

Т.В. Меледина
В.А. Иванова
А.В. Федоров

АППАРАТУРНО-МЕТОДИЧЕСКАЯ БАЗА
ЭКСПЕРИМЕНТОВ В ОБЛАСТИ ПИЩЕВОЙ
БИОТЕХНОЛОГИИ ПРОДУКТОВ ИЗ
РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ



МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

**Т.В. Меледина
В.А. Иванова
А.В. Федоров**

**АППАРАТУРНО-МЕТОДИЧЕСКАЯ БАЗА ЭКСПЕРИМЕНТОВ
В ОБЛАСТИ ПИЩЕВОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ ПРОДУКТОВ
ИЗ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ**

**РЕКОМЕНДОВАНО К ИСПОЛЬЗОВАНИЮ В УНИВЕРСИТЕТЕ ИТМО
по направлению подготовки 19.04.02 Продукты питания
из растительного сырья в качестве учебного пособия
для реализации основных образовательных программ
высшего образования магистратуры**

 **УНИВЕРСИТЕТ ИТМО**

**Санкт-Петербург
2017**

Меледина Т.В., Иванова В.А., Федоров А.В. Аппаратурно-методическая база экспериментов в области пищевой биотехнологии продуктов из растительного сырья. Учебное пособие. – Санкт-Петербург: Университет ИТМО, 2017.– 60 с.

Рецензент: Машкин Д.В., кандидат технических наук, руководитель отдела качества и стандартизации КТ «ООО Штерн Ингредиентс»

В учебном пособии даны основные термины и определения в области практической биотехнологии, которые следует применять в повседневной исследовательской деятельности. Рассмотрены способы культивирования микроорганизмов в лабораторных условиях, так в реальном промышленном производстве. Приведены метрологические понятия, системные и внесистемные единицы, применяемые в биотехнологии. Подробно описано современное лабораторное оборудование для культивирования микроорганизмов. Рассмотрены методы и методики проведения экспериментальных исследований и лабораторных работ.

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, 2017

© Авторы, 2017

Меледина Т.В., Иванова В.А., Федоров А.В. Аппаратурно-методическая база экспериментов в области пищевой биотехнологии продуктов из растительного сырья. Учебное пособие. – Санкт-Петербург: Университет ИТМО, 2017.– 60 с.

Рецензент: Машкин Д.В., кандидат технических наук, руководитель отдела качества и стандартизации КТ «ООО Штерн Ингредиентс»

В учебном пособии даны основные термины и определения в области практической биотехнологии, которые следует применять в повседневной исследовательской деятельности. Рассмотрены способы культивирования микроорганизмов в лабораторных условиях, так в реальном промышленном производстве. Приведены метрологические понятия, системные и внесистемные единицы, применяемые в биотехнологии. Подробно описано современное лабораторное оборудование для культивирования микроорганизмов. Рассмотрены методы и методики проведения экспериментальных исследований и лабораторных работ.

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, 2017

© Авторы, 2017

Оглавление

Введение.....	4
1. Биотехнология. Термины и определения.....	7
2. Способы культивирования микроорганизмов.....	11
2.1. Периодическое культивирование	12
2.2. Полунепрерывное культивирование – приточно-доливной способ	13
2.3 Полунепрерывное культивирование – отъемно-доливной способ	13
2.4. Многоциклическое культивирование	14
2.5. Непрерывное культивирование	14
2.6. Конструкции ферментёров (биореакторов).....	14
3. Метрологическая часть.....	17
3.1. Основные метрологические термины	17
3.2. Системы единиц в биотехнологии	20
3.2.1. Система СИ.....	20
3.2.2. Внесистемные и вспомогательные единицы.....	22
4. Лабораторное оборудование, используемое для культивирования микроорганизмов.....	25
4.1. Простейшие методы наращивания биомассы	25
4.2. Лабораторные ферментёры для процессов культивирования.	26
4.3. Система культивирования микроорганизмов – ферментёр (биореактор) BIOSTAT A (Sartorius, Германия)	29
4.3.1. Блок управления ферментёра BIOSTAT® A.....	31
4.3.2. Перистальтические насосы	32
4.3.3. Блок охлаждения, греющая пластина и компрессор	34
4.3.4. Сосуд для культивирования.....	36
4.3.5. Оборудование управления и программное обеспечение	37
4.3.6. Проведение процесса культивирования	43
5. Лабораторные исследования.....	47
5.1. Изучение влияния условий выращивания на рост и размножение дрожжей в периодической культуре»	47
5.2. Показатели, характеризующие рост и размножение клеток	49
5.3. Методы исследования.....	50
5.3.1. Исследование морфологии клеток различных дрожжей	50
5.3.2. Определение концентрации клеток.....	50
5.3.3.Определение биомассы весовым методом	52
5.3.4. Определение содержания неассимилируемого (формольного) азота в культуральной жидкости	53
5.4. Постановка опыта.....	54
5.5. Культивирование дрожжей и обработка полученных результатов	55
5.6. Определение экономического коэффициента.....	57
Литература.	59

Введение

Проводя сложные или простые эксперименты, получая результаты значительные и пусть даже не очень существенные, нужно помнить слова великого исследователя М.В.Ломоносова: «Один опыт я ставлю выше, чем тысячу мнений, рожденных только воображением».

Аппаратурно-методическая база экспериментов в области пищевой биотехнологии продуктов из растительного сырья является основой учебного процесса и научных исследований.

В учебном процессе лабораторные работы позволяют учащимся не только освоить навыки практической работы со сложными материалами и процессами в биотехнологии, но и открыть возможности более глубокого понимания самой сути происходящих при этом биологических, химических и физических явлений.

В научных исследованиях на сегодняшний день эксперимент в биотехнологии остается основным способом познания. Аппаратура и оборудование постоянно совершенствуются. Используются новые конструкционные материалы и технологии их обработки. Все активнее используются достижения компьютерной техники. Коренным образом расширили возможности экспериментальных исследований новейшие способы сбора и передачи данных. Самым обычным делом становится удаленное управление экспериментом, проведение синхронных исследований на разных площадках, многократное повторение опытов с максимально идентичными условиями. Иными словами, расширились возможности интеграции всевозможных исследований ради достижения единой цели.

Однако пока еще ни одна система, установка или исследовательский комплекс не может работать без участия человека. Саму идеологию эксперимента разрабатывает специалист. Методики сбора и обработки данных создаются с учетом особенностей среды, материалов, скорости процесса и многого другого. Выбор главных факторов остается за исследователем. Направление использования результатов эксперимента определяется с учетом накопленного опыта, в отдельных случаях – интуиции исследователя.

Эксперименты, опыты, практические работы проводятся в специально оборудованных лабораториях. При работе в лабораториях необходимо знать и строго соблюдать установленные правила. Это техника безопасности и охрана труда, противопожарная безопасность, электробезопасность.

Надо отчетливо понимать простую истину, что практически все правила написаны по результатам трагических событий, произошедших

ранее. И вот, чтобы избежать ошибок в будущем, накладываются ограничения на действия людей в тех или иных условиях.

В систему безопасного проведения экспериментальных и лабораторных работ входит еще множество взаимосвязанных условий, элементарное соблюдение которых может сохранить здоровье и даже жизнь, как самих учащихся, исследователей, так и окружающих людей. Кроме того, нарушение установленных правил приводит и к материальным потерям, в некоторых случаях значительным.

Особенно следует обратить внимание на следующее ключевые советы:

- Рабочее место студента (аспиранта) должно быть в порядке, все посторонние предметы – портфели, сумки, свертки, пакеты должны находиться в специально отведенном месте.
- Пользование мобильным телефоном и иными устройствами связи, гаджетами, отвлекающими от работы, не допускается.
- Работайте уверенно и ровно, пунктуально, спокойно, обязательно в халате или спецодежде, включая при необходимости головной убор.
- Не отвлекайтесь, следите только за экспериментом, важны все мелочи и тонкости, фиксируйте все изменения.
- Будьте осторожны с химреактивами. Не трогайте их открытыми руками.
- Недопустимо применять химреактивы без маркировки или с нечитаемыми надписями. Нельзя использовать просроченные химреактивы.
- В лаборатории для опытов применяется только дистиллированная вода.
- С химически опасными веществами работайте только под вытяжкой с соблюдением специальных условий.
- При нагреве жидкости в пробирке, емкости необходимо пользоваться держателями или иными приспособлениями.
- Остатки химреактивов собирают в специально отведенные для этого емкости.
- Не трогайте без разрешения электрические приборы, выключатели, вилки, разъемы, розетки, провода.
- В лаборатории соблюдайте тишину, не занимайтесь посторонними делами.
- Категорически запрещается проводить работы, не по теме текущей лабораторной или исследовательской работы, не имеющие технической и методической документации.
- Перед выполнением работ изучите методическую литературу, особенно ход выполнения эксперимента, приборы и средства измерений.

- По окончании лабораторной работы нужно все привести в исходное состояние, прибрать и вымыть посуду.
- Элементарное соблюдение чистоты и порядка залог успеха вашей практической работы

1. Биотехнология. Термины и определения

В профессиональной сфере биотехнологов приняты и используются специальные термины и определения. Большинство из них прочно закрепились и используются повсеместно, другие применяются достаточно редко. Для упорядочения терминологии принято достаточно много нормативных документов, среди которых стандарты занимают важнейшее место.

Блок-схема, лежащая в основе любого биотехнологического процесса и биотехнологии, позволяет точнее понять терминологию.

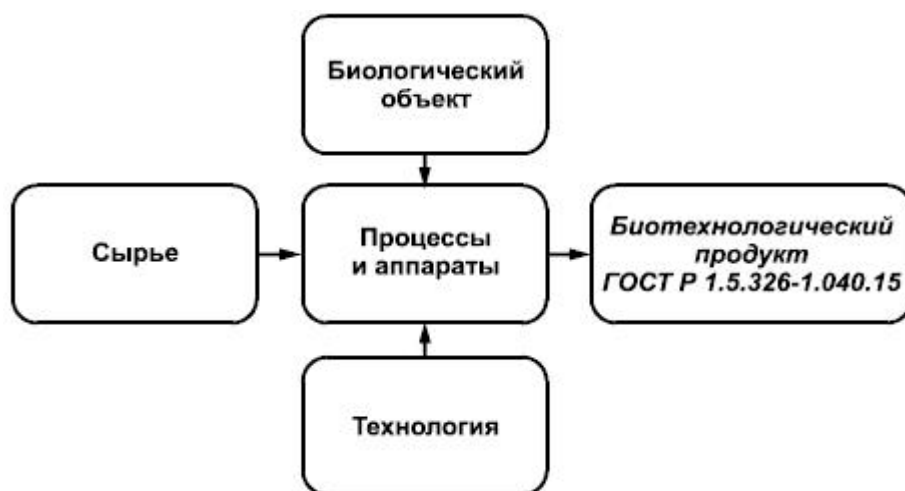


Рисунок 1.1 – Блок-схема биотехнологического процесса

Основные термины и определения, которые обязательно следует использовать в своей работе, приведены в [8,9]:

«БИОТЕХНОЛОГИЯ (BIOTECHNOLOGY): Применение науки и технологии к живым организмам как к областям, продуктам и моделям, с целью преобразовать живые или неживые материалы для производства знания, продукции или услуг.

ПИЩЕВАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ (FOOD BIOTECHNOLOGY) – раздел биотехнологии, занимающийся разработкой теории и практики создания пищевых продуктов общего, лечебно-профилактического и специального назначения.

ПРОМЫШЛЕННАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ (INDUSTRIAL BIOTECHNOLOGY) – применение современной биотехнологии для промышленного производства химических веществ и биоэнергии, используя живые клетки и их ферменты, приводящее к безусловно чистым процессам с минимальным образованием отходов и использованием энергии.

НАНОБИОТЕХНОЛОГИЯ (NANOBIOTECHNOLOGY) – сочетание методов и объектов нанотехнологии, биотехнологии и биомедицины для решения интегральных научно-технических задач данных направлений с учетом принципов биологической безопасности.

БИОЛОГИЧЕСКИЕ АГЕНТЫ (BIOLOGICAL AGENTS) – объекты биотехнологических исследований, включая клетки микроорганизмов, животных, растений; вирусы; компоненты клеток, внеклеточные продукты; иммобилизованные клетки микроорганизмов, животных, растений, их компоненты и внеклеточные продукты.

КЛЕТОЧНАЯ КУЛЬТУРА (CELL CULTURE) – популяция клеток определенного вида микроорганизмов, растений или животных, выращенная *in vitro* в питательной среде.

ЧИСТАЯ КУЛЬТУРА (PURE CULTURE) – культура микроорганизма, представляющая собой один биологический вид без содержания других или гибридных форм.

ШТАММ (STRAIN) – чистая культура одного вида микроорганизмов или вирусов, выделенная из определенного источника или полученная в результате мутации, обладающая специфическими физиолого-биохимическими признаками.

АГАР (AGAR) – загуститель пищевого продукта, получаемый экстрагированием из бурых и красных водорослей *Gelidium amansii*, *Gelidium robustum*, *Gracilaria tenuistipitata*, Rhodophyceae phylum, содержащий полисахаридов от 70,0% до 80,0%, представляющий собой порошок или хлопья от белого до желтоватого цвета или студнеобразную массу в водном растворе.

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОЕ СЫРЬЕ (BIOTECHNOLOGICAL RAW MATERIALS) – материалы природного происхождения или предметы труда, предназначенные для дальнейшей обработки с целью изготовления готового продукта сельскохозяйственного, промышленного и стратегического назначения.

ИСХОДНОЕ СЫРЬЕ (FEEDSTOCK) – первоначальный сырой материал, используемый в химических, биологических или биотехнологических процессах.

