

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
УНИВЕРСИТЕТ ИТМО

Е.П. Сучкова

ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ

Учебно-методическое пособие



УНИВЕРСИТЕТ ИТМО

Санкт-Петербург

2016

УДК 637.1/3

Сучкова Е.П. Основы биотехнологии: Учеб.-метод. пособие. – СПб.: Университет ИТМО, 2016. – 101 с.

Содержит методические указания к лабораторным работам, темы контрольных работ для студентов заочного обучения и список литературы.

Предназначено для бакалавров направления 19.03.01 Биотехнология по дисциплине «Основы биотехнологии» очной и заочной форм обучения.

Рецензент: доктор техн. наук, проф. Л.В. Красникова

Рекомендовано к печати Советом факультета пищевых биотехнологий и инженерии, протокол № 2 от 27.10.2016 г.



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 – 100». Цель Университета ИТМО – становление исследовательского университета мирового уровня, предпринимательского по типу, ориентированного на интернационализацию всех направлений деятельности.

© Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, 2016

© Сучкова Е.П., 2016

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 1

ТРЕБОВАНИЯ, ПРЕДЪЯВЛЯЕМЫЕ К МИКРООРГАНИЗМАМ-ПРОДУЦЕНТАМ

Цель занятия – ознакомиться с требованиями, предъявляемыми к микроорганизмам-продуцентам целевого биотехнологического продукта.

Ход работы. *Выполняются задания:*

Задание 1. Ознакомиться с требованиями, предъявляемыми к микроорганизмам-продуцентам первичных и вторичных метаболитов в биотехнологическом производстве.

Задание 2. Ознакомиться с основными видами микроорганизмов, применяемых в биотехнологическом производстве, и критериями оценки эффективности биотехнологических процессов.

Выполнение лабораторной работы предусматривает опережающую теоретическую подготовку и использование учебно-методической литературы на занятии.

Теоретическое обоснование

Ассортимент продуктов, получаемых в биотехнологических процессах, чрезвычайно широк. По разнообразию и объемам производства на первом месте стоят продукты, получаемые в процессах, основанных на жизнедеятельности микроорганизмов. Эти продукты подразделяются на три основные группы:

1-я группа – биомасса, которая является целевым продуктом (белок одноклеточных) или используется в качестве биологического агента (биометаногенез, бактериальное выщелачивание металлов);

2-я группа – первичные метаболиты – низкомолекулярные соединения, необходимые для роста микроорганизмов в качестве строительных блоков макромолекул, коферментов (аминокислоты, витамины, органические кислоты);

3-я группа – вторичные метаболиты (идиолиты) – соединения, не требующиеся для роста микроорганизмов и не связанные с их ростом (антибиотики, алкалоиды, гормоны роста и токсины).

Среди продуктов микробиологического синтеза огромное количество различных биологически активных соединений, в том

числе белковых и лекарственных веществ, ферментов, а также энергоносители (биогаз, спирты) и минеральные ресурсы (металлы), средства для борьбы с вредителями сельскохозяйственных культур (биоинсектициды) и биоудобрения. В связи с развитием новейших методов биотехнологии (инженерной энзимологии, клеточной и генной инженерии) спектр целевых продуктов непрерывно дополняется. Среди них все большее место занимают средства диагностики и лечения (гибридомы, моноклональные антитела, вакцины и сыворотки, гормоны, модифицированные антибиотики).

Основными элементами, слагающими биотехнологические процессы, являются биологический агент, субстрат, аппаратура и продукт. **Биологический агент** – активное начало в биотехнологических процессах и один из наиболее важных ее элементов. Номенклатура биологических агентов бурно расширяется, но до настоящего времени важнейшее место занимает традиционный объект – микробная клетка. Микробные клетки с различными химико-технологическими свойствами могут быть выделены из природных источников и далее с помощью традиционных (селекция, отбор) и новейших (клеточная и генетическая инженерия) методов существенно модифицированы и улучшены.

При выборе биологического агента и постановке его на производство прежде всего следует соблюдать принцип технологичности штаммов. Это значит, что микробная клетка, популяция или сообщество особей должны сохранять свои основные физиолого-биохимические свойства в процессе длительного ведения ферментации. Промышленные продуценты также должны обладать устойчивостью к мутационным воздействиям, фагам, заражению посторонней микрофлорой (контаминации); характеризоваться безвредностью для людей и окружающей среды, не иметь при выращивании побочных токсичных продуктов обмена и отходов, иметь высокие выходы продукта и приемлемые технико-экономические показатели. В настоящее время многие промышленные микробные технологии базируются на использовании гетеротрофных организмов, а в будущем решающее место среди продуцентов займут автотрофные микроорганизмы, не нуждающиеся для роста в дефицитных органических средах, а также экстремофилы – организмы, развивающиеся в экстремальных условиях среды (термофильные, алкало- и ацидофильные).

