

менных и действий оператора разработана SPADA-система на базе КОНТАР АРМ, предоставляющая четыре вида мнемосхем, одна из разработанных мнемосхем – видеокадр данных в биофилт্রে – представлена на рисунке 1.

В настоящее время система обеспечивает стабилизацию температур в трёх аппаратах, поддержание значения показателя рН в двух аппаратах, контроль уровней среды в трёх аппаратах, удалённое управление двумя электродвигателями и отсечными клапанами. Система обладает запасом аппаратных возможностей для некоторого увеличения количества информационных каналов каждого типа (температура, 4 – 20 мА, сухой контакт, оптопара).

Работы по монтажу и пуску системы показали, что она может быть в короткие сроки демонтирована/смонтирована на месте новой дислокации.

#### Литература

1. ГОСТ Р 8.625-2006. Государственная система обеспечения единства измерений. Термометры сопротивления из платины, меди и никеля. Общие технические требования и методы испытаний.

### **Повышение точности количественного анализа культуральной жидкости на содержание нестойких компонентов с помощью тонкослойной хроматографии**

к.т.н. доц. Зубов Д.В., Солтанлы Н.М.  
Университет машиностроения  
8(499) 267-07-82, nauka@msuie.ru

*Аннотация.* Разработана система количественного анализа культуральной жидкости на содержание нестойких или быстроокисляющихся компонентов. Создана модель процесса и использующий её программно-технический комплекс. Проведено испытание системы для анализа культуральной жидкости на содержание астаксантина. Даны рекомендации для снижения погрешности анализа.

*Ключевые слова:* тонкослойная хроматография, количественный анализ, биотехнология, нестойкие компоненты.

Для текущего контроля биотехнологического производства необходимо помимо контроля технологических параметров (температура, давление, концентрация растворённого кислорода, величина показателя рН) анализировать содержание в культуральной среде собственно продуктов биосинтеза (например антибиотиков или аминокислот). Ввиду широкой номенклатуры получаемых методом биосинтеза продуктов в настоящее время представляется нереальным изготовление специализированных датчиков на каждый из продуктов. Сложный состав среды, часто – повышенное давление, требования к стерилизуемости датчиков вынуждают использовать отборы среды с её последующим химическим анализом.

В качестве быстрого метода качественного анализа часто применяется метод тонкослойной хроматографии (ТСХ), который позволяет быстро обнаруживать малые количества веществ (0,1-0,005 мкг). Суть метода состоит в том, что на хроматографическую пластинку наносят пробы разбавленной культуральной жидкости и индивидуальных веществ, край пластинки погружают в растворитель, который под действием капиллярных сил движется вдоль слоя сорбента и с разной скоростью переносит компоненты проб, что приводит к их пространственному разделению. После хроматографирования пластинку сушат и опрыскивают соответствующим проявителем, в результате чего компоненты смеси проявляются в виде окрашенных пятен, по положению, окраске и размеру которых можно судить о качественном и количественном составе пробы. Помимо проб с неизвестным составом на пластинку наносят пробы с известной концентрацией анализируемого вещества – так называемые свидетели.

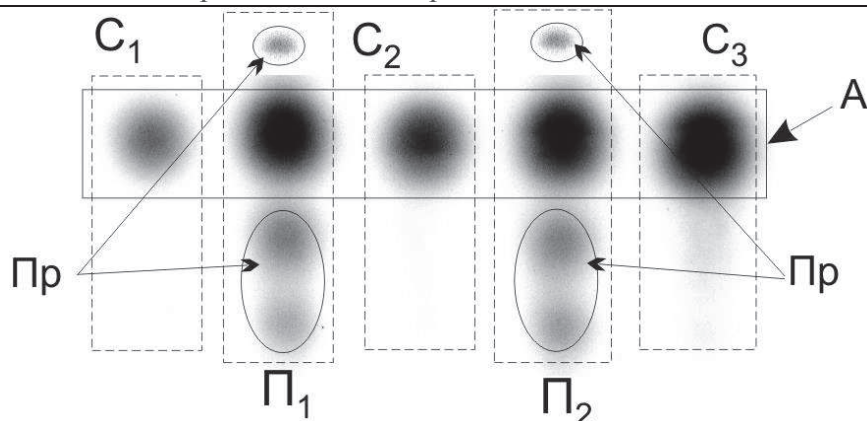


Рисунок 1. Схема изображения проявленной хроматографической пластины

На рисунке 1 приведена схема проявленной хроматографической пластинки: P 1, P 2, P 3 – области, соответствующие стандартам; Пр – области, соответствующие примесям; П<sub>1</sub>, П<sub>2</sub> – области, соответствующие пробам; А – область, соответствующая анализируемому веществу.