РАСТИТЕЛЬНОЕ СЫРЬЕ (VEGETABLE RAW MATERIALS) – органическое сырье, предназначенное для дальнейшей биотехнологической переработки.

БИОИНЖЕНЕРИЯ (BIOENGINEERING) – совокупность методов и технологий создания биологических объектов (биомолекул, клеток, тканей, организмов) с определенными новыми свойствами путем целенаправленного воздействия на соответствующие формы этих биологических объектов генетическими и биохимическими методами.

БИОКОНВЕРСИЯ (BIOCONVERSION) – основной термин, описывающий использование биологических систем для трансформации

одного соединения в другое. Примером является переработка органических отходов или сточных вод микроорганизмами для получения метана.

БИОТРАНСФОРМАЦИЯ (BIOTRANSFORMATION) – химическое преобразование веществ живыми организмами или препаратами ферментов, в результате которого может происходить или инактивация этого вещества, или образование активного метаболита из неактивного исходного соединения.

БИОКАТАЛИЗ (BIOCATALYSIS) – ускорение с помощью ферментов химических реакций, протекающих в живых организмах.

БИОМАССА (BIOMASS) – общая масса живой материи в заданном объёме.

БИОПРОДУКТ (BIOPRODUCT) – продукт полностью или частично полученный в процессе переработки биомассы.

БИОРЕАКТОР, ФЕРМЕНТЁР (BIOREACTOR, FERMENTER) – аппарат для культивирования микроорганизмов или эукариотических клеток, в котором протекают ферментативные биохимические реакции при участии живых клеток или клеточных экстрактов.

ВЫПАРИВАНИЕ (EVAPORATION) – метод химико-технологической обработки для выделения растворителя из раствора, концентрирования раствора, кристаллизации растворенных веществ.

ГЛУБИННОЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЕ (SUBMERGED CULTIVATION) – культивирование биологических агентов в толще питательной среды.

ИММОБИЛИЗАЦИЯ (IMMOBILIZATION) – фиксация низкомолекулярных лигандов, макромолекул, клеточных органелл или клеток на определенном носителе.

ИНОКУЛЯТ (INOCULUM) – доза посевного материала, масса или концентрация клеток, которая вводится в питательную среду.

КОКУЛЬТИВИРОВАНИЕ (COCULTIVATION) – совместное культивирование клеток *in vitro*, используемое для их трансформации или селекции.

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ (CULTIVATION) – выращивание микроорганизмов, животных или растительных клеток, тканей или органов в искусственных условиях на различных по составу питательных средах.

КУЛЬТУРАЛЬНАЯ ЖИДКОСТЬ (CELL CULTURE FLUID) – жидкая среда, получаемая при культивировании различных про- и эукариотических клеток *in vitro* и содержащая остаточные питательные вещества и продукты метаболизма этих клеток.

КУЛЬТУРАЛЬНАЯ СРЕДА (CULTURE MEDIUM) – питательный материал в твердой или жидкой форме, который используют для выращивания клеток микроорганизмов, растений и животных *in vitro*.

ПАСТЕРИЗАЦИЯ (PASTEURIZATION) – тепловая обработка продукта с целью уничтожения болезнетворных микроорганизмов, в частности неспорообразующих патогенных бактерий, или снижения общего их количества (60°C в течение 60 мин или при температуре от 70°C до 80°C в течение 30 мин).

ПОСЕВНОЙ МАТЕРИАЛ, МАТОЧНАЯ КУЛЬТУРА, ИНОКУЛЯТ (SEED MATERIAL, STOCK CULTURE, INOCULUM) – суспензия клеток, являющаяся исходной для наращивания клеточной культуры и используемая для первоначального посева на питательную среду.

СУШКА (DRYING) – термический процесс принудительного удаления жидкости из твердых, жидких веществ или их смесей с помощью испарения.

ФАЗЫ РОСТА МИКРООРГАНИЗМА (MICROORGANISM GROWTH PHASES) – разные стадии роста клеток в культуре. Различают несколько фаз роста: лаг-фазу, фазу ускоренного роста, логарифмическую, фазу замедленного роста и стационарную.

ФЕРМЕНТАЦИЯ (FERMENTATION) – процесс биохимической переработки органического сырья с помощью микроорганизмов, отдельных ферментов или их комплексов.

ЦЕНТРИФУГИРОВАНИЕ (CENTRIFUGATION) – разделение неоднородных систем (например, жидкость/твердые частицы) на фракции по плотности при помощи центробежных сил

ЭКСТРАКЦИЯ (EXTRACTION) – метод извлечения вещества из раствора или сухой смеси с помощью подходящего растворителя (экстрагента).»

2. Способы культивирования микроорганизмов

Культивирование микроорганизмов – важный этап многих технологических производств. При культивировании происходит накопление биомассы и продуктов метаболизма (жизнедеятельности) микроорганизмов. На рисунке 2.1 приведена классификация способов культивирования. Продукты метаболизма могут, как накапливаться внутри клеток, так и выделяться в питательную среду.

Выбор способа культивирования зависит не только от потребностей микроорганизма, но и от конечной цели. Процессы культивирования различаются содержанием кислорода, состоянием питательной среды, способом перемешивания, количеством ферментёров, способом управления. Последний делится на хеостатные, турбидостатные, оксидатные, рН-статные. Система может быть открытой или закрытой.



Рисунок 2.1 – Классификация способов культивирования

Открытая система культивирования – это система, в которую все компоненты (питательная среда, дрожжевая культура, минеральные вещества, витамины и др.) могут и поступать, и покидать ее (биомасса,

продукты синтеза и метаболизма). Закрытая система – это система, в которой хотя бы один из компонентов не обменивается со средой своей массой. Все непрерывные культуры, имеющие, с одной стороны приток питательной среды, с другой – отток биомассы, являются открытыми системами.

2.1. Периодическое культивирование

Периодический способ культивирования часто применяется в различных отраслях микробиологической промышленности. В этом случае инокулят вносят в питательную среду в начале процесса и культивируют культуру до достижения ею заданной фазы роста. Такой способ культивирования используют при накоплении биомассы чистой культуры дрожжей в лаборатории и на первых производственных стадиях в цехе чистых культур.

Концентрация микроорганизмов в периодической культуре нарастает и останавливается из-за ограничения питательных веществ или из-за ингибирования токсичными продуктами жизнедеятельности микроорганизма. При периодическом культивировании происходит непрерывное изменение физиологического состояния клеток вследствие меняющихся условий внешней среды.



Рисунок 2.2 – Изменение концентрации клеток и субстрата в простой периодической культуре [3]

Периодический способ культивирования осуществляется как в стационарных условиях, так и в условиях с перемешиванием на лабораторной качалке, шейкере или с помощью перемешивающего устройства, встроенного внутрь производственного ферментёра. Когда клетки распределены по всему объёму жидкой питательной среды, происходит перемешивание культуры, что, безусловно, выравнивает условия роста в различных частях рабочей ёмкости. Системы с

перемешиванием называются динамическими. Наиболее часто в производстве применяется глубинное выращивание в ферментёре с принудительной аэрацией и перемешиванием. Глубинное культивирование с перемешиванием ускоряет рост микроорганизмов, клетки в такой системе находятся во взвешенном состоянии и равномерно рассредоточены по всему объёму, имеют одинаковые условия. Субстраты и продукты метаболизма рассредоточены по всему объёму равномерно.

Исследуя динамику роста культур микроорганизмов, нужно соблюдать условия жизнеспособности засева, а именно должно быть достаточно питательных веществ при рациональных физико-химических параметрах. Не должно быть ингибиторов, подавляющих рост клеток.

2.2. Полунепрерывное культивирование – приточно-доливной способ

В промышленности также используют методы, которые нельзя однозначно отнести к непрерывному или периодическому культивированию. Полунепрерывный способ называют ещё периодическим способом с притоком питательной среды, или приточно-доливным, а также периодическим способом культивирования с доливом питательной среды. При реализации полунепрерывного способа в процессе культивирования, первично вносят питательную среду до засева культуры. Затем добавляют немного питательных веществ или порциями, или непрерывно «по каплям», с целью регулирования энергетического обмена дрожжей. При этом экономический коэффициент в такой культуре выше по сравнению с простой периодической культурой, т.к. такой способ культивирования позволяет снизить и даже исключить эффект Кребтри.

При таком способе микроорганизмы не покидают ферментёр в процессе всего культивирования. Этот способ используется в основном при культивировании пекарских дрожжей, как в цехе чистых культур, так и на производстве.

2.3 Полунепрерывное культивирование – отъемно-доливной способ

Для уменьшения токсичного воздействия вторичных метаболитов дрожжей, увеличения периодичности выведения чистой культуры дрожжей используется отъемно-доливной способ культивирования (открытая система).

При таком культивировании происходит добавление свежей питательной среды в рабочую ёмкость ферментёра, накопление биомассы и периодический отъем культуральной жидкости. Отъемно-доливной способ рассматривают как дальнейшее совершенствование периодического способа культивирования и шаг к переходу к непрерывному

культивированию микроорганизмов. При этом способе обеспечивается «омолаживание» или «обновление» культуры и существенно замедляется наступление фазы отмирания.

Такой способ имеет существенный недостаток. Добавляется питательная среда полного состава, а это невозможно для синтеза вторичных метаболитов.

2.4. Многоциклическое культивирование

Многоциклическое культивирование можно вести в одном ферментёре. Это называется одностадийный процесс. На практике часто используют многостадийные процессы. При этом несколько ферментёров соединяют в одну большую «батарею» и в каждом из них протекает последовательно периодическое культивирование.

2.5. Непрерывное культивирование

Непрерывные процессы называют именно так, потому что и подача питательной среды, и удаление биомассы и продуктов ее жизнедеятельности происходит непрерывно. При этом достигается постоянство концентрации микроорганизмов и удельной скорости роста популяции. При таком способе культивирования существует возможность продления жизни популяции, поддерживая её непрерывной подачей свежей питательной среды, отбором биомассы и продуктов метаболизма.

2.6. Конструкции ферментёров (биореакторов)

В микробиологической промышленности применяется много разных ферментёров или биореакторов. Выбор той или иной конструкции определяется особенностями процесса и возможностями создателей.

К примеру, в производстве органических кислот применяют аппараты аэробной поверхностной ферментации. Здесь для ферментации применяют плоские металлические кюветы, которые размещены в камерах. Эти камеры называют «бродильные камеры». В кюветах находится питательная среда, при этом высота слоя относительно небольшая 80–150 мм. Питательная среда жидкая, поэтому данный способ относят жидкофазной ферментации. Среду инокулируют спорами продуцента. Это осуществляется с воздухом, поступающим в бродильную камеру с одинаковой скоростью. Должны быть постоянны температура и влажность. По окончании цикла кюветы опорожняют через сливные штуцеры в днищах, и жидкость идет на дальнейшую стадию производства.

Твердофазная ферментация производится в вентилируемых камерах, в которых находятся лотки с перфорированными днищами. Твердый материал в виде сыпучей среды засыпают в эти лотки, которые размещают на стеллажах внутри камер. Высота слоя насыпанного материала 10–15 мм. Особенностью является то, что воздух подается через перфорированные днища лотков. Это обеспечивает более оптимальную аэрацию среды.

Обеспечить максимальную интенсивность массо- и энергообмена клеток со средой дается нелегко. Как правило конструкции аппаратов аэробной глубинной ферментации сложны, а следовательно требуют больших затрат при эксплуатации, обслуживании и ремонте.

Если различать и классифицировать ферментёры (биореакторы) по структуре организованного движения, то это аппараты полного перемешивания и полного вытеснения.

Способ подвода энергии также во многом определяет конструкцию ферментёров. Энергию подводят к газовой фазе или к жидкой фазе, или комбинированно.

В ферментёрах с подводом энергии к газовой фазе подается сжатый воздух. При этом происходит аэрация и перемешивание культуральной жидкости. И таких аппаратов создано значительное многообразие, можно выделить основные группы:

- барботажные ферментёры, с подачей воздуха через специальные устройства, в нижней части оборудования;
- эрлифтные аэраторы, в которых применяется цилиндр-диффузор, перемешивающий по распределительным трубам субстрат и воздух;
- газлифтные биореакторы или (трубчатые), где жидкость многократно циркулирует внутри аппарата кожухотрубчатого типа;
- форсуночные биореакторы, в которых для подачи воздуха применяются форсунки;
- биореакторы колонного типа, в которых организовано противоточное движение жидкой и газовой фаз, с многократной обработкой на горизонтальных тарелках.

К ферментёрам с подводом энергии к жидкой фазе относят следующие конструкции:

- биореакторы, оснащенные аппаратом самовсасывающей турбиной, сложной конструкции, обеспечивающей рециркуляцию жидкости вдоль стенок объема с возвратом в диффузор;
- ферментёр (биореактор) с несколькими турбозежекторными перемешивающими устройствами, расположенными между секциями, на которые разделяется весь рабочий объем.

Оба принципа подвода энергии к жидкой и газовой фазе одновременно реализуются в биореакторах с комбинированным подводом энергии. Причем в газовой фазе происходит аэрация, а в жидкой перемешивание. К примеру, это, как правило, сосуд цилиндрической формы с мешалкой и барботером.

Далее аппараты можно разделить по способу перемешивания:

- механические, имеющие мешалку на валу и аэратор;
- пневматические, которые объединяют барботажные, эрлифтные и диффузорные;

- циркуляционные, содержащие насосы, эжекторы или иные устройства, обеспечивающие движение жидкости по замкнутому циклу, с восходящим и нисходящим потоком.

Надо понимать, что рассмотренная классификация носит некоторый обобщенный характер и могут быть особенности конструкции, которые не позволят точно отнести биореактор к той или иной группе. Но все же это общепринятая идеология позволяет ориентироваться в многообразии применяемого оборудования.

