



Про лимонную кислоту и способы ее получения

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ
ПО ОРГАНИЗАЦИИ УРОЧНОЙ И ВНЕУРОЧНОЙ
ДЕЯТЕЛЬНОСТИ В РАМКАХ МОДУЛЯ

АВТОРЫ УРОКА:

Федотова А.А.

АССИСТЕНТ КАФЕДРЫ БИОТЕХНОЛОГИИ ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России

Колодязная В.А.

КАНДИДАТ БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК, ЗАВЕДУЮЩАЯ КАФЕДРОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ, ДОЦЕНТ ФГБОУ ВО СПХФУ
МИНЗДРАВА РОССИИ

Для возраста

10-11 класс

Трудоемкость

2 час



htweek.ru



Основные сведения

Цитрусовые плоды, виноград, кисломолочные продукты человек использовал в питании с древних времен. После того как биохимики установили, что в этих продуктах присутствуют **лимонная, винная и молочная кислоты**, было организовано их промышленное производство. С тех пор эти кислоты стали вводить в пищевые продукты для придания им кислого вкуса.

С помощью **микробиологического синтеза** можно получать почти все органические кислоты, и они считаются более предпочтительными, чем синтезированные химическим путем.

В настоящее время только **шесть кислот производятся микробиологическим синтезом в промышленных масштабах:**

- лимонная,
- итаконовая
- глюконовая
- оксиглюконовая
- уксусная
- молочная

В наибольших количествах в мире выпускается именно лимонная кислота.

Дорожная карта урока

Название	Про лимонную кислоту и способы ее получения.		
Смысл	Идея урока заключается в знакомстве учеников с биотехнологией: такими понятиями, как продуцент биологически активных веществ, микробиологический промышленный синтез. На занятии ученики приобретут теоретические знания о важности роли лимонной кислоты, участвующей в биохимических реакциях человеческого организма. Приобретут навыки работы в лаборатории и смогут самостоятельно провести опыт определения общей кислотности раствора.		
Ключевые слова	Лимонная кислота, продуцент, микробиологический синтез		
Возраст, число участников	Возраст – 10-11 классы, количество участников от 7 до 15 человек. Форма организации – групповая работа.		
Ресурсное обеспечение	Компьютер/ноутбук, проектор, экран, штатив с бюреткой для титрования, колбы конические на 250 мл, пипетки стеклянные на 1 или 5 мл, мерный цилиндр на 50 мл, штатив с бюреткой для титрования, 0,1н раствор NaOH, 1% раствор фенолфталеина (индикатор), вода очищенная.		
Этап и время	Что делает организатор?	Что делают участники?	Ресурсное обеспечение, необходимое оборудование, необходимые реактивы
Структура занятия			
Урок 1.			
Шаг 1. Погружение учеников в теоретические аспекты темы занятия 30 минут	Погружение учеников в тематику занятия: Теоретическая мини-лекция, проводимая преподавателем по основным понятиям.	Проводят тематическую дискуссию, касающуюся основных понятий: продуцент, биохимический и промышленный путь синтеза лимонной кислоты. Самостоятельно предлагают способы получения лимонной кислоты.	Ноутбук/компьютер, проектор, презентация
Шаг 2. Интерактивная игра	Преподавателем подготавливается раздаточный материал,	Ученикам предлагается, используя раздаточные	Ноутбук/компьютер, проектор, презентация, раздаточный

30 минут	объясняется задача и регламентируется время на выполнение	материалы по группам составить принципиальную схему получения лимонной кислоты, после чего провести тематическую дискуссию, сравнить результаты групп и ознакомиться с корректной схемой, которая выводится учителем после обсуждения.	материал
Урок 2.			
<p>Шаг 1. Практический этап. Проведение эксперимента по установлению общей кислотности культуральной жидкости (модельного раствора)</p> <p>60 минут</p>	Описывает методику определения общей кислотности раствора согласно представленному описанию	Выполняют определение общей кислотности раствора в группах по 2-3 человека, фиксируют полученные данные в журнале	штатив с бюреткой для титрования, колбы конические на 250 мл, пипетки стеклянные на 1 или 5 мл, мерный цилиндр на 50 мл, штатив с бюреткой для титрования, 0,1н раствор NaOH, 1% раствор фенолфталеина (индикатор), вода очищенная.