Для количественного анализа пробы нами была разработана модель окрашенности пикселя хроматограммы. Основные допущение при построении модели:

1. Определяемое вещество полностью реагирует с окрашивающим реагентом.
2. Слой определяемого вещества достаточно тонок, но окрашенные частицы нижележащих слоёв полностью закрываются вышележащими.
3. Окрашивающий реагент равномерно (с равной вероятностью по каждому субпикселю) распределяется по всему пикселю.
4. Окраска пикселей пятна монотонно зависит количества содержащегося в соответствующей области поверхности пластины окрашивающего компонента и эта зависимость в координатах «количество вещества – интенсивность окраски» выпукла вверх, т.е. должна удовлетворять удовлетворяющая условиям: конечное значение производной  $dI/dN$  при  $N=0$  и  $\lim_{N \rightarrow \infty} I = I^{\max}$ . Здесь:  $I$  – интенсивность окраски,  $N$  – количество вещества в зоне хроматографической пластины, соответствующей пикселю отсканированного изображения,  $I^{\max}$  – параметр модели, максимальная интенсивность окраски чистого вещества.

Были сформулированы условия физической реализуемости, подобраны удовлетворяющие им функции и разработаны методы их параметрической идентификации по результатам обработки фрагментов изображения пятен-свидетелей, разработано программное обеспечение, позволяющая анализировать отсканированные изображения проявленных пластин.

Обычно метод ТСХ применяется для количественного или полуколичественного анализа, но применение математической обработки отсканированной хроматограммы позволило достигнуть точности определения 5-7% для ряда веществ: эритромицин А (антибиотик), L-лизин (аминокислота), мальтоза (дисахарид) [1].

Обычно метод ТСХ применяется для количественного или полуколичественного анализа, но применение математической обработки отсканированной хроматограммы позволило достигнуть точности определения 5-7% для ряда веществ: эритромицин А (антибиотик), L-лизин (аминокислота), мальтоза (дисахарид) [1].

Нами была предпринята попытка применить эту методику для анализа культуральной среды на содержание астаксантина (каротиноид). Поскольку астаксантин в ходе биосинтеза накапливается внутри клеток продуцента (дрожжей *Phaffia rhodozyma*) клетки предварительно разрушали баллистическим способом с использованием стеклянных шариков диаметром 0,2-0,5 мм и осуществляли экстракцию с помощью этилового спирта. В качестве сорбента использовался силикагель, нанесенный на стеклянные пластинки тонким слоем. Детектирование пятен при этом проводилось без использования реагентов по естественной окраске самого астаксантина (ярко оранжево-красный). Для приготовления стандартных растворов используется образец – спиртовой раствор астаксантина с заведомо известной концентрацией (определенной методом ВЭЖХ). На рисунке 2 приведено изображение отсканированной

хроматограммы образцов культуральной жидкости на содержание астаксантина.

Однако, оказалось что астаксантин имеет ряд существенных особенностей, препятствующих его анализу:

1. Концентрация астаксантина в экстракте мала и, соответственно, пятно на хроматограмме получается бледным.

2. При контакте с кислородом воздуха астаксантин быстро окисляется, обесцвечиваясь.

Проведённая серия экспериментов показала, что даже яркое пятно (полученное с помощью спиртового раствора астаксантина значительно большей концентрации, чем ожидается в реальном процессе) за 10 минут обесцвечивается настолько, что при сканировании с глубиной цвета 24 бит/пиксел практически не обнаруживается. Дополнительные трудности связаны с неодновременным нанесением проб на пластинку и, соответственно, разным временем контакта с воздухом.

Для решения этих проблем предложено наносить на одно и то же место на пластинке не по одной, а по несколько капель последовательно в порядке прямо и обратно, т.е. некоторое конкретное пятно будет сформировано из капли нанесённой на него при прямом и капли при обратном ходе. Например, самое левое пятно будет состоять из самой старой и самой свежей капли.