Геометрические параметры ферментеров в большинстве таковы, что это цилиндр с соотношением диаметра и высоты примерно один к двум.

В качестве материала используется нержавеющей сталь различных марок. Для термостатирования применяются пассивные и активные способы, а именно двойные стенки сосуда и теплообменники змеевикового типа.

Рабочим объемом ферментера является не более 70% от всего объема.

На конструкцию наибольшее влияние оказывает обеспечение стерильности. Это одновременно герметичность в работе и доступность ко всем узлам и элементам для паровой обработки. Особенно это касается скрытых полостей и внутренних поверхностей труб. Стерильность это самое главное в работе биореакторов.

3. Метрологическая часть

3.1. Основные метрологические термины

Все экспериментальные исследования в биотехнологии должны базироваться на общепринятых метрологических принципах, которые позволяют не только привести полученные результаты к единообразию, но и дают возможность оценить достоверность результатов.

Перед изучением настоящего раздела полезным будет ознакомиться с положениями, изложенными авторами [6,7].

Как точно сформулировано в [10] «Метрология (metrology): наука об измерениях, методах и средствах обеспечения их единства и способах достижения требуемой точности».

В нашей стране создана и успешно функционирует государственная система обеспечения единства измерений, представляющая собой разветвленную сеть достаточно основательно оснащенных учреждений и метрологических центров. Все это опирается на четкую законодательную нормативно-юридическую базу. Успешно развивается международное сотрудничество в этой области.

В практической деятельности, особенно в узкопрофессиональной среде, могут использоваться всевозможные термины, однако для публикаций, презентаций следует пользоваться так называемыми нормативными терминами для лучшего взаимопонимания. Мы вполне можем руководствоваться межгосударственными рекомендациями [10]:

Первое и основополагающее – это **ВЕЛИЧИНА** (quantity). В [10] это «свойство материального объекта или явления, общее в качественном отношении для многих объектов или явлений, но в количественном отношении индивидуальное для каждого из них. **РАЗМЕР ВЕЛИЧИНЫ** – количественная определенность величины, присущая конкретному материальному объекту или явлению».

Принято выделять так называемую **ОСНОВНУЮ ВЕЛИЧИНУ**. В [10] это «одна из величин подмножества, условно выбранного для данной системы величин так, что никакая из величин этого подмножества не может выражаться через другие величины».

Во всем мире с успехом применяется так называемая Международная система величин. В нее входят семь величин: длина, масса, время, электрический ток, термодинамическая температура, количество вещества и сила света.

Сама по себе величина и ее размер не несут конкретной необходимой информации об объекте или явлении, поэтому вводится понятие **РАЗМЕРНОСТЬ**. Определение, для первого восприятия довольно сложное, но оно очень точно отражает суть и смысл рассматриваемого понятия, дано в [10]: «выражение в форме степенного одночлена, составленного из

произведений символов основных величин в различных степенях и отражающее связь данной величины с величинами, принятыми в данной системе величин за основные с коэффициентом пропорциональности, равным 1. Единица измерения величины: величина фиксированного размера, которой присвоено числовое значение, равное 1, определяемая и принимаемая по соглашению для количественного выражения однородных с ней величин».

Используются системные и внесистемные единицы.

Для исследований в области биотехнологии и для ряда других областей знаний, применяются так называемые КАЧЕСТВЕННЫЕ СВОЙСТВА, или назывательные, неразмерные свойства. Неразмерное свойство в [10] – «это свойство материального объекта или явления, которое не имеет размера. Качественное свойство имеет значение, которое может быть выражено словами, буквенно-числовым кодом или другим способом. Например, пол человека, цвет образца краски, цвет капельной пробы в химии, двухбуквенный код страны по ИСО, последовательность аминокислот в полипептиде». Мы можем отнести сюда запах вещества, вкус пробы и т.п. и практически все органолептические показатели можно отнести к качественным свойствам.

Довольно часто применимы так называемые порядковые величины, которые определяются, как это приведено в [10] «в соответствии с принятыми по соглашению методом измерений или методикой измерений, для которой может быть установлено в соответствии с ее размером общее порядковое соотношение с другими величинами того же рода, но для которой не применимы алгебраические операции над этими величинами». В качестве примера: твердость по шкале Роквелла или Моора, октановое число, сила землетрясения по шкале Рихтера.

Так что же такое ШКАЛА? Есть много определений. Можно взять такое из [10] – «упорядоченная совокупность значений величины, служащая исходной основой для измерений данной величины». Шкала должна иметь так называемые опорные реперные точки, принятые профессиональным национальным или международным сообществом специалистов. Эти точки и методики их измерений закрепляются соответствующими нормативно-правовыми документами.

Опытное получение одного или нескольких значений величины, принято называть ИЗМЕРЕНИЕМ ВЕЛИЧИНЫ. В практической деятельности может быть статическое и динамическое измерение. Первое неизменно на протяжении времени всей процедуры, а второе, когда средства измерений используют в динамическом режиме.

Приведем хорошие определения из [10]: «АБСОЛЮТНОЕ ИЗМЕРЕНИЕ – измерение, основанное на прямых измерениях одной или нескольких основных величин и/или использовании значений физических

констант. **ОТНОСИТЕЛЬНОЕ ИЗМЕРЕНИЕ** – измерение отношения одноименных величин или функций этого отношения».

Ни одно измерение не может быть выполнено без погрешности. Это не брак, а естественный процесс. Та составляющая погрешности, обусловленная погрешностью применяемого средства измерений – **ИНСТРУМЕНТАЛЬНАЯ ПОГРЕШНОСТЬ**.

По способу выражения различают **АБСОЛЮТНУЮ ПОГРЕШНОСТЬ**, приводится в единицах самой измеряемой величины, и **ОТНОСИТЕЛЬНУЮ ПОГРЕШНОСТЬ**, равную отношению абсолютной погрешности к самой измеряемой величине.

Измерения выполняются **СРЕДСТВАМИ ИЗМЕРИТЕЛЬНОЙ ТЕХНИКИ**. По [10] это: «обобщающее понятие, охватывающее технические средства, специально предназначенные для измерений. Совокупность функционально объединенных и расположенных в одном месте мер, измерительных приборов, измерительных преобразователей и других устройств, предназначенная для измерений одной или нескольких величин, принято называть **УСТАНОВКОЙ**».

Приняты несколько терминов и определений, которые должны применяться в профессиональной деятельности специалистов. В соответствии с государственным стандартом [11]:

«МЕТОДИКА или **МЕТОД ИЗМЕРЕНИЙ** – совокупность конкретно описанных операций, выполнение которых обеспечивает получение результатов измерений с установленными показателями точности. **ПОКАЗАТЕЛЬ ТОЧНОСТИ ИЗМЕРЕНИЙ** – установленная характеристика точности любого результата измерений, полученного при соблюдении требований и правил данной методики измерений».

Установлены Федеральным законом термины, которые обязательные к использованию в исследовательской и учебной работе [12]: **«ЕДИНИЦА ВЕЛИЧИНЫ** – фиксированное значение величины, принятое за единицу данной величины и применяемое для количественного выражения однородных с ней величин. **ЕДИНСТВО ИЗМЕРЕНИЙ** – состояние измерений, при котором их результаты выражены в допущенных к применению в Российской Федерации единицах величин, а показатели точности измерений не выходят за установленные границы. **ИЗМЕРЕНИЕ** – совокупность операций, выполняемых для определения количественного значения величины».

Мы привели лишь основные устоявшиеся и нормативно закреплённые метрологические термины. Развитие науки и техники и все большая и большая интернационализация нашей жизни будут постоянно трансформировать, пополнять терминологию. Поэтому современный специалист должен следить в информационном пространстве за изменяющейся обстановкой в своей и смежных областях знаний.

3.2. Системы единиц в биотехнологии

В природе и технике существовало и существует огромное многообразие наименований, обозначений физических величин, позволяющих описывать тот или иной предмет, явление, процесс, свойство. Наша повседневная жизнь неразрывно связана с теми или иными единицами измерений. Одни единицы применяются достаточно часто, другие очень редко. К примеру, единицы массы и объёма, температуры, давления, скорости движения вошли в наш повседневный обиход настолько прочно, что мы просто не представляем жизнь без них. В биотехнологии используется много единиц измерений как системных, так и внесистемных, ниже описаны наиболее часто встречающиеся.

3.2.1. Система СИ

Большинство стран мира использует так называемую систему СИ. (SI, фр. Le Système International d'Unités). Принята в 1960 году XI Генеральной конференцией по мерам и весам. Она последовательно закреплялась в нашей стране, принятием нормативных актов. С 2003 года в Российской Федерации действует так называемый **МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ** [13]. Этот нормативный документ в очередной раз закрепил применение системы СИ в нашей стране. В нормативных, технических, инженерных, технологических, конструкторских, проектных и других документах к продукции применимы установленные международные или русские обозначения единиц. Основные единицы системы Си приведены в Таблице 3.1.

Таблица 3.1 Основные единицы СИ

Наименование	Размерность	Наименование	Обозначение	
			Межд.	Рус.
Длина	L	метр	m	м
Масса	M	килограмм	kg	кг
Время	T	секунда	s	с
Электрический ток (сила электрического тока)	I	ампер	A	А
Термодинамическая температура	Θ	кельвин	K	К
Количество вещества	N	моль	mol	моль
Сила света	J	кандела	cd	кд

На практике в биотехнологии часто применяются так называемые производные единицы СИ, которые образованы от основных единиц. В Таблице 3.2 приведены наиболее часто используемые единицы.

Есть особая группа производных величин, сама ставшая основой для образования последующих других производных величин. За ними закрепились устойчивые специальные наименования и обозначения. В Таблице 3.3 приведены именно эти специальные величины.

Таблица 3.2 Производные единиц СИ

Наименование	Размерность	Наименование	Обозначение	
			Межд.	Рус.е
Площадь	L^2	квадратный метр	m^2	$м^2$
Объем, вместимость	L^3	кубический метр	m^3	$м^3$
Скорость	LT^{-1}	метр в секунду	m/s	$м/с$
Плотность	$L^{-3}M$	килограмм на кубический метр	kg/m^3	$кг/м^3$
Удельный объем	L^3M^{-1}	кубический метр на килограмм	m^3/kg	$м^3/кг$
Молярная концентрация компонента	$L^{-3}N$	моль на кубический метр	mol/m^3	$моль/м^3$

Таблица 3.3. Производные единицы СИ

Величина		Единица			
Размерность	Наименование	Наименование	Обозначение		СИ
			Межд.	Рус.е	
Частота	T^{-1}	герц	Hz	Гц	s^{-1}
Сила	LMT^{-2}	ньютон	N	Н	$m \cdot kg \cdot s^{-2}$
Давление	$L^{-2}MT^{-2}$	паскаль	Pa	Па	$m^{-1} \cdot kg \cdot s^{-2}$
Энергия, работа, количество теплоты	L^2MT^{-2}	джоуль	J	Дж	$m^2 \cdot kg \cdot s^{-2}$
Мощность	L^2MT^{-3}	ватт	W	Вт	$m^2 \cdot kg \cdot s^{-3}$
Температура Цельсия	Θ	градус Цельсия	$^{\circ}C$	$^{\circ}C$	K

3.2.2. Внесистемные и вспомогательные единицы

Среди широкого многообразия единиц измерения ГОСТ 8.417-2002 рекомендует использование следующих внесистемных величин, приведенных в Таблице 3.4.

Таблица 3.4. Основные несистемные единицы, допустимые к применению наравне с единицами СИ

Наименование величины	Единица				
	Наименование	Обозначение		Соотношение с единицей СИ	Область применения
		Межд.	Рус.		
Масса	тонна	t	т	$1 \cdot 10^3 \text{ kg}$	Все области
Время	минута	min	мин	60 s	Все области
	час	h	ч	3600 s	
	сутки	d	сут	86400 s	
Объем, вместимость	литр	l	л	$1 \cdot 10^{-3} \text{ m}^3$	Все области

На практике допускается применять единицы относительных величин Таблица 3.5.

Таблица 3.5. Относительные величины

Наименование величины	Единица			
	Наименование	Обозначение		Значение
		Межд.	Рус.	
Относительная величина; массовая доля компонента; молярная доля компонента	Единица	1	1	1
	Процент	%	%	$1 \cdot 10^{-2}$
	Промилле	‰	‰	$1 \cdot 10^{-3}$
	Миллионная доля	Ppm	Млн ⁻¹	$1 \cdot 10^{-6}$
	Нано доля	Ppb	Нано ⁻¹	$1 \cdot 10^{-9}$

Для удобства использования единиц на практике применяются множители и приставки, которые достаточно прочно закрепились. Но всегда следует помнить, что при расчетах следует обязательно вернуться к исходной единице, пусть там будет даже шесть, семь, десять и более знаков после запятой. Наиболее распространенные множители и приставки приведены в Таблице 3.6.

Таблица 3.6. Множители и приставки, используемые для образования наименований и обозначений единиц СИ

Десятичный множитель	Приставка	Обозначение приставки	
		международное	русское
10^{24}	иотта	Y	И
10^{21}	зетта	Z	З
10^{18}	экса	E	Э
10^{15}	пета	P	П
10^{12}	тера	T	Т
10^9	гига	G	Г
10^6	мега	M	М
10^3	кило	k	к
10^2	гекто	h	г
10^1	дека	da	да
10^{-1}	деци	d	д
10^{-2}	санци	c	с
10^{-3}	милли	m	м
10^{-6}	микро		мк
10^{-9}	нано	n	н
10^{-12}	пико	p	п
10^{-15}	фемто	f	ф
10^{-18}	атто	a	а
10^{-21}	зепто	z	з
10^{-24}	иокто	y	и

Действующий стандарт требует при записи в тексте помещать обозначения единиц за числовыми значениями величин и обязательно на строке с ними, перенос на следующую строку не допускается. Пробел ставится между последней цифрой числа и обозначением единицы. Пример правильной и неправильной записи приведен в Таблице 3.7.

