числа клеток или количества продуктов от времени при прямом наблюдении за этими параметрами, поскольку логарифмический рост культуры приводит к появлению кажущейся лаг-фазы. Период индукции  $t$  определяется при анализе экспоненциальной фазы роста в полулогарифмических координатах из зависимости  $\ln \frac{N}{N_0}$  от  $t$  как отрезок, отсекаемый на оси абсцисс при  $\ln \frac{N}{N_0} = 0$ .

Период индукции может отражать следующие процессы.

1. Неспецифическую, неферментативную трансформацию исходного субстрата в продукт, приемлемый для дальнейшего метаболизма клеточной популяции:



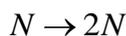
Вещество  $S$  не используется клеткой в силу его химической природы или физического состояния. Процесс перехода вещества  $S$  в субстрат  $S$  характеризуется константой скорости  $k_0$  и может представлять собой химическое превращение вещества или его физическую трансформацию (например, переход из одной фазы в другую).

2. Адаптационные процессы в клетке, в первую очередь синтез необходимого фермента или ферментной системы:

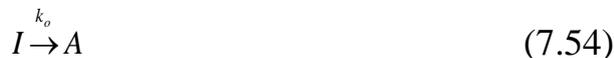


Состояние клеток  $\bar{N}$  характеризуется отсутствием необходимой ферментной системы и неспособностью клетки усваивать тот или иной субстрат и вступать в процесс деления (автоумножения биокаталитической системы).

Образовавшаяся в результате адаптационного процесса клетка в состоянии  $N$  способна к автокаталитическому росту:



3. Присутствие в культурной среде ингибитора роста, блокирующего развитие популяции. С течением времени концентрация ингибитора  $I$  может падать в результате его расхода или вывода из системы:



В качестве типичного примера данного механизма, вызывающего период индукции, можно привести влияние кислорода на рост анаэробных организмов. В присутствии заметных количеств кислорода рост популяции блокирован, однако за счет процессов восстановления кислорода или вытеснения его в газовую фазу система «избавляется» от сильного ингибитора, и начинается рост клеточной популяции.

Три обсуждаемых механизма, приводящих к возникновению периода индукции, могут быть идентифицированы путем кинетического эксперимента и последующего анализа экспериментальных данных.

Трансформация пресубстрата в субстрат.

В случае, если накопление субстрата в системе идет в соответствии со схемой (7.52)



кинетику его роста описывает уравнение

$$\frac{dS}{dt} = k_o \bar{S}$$

решение которого записывается следующим образом:

$$S = S_o [1 - \exp(-k_o t)],$$

где  $S_o$  - начальная введенная в систему концентрация вещества  $\bar{S}$ .

Можно показать, что

$$\ln \frac{N}{N_o} = \frac{\mu_m t}{a} + \frac{\mu_m}{k_o} \frac{1-a}{a} \ln \frac{a}{1-a} \quad (7.55)$$

где  $a = 1 + \frac{K_s}{S_o}$

Как следует из уравнения (7.55), в координатах  $\ln \frac{N}{N_o}$ ,  $t$ - тангенс угла наклона, который представляет собой удельную скорость роста клеток,  $\frac{\mu_m}{a} = \mu$ . В точке  $\ln \frac{N}{N_o} = 0$ , где  $t = \tau$ , имеем

$$\frac{\mu_m}{a} \tau = -\frac{\mu_m}{k_o} \frac{1-a}{a} \ln \frac{a}{1-a}$$

Таким образом, на кинетической кривой роста культуры в случае наличия процесса кинетической стадии трансформации исходного вещества в приемлемый метаболит должен наблюдаться период индукции.

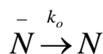
Протяженность периода индукции связана с начальной концентрацией пресубстрата соотношением

$$\tau_s = \frac{K_s}{S_o k_o} \left( 1 + \frac{S_o}{K_s} \right)$$

Из данного уравнения следует важная особенность кинетики процесса, включающего стадию трансформации пресубстрата: высокие концентрации пресубстрата могут полностью элиминировать период индукции.