Сценарий урока

Урок 1.

При подготовке к уроку необходимо:

1. Скачайте презентацию «Про лимонную кислоту и способы ее получения».
2. Ознакомьтесь с сопроводительным текстом к слайдам презентации.

Шаг 1. Погружение учеников в теоретические аспекты темы занятия (20-25 минут)

Ресурсное обеспечение: Ноутбук/компьютер, проектор, презентация

Преподавателю предлагается следовать той структуре урока, представленной в презентации (слайд 2), сопровождающий текст будет указан далее.

Слайд 3-4: Введение

Цитрусовые плоды, виноград, кисломолочные продукты человек использовал в питании с древних времен. После того как биохимики установили, что в этих продуктах присутствуют **лимонная, винная и молочная кислоты**, было организовано их промышленное производство. С тех пор эти кислоты стали вводить в пищевые продукты для придания им кислого вкуса.

С помощью **микробиологического синтеза** можно получать почти все органические кислоты, и они считаются более предпочтительными, чем синтезированные химическим путем.

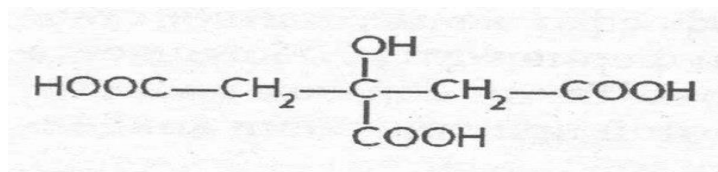
В настоящее время только **шесть кислот производятся микробиологическим синтезом в промышленных масштабах:**

- лимонная,
- итаконовая
- глюконовая
- оксиглюконовая
- уксусная
- молочная

В наибольших количествах в мире выпускается именно лимонная кислота.

Слайд 5-7: Немного теории

Лимонная кислота - $C_6H_8O_7$ - это трехосновная оксикислота.



Из водных растворов она кристаллизуется с одной молекулой воды в виде бесцветных прозрачных кристаллов. Свое тривиальное название эта кислота получила от названия citrusовых плодов, в которых она была впервые обнаружена.

Лимонная кислота благодаря своим физико-химическим свойствам и вкусовым качествам широко используется во многих отраслях промышленности. Она прекрасный хелатирующий (комплексообразующий) агент, что позволяет использовать ее в процессах электрогальваники, дублении кож, окраске тканей, приготовлении чернил, очистке паровых котлов, изготовлении синтетических моющих средств. Используется лимонная кислота в химической промышленности, в частности, при производстве алкидных смол, а ее эфиры служат пластификаторами при изготовлении лаков.

Лимонная кислота как пищевая добавка (кодифицированный номер Е 330) успешно используется в пищевой индустрии, главным образом, благодаря её хорошей растворимости, низкому уровню токсичности, безвредности для окружающей среды и хорошей совместимости с другими веществами и ингредиентами. Это эффективный регулятор кислотности, консервант, диспергатор, антиоксидант и комплексообразователь. Поэтому мировое производство лимонной кислоты из года в год возрастает. Объемы её производства в мире составляют более 1400 тысяч тонн в год, емкость российского рынка – около 30 тыс. тонн в год. Основные страны производители этого продукта – Китай, США, Австрия.

Лимоны и апельсины были главными источниками естественной (растительной) лимонной кислоты, которую производили преимущественно в Италии, где в середине XIX в. начали действовать первые заводы по производству кристаллической лимонной кислоты. Затем аналогичные предприятия были введены в строй в Калифорнии (США), Франции, Бельгии и Чехословакии.