Таблица 3.7. Пример записи в тексте

Правильно:	Неправильно:
100 kW; 100 кВт	100kW; 100кВт
80 %	80%
20 °C	20°C
(1/60) s	1/60/s

Соотношение некоторых внесистемных единиц, часто используемых в практической деятельности в биотехнологии и смежных отраслях науки, приведено в Таблице 3.8.

Таблица 3.8 Соотношение некоторых несистемных единиц.

Наименование величины	Единица			
	Наименование	Обозначение		СИ
		Меж.	Рус.	
Длина	ангстрем	Å	Å	$1 \cdot 10^{-10} \text{ m}$
Сила, вес	дина	dyn	дин	$1 \cdot 10 \text{ N}$
	килограмм-сила	kgf	кгс	9,80665 N (точно)
	грамм-сила	gf	гс	$9,80665 \cdot 10 \text{ N}$ (точно)
Давление	килограмм-сила на квадратный сантиметр	kgf/cm	кгс/см	98066,5 Pa (точно)
	миллиметр водяного столба	mm Н О	мм вод.ст.	9,80665 Pa (точно)
	миллиметр ртутного столба	mm Hg	мм рт.ст.	133,322 Pa
Динамическая вязкость	пуаз	P	П	$0,1 \text{ Pa} \cdot \text{s}$
Кинематическая вязкость	стокс	St	Ст	$1 \cdot 10^{-4} \text{ m}^2/\text{s}$
Количество теплоты, теплота фазового превращения, теплота химической реакции	калория (международная)	cal	кал	4,1868 J
Длина	микрон		мк	$1 \cdot 10^{-6} \text{ m}$

Для удобства восприятия единиц СИ и несистемных единиц в тексте рекомендуется выбирать такие приставки, чтобы числовые значения укладывались в диапазон от 0,1 до 1000. В некоторых областях знаний традиционно используют одну и ту же дольную единицу, это объясняется разумным консерватизмом специалистов. К введению каких-то новых обозначений следует относиться с достаточной осторожностью, так как это может привести к недоразумениям и ошибкам.

4. Лабораторное оборудование, используемое для культивирования микроорганизмов

4.1. Простейшие методы наращивания биомассы

Простейшим методом наращивания биомассы дрожжей является культивирование на поверхности твердых питательных сред в чашках Петри.

Кроме того, процесс может быть осуществлен в стационарных условиях в стеклянных колбах или в колбах Карлсберга с питательной средой вместимостью 5 л или 10 л, показанных на рисунке 4.1. С целью увеличения массообмена клеток с питательной средой в лабораторной практике используют выращивание в колбах, в которых культуральная жидкость (дрожжи и продукты их метаболизма) перемешивается с использованием шейкера (качалки) с регулируемым числом оборотов. Перемешивание может также осуществляться с помощью магнитной мешалки, помещенной в среду культивирования.



Рисунок 4.1 – Колба Карлсберга

Перемешивание культуральной жидкости способствует увеличению растворения кислорода в среде. В результате увеличивается доля углеводов, участвующих в биосинтетических процессах формирования новых клеток (эффект Пастера). Это наглядно видно на рисунке 4.2.

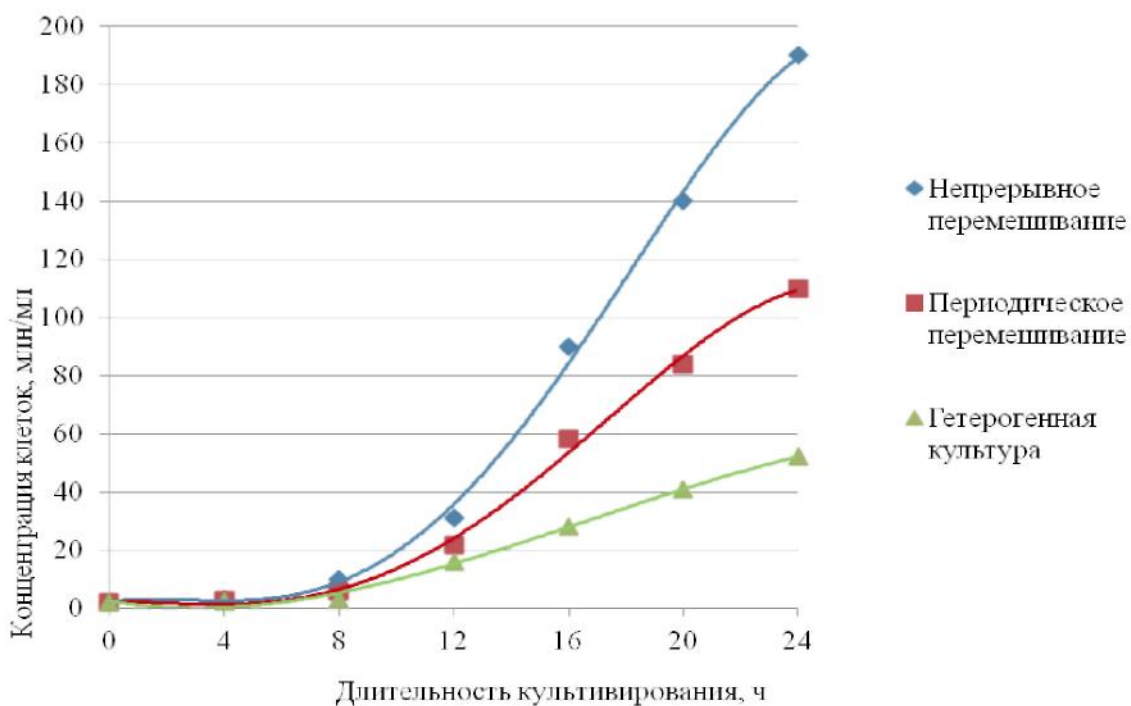


Рисунок 4.2 – Влияние перемешивания на прирост клеток

Для изучения ферментативных процессов, разработки режимов культивирования биомассы с заданными свойствами и направленного синтеза вторичных метаболитов используют лабораторные ферментёры с перемешиванием, которые снабжены максимально универсальными контролирующими устройствами для глубинного культивирования, как микроорганизмов, так и клеток животных и растительных тканей.

Известны вращающиеся ферментёры [3], предложенные вместо ферментёров с перемешиванием с целью исключения механического стресса, в результате которого изменяется метаболизм клеток.

4.2. Лабораторные ферментёры для процессов культивирования.

Лабораторный ферментёр EasyLab с культуральным сосудом объёмом 250-500 мл предназначен для решения широкого спектра задач, в которых основным фактором является минимальный объём культуральной смеси. Заменяя собой культивирование в пробирках или шейкерах, ферментёр EasyLab обладает всеми необходимыми функциями для простого и эффективного контроля вашего ферментационного процесса.

Оборудование располагает следующими особенностями:

- полностью изменяемая конфигурация ферментёра;
- различные виды мешалок для разных применений, а также мешалки, изготавливаемые специально для заказчика;

- подача газов с помощью ручных/автоматических ротаметров;
- до 4-х перистальтических насосов с фиксированной или переменной скоростью;
- возможность выбора конфигурации портов крышки ферментёра;
- дополнительное оборудование: чиллер, термостат, анализатор газов.

Лабораторный ферментёр MiniPro-Lab с культуральным сосудом объёмом 1,5-3 л предназначен для выращивания бактериальных, грибных или дрожжевых культур. Благодаря системе управления C-Bio лабораторный ферментёр обладает тем же набором функций по контролю и мониторингу процессов культивирования, что и стерилизуемые на месте промышленные решения.

Лабораторный ферментёр Pro-Lab с двумя культуральными сосудами предназначен для проведения параллельных экспериментов при оптимизации процессов культивирования, а также для осуществления шага масштабирования культуры. Одна система управления в непрерывном режиме собирает и анализирует данные, поступающие от нескольких культуральных сосудов. Благодаря этому вам больше не нужно тратить время на постоянный контроль и анализ данных в нескольких параллельных ферментациях [3].

NLF – мобильный стеклянный или из нержавеющей стали лабораторный ферментёр, биореактор. Общий объём 16 л, 19 л, 22 л (стекло/сталь) или 16 л, 19 л, 30 л (сталь). Передвижной ферментёр, биореактор NLF, можно легко разместить в лаборатории. Конструкция основана на хорошо отлаженном модульном принципе фирмы Bioengineering. Разнообразие разъемов позволяет быстро подключать различные типы датчиков и расширять установку. Дно сосуда с двойной рубашкой обеспечивает оптимальное термостатирование. Вал мешалки имеет двойное уплотнение. Аппарат строго поделен на гигиеническую и электрическую части – устройство связано с блоком управления с помощью многожильного кабеля.

L1523 – классический лабораторный ферментёр, биореактор, стерилизуемый на месте, доступен как в стеклянном исполнении, так и из нержавеющей стали. Ферментёр вмонтирован в стандартный стол, взаимозаменяемые цилиндры различной высоты и диаметра позволяют менять ферментационный объём при одной и той же базовой установке. Высокое качество и надежность при низкой закупочной цене и эксплуатационных расходах. Перемешивающие устройства и систем аэрации можно легко заменять, адаптируя аппарат под специфические требования культуры.

KLF – маленькие лабораторные ферментёры, биореакторы, стерилизуемые на месте. Надежная и простая модель лабораторного ферментёра, биореактора со стеклянным цилиндром объёмом 2,4 л, 3,1 л,

или 3,7 л. Особенностью ферментёра, биореактора KLF является стерилизация *in situ*.

R'ALF – автоклавируемые лабораторные ферментёры и биореакторы. Объём сосуда 2,0, 3,7, 5,0 или 6,7 л. Новое поколение лабораторных ферментёров. Компактные удобные и эффективные аппараты. Система может включать в себя от одного до восьми соединенных вместе ферментёров R'ALF. Единое подключение воды, газа и энергоснабжения при индивидуальных системах контроля позволяет одновременно проводить несколько ферментаций[5].

Биореакторы LambdaMinifor имеют несколько емкостей с рабочим объёмом от 35 мл до 6 л. Ферментёры просты в использовании и позволяют контролировать все важные параметры процесса культивирования микроорганизмов.

Стеклянные емкости имеют до 8 горлышек с резьбой GL, которая позволяет легко и быстро крепить датчики и шланги с помощью пластиковых колпачков и зажимов. Емкости имеют большое центральное горло для крепления мешалки и системы аэрации. Семь боковых горл предназначены для установки датчиков и других элементов. Силиконовые уплотнения защищают среду от загрязнения.

Перемешивание в биореакторах производится с помощью вибрации: перемещении мешалки вверх и вниз. Мешалка имеет специальную конструкцию – несколько эластичных дисков крепятся на разной высоте, при движении вверх/вниз они создают эффект рыбьего хвоста в воде. Мешалка "рыбий хвост" обеспечивает очень эффективное перемешивание без образования воронок и завихрений (как у классических мешалок), снижает формирование пены. Мешалка данного типа – хорошее решение для клеточных культур. Частота вибраций (перемещений вверх/вниз) регулируется в широком диапазоне.

В ферментёрах Minifor используется новая система барботажа, которая не требует очистки. Распределитель сделан из специального силикона и имеет миниатюрные отверстия. Если воздух не подается в емкость, то отверстия закрыты, и они не загрязняются. Под давлением подаваемого воздуха отверстия открываются, и происходит аэрация культуры.

Другой особенностью ферментёров Minifor является система нагрева. Нагревательный элемент представляет собой спираль высокой мощности (но невысокой температуры), которая размещена в углублении блока нагрева. Тепло отражается от стенок и мягко нагревает емкость и среду, без локальных перегревов подобно солнечным лучам. Данный метод нагрева позволяет очень мягко контролировать нагрев среды. Для охлаждения среды в одно из горлышек крепится петля, в которую можно подать холодную воду.

Биореакторы серии DiaBench включают в себя классические лабораторные биореакторы из боросиликатного стекла с рубашкой или без для поддержания температуры. Благодаря универсальной конструкции их можно применять для культивирования микроорганизмов (бактерий, дрожжей, грибов, фототрофных организмов), клеток, биотоплива и пр. Биореакторы стерилизуются в автоклавах.

Биореакторы управляются с помощью PLC-контроллера с сенсорным дисплеем. Система полностью регулирует такие параметры, как pH, содержание кислорода, температуру, скорость перемешивания, уровень пены. Программное обеспечение DIA-NET обеспечивает полный контроль над процессом в режиме реального времени и может работать с несколькими системами (до 18 штук).

Контроллер позволяет подключать одновременно до 12 ферментёров. Каждый биореактор может управляться со своего дисплея, либо все реакторы будут управляться с единого. Для одного биореактора можно установить до 8 перистальтических насосов, работающих с переменной или постоянной скоростью, и до 8 расходомеров массы.

4.3. Система культивирования микроорганизмов – ферментёр (биореактор) BIOSTAT A (Sartorius, Германия)

Процессы культивирования лежат в основе большинства биотехнологических производств. Для осуществления этих процессов, помимо культуры микроорганизмов и питательной среды, необходима аппаратура для культивирования, позволяющая осуществлять контроль и управление, а также проводить все необходимые вспомогательные операции. Рассматриваемая лабораторная система BIOSTAT® A-MO показана на рисунке 4.3 и предназначена для культивирования микроорганизмов в ходе периодического процесса.