### Адаптационный процесс

Если период индукции связан с каталитической адаптацией организма к новым условиям



то популяция введенных в систему клеток будет состоять из двух видов:

$$M = \bar{N} + N,$$

где клетки типа  $\bar{N}$  не адаптированы к новым условиям (не произошел синтез необходимых ферментов); клетки типа  $N$  - адаптированные клетки, способные к активному процессу деления.

Полная кинетическая схема для обсуждаемого случая имеет следующий вид:



где  $k_o$  - константа скорости адаптационного процесса.

Систему уравнений, описывающих кинетику роста, можно представить в следующем виде:

$$-\frac{d\bar{N}}{dt} = k_o \bar{N}, \quad \frac{dN}{dt} = k_o \bar{N} + \mu N$$

Чтобы определить в системе рост общего числа клеток, необходимо рассчитать динамику изменения количества (концентраций) клеток типа  $\bar{N}$  и  $N$  и выяснить динамику изменения общего числа клеток. Можно показать, что

$$\bar{N} = N_o \exp(-k_o t),$$

где  $N_o$  - начальная концентрация клеток.

Тогда

$$\frac{dN}{dt} - \mu N = k_o N_o \exp(-k_o t)$$

Можно показать, что

$$M = \frac{k_o N_o}{k_o + \mu} \exp(\mu t) + \frac{N_o \mu}{k_o + \mu} \exp(-k_o t) \quad (7.57)$$

Из уравнения (7.57) видно, что при  $t = 0$ ,  $M = N_o$ , при больших  $t$  данное уравнение трансформируется в обычное уравнение экспоненциального роста. Преобразуем уравнение (7.57) в форму, удобную для анализа в полулогарифмических координатах:

$$\ln \frac{M}{N_o} = \mu t + \ln \left\{ \frac{k_o}{k_o + \mu} \left[ 1 + \frac{\mu}{k_o} \exp[-(k_o + \mu)t] \right] \right\}$$

Следовательно, при больших временах протекания процесса данная зависимость вырождается в линейную функцию:

$$\ln \frac{M}{N_o} = \mu t + \ln \frac{k_o}{k_o + \mu}$$

Тангенс угла наклона полученной зависимости равен удельной скорости роста клеток; отрезок, отсекаемый прямой на оси времени (период индукции), имеет вид

$$\tau_a = \frac{1}{\mu_m} \ln \left( 1 + \frac{\mu_m}{k_o} \right)$$

Таким образом, в случае адаптационного процесса период индукции не зависит от концентрации субстрата и определяется свойствами клеточной культуры.

### Расходуемый ингибитор роста

Рассмотрим кинетику процесса в условиях присутствия сильного ингибитора, расходуемого в независимом от роста культуры процессе. Предполагается, что ингибитор, равновесно взаимодействуя с ключевой ферментной системой, предотвращает рост культуры:



При этом комплексе  $NI$  не активен в автокаталитическом процессе роста. Концентрация ингибитора в системе в соответствии со схемой (7.58) может быть описана дифференциальным уравнением

$$\frac{dI}{dt} = -k_o I$$

и как функция времени будет иметь вид

$$I = I_o \exp(-k_o t),$$

где  $I_o$  - концентрация ингибитора в начальный момент времени.

Дифференциальное уравнение для скорости роста культуры в условиях, при которых часть клеток будет находиться в неактивном комплексе  $NI$ , можно записать в форме

$$\frac{dN}{dt} = \mu(N - NI)$$

Концентрация клеток в инактивированном состоянии будет задана функцией

$$NI = N \frac{I_0}{K_i} \exp(-k_o t)$$

Тогда

$$\frac{dN}{dt} = \mu N \left( 1 - \frac{I_0}{K_i} \exp(-k_o t) \right) \quad (7.59)$$