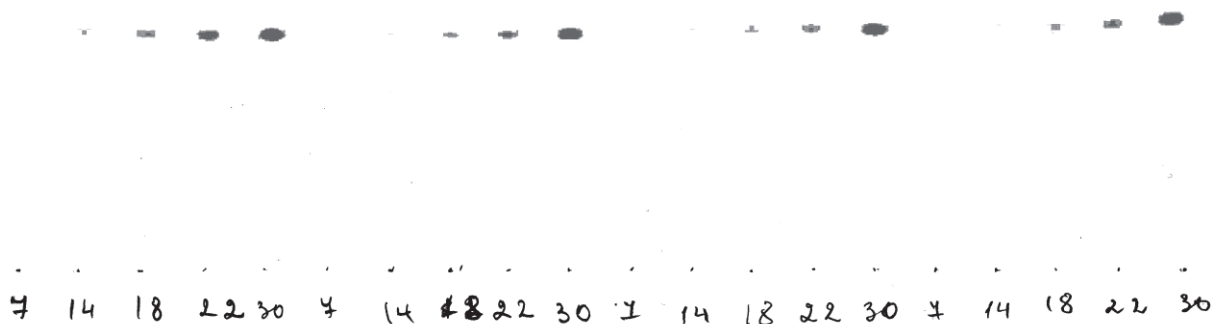


Рисунок 2. Пример отсканированной хроматограммы астаксантина

Для корректного учёта процесса обесцвечивания проявленной хроматограммы была построена математическая модель процесса обесцвечивания: хроматограмму сканировали (с отключенными инструментами улучшения качества изображения) с периодом в 30 секунд до полного обесцвечивания пятен хроматограммы, после чего строили зависимости изменения интенсивности окраски фиксированных пикселей от времени. Полученные зависимости аппроксимировали с помощью экспоненциального закона по методу наименьших квадратов:

$$I(t) = I_0 e^{-t/t_e},$$

где  $I(t)$  – текущая интенсивность окраски в момент времени  $t$ ;

$I_0$  – интенсивность окраски в начальный момент времени (при первом сканировании);

$t_e$  – параметр модели.

Полученная зависимость позволяет провести коррекцию интенсивности окраски пикселей и снизить погрешность, возникающую из-за того, что пиксели сканируются не одновременно, а построчно, с заметной задержкой, в результате которой пиксели, расположенные ближе к нижнему краю хроматограммы – успевают обесцветиться.

Проведённые опыты на образцах с известной концентрацией (определённой методом ВЭЖХ) показали снижение погрешности анализа.

Таким образом, за счет применения математической обработки можно существенно повысить точность анализа с помощью метода тонкослойной хроматографии, снизить влияние

### Литература

1. Парамонов Е.А., Зубов Д.В. Применение компьютерной обработки изображения для повышения точности анализа методом тонкослойной хроматографии // Инженерная физика. – 2008 №4 – с.53–58.

### **Выявление трофических потребностей *Fusarium sambucinum* для синтеза белковых веществ в условиях жидкофазного глубинного культивирования**

Неманова Е.О., к.т.н. Русинова Т.В., к.б.н. доц. Горшина Е.С., д.т.н. проф. Бирюков В.В.  
Университет машиностроения  
8(499)267-12-06

*Аннотация.* В статье определены источники углерода (глюкоза, мальтоза) и азота ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ), наиболее эффективно обеспечивающие синтез белковых веществ штаммом-продуцентом в условиях жидкофазного глубинного культивирования. Выбрано основное сырье для разработки технологии получения высокобелковой биомассы на основе *Fusarium sambucinum* шт. D-104.

*Ключевые слова:* микопротеин, жидкофазное глубинное культивирование, сырой протеин, *Fusarium sambucinum*.

Одними из наиболее востребованных объектов современной пищевой биотехнологии являются грибные штаммы продуценты. Сочетание технологических преимуществ, широкого спектра синтезируемых метаболитов, а также отсутствия токсичности делает возможным получение целого ряда различных биотехнологических продуктов на их основе. Одним из таких продуктов является *микопротеин* (пищевая биомасса мицелиальных грибов, полученная методом жидкофазного глубинного культивирования) на основе *Fusarium sambucinum* шт. D-104. Высокая пищевая ценность микопротеина и ряд фармакологических свойств позволяют отнести этот продукт к разряду продуктов здорового питания.

Основным сдерживающим фактором в разработке промышленной технологии получения микопротеина на основе *Fusarium sambucinum* шт. D-104 является отсутствие научных основ направленного биосинтеза высокобелковой биомассы сложным эукариотическим организмом.

Принципиальное значение для синтеза белковых веществ и накопления биомассы штаммом-продуцентом имеет характер источников углеродного и азотного питания. В связи с этим целью данной работы являлось изучение влияния различных источников углерода и азота на синтез белковых веществ и накопление биомассы *F. sambucinum* шт. D-104 в условиях жидкофазного глубинного культивирования.

### Материалы и методы

В работе использовали штамм *Fusarium sambucinum* Fuck.var. *ossiculum* (Berk. et Curt.) Bilai шт. D-104, депонированный в коллекции ВКПМ под номером F-1161 (заявка на патент РФ № 2012138568) [1].

При расчете состава сред в экспериментах по изучению утилизации различных источников углерода и азота использовали эквивалентные по углероду количества сахаров и эквивалентные по азоту количества азотистых соединений в соотношении С : N = 8 : 1 [2].

Влияние источника углерода на рост и накопление биомассы и белковых веществ в глубинных условиях изучали в конических колбах V=250 мл с объемом среды 100 мл следующего состава (г/л):  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  – 3,0;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1,2;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,2;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,01; тиамин – 100γ; pH = 5,6 – 5,8. В качестве источников углерода в экспериментах сравнивали глюкозу, мальтозу, фруктозу, сахарозу, ксилозу, галактозу, раффинозу, лактозу. Влияние источников