Назначение оборудования: данное оборудование используется для исследований по разработке и оптимизации процедур ферментации, а также для проведения процессов ферментации в условиях ограниченного объёма воспроизводимым способом. Благодаря контрольно-измерительной системе оборудование позволяет выполнять измерения в режиме реального времени, осуществлять контроль и оценку параметров процесса. Например, температуры, показателя pH, аэрации среды и т.д.



Рисунок 4.3 – Ферментёр BIOSTAT A производитель Sartorius (Германия)

Составные части оборудования: в состав системы для культивирования микроорганизмов BIOSTAT® A входят следующие элементы:

- **БЛОК УПРАВЛЕНИЯ**, включающий контроллер; модули аэрации биореактора воздухом и/или кислородом, а также модули перистальтических насосов, которые включают 3 внутренних встроенных перистальтических насоса пониженной нагрузки с контролем включения/выключения. Дополнительно можно подключать 1 внешний модуль перистальтического насоса, а также модули измерения и регулирования pH, температуры, уровня аэрации среды, уровня пенообразования.
- **БЛОК ОХЛАЖДЕНИЯ** – холодильный контур с контурами циркулирования воды для охлаждения конденсатора и охлаждающего штифта;
- **ГРЕЮЩАЯ ПЛАСТИНА** – пластина для подогрева культуральной жидкости;
- **СОСУД ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ** – стеклянный сосуд с одинарными стенками UniVessel® Glass с подставкой из нержавеющей стали, объём сосуда – 2 л;
- **КРЫШКА СОСУДА** – плоская крышка, выполненная из нержавеющей стали, с отверстиями и креплениями для датчиков,

разветвителей для подвода рабочих сред, устройств отбора проб, аэрации, удаления газов;

- ПРИВОД МЕШАЛКИ – верхний привод с двигателем;
- ОБОРУДОВАНИЕ УПРАВЛЕНИЯ – в рассматриваемом варианте – персональный компьютер (также возможно управление через ноутбук, планшет, смартфон);
- КОМПРЕССОР – используется для аэрации питательной среды при культивировании микроорганизмов в аэробных условиях.

Рассмотрим более подробно особенности строения и эксплуатации основных частей и блоков биореактора BIOSTAT® A на примере модификации MO.

4.3.1. Блок управления ферментёра BIOSTAT® A

На передней панели блока управления расположен главный выключатель «Mains» и три перистальтических насоса (рисунок 4.4).



Рисунок 4.4 – Блок управления системы BIOSTAT® A – MO, вид спереди

На задней панели блока расположены входы подачи газа (воздух/кислород), а также разъёмы для подключения двигателя мешалки, сетевого кабеля, холодильника, внешнего насоса, ноутбука (компьютера).

На боковой панели блока, как показано на рисунке 4.5, расположены сверху вниз разъёмы:

- выходов подачи газа (воздух/кислород) (Air/O₂);
- выходов подачи N₂ и CO₂ (у модели BIOSTAT® A – MO здесь установлены заглушки, данные выходы используются только в модификации BIOSTAT® A – CC);
- датчика измерения pH и температуры (pH);
- датчика растворённого кислорода (pO₂);
- датчика уровня пены (Foam);

- держателя одноразового сосуда (UniVessel® SU);
- датчика температуры для одноразового сосуда (Temp);
- подогревателя воздушных фильтров (Filter-heater);
- а также разъём для подключения кабеля греющей пластины (Heating Blanket).



Рисунок 4.5 – Блок управления системы BIostat® A – MO, вид сбоку

4.3.2. Перистальтические насосы

В оборудовании установлено три цифровых модуля перистальтических насосов WM 114 (рисунок 4.6). Модули перистальтических насосов нагнетают корректировочные и питательные среды через трубки в сосуд для культивирования (таблица 4.1).



Рисунок 4.6 – Модуль встроенного перистальтического насоса WM 114

Таблица 4.1 – Зависимость скорости потока жидкости от внутреннего диаметра трубок и скорости насоса

Тип насоса	Внутренний диаметр трубки, мм	Скорость потока (максимальная) для насоса WM 114*, мл/мин	Скорость потока (максимальная) для насоса 120U/DV**, мл/мин
WM 114 (фиксированная скорость 43 об/мин, 24 В постоянного тока)	0.5	0.9	1.0
	0.8	1.8	2.1
	1.6	6.0	7.3
	2.4	12.5	15.0
	3.2	20.2	24.0
	4.8	36.5	44.0

* скорость работы встроенного насоса WM114 фиксированная – 43 об/мин.

** данные приведены для средней скорости насоса 120U/DV Watson-Marlow – 52 об/мин.

Дополнительно может использоваться внешний перистальтический насос (рисунок 4.7). Подключается такой насос к соединению «Ext. Pump» («Внешний насос») блока управления системы BIOSTAT® A – MO, расположенному на задней поверхности блока.



Рисунок 4.7 – Внешний перистальтический насос 120U/DV Watson-Marlow

4.3.3. Блок охлаждения, греющая пластина и компрессор

Блок охлаждения служит для подачи охлаждающей воды в систему охлаждения BIOSTAT® A. Порядок подсоединения шлангов подачи и отведения охлаждающей жидкости между холодильником, конденсатором, штифтом охлаждения изображен на боковой панели блока охлаждения.

Важно: 1) следить за уровнем жидкости на боковой панели блока охлаждения, а при необходимости подливать дистиллированную воду через верхнее отверстие блока (рисунок 4.8); 2) следить, чтобы поводящие/отводящие шланги холодильника не были перекручены или отсоединены.



Рисунок 4.8 – Блок охлаждения системы BIOSTAT® A

Греющая пластина («термо-одеяло») представляет собой пластину, предназначенную для обогрева сосуда для культивирования (рисунок 4.9).

Важно: 1) греющую пластину закрепляют красной стороной к ёмкости для культивирования; 2) греющую пластину допускается подключать только после закрепления её на сосуде, заполненном питательной средой (рисунок 4.10), и только в предназначенный для этого гнездовой разъём («Heating Blanket») блока управления; 3) нельзя закреплять пластину сильнее, чем это позволяет форма сосуда; 4) необходимо следить, чтобы пластина была установлена на сосуде ровно, без складок и смятия; 5) при хранении пластину нельзя перегибать или складывать.

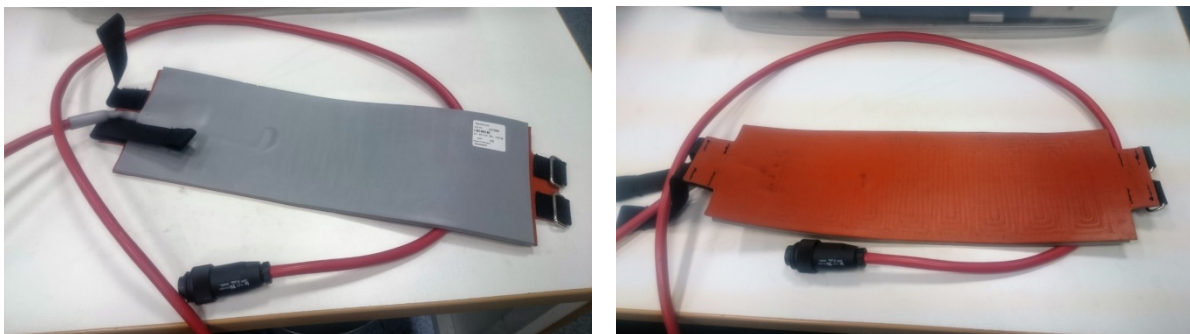


Рисунок 4.9 – Греющая пластина системы BIOSTAT® A

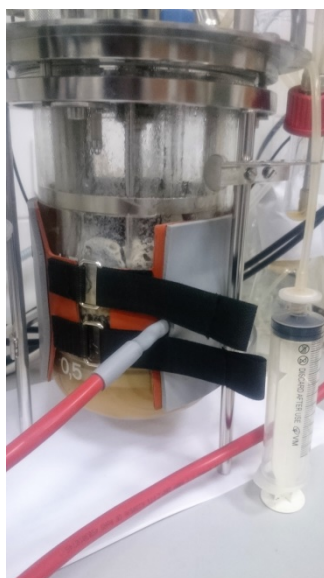


Рисунок 4.10 – Вид подключенной греющей пластины ферментёра BIOSTAT® A

Компрессор. Давление лабораторного источника подачи сжатого воздуха (рисунок 4.11) должно быть предварительно установлено на 1,5 атм. Давление в подводящих линиях сосуда ограничивается максимум 1атм с помощью предохранительных клапанов в модулях аэрации. Предохранительный клапан приоткрывается при $>0,8$ атм и полностью открывается при давлении 1 атм.

Важно: максимальная скорость аэрации для сосуда UniVessel® Glass, 2 л составляет 3,0 л/мин, более высокая скорость аэрации может привести к засорению выходного фильтра.



Рисунок 4.11 – Компрессор для подачи сжатого воздуха в систему BIostat® A

4.3.4. Сосуд для культивирования

Система культивирования BIostat® A комплектуется стеклянными сосудами UniVessel® Glass (рисунок 4.12) с одинарными стенками объемом 1, 2 или 5 л. Предусмотрена также возможность комплектования системы одноразовыми пластиковыми сосудами UniVessel® SU объемом 2 л (рисунок 4.14).

Важно: 1) необходимо осторожно обращаться с сосудами для культивирования – перемещать сосуд, заполненный средой для культивирования, можно только в специально предназначенной для этого подставке; 2) перед работой необходимо проверять сосуд на предмет его целостности и чистоты.



Рисунок 4.12 – Стеклянный сосуд для культивирования UniVessel® Glass

Как уже отмечалось, крышка сосуда – это плоская крышка, выполненная из нержавеющей стали, с отверстиями и креплениями для

вспомогательных датчиков и устройств. На ней установлен приводной двигатель вала мешалки на 200Вт (рисунок 4.13).



Рисунок 4.13 – Крышка ферментёра BIOSTAT® А с подключенным приводным двигателем

Важно: 1) учитывать допустимый диапазон вращений мешалки для каждого типа сосудов (так, для стеклянного сосуда UniVessel® Glass объёмом 2л этот диапазон составит 3-1100 об/мин); 2) перед присоединением/отсоединением двигателя необходимо убедиться, что оборудование выключено.

4.3.5. Оборудование управления и программное обеспечение

Локальное управление системой BIOSTAT® А можно осуществлять посредством:

- веб-браузера (Chrome) на подключаемом ноутбуке (компьютере);
- приложения App на планшете/смартфоне.

Пользовательские интерфейсы зависят от следующих условий:

- используемое оборудование управления (ноутбук, планшет или смартфон);
- модель оборудования (BIOSTAT® А-МО, BIOSTAT® А-СС);
- тип сосуда для культивирования (UniVessel® Glass, UniVessel® SU);
- конфигурация оборудования (стандартная, расширенная).

Пользовательский интерфейс представляет собой общую схему управляемого оборудования с символами, обозначающими сосуд для культивирования, компоненты сегмента аэрации, датчиков, насосов,

счетчиков дозровок и т.д. Расположение и количество символов зависит от используемого оборудования управления и показано на следующем примере (рисунок 4.13):

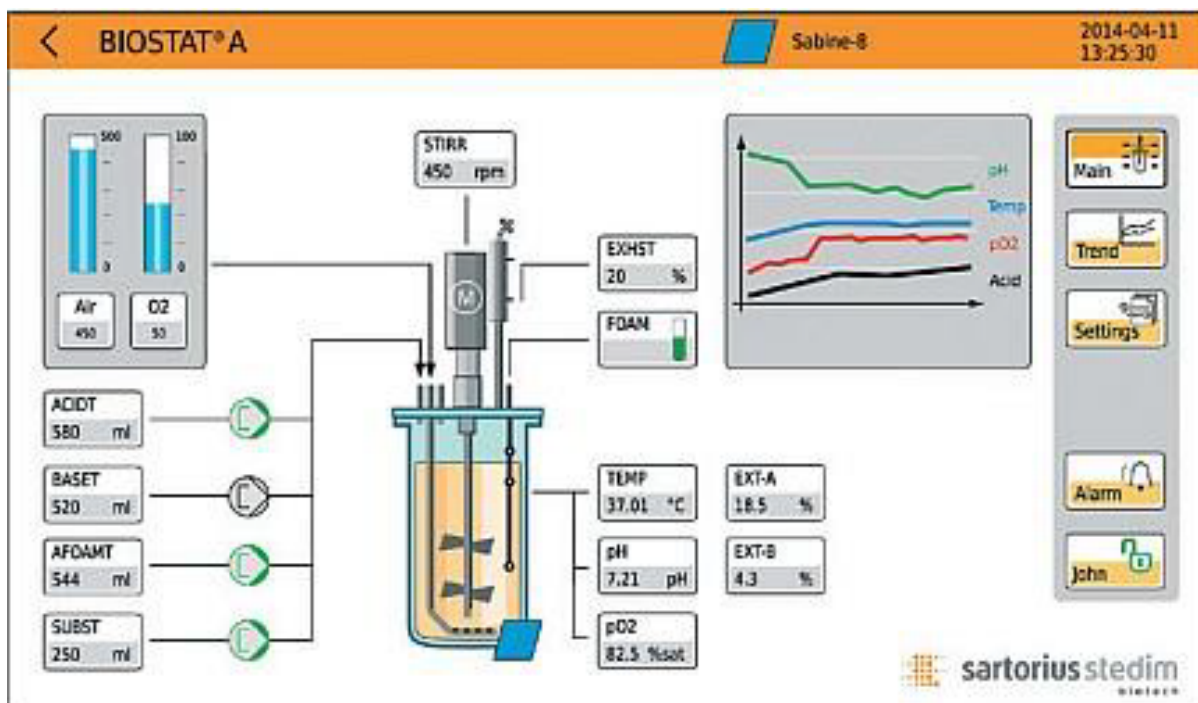


Рисунок 4.13 – Пользовательский интерфейс программного обеспечения системы BIOSTAT® A (вариант – UniVessel® Glass, 2-х газовый модуль, расширенная конфигурация)