В промышленной биотехнологии применяют 3 вида штаммов микроорганизмов:

- 1) природные штаммы, улучшенные естественным и искусственным отбором (при производстве микробной биомассы);
- 2) штаммы, полученные в результате индуцированного мутагенеза;
- 3) генно-модифицированные (рекомбинантные) штаммы, обладающие самой высокой генетической нестабильностью.

Промышленные штаммы должны удовлетворять следующим **требованиям**:

1. Безвредность для потребителя и обслуживающего персонала.
2. Высокая скорость роста биомассы и целевого продукта (БАВ) при экономичном потреблении питательной среды.
3. Направленная биосинтетическая активность при минимальном образовании побочных продуктов.
4. Генетические однородность и стабильность в отношении к субстратам и условиям культивирования.
5. Отсутствие токсических веществ в целевом продукте и промышленных стоках.
6. Устойчивость к фагам и другой посторонней микрофлоре.
7. Способность расти на дешевых и доступных субстратах, отходах пищевой и химической промышленности при высокой плотности клеток.

Только по совокупности этих и других свойств можно оценить полезность и рентабельность продуцента. Наиболее изучены и чаще применяются в биотехнологии бактерии рода *Clostridium*, *Thermoanaerobacter*, *Bacillus*, *Acetobacter*, *Pseudomonas*, *Brefibacterium*. Основные виды микроорганизмов, используемых в промышленности для получения целевых продуктов, представлены в табл. 1.

Одноклеточные организмы характеризуются более высокими скоростями процессов синтеза, чем высшие растения и животные. Они могут перерабатывать в сутки объем биомассы, превышающий массу клетки в 30–40 раз. В действительности действуют разнообразные ограничивающие факторы. Однако возможности бактерий к быстрому размножению намного превосходят возможности других видов организмов, это их свойство является важнейшим при производстве микробного белка и БАВ.

Таблица 1

**Микроорганизмы, используемые в промышленности
для получения целевых продуктов**

Организм	Тип	Продукт
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Дрожжи	Пекарские дрожжи, вино, эль, саке
<i>Streptococcus thermophilus</i>	Бактерии	Йогурт, ряженка
<i>Propionibacterium shermanii</i>	Бактерии	Швейцарский сыр
<i>Gluconobacterium suboxidans</i>	Бактерии	Уксус
<i>Penicillium roquefortii</i>	Плесень	Сыры типа рокфора
<i>Aspergillus oryzae</i>	Плесень	Саке
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Дрожжи	Этанол
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	Бактерии	Ацетон
<i>Xanthomonas campestris</i>	Бактерии	Полисахариды
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Бактерии	L-Лизин
<i>Candida utilis</i>	Дрожжи	Микробный белок
<i>Propionibacterium shermanii</i>	Бактерии	Витамин B12
<i>Aspergillus oryzae</i>	Плесень	Амилаза
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	Дрожжи	Лактаза
<i>Saccharomycopsis lipolytica</i>	Дрожжи	Липаза
<i>Bacillus</i>	Бактерии	Протеазы
<i>Endothia parasitica</i>	Плесень	Сычужный фермент
<i>Leocanostoc mesenteroides</i>	Бактерии	Декстран
<i>Xanthomonas campestris</i>	Бактерии	Ксантан
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Плесень	Пенициллины
<i>Chehalosporium acremonium</i>	Плесень	Цефалоспорины
<i>Rhizopus nigricans</i>	Плесень	Трансформация стероидов
Гибридомы	—	Иммуноглобулины и моноклональные антитела
<i>E. coli</i> (рекомбинантные штаммы)	Бактерии	Инсулин, гормон роста, интерферон
<i>Blakeslea trispora</i>	Плесень	β-Каротин
<i>Bacillus thuringiensis</i>	Бактерии	Биоинсектициды
<i>Bacillus popilliae</i>	Бактерии	Биоинсектициды

Бактерии биохимически универсальны, могут усваивать самые разнообразные питательные вещества и даже способны выбирать наилучшие органические соединения из смеси, поэтому могут приспособляться к самым разнообразным условиям существования.