Слайд 8: Предложите свои способы получения лимонной кислоты

Примечание: Пусть учащиеся разделяться в группы по 2-3 человека и проведут дискуссию в течение 2-3 минут на тему возможных способов получения лимонной кислоты. Каждая группа предложит свой вариант, сравнит с вариантами других групп, после чего позже в ходе урока мы уже рассмотрим принципиальную схему получения лимонной кислоты.

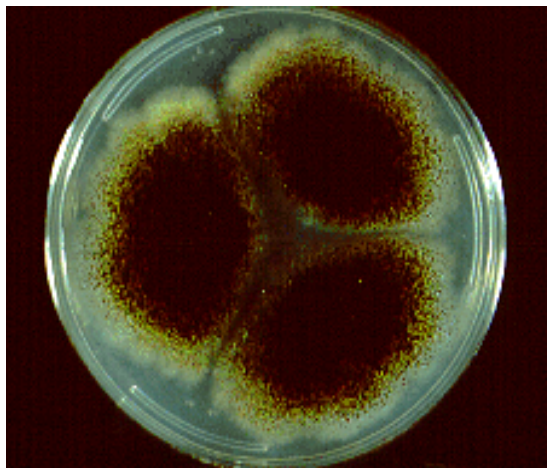
Слайд 9-11: Продуцент

Кто такой продуцент?

Главным звеном биотехнологического процесса является биообъект. К биообъектам относятся микроорганизмы, клетки, ткани и органы растений и животных, изолированные из клеток структуры (ферменты, ДНК, РНК и др.), макроорганизмы (растения, животные), вирусы и др.

Но чаще всего в качестве биообъектов используют клетки. Клетки биообъектов, образующие нужный биотехнологический продукт, называют «продуцентами».

Продуцент лимонной кислоты.



Лимонную кислоту синтезируют представители различных таксономических групп микроорганизмов – микромицеты, дрожжеподобные грибы, бактерии.

В промышленном производстве лимонной кислоты, в основном, используют микромицет ***Aspergillus niger***. Эффективность биотехнологического процесса (микробиологического синтеза или ферментации) во многом зависит от наличия у производителя высокопродуктивного штамма - продуцента лимонной кислоты. Он должен

отвечать современным научным критериям и, в первую очередь, иметь высокую скорость кислотообразования, обладать высокой степенью превращения источника углерода в лимонную кислоту, быть генетически однородным и стабильным, не являться патогенным по отношению к человеку и окружающей среде.

Этим требованиям отвечают селекционированные штаммы микромицета *Aspergillus niger*, полученные в результате ступенчатого мутагенеза, которые, в отличие от природных штаммов обладают сверхсинтезом целевого продукта и высокой способностью адаптироваться к изменению условий культивирования, в частности к модификации и изменению состава питательной среды.

Производство лимонной кислоты с использованием микробиологического синтеза основано на ферментации с использованием продуцента микромицета ***Aspergillus niger***. **Именно такой метод позволяет значительно увеличить выход конечного продукта в сравнении с производством с помощью химического синтеза.**

Слайд 12-13: Микробиологический синтез

Биотехнологи искусно используют живые биологические организмы, их системы и процессы, применяя научные методы генной инженерии, с целью создания новых сортов продуктов, растений, витаминов, лекарственных средств, а также улучшения свойств существующих видов в растительной и животной среде, устойчивых к неблагоприятным климатическим условиям, вредителям и болезням.

Биотехнологи научились использовать маленьких помощников для получения нужных продуктов, продуцент лимонной кислоты не исключение!