Меню. Расположение панели меню зависит от используемого оборудования управления. Панель меню находится в нижней или боковой области пользовательского интерфейса. Панель меню содержит следующие основные кнопки (рисунок 4.14):



Рисунок 4.14 – кнопки панели меню пользовательского интерфейса

Таблица 4.2 – Основные функции кнопок панели меню

<p>Кнопка «Main» («Главное»)</p>	<p>Начальная страница со схематическим изображением сосуда для культивирования: – отображение элементов текущей конфигурации; – обзор измеренных значений и параметров процесса; –открытие меню контроллеров для элементов.</p>
<p>Кнопка «Trend» («Тренд»)</p>	<p>Отображение последовательностей процессов, выбор: – параметров процесса; – установок в контурах управления; – выводы контроллеров.</p>
<p>Кнопка «Settings» («Настройки»)</p>	<p>Базовые настройки системы, например: – диапазоны измерений параметров процесса; – ручное управление, например, вводами и выводами, контроллерами и т.д.; – внешняя связь (например, с принтерами, внешними компьютерами); – выбор, изменение конфигураций (только для пользователей, имеющих функции администратора).</p>
<p>Кнопка «Alarm» («Предупреждения»)</p>	<p>Обзорная таблица инициированных предупреждений: – при появлении предупреждений цвет символа изменяется, и раздается звуковой сигнал; – отображение красным цветом: в таблице сохраняются неподтвержденные предупреждения; – нажатием кнопки основной функции открывается меню общего обзора всех предупреждающих сообщений.</p>
<p>Кнопка «Login» («Вход в систему»)</p>	<p>Регистрация пользователя в системе.</p>

Меню контроллеров. Главный интерфейс (рисунок 4.13) открывается после включения блока управления. Касаясь элементов функций, можно выбирать требуемые меню контроллеров. Порядок работы с меню контроллера на примере показателя рН – «рН Controller» (рисунок 4.15).

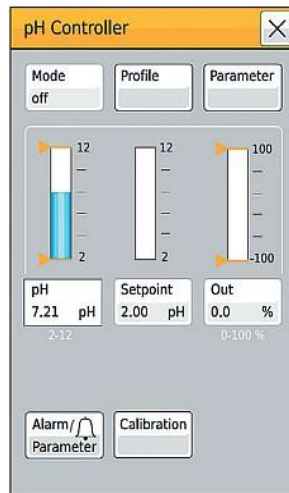


Рисунок 4.15 – Интерфейс контроллера показателя рН

Для получения доступа в меню контроллера показателя рН необходимо нажать на кнопку «рН» на главном интерфейсе (рисунок 4.13). В таблице 4.3 представлена расшифровка функций каждого поля меню контроллера показателя рН.

Меню калибровки. В меню контроллера датчика рН нажмите сенсорную кнопку «Calibration» («Калибровка»). Откроется меню рН-калибровки «Calibration рН» (рисунок 4.16).

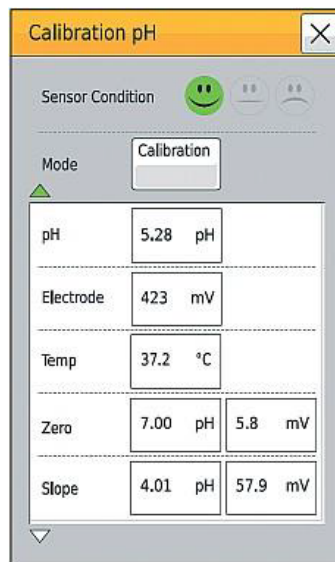


Рисунок 4.16 – Интерфейс меню рН-калибровки

Таблица 4.3 – Меню контроллера показателя рН

Поле	Индикация	Функция
Mode (режим)	off (выкл.)	контроллер выключен
	manual (ручной)	ручной доступ к выходу управления «Out»
	auto (автоматический)	управление на основе предопределенного значения
	profile (по профилю)	управление на основе введенного профиля значений
Profile (профиль)		ввод профиля значений показателя в зависимости от времени
Parameter (параметр)		изменение параметров управления
pH	7.21 pH	отображение текущего значения pH
SetPoint (установленное значение)	2.0 pH	конфигурирование заданного значения pH
Out (выход)	0.0%	конфигурирование выхода контроллера (автоматический режим)
Alarm Parameter (параметры предупреждений)		установка параметров предупреждений
Calibration (калибровка)		открытие меню калибровки

В таблице 4.4 представлены функции основных полей меню pH-калибровки.

Функции предупреждений. Предусмотрена возможность конфигурирования предупреждений о параметрах процесса с целью непрерывного контроля процесса. Если функция предупреждения включена, и параметр выходит за пределы предупреждения, инициируется и отображается предупреждение о параметре процесса.

Таблица 4.4. Меню рН-калибровки

Поле	Индикация	Функции
Sensor Condition (состояние датчика)*		отличное состояние датчика; можно продолжать культивирование с использованием датчика
		удовлетворительное состояние датчика; продолжать культивирование с использованием датчика ненадежно
		неудовлетворительное состояние датчика; продолжать культивирование с использованием датчика невозможно
Mode /Calibration (режим / калибровка)	Calibrate (калибровать)	выполнение калибровки
	Re-calib (перекалибровать)	выполнение повторной калибровки
	Zero-calib (калибровка нуля)	выполнение калибровки нуля
	Slope-calib (калибровка крутизны)	выполнение калибровки крутизны
pH / electrode / temp... (рН, электрод, температура...)		отображение значений датчика
* символы отображения состояния датчика защищены авторским правом компании «Knick Company»		

Включение/Выключение предупреждений:

- нажмите сенсорную кнопку «Alarm Parameter» («Параметры предупреждений») в меню соответствующего контроллера (рисунок 4.17);

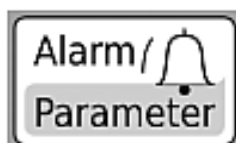


Рисунок 4.17 – Кнопка «Alarm Parameter» («Параметры предупреждений»)

- нажмите кнопку «disabled» («неактивно»), для того чтобы выключить передачу контроллером сигналов предупреждений (рисунок 4.18);
- нажмите кнопку «enabled» («активно»), для того чтобы включить передачу контроллером сигналов предупреждений (рисунок 4.18).



Рисунок 4.18 – Интерфейс вкладки «Alarm Parameter» («Параметры предупреждений»)

Настройка «передача контроллером сигналов предупреждений» по умолчанию выключена.

Для того чтобы задать пределы предупреждений необходимо:

- 1) нажать сенсорную кнопку «Alarm Parameter» в меню соответствующего контроллера;
- 2) нажать кнопку «Value», чтобы установить верхний и нижний предел предупреждения;
- 3) ввести значение для предела предупреждения в следующем окне (значение отображается на сером фоне сенсорной кнопки).

Управление доступом пользователей. Для управления системой пользователь должен зарегистрироваться и войти в систему. Каждый пользователь приписывается к одной из следующих групп: Guest (гость), User (пользователь), Administrator (администратор). Соответствующие логин и пароль для входа в систему пользователь получает в сервисной службе поставщика оборудования.

4.3.6. Проведение процесса культивирования

Основные стадии технологического процесса глубинного культивирования микроорганизмов представлены на рисунке 4.19.

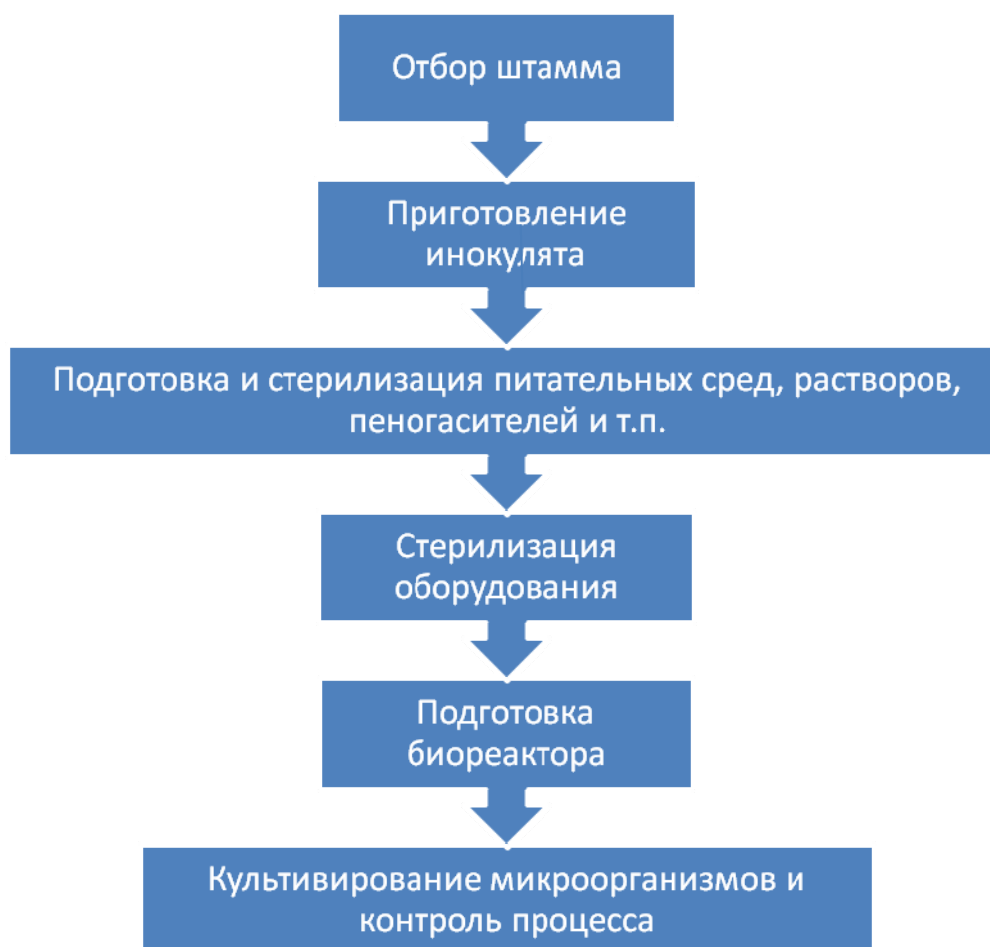


Рисунок 4.19. Стадии технологического процесса глубинного культивирования микроорганизмов.

Первые два этапа определяются целями и задачами планируемого эксперимента и здесь не описываются. На следующих трех этапах речь идёт о приготовлении и стерилизации питательных сред, растворов, пеногасителей, стерилизации оборудования и коммуникаций. Рассмотрим основные моменты, на которые стоит обратить внимание при подготовке к культивированию.

Заполнение сосуда для культивирования питательной средой

Если используется теплостойкая среда для культивирования, то необходимо просто наполнить сосуд для культивирования средой перед автоклавированием.

А если предполагается использовать нестойкую к высоким температурам среду для культивирования, то рекомендуется следующая последовательность операций:

- 1) залейте небольшое количество (приблизительно 200–300 мл) питательной среды в сосуд для культивирования и выполните автоклавирование сосуда;
- 2) после автоклавирования наполните сосуд для культивирования питательной средой;
- 3) убедитесь, что подается стерильная питательная среда.

Автоклавирование сосуда для культивирования и сопутствующих принадлежностей

При подготовке к автоклавированию проводят заполнение сосуда средой, установку и фиксацию крышки и всех вспомогательных коммуникаций, датчиков и устройств. Все промежуточные линии сосуда для культивирования, соединенные с погружными трубками, и шланг между впускным воздушным фильтром и распределяющей трубкой следует перекрыть с помощью шланговых зажимов (рисунок 4.20). Не перекрывают только трубку, соединяющую конденсатор и стерилизующий фильтр! Этот сегмент отвечает за удаление избытка воздуха и обеспечивает выравнивание давления внутри сосуда и атмосферного давления с сохранением стерильности.



Рисунок 4.20. Вид оборудования, подготовленного к автоклавированию

Автоклавирование сосудов для культивирования проводят при температуре 121°C. Время выдержки в автоклаве, необходимое для полной

стерилизации, определяется опытным путем. Для того чтобы обеспечить надежную стерилизацию (например, для полного уничтожения термофильных спор), в сосудах для культивирования необходимо поддерживать температуру стерилизации в течение минимум 30 минут.

Важно: 1) не допускать перекручивания линии вытяжки воздуха; 2) не использовать вакуумные автоклавы (по завершении стерилизации вакуум может привести к сильному вспениванию среды; попадание пены во впускные или выходные фильтры забивает их и нарушает функционирование).

Подготовка биореактора

После автоклавирования сосудов для культивирования необходимо переместить на рабочую поверхность и установить его рядом с блоком питания таким образом, чтобы обеспечить удобное подсоединение всех линий и периферийных устройств. Далее осуществите следующие операции:

- закрепите привод мешалки на валу мешалки. Для этого аккуратно поверните кожух двигателя влево или вправо до зацепления муфты двигателя с муфтой вала мешалки, плотно затяните установочный винт гильзы, после этого подключите привод к блоку управления;
- закрепите греющую пластину на сосуде для культивирования, после чего подключите разъем пластины к блоку управления;
- соедините датчики (температуры, pH, уровня пены) с оборудованием;
- соедините подводящие газовые линии с блоком управления, а модули аэрации с сосудом для культивирования;
- обеспечьте подачу корректирующих растворов, для чего установите промежуточные шланги в перистальтические насосы оборудования;
- подключите шланги холодильника к конденсатору и охлаждающему штифту в том порядке, который указан на боковой панели блока охлаждения;
- проверьте все линии, соединения и оборудование на предмет правильности подключения и отсутствия неисправностей;
- подключите блок управления, холодильник, источник сжатого воздуха и компьютер (ноутбук) в сеть, включите блоки кнопками на передних панелях;
- снимите зажимы со всех промежуточных линий сосуда для культивирования;
- соедините блок управления BIOSTAT® A с портом в ноутбуке (компьютере);
- в веб-браузере активируйте IP-адрес оборудования BIOSTAT® A – по умолчанию «192.168.0.250»; на экране появится начальная страница программного управления системы BIOSTAT® A;

– выберите функции измерения и контроля и задайте параметры, необходимые для реализуемого процесса.