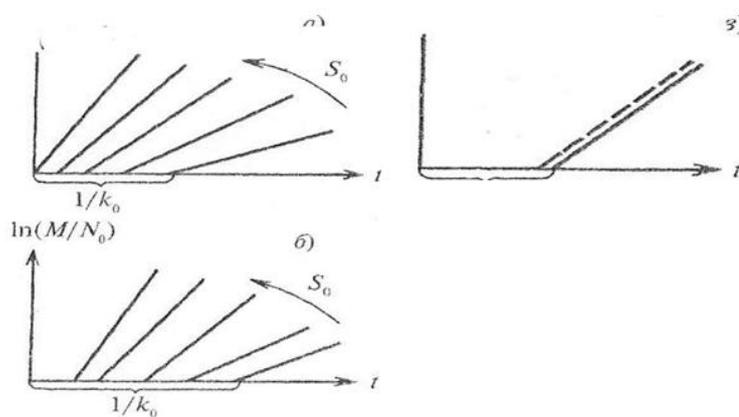


Рисунок 7.9 - Кинетические кривые роста клеточных популяций в экспоненциальной фазе для различных механизмов роста

а - конверсия пресубстрата в субстрат; б - адаптационный рост, в - расходуемый ингибитор роста.

Экспоненциальный член, входящий в уравнение, уменьшается при времени, превышающем  $\frac{1}{k_o}$ , и становится пренебрежимо мал по сравнению с единицей. В этом случае зависимость  $\ln \frac{N}{N_0}$  представляет собой линейную функцию от времени

$$\ln \frac{N}{N_0} = \mu t - \frac{\mu I_0}{k_o K_i}$$

Тангенс угла наклона этой зависимости представляет собой удельную скорость роста культуры; отрезок, отсекаемый на оси времени, период индукции, равный

$$\tau_i = \frac{I_0}{K_i} \frac{1}{k_i}$$

В этом случае период индукции на кинетической кривой роста культуры не зависит от концентрации субстрата или удельной скорости роста клеточной популяции, а определяется только концентрацией ингибитора.

Дискриминация механизмов и определение кинетических параметров проведенный выше анализ показывает, что три обсуждаемых механизма появления на кинетических кривых роста периода индукции описываются различными уравнениями, которые могут быть сопоставлены с экспериментальными данными.

Несложно показать участие или отсутствие в механизме процесса ингибитора, блокирующего развитие культуры. Если экспериментально найденный при различных концентрациях субстрата период индукции не зависит от концентрации субстрата или удельной скорости роста культуры, то, вероятно, период индукции связан с действием расходуемого ингибитора. Доказательством этого можно считать обнаружение линейной зависимости между концентрацией введенного в систему ингибитора и периодом индукции.

Из рисунка 7.9 в видно, что кинетические кривые роста в экспоненциальной фазе не зависят от концентрации субстрата (это указывает на механизм с расходуемым ингибитором роста). В двух других случаях (рисунок 7.9 - а, б) наблюдается ярко выраженная зависимость  $\tau$  от концентрации субстрата, при этом предельно большой период индукции, реализуемой при малых концентрациях субстрата, соответствует обратному значению константы скорости конверсии пресубстрата в субстрат (рисунок 7.9 - а) или адаптационного процесса (рисунок 7.9 - б). Для механизма с конверсией пресубстрата в субстрат период индукции элиминируется высокими концентрациями субстрата. При адаптационном процессе, даже при очень высоких концентрациях субстрата, может детектироваться остаточный предельный период индукции. В этом случае период индукции на кинетической кривой роста культуры не зависит от концентрации субстрата или удельной скорости роста клеточной популяции, а определяется только концентрацией ингибитора.

Два последних механизма можно дискриминировать на основании изучения зависимости периода индукции от начальной концентрации субстрата или удельной скорости роста. При  $S_o \rightarrow 0$  величина  $\frac{S_o}{K_s}$  становится много меньше единицы, а

$$\lim_{S_o \rightarrow \infty} \tau_s = 0, \quad \lim_{S_o \rightarrow \infty} \tau_a = \frac{\ln\left(1 + \frac{\mu_m}{k_o}\right)}{\mu_m} > 0$$

т. е. в случае адаптационного механизма период индукции не снимается высокими концентрациями субстрата.