В последние годы расширяется применение смешанных микробных культур и их природных ассоциаций. По сравнению с монокультурами микробные ассоциации способны ассимилировать сложные, неоднородные по составу субстраты, минерализуют сложные органические соединения, имея повышенную способность к биотрансформации, имеют повышенную устойчивость к воздействию неблагоприятных факторов среды и токсических веществ, а также повышенную продуктивность и возможность обмена генетической информацией между отдельными видами сообщества. Основные области применения смешанных культур: охрана окружающей среды, биodeградация и усвоение сложных субстратов, пищевая промышленность.

В любом биотехнологическом процессе ключевую роль играют биологический агент, его природа и физиолого-технологические свойства. Для роста любого биообъекта нужны исходный жизнеспособный посевной материал, источники энергии и углерода, питательные вещества для синтеза биомассы, отсутствие действия ингибиторов роста, соответствующие физико-химические условия ферментации (рН, температура, аэрация и др.).

Процессы культивирования микроорганизмов в биотехнологических производствах направлены на получение целевых продуктов, в качестве которых могут выступать как клетки микроорганизмов, так и продукты их жизнедеятельности. В то же время термин «культивирование» неразрывно связан с ростом и размножением клеток микроорганизмов.

Критериями оценки эффективности биотехнологических процессов являются: скорость роста продуцента, выход продукта, экономический коэффициент, непродуктивные затраты энергии, энергозатраты и затраты на обезвреживание отходов.

Рост – необратимое увеличение живой клеточной массы, приводящее к увеличению числа клеток микроорганизмов в результате размножения. Важнейшей количественной характеристикой этого процесса является удельная скорость роста μ , выражающая увеличение биомассы клеток в единицу времени.

Скорость роста продуцента служит одним из основных показателей, характеризующих адекватность условий ферментации. Скорость роста (увеличение биомассы) организмов с бинарным

делением в хорошо перемешиваемой среде в периодической культуре будет пропорциональна концентрации микробной биомассы:

$$dX/dt = \mu X,$$

где dX/dt – скорость роста; X – биомасса; μ – коэффициент пропорциональности (удельная скорость роста).

Удельная скорость роста μ является одним из основных параметров, определяющих физиологическое состояние продуцента; ряд других параметров может быть выражен через этот показатель. Параметр аналогичен сложным процентам (например, если удельная скорость роста равна $0,1 \text{ ч}^{-1}$, то увеличение биомассы равно 10 % в час). Таким образом, ростовые процессы приводят к накоплению биомассы.

Эффективность биотехнологического процесса оценивается выходом продукта Y по субстрату («экономический коэффициент»), определяется как количество продукта, получаемого из данного количества субстрата:

$$Y = X/S_0 - S,$$

где S и S_0 – конечная и исходная концентрации субстрата.

Данный коэффициент выражает эффективность использования субстрата для получения целевого продукта и является очень важной характеристикой, так как непосредственно связан с продуктивностью и позволяет влиять на себестоимость конечного продукта.

Кривая роста микроорганизмов в периодических условиях. В биотехнологии большое значение имеет анализ основных закономерностей роста и развития культивируемых микроорганизмов. В его основу положена кривая роста микроорганизмов в простых периодических условиях (рис. 1).