Проведение культивирования

Поместите посевную микробную культуру в сосуд для культивирования. Далее выполняйте плановые действия и процедуры, в том числе отбор проб, так как это необходимо для контроля последовательности процесса. По завершении процесса выключите оборудование с помощью главного выключателя, извлеките культуру и поместите ее в следующую точку использования (масштабирование, обработку и т.д.). Оборудование после завершения процесса необходимо разобрать, вымыть и высушить элементы, находившиеся в контакте с питательной средой, вспомогательными растворами, датчики поместить в специальные растворы хранения.

Важно: при возникновении дополнительных вопросов по любому пункту вышеописанных операций или особенностям блоков и узлов, датчиков и программного обеспечения системы BIOSTAT® А обратитесь к инструкции по эксплуатации данной системы.

5. Лабораторные исследования

5.1. Изучение влияния условий выращивания на рост и размножение дрожжей в периодической культуре»

Периодическая культура или, по определению Перта, простая периодическая культура – это наиболее распространенный способ культивирования микроорганизмов в промышленности. В частности такой способ используют при накоплении чистой культуры дрожжей в бродильных производствах, а также на первых стадиях накопления биомассы на предприятиях, выпускающих пекарские дрожжи. В связи с тем, что этот способ не предполагает поступления свежей питательной среды и удаления биомассы в процессе культивирования, дрожжи растут и размножаются, проходя определенный цикл развития. Последовательность стадий (или фаз, роста) описывается кривой роста (рисунок 5.1). В периодической культуре на кривой роста можно выделить около 6 фаз размножения клеток.

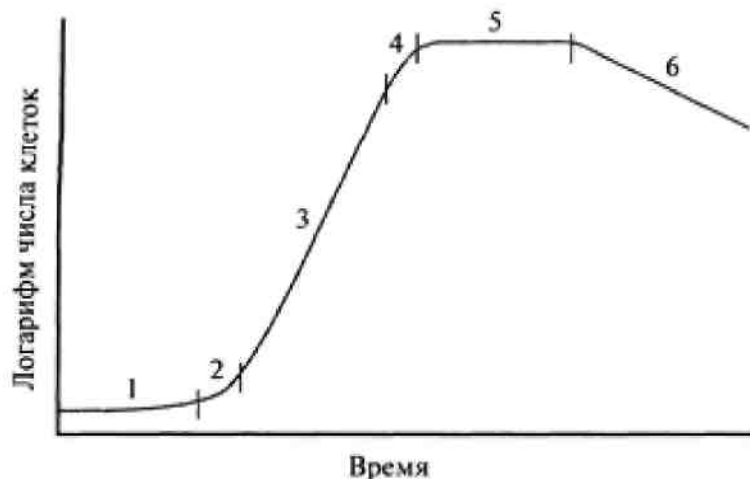


Рисунок 5.1 – Кривая роста культуры при периодическом культивировании

1 фаза (лаг-фаза) протекает с момента внесения клеток в питательную среду до начала их размножения. Длительность этой фазы зависит от физиологического состояния дрожжей и дозы посевного материала. В этот период происходит синтез ферментов, увеличивается количество рибосом, содержание ДНК и РНК в клетках. В этот период увеличивается масса клеток, а не их количество. В неблагоприятных условиях может наблюдаться уменьшение концентрации дрожжей в среде.

2 фаза, или фаза ускоренного роста, характеризуется продолжением биосинтеза макромолекул и началом размножения клеток

3 фаза называется экспоненциальной, или логарифмической. В этот период клетки размножаются с максимальной скоростью роста. Этот процесс идет до тех пор, пока не возникнет дефицита питательных компонентов или ингибирующих размножение клеток метаболитов, например этанола.

4 фаза, или фаза замедления роста (фаза отрицательного ускорения), скорость прироста биомассы снижается, что приводит к снижению потребления кислорода, понижению действия дыхательных ферментов.

5 фаза – стационарная фаза. Клетки имеют иной химический состав, меньше по размеру, содержат меньше РНК и менее чувствительны к физическим и химическим воздействиям, чем в экспоненциальной фазе. В стационарной фазе количество биомассы остается постоянным, размножение дрожжей практически прекращается.

6 фаза – фаза отмирания. Причинами отмирания может быть накопление в субстрате большого количества токсичных продуктов метаболизма и, конечно, истощение самой среды в питательных веществах.

5.2. Показатели, характеризующие рост и размножение клеток

При изучении процесса размножения рассчитывают удельную скорость роста и время удвоения биомассы. Кроме того, при контроле процесса по концентрации клеток определяют константу скорости деления клеток и время, необходимое для одного цикла деления.

Удельная скорость представляет собой важную характеристику процесса культивирования и рассчитывается по формуле 5.1:

$$\mu = \ln \frac{x}{x_0} \tau^{-1} \quad (5.1)$$

где μ - прирост биомассы в единицу времени на единицу биомассы, ч⁻¹;

X_0 – биомасса в момент засева, г или г/дм³;

X – биомасса дрожжей через время τ , г или г/дм³;

τ – длительность процесса культивирования, ч.

Соответственно, время удвоения клеточной массы (τ_d) составляет:

$$\tau_d = \ln 2 / \mu, \text{ ч.} \quad (5.2)$$

В том случае, когда процесс контролируется по концентрации дрожжевых клеток в популяции, масса которых, как правило, различается в разных фазах (стадиях кривой роста), развития клеток, рассчитывают число клеточных делений за 1 ч или константу скорости деления (ν , ч⁻¹) и время, необходимое для одного цикла деления (g)

$$\nu = \frac{\ln N - \ln N_0}{\ln 2 \cdot \Delta \tau} \quad (5.3)$$

N_0 – количество клеток при начале засева;

N – количество клеток через время τ ;

$\Delta \tau$ – период времени, выбранный для определения константы скорости деления клеток (длительность процесса культивирования), ч.

Соответственно,

$$g = 1 / \nu, \text{ ч} \quad (5.4)$$

В период экспоненциальной стадии роста клетки размножаются с одинаковой скоростью, равной μ_{\max} , что следует из уравнений 5.1 и 5.2.

$$X = X_0 e^{\mu_{\max} \tau} \quad (5.5)$$

где X_0 (D_0) – концентрация клеток (биомасса) в момент засева, млн

клеток/мл (г или г/дм³);

μ_{\max} – максимальная удельная скорость роста, ч⁻¹;

τ – длительность процесса культивирования, ч;

e – основание натурального логарифма.

При логарифмировании этого уравнения получаем уравнение 5.2

$$\ln X = \ln X_0 + \mu_{\max} \tau. \quad (5.6)$$

где μ_{\max} – максимальная скорость роста биомассы, ч⁻¹;

X_0 – биомасса в момент засева, г или г/дм³;

X – биомасса дрожжей через время τ , г/дм³ или г;

τ – длительность процесса культивирования, ч.

В микробиологии практике при количественном определении прироста биомассы применяют нефелометрические измерения. Это очень удобный метод. Но при исследовании дрожжевых организмов следует учитывать их отличительные свойства от бактериальных. Это в первую очередь больший размер, гетерогенность по размеру клеток и характеру почкования.

5.3. Методы исследования

5.3.1. Исследование морфологии клеток различных дрожжей

Для оценки физиологического состояния посевного материалы оценивают его морфологию. Для этого используют метод «раздавленной» капли: на поверхность обезжиренного предметного стекла микробиологической петлей наносят каплю суспензии исследуемой культуры дрожжей, например, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces fragilis* или *Brettanomyces bruxellensis* из жидкой питательной среды, при необходимости добавляют каплю красителя. Затем осторожно покрывают покровным стеклом каплю так, чтобы между покровным и предметным стеклами не было пузырьков воздуха, и жидкость не выступала за края покровного стекла. Изучают морфологические особенности каждой культуры: форму и размеры клеток, характер размножения, наличие вакуолей и липидных включений, количество неактивных и мертвых клеток. Фотографируют препараты.

5.3.2. Определение концентрации клеток

При определении концентрации клеток в инокуляте или при культивировании дрожжей используют счетную камеру Горяева. Для этого камеру покрывают покровным стеклом и притирают его к боковым пластинкам камеры до образования радужных колец Ньютона. Покровное

стекло притирают, чтобы обеспечить высоту слоя исследуемой жидкости 0,1 мм. Точность определения количества клеток зависит от того, насколько плотно покровное стекло прилегает к поверхности камеры. Затем каплю исследуемой суспензии, после тщательного перемешивания, помещают под покровное стекло, после чего счетную камеру помещают на столик микроскопа и совмещают поле зрения с сеткой. Ее легче находить при увеличении в 400 раз (окуляр 10, объектив 40). При этом увеличении в поле зрения микроскопа 16 квадратов, входящие в один большой квадрат (рисунок 5.2).

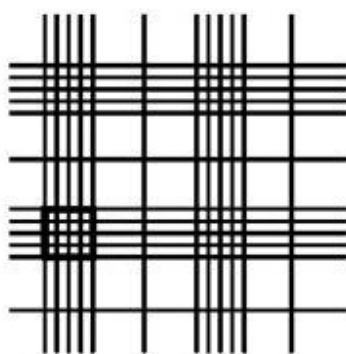


Рисунок 5.2 – Фрагмент сетки счётной камеры Горяева

Суспензию дрожжей готовят из расчета содержания количества клеток в одном большом квадрате не более 30. Разведение популяции учитывают при расчете концентрации дрожжей в культуральной жидкости, поэтому этот показатель должен быть зафиксирован. Например, если плотность популяции в ферментёре достаточно велика, готовят разведение в 10 раз (1 см³ культуральной жидкости + 9 см³ водопроводной воды или 0,9% раствор NaCl).

Подсчитывают клетки, расположенные в большом квадрате. К ним добавляются, находящиеся на пограничных линиях, но только если они большей частью находятся внутри квадрата. Клетки, разделенные линией как бы пополам, считают только на двух граничащих областях.

Подсчитывают клетки в пяти больших квадратах, находящихся в углах и по центру сетки. Большой квадрат во всех счетных камерах имеет объем 1/250 мм³, следовательно, объём пяти квадратов равен 5/250 мм³. Чтобы определить количество клеток в 1 см³ (или 1000 мм³) исследуемой суспензии, среднюю сумму количества клеток в пяти больших квадратах умножают на пятьдесят тысяч (50000).

В 1 см³ дрожжей суспензии удобно можно определить число клеток по формуле:

$$X = A * 50\,000 * B \quad (5.7)$$

где А — сумма клеток в пяти больших квадратах;
В — разведение суспензии дрожжей;
50 000 — коэффициент пересчета объёма пяти больших квадратов на 1 см³.

Для подсчета клеток можно использовать другую формулу, позволяющую выразить полученный результат сразу в млн клеток/см³:

$$X = \Sigma n * K / 20 \quad (5.8)$$

где Σn — сумма клеток в 5 больших квадратах камеры;
К — разбавление популяции.

5.3.3. Определение биомассы весовым методом

Приборы и материалы:

- сушильный шкаф;
- бюксы, высушенные до постоянной массы;
- центрифуга;
- пипетка на 10 см³;
- цилиндр на 10 см³;
- стеклянная палочка.

Ход определения. Из ферментёра пипеткой отбирают 10 см³ культуральной жидкости, помещают в центрифугу. Обработывают 10 мин при скорости 5000 об/мин. Затем сливают надосадочную жидкость и дистиллированной водой из цилиндра (5 см³) стеклянной палочкой промывают осадок, оставшиеся 5 см³ воды используют для смыва находящихся на палочке дрожжей (количественный метод). После этого снова центрифугируют 10 мин при скорости 5000 об/мин. Далее дрожжи мерно, как указано выше, переносят в бюкс с известной массой. Бюкс помещают в сушильный шкаф и сушат до постоянной массы при 105 °С в течение не менее 10 ч.

5.3.4. Определение содержания неассимилируемого (формольного) азота в культуральной жидкости

Дрожжи используют для синтеза биомассы азот аминокислот и аммиачный азот (NH_4^+). Для определения количества неусвоенного азота (формольного азота или формольного числа) в культуральной жидкости используют метод формольного титрования. Суть метода заключается в том, что формалин реагирует с аминогруппами аминокислот и ионами (NH_4^+). Образующиеся метиленаминокислоты и серную кислоту оттитровывают щелочью.

Приборы и материалы:

- центрифуга;
- конические колбы на 250 см³;
- цилиндр на 100 см³;
- бюретка;
- 0,1н. раствор гидроксида натрия;
- 40% раствор формалина, нейтральный;
- раствор фенолфталеина;
- дистиллированная вода.

Ход определения. 10 см³ бражки, полученной после центрифугирования 30 см³ культуральной жидкости, разбавляют дистиллированной водой (90 см³) и титруют 0,1 н. раствор гидроксида натрия с фенолфталеином до слабо-розового окрашивания. Затем в ту же колбу цилиндром наливают 5 см³ нейтрального 40 %-го раствора формалина и титруют 0,1н. раствором гидроксида натрия до слабо-розового окрашивания.