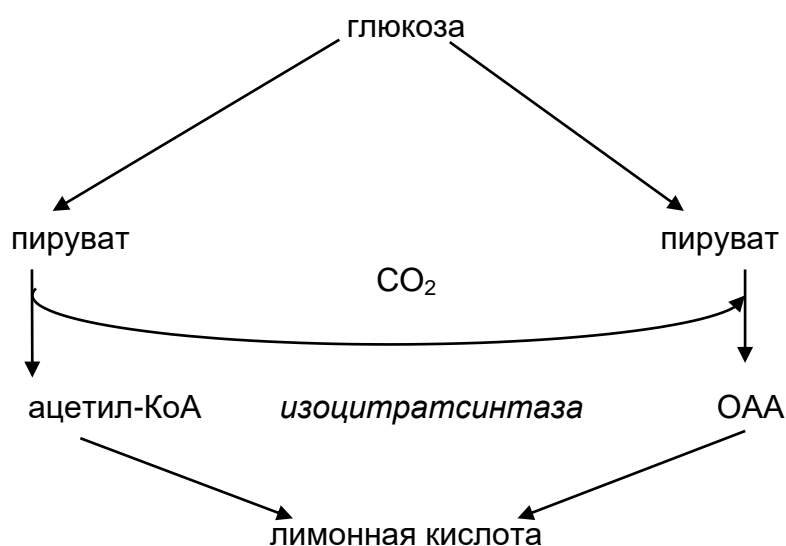
Слайд 14-16: Механизм синтеза лимонной кислоты

Известному ученому Хансу Кребсу принадлежит одно из самых замечательных открытий в биохимии. Он показал, что **лимонная кислота является ключевым соединением аэробного обмена веществ (цикл трикарбоновых кислот, цикл Кребса).**

Цикл трикарбоновых кислот практически универсален — это главный, если не единственный, путь окисления во всех тканях высших животных, у большинства аэробных микроорганизмов и во многих растительных тканях.

В биохимии лимонная кислота является промежуточным звеном метаболического цикла трикарбоновых кислот и играет важную роль в системе биохимических реакций клеточного дыхания множества живых организмов.

Клетка расходует синтезируемую лимонную кислоту (цитрат) на образование различных метаболитов в ЦТК, включает её в сложную цепь взаимосвязанных биохимических превращений.



Микробные клетки, как и клетки растений и животных, в нормальных физиологических условиях **не синтезируют избытки метаболитов**. Они образуют их ровно столько, сколько им необходимо для поддержания своей жизнедеятельности.

У продуцента лимонной кислоты *Aspergillus niger* за счет изменения условий культивирования и соотношения индукции/репрессии генов в геноме клетки, сформировались механизмы, которые приводят к накоплению избытка метаболита в клетке и выделению его в среду.

Этот процесс, называемый **сверхсинтезом** того или иного метаболита, широко используется в биотехнологии для получения целевых продуктов, имеющих промышленное значение. К таким продуктам относится и лимонная кислота.

Шаг 2. Интерактивная игра «Принципиальная схема получения лимонной кислоты»

Ресурсное обеспечение: Ноутбук/компьютер, проектор, презентация, раздаточный материал

1. Продолжайте использовать презентацию «Про лимонную кислоту и способы ее получения» (слайд 17 и далее).
2. Ознакомьтесь с раздаточным материалом в файле «Интерактивная игра_принципиальная схема получения лимонной кислоты».
3. Предварительно подготовьте раздаточный материал: вырежьте прямоугольники с обозначением стадий получения лимонной кислоты, а также овалы, обозначающие вещества, используемые на данной стадии/вспомогательное оборудование для стадии, перемешайте раздаточный материал.

В данной игре ученикам предлагается в группах по 2-3 человека попробовать составить в логическом порядке принципиальную схему получения лимонной кислоты. Стадии, обозначенные прямоугольниками, рекомендуется располагать вертикально по порядку, а вещества, входящие в состав стадии вокруг прямоугольника.

Будьте внимательны! Некоторые овалы могут быть лишними. Преподавателю рекомендуется заранее ознакомиться с правильной схемой получения.

Временное ограничение на выполнение в группе – 15 минут.

Тематическая дискуссия и обсуждение результатов групп – 10 минут.

Ознакомление с корректной схемой (выводится преподавателем на экран, слайды презентации «Про лимонную кислоту и способы ее получения» **18-22**) – 5 минут.

Урок 2.

При подготовке к уроку необходимо:

1. Проведите вводный инструктаж для детей перед проведением практической работы.
3. Предварительно подготовьте рабочее место для выполнения эксперимента, согласно материально техническому обеспечению урока.