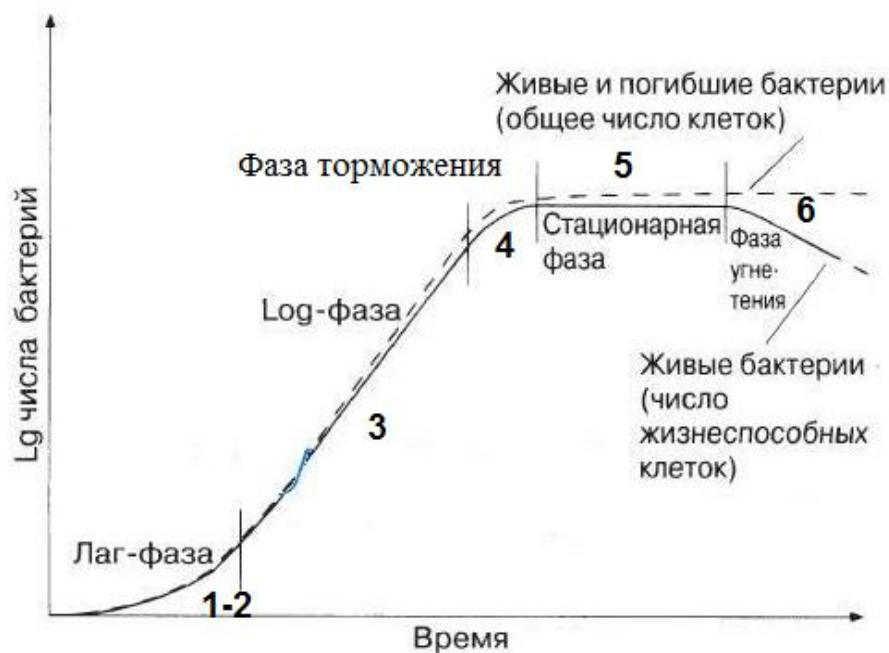


Рис. 1. Кривая роста микроорганизмов:

1 и 2 (ляг-фаза и фаза ускорения роста) – подбор условий культивирования и состава питательной среды; 3 (лог-фаза) – синтез первичных метаболитов, образование биомассы; 4 и 5 (фаза торможения и стационарная) – синтез вторичных метаболитов, «урожай биомассы»; 6 (фаза отмирания) – процессы стерилизации, внутриклеточные метаболиты

Подбор необходимых для культивирования форм микроорганизмов с заданными свойствами включает несколько этапов: выделение микроорганизмов, получение накопительных культур, выделение чистых культур.

1. Выделение микроорганизмов. Отбираются пробы из мест обитания микроорганизмов (почва, растительные остатки и т. д.). Применительно к углеводородокисляющим микроорганизмам таким местом может быть почва возле бензоколонок; винные дрожжи обильно встречаются на винограде; анаэробные целлюлозоразлагающие и метанобразующие микроорганизмы в больших количествах обитают в рубце жвачных животных.

2. Получение накопительных культур. Образцы вносят в жидкие питательные среды специального состава, создают благоприятные условия для развития продуцента (температура, pH, источники энергии, углерода, азота и т. д.). Для накопления

продуцента холестериноксидазы используют среды с холестерином в качестве единственного источника углерода; углеводород-окисляющих микроорганизмов – среды с парафинами; продуцентов протеолитических или липолитических ферментов – среды, содержащие белки или липиды.

3. Выделение чистых культур. На плотные питательные среды засевают образцы проб из накопительных культур. Отдельные клетки микроорганизмов на плотных питательных средах образуют изолированные колонии, или клоны, при их пересеве получают чистые культуры, состоящие из клеток одного вида продуцента. Другой путь подбора микроорганизмов – из имеющихся коллекций. Например, продуцентами антибиотиков чаще являются актиномицеты, этанола – дрожжи. Клон – культура, полученная из одной клетки, чистая культура – совокупность особей одного вида микроорганизмов, штаммы – культуры, выделенные из различных природных сред или из одной среды в разное время.

Контрольные вопросы

1. Перечислите требования, предъявляемые к микроорганизмам-продуцентам метаболитов в биотехнологическом производстве.
2. Назовите 5–7 видов микроорганизмов, используемых в промышленности для получения целевых продуктов.
3. Назовите критерии оценки эффективности биотехнологических процессов и охарактеризуйте их.

Оформление отчета

Отчет должен содержать:

1. Цель работы.
2. Основную информацию в рекомендованном виде.
3. Описание одного вида микроорганизмов из списка, используемых в промышленности для получения целевых продуктов.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 2

ПРИГОТОВЛЕНИЕ И МИКРОСКОПИРОВАНИЕ ПРЕПАРАТОВ МИКРООРГАНИЗМОВ

Цель занятия – освоить методы приготовления и особенности исследования препаратов живых и фиксированных клеток.

Ход работы. *Выполняются задания:*

Задание 1. Ознакомиться с морфологическим составом и характеристиками микроорганизмов.

Задание 2. Приготовление и микроскопирование препаратов «раздавленная» и «висячая» капля.

Для выполнения работы в соответствии с методическими указаниями приготовить на предметных стеклах препараты «раздавленная капля» и «висячая капля» из культур молочнокислых бактерий или заквасок. Просмотреть с объективом 40 под микроскопом. Зарисовать.

Задание 3. *Приготовление окрашенных препаратов.* На предметных стеклах приготовить мазки из культур молочнокислых бактерий или заквасок, по 2 мазка из каждой культуры. Освоить технику приготовления окрашенных препаратов. Окрасить первые мазки простым методом с применением метиленовой сини, а вторые – по методу Грама.