Количество (см³) 0,1н. раствора гидроксида натрия, пошедшего на титрование, называется формольным числом (A_1). Это величина относительная. Чтобы выразить формольное число в абсолютных цифрах используют формулу:

$$N=A_1 * 0,0014 \quad (5.9)$$

Где N – количество усвояемого азота, г;
0,0014 – коэффициент, соответствующий содержанию азота в 1 см³ 0,1 н NaOH, г /см³.

5.4. Постановка опыта

Приготовление питательной среды

Солодовое сусло получают с пивоваренного завода.

Приборы:

Для определения сухих веществ в среде используется рефрактометр Index instrument PTR46, или сахарометр.

Ход приготовления.

Для культивирования дрожжей используют стерильное сусло с массовой долей сухих веществ 12% (СВ₁).

В том случае, когда содержание сухих веществ в сусле более 12% (СВ₂), необходимо его развести, используя уравнение 5.10. Количество внесенной воды (V_{H₂O}) для разбавления плотного сусла рассчитывается по формуле 5.11.

$$V_1 \cdot \rho_1 \cdot СВ_1 = V_2 \cdot \rho_2 \cdot СВ_2 \quad (5.10)$$

Где V₁ = 100 см³;

ρ₁ – плотность 12% сусла 1,0489;

СВ₁ = 12%;

V₂ – объём сусла с содержанием СВ₂;

ρ₂ – относительная плотность исходного сусла;

СВ₂ – содержание сухих веществ в исходном сусле, %.

$$V_{H_2O} = V_1 - V_2 \quad (5.11)$$

Солодовое сусло в количестве 100 см³ с соблюдением условий асептики вносят в стерильную колбу с ватной пробкой вместимостью 500 см³.

Перед началом культивирования определяют формольный азот по методике, приведенной в разделе 5.3.4.

Приготовление инокулята (посевного материала)

Объект исследования – образцы биомассы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.

Приборы:

– весы (точность измерения до 0.001 г);

– для подсчета концентрации Камера Горяева;

– для определения содержания сухих веществ в биомассе

используется влагомер

Ход приготовления.

Величина засева составляет 0,5 об% (т.е. 0,5 г в 100 см³) в расчете на абсолютно сухие дрожжи (100% СВ: АСБ). Для расчета необходимого для засева количества дрожжей определяют содержание сухих веществ (СВ) в образцах дрожжей, предложенных для исследования (СВд), затем проводят расчет количества АСБ дрожжей, которые следует внести в питательную среду. Для этого используют уравнение:

$$0,5 \times 100 = X \times \text{СВ}_d. \quad (5.12)$$

Например, было установлено, что содержание сухих веществ в прессованных дрожжах составляет 30%, тогда количество инокулята, которое вносится в питательную среду, будет составлять:

$$0,5 \times 100 / 30 = 1,67 \text{ г} \quad (5.13)$$

После внесения дрожжей определяют концентрацию клеток в камере Горяева. Затем после внесения инокулята записывают объём жидкости в колбе.

5.5. Культивирование дрожжей и обработка полученных результатов

Приборы:

- для культивирования дрожжей: термостат;
- для определения сухих веществ в среде: рефрактометр Index instrument PTR46, или сахарометр;
- для определения рН: титратор Tirino plus 848;
- для определения прироста биомассы дрожжей используют весы (точность измерения 0,001 г).

Ход приготовления. Культивирование дрожжей осуществляют в течение 3 ч при температуре 30 °С.

По истечении 3 часов измеряют объём культуральной жидкости (V_k), затем из нее отбирают 10 см³ для определения концентрации биомассы (см. п. 5.3.3) и 5 см³ для определения концентрации клеток (см. п.5.3.2).

Затем в культуральной жидкости определяют величину рН, содержание сухих веществ по сахарометру с учетом поправки на температуру (таблица 5.1) и содержание неассимилируемого азота (формальное число, п. 4).

Результаты вносят в таблицы 5.2-5.4. Рассчитывают экономический коэффициент (таблица 5.3) и показатели, характеризующие динамику процесса (таблица 5.4).

Таблица 5.1. Поправка на показание сахарометра
в зависимости от температуры измерения

Температура среды	Показания сахарометра, %			
	5	10	12	14
От показания сахарометра отнять				
18				
19				
К показанию сахарометра прибавить				
21	0,05	0,06	0,06	0,06
22	0,11	0,11	0,11	0,12
23	0,16	0,17	0,18	0,18
24	0,22	0,23	0,23	0,24
25	0,28	0,30	0,30	0,31
26	0,34	0,36	0,37	0,37
27	0,40	0,42	0,43	0,44
28	0,47	0,49	0,50	0,51
29	0,57	0,56	0,57	0,58
30	0,61	0,63	0,64	0,65

Таблица 5.2. Результаты опыта

Показатели		Значения	
Объем среды, см ³	начальный, (V _о)		
	конечный (V _к)		
Величина pH	начальная		
	конечная		
Сухие вещества в среде, %	начальное (СВ _н)		
	конечное (СВ _к)		
Плотность среды ρ, кг/м ³	Начальная		
	Конечная		
Концентрация клеток, млн клеток /мл	Начальная (X _о)		
	Конечная (X _к)		
Дрожжи, г АСБ, 10 см ³	Начальная (D _о)		
	Конечная (D _к)		
Формольный азот, см ³	Начальная (A _о)		
	Конечная (A _к)		

5.6. Определение экономического коэффициента

Глубину истощения субстрата оценивают по количеству потребленных углеводов. Эффективность использования сахаридов определяется по величине экономического коэффициента. Этот показатель имеет важное значение, т.к. определяет эффективность процесса и себестоимость полученных дрожжей. Экономический коэффициент (Y), или выход биомассы, рассчитывают путем деления урожая биомассы ($D_k - D_o$, г АСБ) на количество потребленного субстрата (сахаридов ΔS) и выражают в %.

$$Y = (D_k - D_o / \Delta S) * 100 \quad (5.14)$$

где D_k – количество биомассы в конце процесса культивирования, г АСБ;

D_o – величина засева, г АСБ.

Для определения выхода биомассы в конце эксперимента объём жидкости в колбе доводят до начального значения (V_n , см³). Затем дрожжи хорошо перемешивают (не должно быть осадка) и отбирают 10 см³ культуральной жидкости с дрожжами. Содержание АСБ определяют путем высушивания до постоянной массы (A , г АСБ в 10 см³).

Количество биомассы в конце процесса культивирования рассчитывают по формуле:

$$D_k = V * C \quad (5.15)$$

Где V – объём культуральной жидкости в конце процесса культивирования (дм³);

C – концентрация дрожжей, г АСБ /10 см³.

Для расчета концентрации учитываем тот факт, что для определения АСБ из культуральной жидкости было отобрано 10 см³ (см. методика 3):

в 10 см³ – A г АСБ;

в 1000 см³ – C г АСБ;

$C = 1000 \times A / 10 = 100A$.

Таблица 5.3 – Определение экономического коэффициента потребления углеводов

Вариант опыта	Биомасса (D), г АСБ $D \times V/10$		Прирост дрожжей ($\Delta D = D_k - D_o$), г АСБ	Потребленные углеводы ($\Delta S = СВ_n - СВ_k$), %	Экономический коэффициент, $\Delta D/\Delta S \cdot 100, \%$
	D_k	D_o			

Для определения константе скорости деления клеток используются данные, приведенные в таблице 5.4. Расчет проводят по формуле (5.3).

Таблица 5.4

Вариант опыта	Концентрация клеток, млн/мл		Длительность процесса культивирования, ч	Константа скорости деления клеток (ν), ч ⁻¹
	X_k	X_n		

Литература.

1. Мезенова, О.Я. Биотехнология рационального использования гидробионтов [Электронный ресурс]: учеб. — Электрон. дан. — Санкт-Петербург: Лань, 2013. — 416 с. — Режим доступа: <https://e.lanbook.com/book/13096>. — Загл. с экрана.
2. Меледина, Т.В. Физиологическое состояние дрожжей [Электронный ресурс]: учеб. пособие / Т.В. Меледина, С.Г. Давыденко, Л.М. Васильева. — Электрон. дан. — Санкт-Петербург: НИУ ИТМО, 2013. — 48 с. — Режим доступа: <https://e.lanbook.com/book/71157>. — Загл. с экрана.
3. Перт, С. Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток / пер. с англ. Петровой Т.А., Позмоговой И.Н. - М.: Мир, 1978. — 330с.
4. Меледина, Т.В. Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*. Морфология, химический состав, метаболизм: учебное пособие [Электронный ресурс]: учеб. пособие / Т.В. Меледина, С.Г. Давыденко. — Электрон. дан. — Санкт-Петербург: НИУ ИТМО, 2015. — 88 с. — Режим доступа: <https://e.lanbook.com/book/91493>. — Загл. с экрана.
5. Просеков, А.Ю. Современные методы исследования сырья и биотехнологической продукции [Электронный ресурс]: учеб. пособие / А.Ю. Просеков, О.О. Бабич, С.А. Сухих. — Электрон. дан. — Кемерово: КемТИПП, 2012. — 115 с. — Режим доступа: <https://e.lanbook.com/book/4679>. — Загл. с экрана.
6. Бегунов, А.А. Методы и средства аналитических измерений [Электронный ресурс]: учеб. пособие / А.А. Бегунов, А.А. Коваль. — Электрон. дан. — Санкт-Петербург: НИУ ИТМО, 2012. — 128 с. — Режим доступа: <https://e.lanbook.com/book/40702>. — Загл. с экрана.
7. Бастраков, В.М. Метрология: учебное пособие [Электронный ресурс]: учеб. пособие — Электрон. дан. — Йошкар-Ола: ПГТУ, 2016. — 288 с. — Режим доступа: <https://e.lanbook.com/book/93227>. — Загл. с экрана.
8. ГОСТ Р 57095-2016 «БИОТЕХНОЛОГИИ Термины и определения (Biotechnology. Terms and definitions) М.: Стандартинформ, 2016 Режим доступа: <http://docs.cntd.ru/document/1200139551> . — Загл. с экрана.
9. ГОСТ Р 57007-2016 Наилучшие доступные технологии. Биологическое разнообразие. Термины и определения (Best available techniques. Biodiversity. Terms and definitions. М.: Стандартинформ, 2016 Режим доступа: <http://docs.cntd.ru/document/1200136903> — Загл. с экрана.
10. РМГ 29-2013 РЕКОМЕНДАЦИИ ПО МЕЖГОСУДАРСТВЕННОЙ СТАНДАРТИЗАЦИИ Государственная система обеспечения единства измерений. МЕТРОЛОГИЯ. Основные термины и определения. (State system for ensuring the uniformity of measurements. Metrology. Basic terms

and definitions) Минск, 2013. Режим доступа <http://docs.cntd.ru/document/1200115154>. - Загл. с экрана.

11. ГОСТ Р 8.563-2009 Методики (методы) измерений. State system for ensuring the uniformity of measurements. Procedures of measurements. М.: Стандартиформ, 2010 – Режим доступа <http://docs.cntd.ru/document/1200077909> — Загл. с экрана.

12. Федеральный закон «Об обеспечении единства измерений». от 26.06.2008 N 102-ФЗ (ред. от 13.07.2015) — Загл. с экрана.

13. ГОСТ 8.417-2002 Государственная система обеспечения единства измерений. ЕДИНИЦЫ ВЕЛИЧИН. (State system for ensuring the uniformity of measurements. Units of quantities). М.: Стандартиформ, 2002 Режим доступа <http://docs.cntd.ru/document/1200031406> — Загл. с экрана.

Миссия университета – генерация передовых знаний, внедрение инновационных разработок и подготовка элитных кадров, способных действовать в условиях быстро меняющегося мира и обеспечивать опережающее развитие науки и технологий и других областей для содействия решению актуальных задач.

КАФЕДРА ПИЩЕВОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ ПРОДУКТОВ ИЗ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ

Кафедра организована 1986 году для обеспечения высококвалифицированными кадрами предприятий пищевой промышленности. За три десятилетия было подготовлено более 2000 специалистов. Выпускники кафедры всегда востребованы пищевой индустрией. В 2016 году кафедра была в числе победителей конкурса «Звездные кафедры» ИТМО TOP CHAIRS. Учащиеся и преподаватели многократно побеждали в профессиональных конкурсах различного уровня.

Обучение ведется по линии бакалавриат – магистратура – аспирантура.

Состав кафедры:

- 5 докторов наук;
- 9 кандидатов наук;
- 3 профильные лаборатории;
- 300 студентов и аспирантов

На кафедре функционируют международные научно-производственные учебные центры по хлебопечению и производству напитков.

Кафедра проводит научно-исследовательские работы фундаментального и прикладного характера в области пищевой биотехнологии продуктов из растительного сырья. Подготовлено более 50 кандидатов и докторов наук. Сейчас на кафедре вместе российскими гражданами учатся представители нескольких зарубежных стран: Белоруссии, Ганы, Египта, Казахстана, Молдовы, Руанды, Сирии, США, Таджикистана, Украины.

Меледина Татьяна Викторовна
Иванова Вера Анатольевна
Федоров Александр Валентинович

**АППАРАТУРНО-МЕТОДИЧЕСКАЯ БАЗА ЭКСПЕРИМЕНТОВ В
ОБЛАСТИ ПИЩЕВОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ ПРОДУКТОВ ИЗ
РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ**

Учебное пособие

В авторской редакции

Редакционно-издательский отдел Университета ИТМО

Зав. РИО

Н.Ф. Гусарова

Подписано к печати

Заказ №

Тираж

Отпечатано на ризографе