4. Ученикам рекомендуется подготовить тетради для записи материалов урока, заполнения протокола эксперимента, а также разделиться на группы по 2-3 человека для удобства выполнения практической работы.

Шаг 1. Практический этап. Проведение эксперимента по установлению общей кислотности культуральной жидкости (модельного раствора)

Примечание: Предложите ученикам вспомнить, что было пройдено на прошлом уроке, освежите в памяти принципиальную схему получения лимонной кислоты. Задайте вопрос на какой стадии образуется продукт (культуральная жидкость), который будет проанализирован в ходе практической работы.

При необходимости вернитесь к слайдам 18-22 презентации «Про лимонную кислоту и способы ее получения», где отражена корректная принципиальная схема получения лимонной кислоты.

Ответ: культуральная жидкость образуется на стадии микробиологического синтеза (ферментации) – смотри методическое описание в практической работе.

Ресурсное обеспечение: штатив с бюреткой для титрования, колбы конические на 250 мл, пипетки стеклянные на 1 или 5 мл, мерный цилиндр на 50 мл, штатив с бюреткой для титрования, 0,1н раствор NaOH, 1% раствор фенолфталеина (индикатор), вода очищенная.

Методическое описание и инструкции к выполнению практической работы:

Культуральная жидкость – это жидкость, образующаяся в процессе ферментации и содержащая клетки продуцента, остатки питательной среды, метаболиты, главным из которых является **целевой продукт**.

Культуральная жидкость после окончания ферментации гриба *Asp.niger* представляет собой смесь лимонной, щавелевой и глюконовой кислот, несброженного сахара, минеральных примесей и мицелия продуцента.

Раздельное определение органических кислот основано на различной растворимости их кальциевых солей в воде и слабокислом растворе. Лимоннокислый кальций очень слабо растворим в горячей воде и хорошо растворим в разбавленной соляной кислоте. Щавелевокислый кальций практически нерастворим ни в воде, ни в слабом растворе соляной кислоты. Глюконовокислый кальций хорошо растворим в воде.

На данном занятии мы определим общую кислотность культуральной жидкости, полученной в ходе процесса ферментации с помощью аналитического метода - титрования.

Методика выполнения

1. Определение общей кислотности в культуральной жидкости.

В чистую коническую колбу на 250 мл помещают 3 мл **испытываемой пробы***, добавляют 20 мл воды очищенной и в качестве индикатора 3-4 капли фенолфталеина. Полученный раствор титруют 0,1н раствором едкого натра до появления розовой окраски, сохраняющейся в течение 1-2 минут.

Расчет общей кислотности раствора С (г/л) проводят по формуле:

$$C_{\text{общ}} = \frac{V_{\text{NaOH}} * C_{\text{NaOH}} * M_{\text{л.к.}}}{3 * V_{\text{ф-та}}},$$

где $C_{\text{общ}}$ – общая кислотность, г/л (перевести в массо-объемные %);

V_{NaOH} – объем раствора NaOH, израсходованного на титрование, в мл;

C_{NaOH} – концентрация раствора NaOH, моль/л;

$M_{\text{л.к.}}$ – молекулярная масса лимонной кислоты моногидрата, г/моль (210 г/моль);

$V_{\text{пр.}}$ – объем пробы, взятой для титрования, мл;

3 – количество NaOH, реагирующее с 1 моль лимонной кислоты.

Кислотность раствора рассчитывается по лимонной кислоте, поскольку в культуральной жидкости на ее долю приходится до 90-95% от общей суммы кислот.

В качестве испытываемой пробы ученикам предлагается использовать предварительно приготовленный учителем **модельный раствор культуральной жидкости содержащий **определенно заданную концентрацию лимонной кислоты**.*

****Можно также рассмотреть возможность определения общей кислотности раствора лимонного сока, полученного из обычного цитрусового (выдавить сок из лимона) и сравнить эти два показателя**

Полученные результаты ученикам предлагается внести в таблицу:

№ пробы	Описание внешнего вида культуральной жидкости	Значение общей кислотности	Примечания

--	--	--	--

Самооценка результатов образования

Пожалуйста, ответьте на вопросы. Опираясь на систему оценивания, подсчитайте общее количество баллов.