Задание 4. Микроскопирование препаратов, окрашенных по методу Грама. Просмотреть окрашенные препараты с иммерсионным объективом 90. Зарисовать цветными карандашами.

Методические указания

Оборудование и материалы: биологические объекты, микроскоп, предметные стекла, иммерсионное масло, бактериологические петли, фильтровальная бумага, предметное стекло с лункой, покровные стекла, спиртовки, растворы основных красок: фуксин Пфейффера, краска Грама, раствор Люголя, раствор метиленовой сини, вода дистиллированная, спирт 96 %.

Для изучения микроорганизмов пользуются сложными оптическими приборами – микроскопами. Микроскопы, применяемые в лабораториях, бывают оптические (монокулярные, бинокулярные), люминесцентные, а также электронные.

Оптический микроскоп состоит, в свою очередь, из механической и оптической частей (рис. 2). Механическая часть состоит из штатива, тубуса, предметного столика и винтов. Штатив включает основание, которое служит опорой микроскопа, и тубусодержатель, используемый для крепления подвижного тубуса и в качестве ручки для переноса микроскопа.

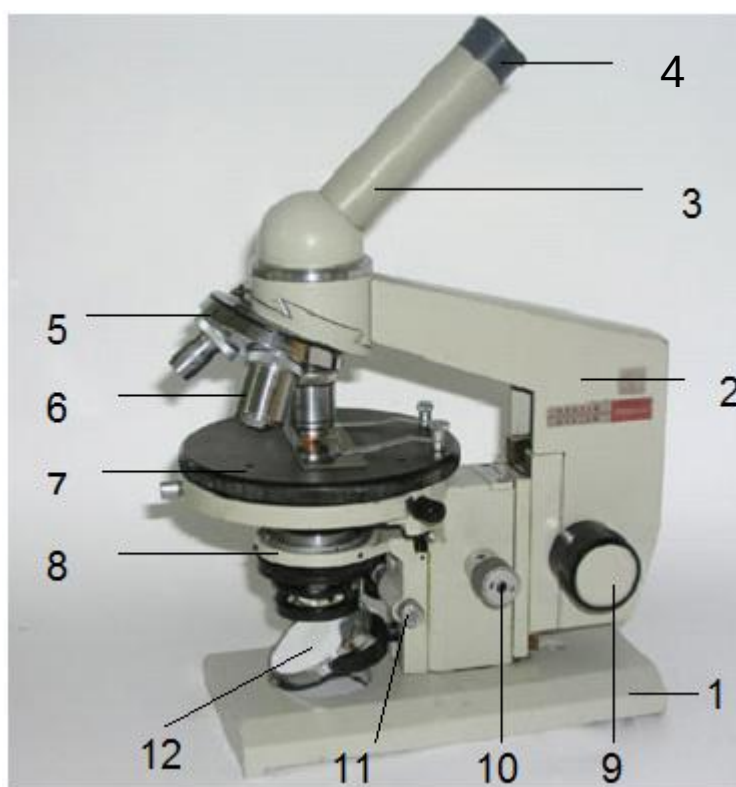


Рис. 2. Устройство светового микроскопа:

- 1 – основание микроскопа; 2 – тубусодержатель; 3 – тубус;
- 4 – окуляр (чаще $\times 7$); 5 – револьвер микроскопа;
- 6 – объективы (сухой: $\times 8$, $\times 20$, $\times 40$; иммерсионный $\times 90$);
- 7 – предметный столик; 8 – конденсор; 9 – макрометрический винт;
- 10 – микрометрический винт; 11 – винт конденсора; 12 – зеркало

Тубус – это зрительная труба микроскопа. В верхнее отверстие тубуса свободно вставляется окуляр, а на нижнем его конце находится вращающийся вокруг своей оси барабан револьвера,

в который ввинчиваются объективы. Вращая барабан револьвера, можно быстро центрировать объективы в процессе работы с микроскопом, т. е. ставить объективы в оптическую ось тубуса микроскопа. На револьвере напротив объектива имеется желобок, в который входит ступица (пружинка), закрепляющая объектив в центрированном положении. При попадании ступицы в желобок ощущается щелчок и требуется некоторое усилие для выведения револьвера из этого положения.