На рисунке 7.10 приведена зависимость периода индукции от концентрации субстрата для всех обсуждаемых механизмов процесса.

Аналогично выглядят зависимости периода индукции от удельной скорости роста популяции. Зависимости периода индукции для механизмов (7.52) и (7.54) от экспериментально найденной удельной скорости роста имеют вид

$$\tau_s = -\frac{\mu_m - \mu}{k_o \mu} \ln \frac{\mu_m - \mu}{\mu}$$

$$\tau_a = \frac{1}{\mu} \ln \left( 1 + \frac{\mu}{k_o} \right) \quad (7.60)$$

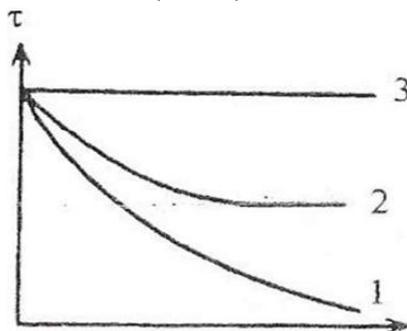


Рисунок 7.10 - Зависимость периода индукции от концентрации субстрата для различных механизмов

1 - конверсия пресубстрата в субстрат; 2 - адаптационный процесс; 3 - расходуемый ингибитор роста.

Аналогично

$$\lim_{S_o \rightarrow 0} \tau_s = \frac{1}{k_o}$$

$$\lim_{S_o \rightarrow 0} \tau_a = \frac{1}{k_o}$$

Эта зависимость позволяет определить параметр  $k_o$ :

$$k_o = \frac{1}{\lim_{S_o \rightarrow 0} \tau_{s,\alpha}}$$

Однако, при больших концентрациях субстрата зависимости периоды индукции от начальной концентрации субстрата существенно различаются:

$$\lim_{S_o \rightarrow \infty} \tau_s = 0$$

$$\lim_{S_o \rightarrow 0} \tau_a = \frac{\ln \left( 1 + \frac{\mu_m}{k_o} \right)}{\mu_m} > 0$$

Параметр  $k_o$  может быть вычислен. Для механизма с участием стадии конверсии пресубстрата

$$k_o = \frac{\mu_m - \mu}{\tau_s \mu} \ln \frac{\mu}{\mu_m - \mu}$$

При найденном значении  $\mu_m$  и вычислении переменной  $p = \left(1 - \frac{\mu_m}{\mu}\right) \ln \left(1 - \frac{\mu_m}{\mu}\right)$  в случае справедливости этого механизма должно наблюдаться постоянство  $\frac{\mu_m}{\tau}$  при вариации удельной скорости роста культуры. Эта постоянная равна константе скорости конверсии пресубстрата в субстрат.

В случае механизма (7.60) должно выполняться соотношение  $\exp(\mu\tau_a) = 1 + \frac{\mu}{k_o}$  т.е. должна наблюдаться проходящая через единицу линейная зависимость между переменными  $\exp(\mu/\tau_a)$  и  $\mu$ . Тангенс угла наклона этой зависимости дает значение  $\frac{1}{k_o}$ .

### Вопросы для самоконтроля

1. Дайте определение лаг-фазы.
2. Какие основные механизмы могут приводить к появлению лаг-фазы на кинетической кривой роста клеток?
3. Напишите основные уравнения, описывающие лаг-фазы.
4. Какова методика дискриминации механизмов, приводящих к появлению лаг-фазы?
5. Приведите примеры роста клеточных популяций с лаг-фазой.
6. Каков биологический смысл лаг-фазы?
7. Какие факторы и при каких условиях могут изменить длительность лаг-фазы?

## ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1

Таблица П1

### Значения критерия Кохрена ( $P = 0,95$ )

Число- опытов	Число степеней свободы $f$					
	1	2	3	4	5	6
2	0,999	0,975	0,939	0,906	0,877	0,853
3	0,967	0,871	0,798	0,746	0,707	0,677
4	0,907	0,768	0,684	0,629	0,590	0,560
5	0,841	0,684	0,598	0,544	0,507	0,478
6	0,781	0,616	0,532	0,480	0,445	0,418

**Значения критерия Фишера ( $P = 0,95$ )**

Число степеней для знаменателя $f_2$	Число степеней свободы $f_1$ (для числителя)					
	1	2	3	4	5	6
1	161,45	199,50	215,71	224,58	230,16	233,99
2	18,51	19,00	19,16	19,25	19,30	19,33
3	10,13	9,55	9,28	9,12	9,01	8,94
4	7,71	6,94	6,59	6,39	6,26	6,16
5	6,61	5,79	5,41	5,19	5,05	4,95
6	5,99	5,14	4,76	4,55	4,39	4,28

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. **Алексеев Г.В.** Математические методы инженерии: Учеб.- метод. пособие. СПб.:НИУ ИТМО; ИХиБТ, 2014. - 68 с.
2. **Варфоломеев С.Д., Гуревич К.Г.** Биокинетика (практический курс): учебное пособие. - М.: ФАИР - ПРЕСС, 1999. - 720 с.
3. **Вершинин В.И., Перцев Н.В.** Планирование и математическая обработка результатов химического эксперимента: Учебное пособие 3-е изд., перераб. и доп. - Спб.: Изд-ва «Лань», 2017 - 236 с.
4. **Грачев Ю.А., Плаксин Ю.М.** Математические методы планирования экспериментов. - М.: ДеЛи. принт, 2005. - 296 с.
5. **Клунова С.М., Егорова Т.А., Живухина Е.А.** Биотехнология: Учеб. - М.: Изд. центр «Академия», 2010. - 256 с.
6. **Кобзарь А.Н.** Прикладная математическая статистика для инженеров и научных работников. - М.: Изд-во «КолосС», 2012. - 816 с.
7. **Ковалёв А.А.** Научные теории и новые технические решения. - СПб.: Ги-орд, 2012.
8. **Кукушкина В.В.** Организация научно-исследовательской работы студентов: учебное пособие. - М.: ИНФРА-М, 2011. - 263 с.
9. Методы исследований в биотехнологии: краткий курс лекций для аспирантов направления подготовки 06.06.01 Биологические науки (профиль подготовки - Биотехнология (в том числе бионанотехнологии) / Сост.: Б.И. Древко // ФГБОУ ВПО «Саратовский ГАУ». - Саратов, 2014. - 67 с.
10. Методология научного исследования / под ред. Н.А. Слесаренко: Учебник. - СПб.: Изд-во «Лань», 2017. - 268 с.
11. **Огурцов А.Н.** Основы научных исследований. - Харьков: НТУ «ХПИ», 2008. - 178 с.
12. **Огурцов А.Н.** Ферментативный катализ. - Харьков: НТУ «ХПИ», 2010. - 304 с.
13. **Огурцов А.Н.** Молекулярная биотехнология микробиологических систем. - Харьков: НТУ «ХПИ», 2012. - 142 с.
14. **Огурцов А.Н.** Молекулярная биофизика и ферментативный катализ. - Харьков: НТУ «ХПИ», 2011.- 400 с.
15. **Пастухов И.П., Тарасова Н.В.** Основы учебно-исследовательской деятельности студентов. - М.: Академия ИЦ, 2012. - 160 с.
16. **Щербаков В.Г.** Биохимия: учебник / В.Г. Щербаков, В.Г. Лобанов, Т.Н. Прудникова. - 3-е изд., испр. и доп. - СПб.: ГИОРД, 2009. - 472 с.

## СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	3
1. НАУЧНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ .....	5
1.1 Этапы начуно-исследовательской работы .....	11
1.2 Научное направление, научная проблема и тема научного исследования ..	14
1.3 Методическая схема построения научно-исследовательской работы магистрантов .....	15
1.4 Постановка цели и задач научно-исследовательской работы .....	16
2. ОСНОВЫ МЕТОДОЛОГИИ НАУЧНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ .....	18
2.1 Понятие о методе и методологии исследования .....	18
2.2 Методы имперических исследований .....	20
2.3 Абстрагирование, анализ, синтез .....	21
2.4 Индукция и дедукция. Моделирование .....	23
2.5 Методы теоритических исследований .....	24
2.6 Системно-структурный метод .....	25
3. ПОДГОТОВИТЕЛЬНЫЙ ЭТАП НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЫ .....	29
3.1 Выбор темы исследования .....	29
3.2 Методика планирования научно-исследовательской работы .....	31
3.3 Методика изучения состояния вопроса и написание литературно- аналитического обзора по теме исследования .....	34
3.4 Источники научной информации .....	42
4. КОРРЕЛЯЦИЯ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КАЧЕСТВА И БЕЗОПАСНОСТИ ПИЩЕ- ВЫХ ПОДУКТОВ .....	51
4.1 Корреляция трех переменных .....	54
4.2 Множественная регрессия .....	55
4.3 Частные коэффициенты корреляции .....	56
4.4 Оценка достоверности коэффициента корреляции .....	57
5. ПЛАНИРОВАНИЕ И ПОСТАНОВКА МНОГОФАКТОРНЫХ ЭКСПЕРИМЕНТОВ. СОСТАВЛЕНИЕ МАТЕМАТИЧЕСКИХ МОДЕЛЕЙ .....	58
5.1 Постановка задачи оптимизации и планирование многофакторных экспери- ментов .....	59
5.1.1 Методы построения экспериментально-статистических моделей процесса .....	60
5.1.2 Проверка воспроизводимости опытов .....	61
5.1.3 Методы планирования многофакторных экспериментов .....	64

5.1.4	Определение значимости коэффициентов регрессии.....	67
5.1.5	Проверка гипотезы адекватности .....	67
5.1.6	Метод дробных реплик .....	68
5.1.7	Устранение влияния временного дрейфа .....	69
5.2	Оптимизация параметров исследуемых технологических процессов.....	75
5.2.1	Метод крутого восхождения (наискорейшего спуска).....	75
5.2.2	Симплексный метод оптимизации (СМО) .....	77
5.2.3	Ортогональное центральное композиционное планирование.....	82
6.	ИССЛЕДОВАНИЕ КИНЕТИЧЕСКИХ ЗАКОНОМЕРНОСТЕЙ В БИО- И ХОЛОДИЛЬНЫХ ТЕХНОЛОГИЯХ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ .....	87
6.1	Постановка кинетического эксперимента .....	87
6.2	Кинетические кривые. Основные участки кинетических кривых .....	87
6.3	Константа скорости и порядок химической реакции .....	90
6.4	Влияние температуры на скорость химических реакций .....	92
6.5	Кинетика сложных реакций.....	93
6.6	Кинетика ферментативных реакций .....	95
6.7	Нестационарная кинетика ферментативных реакций .....	101
6.7.1	Предстационарная кинетика многостадийной ферментативной реакции .....	102
6.7.2	Нестационарная кинетика ферментативных реакций при переменной концентрации субстрата .....	103
7.	МЕТОДОЛОГИЯ ИССЛЕДОВАНИЯ РОСТА КЛЕТОЧНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ.....	108
7.1	Интегральная форма уравнения роста клеточной популяции.....	117
7.2	Ингибирование роста клеточных популяций продуктами ферментации.....	123
7.3	Определение механизма ингибирования из вида кинетической кривой роста клеточной популяции.....	127
	ПРИЛОЖЕНИЯ .....	138
	СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	140

Колодязная Валентина Степановна, Кипрушкина Елена Ивановна,  
Бараненко Денис Александрович, Шестопалова Ирина Анатольевна, Бройко  
Юлия Владимировна

## **МЕТОДОЛОГИЯ НАУЧНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ В ПИЩЕВОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ**

**Учебное пособие**

В авторской редакции

Редакционно-издательский отдел Университета ИТМО

Зав. РИО

Н.Ф. Гусарова

Подписано к печати

Заказ №

Тираж

Отпечатано на ризографе

**Редакционно-издательский отдел**  
**Университет ИТМО**  
197101, Санкт-Петербург, Кронверкский пр., 49