Ответ «да» – 5 баллов

Ответ «скорее да» – 3 балла

Ответ «скорее нет» – 1 балл

Ответ «Нет» - 0 баллов

Чему я научился	Моя самооценка
1. Узнал новые термины: биообъекты, лимонная кислота, продуцент, сверхсинтез	Да Скорее да Скорее нет Нет
2. Узнал формулу лимонной кислоты, ее свойства и сферы использования	Да Скорее да Скорее нет Нет
3. Узнал о важной роли лимонной кислоты в цикле трикарбоновых кислот	Да Скорее да Скорее нет Нет
4. Познакомился с микробиологическим синтезом биологически активных веществ	Да Скорее да Скорее нет Нет
5. Освоил методику определения общей кислотности раствора	Да Скорее да Скорее нет Нет
6. Приобрел навыки работы с лабораторной посудой и реагентами	Да Скорее да Скорее нет Нет
7. Произвел расчет общей кислотности и сравнил полученные результаты в группе и между групп	Да Скорее да Скорее нет Нет

30-35 баллов блестяще! Вы в совершенстве усвоили содержание модуля.

20-29 баллов вы отлично поработали и усвоили большую часть предложенного материала, спасибо!

15 – 19 баллов неплохо! Надеемся, вы узнали немало интересного и ещё вернётесь к темам, затронутым в модуле.

10 – 14 баллов спасибо за старание!

0 – 9 баллов возможно, вам стоит попробовать поработать с этим материалом ещё раз - чуть позже.

Заключение

Теоретические знания и практический опыт, полученный учениками в ходе урока, позволит наглядно продемонстрировать взаимосвязь фундаментальных знаний биотехнологии с прикладным использованием продуцентов биологически активных веществ для биосинтеза полезных продуктов.

В разнообразии учебных дисциплин СПХФУ, как на уровне бакалавриата, специалитета, так и магистратуры отводятся отдельные практические занятия по биотехнологии.

Блок о СПХФУ

Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия появилась благодаря усилиям классика мировой химической науки, профессора Д.И. Менделеева.

Учредительное заседание временного совета Петроградского химико-фармацевтического института состоялось 12 августа 1919 года. Тогда же были утверждены основные кафедры и первый устав института. В том составе институтского совета состояли выдающиеся учёные, академики В. Л. Комаров, Л. А. Орбели, Г. А. Надсон. Известный сторонник высшего образования для фармацевтов профессор А. С. Гинзберг стал первым директором института. Официальной датой открытия ВУЗа стало 22-ое октября 1919 года.

В 1990 г. ЛХФИ переименован в СПХФИ. А 24 апреля 1996 г. приказом Министерства здравоохранения и медицинской промышленности РФ СПХФИ переименован в СПХФА (Санкт-Петербургскую государственную химико-фармацевтическую академию).

В 2018 году СПХФА переименован в СПХФУ (Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет).

Сегодня СПХФУ — крупнейшее в России образовательное учреждение в области фармации.

Миссия Университета — осуществление целенаправленной подготовки высококвалифицированных, социально ответственных и востребованных как в России, так и за рубежом специалистов, основанной на единстве среднего профессионального, высшего и дополнительного профессионального образования, и научно-исследовательской деятельности для отраслей, обеспечивающих здоровье

сбережение нации, по следующим направлениям: химия, фармация, химическая и биотехнологии, медицинские технологии, экологическая безопасность, контроль качества пищевых продуктов.

СПХФУ осуществляет подготовку высокопрофессиональных, социально ответственных и востребованных специалистов с высшим образованием, специалистов высшей квалификации (кандидатов и докторов науки научно-педагогических кадров в сфере обращения лекарственных средств в России и за рубежом, основанную на единстве высшего, послевузовского и дополнительного профессионального образования.