Предметный столик предназначен для размещения изучаемого препарата. Препарат закрепляют имеющимися на столике пружинными клеммами. В центре предметного столика есть отверстие для прохождения лучей света, освещающих препарат. Предметный столик можно передвигать в двух взаимно перпендикулярных направлениях с помощью двух винтов, симметрично расположенных на краях, или в разных направлениях посредством боковых винтов. Вместе со столиком передвигается и препарат, что позволяет рассматривать его в разных местах.

Винты (микрометрический и макрометрический) позволяют передвигать тубус вверх и вниз для установления находящихся на нем объективов на необходимом расстоянии от препарата (так, чтобы препарат находился в фокусе данного объектива). При вращении винтов по часовой стрелке тубус опускается, а против часовой стрелки – поднимается. Макрометрическим винтом пользуются для предварительной установки объектива, т. е. установки его на такое удаление от препарата, при котором препарат становится видимым. При работе с объективами 40 и 90 для точной их установки используют также микрометрический винт, полный оборот которого передвигает тубус всего на 0,1 мм. Этот винт имеет сложное устройство и может испортиться при неправильном обращении с ним, его можно поворачивать не более чем на 180° в ту или другую сторону.

Оптическая часть микроскопа состоит из осветительной и оптической систем. Осветительная система микроскопа находится под предметным столиком и состоит из зеркала и конденсора с диафрагмой. Зеркало отражает лучи света от источника и направляет их в сторону конденсора. Зеркало двухстороннее: одна сторона плоская, другая вогнутая. При дневном освещении пользуются плоским, а при искусственном (электрическом) освещении – вогнутым зеркалом.

Зеркало имеет две взаимно перпендикулярные оси, позволяющие установить его в разнообразных положениях для наилучшего отражения света от источника. Конденсор служит для лучшего освещения препарата и состоит из нескольких линз, благодаря которым он собирает отраженные от зеркала световые лучи в сильный световой пучок и направляет их через отверстие предметного столика на препарат, а затем в объектив. Конденсор с помощью винта (кремальеры конденсора) можно продвигать вверх и вниз. Чем ниже опускается конденсор, тем слабее освещается препарат, и наоборот. При микроскопировании неокрашенных препаратов (с объективами 8 и 40) конденсор опускают так, чтобы лучше были видны микробы, а при микроскопировании окрашенных препаратов и работе с объективами большего увеличения его поднимают вверх до предела. Диафрагма находится под конденсором и служит для регулирования количества света, поступающего в конденсор. Так называемая ирисовая диафрагма состоит из ряда подвижных металлических пластинок, которые сдвигаются и раздвигаются, в результате чего отверстие диафрагмы может изменяться.

Оптическая система микроскопа состоит из объективов и окуляров. Объектив представляет собой систему линз, заключенных в металлическую оправу. Линза, обращенная к объекту, называется фронтальной. Объектив обладает определенной увеличительной (разрешающей) способностью. Чем больше кривизна линз, тем короче фокусное расстояние и больше разрешающая способность объектива.

Объектив дает действительное, увеличенное, обратное изображение объекта и выявляет его детали. Биологические микроскопы М-10, МБИ-1, МБИ-2, МБИ-3 имеют три объектива, дающих разное увеличение. На оправу каждого объектива нанесена цифра, показывающая увеличение, даваемое данным объективом: на одном 8, на другом 40, на третьем 90 (на объективах других моделей микроскопов могут быть нанесены другие цифровые или буквенные обозначения). Фокусное расстояние объектива 8 равно 9 мм, 40 – 0,65 мм и объектива 90 – 0,15 мм.

Объективы подразделяются на сухие и иммерсионные (масляно-погружные). При рассмотрении препарата с помощью сухих объективов (8 и 40) между их фронтальной линзой и препаратом находится воздух. При работе с иммерсионным объективом (90) для

предотвращения рассеивания света пространство между фронтальной линзой объектива и препаратом заполняют кедровым (иммерсионным) маслом (нижнюю часть объектива погружают в каплю масла), которое имеет показатель преломления, приблизительно равный показателю преломления стекла.

Окуляр состоит из двух линз, заключенных в металлическую оправу. Нижняя линза называется собирательной, верхняя – глазной. Окуляр увеличивает изображение, данное объективом, т. е. дает мнимое изображение, поэтому чем в большей степени увеличивает окуляр, тем менее четким будет изображение. Биологические микроскопы имеют 3 окуляра с увеличением в 7, 10 и 15 раз. Таким образом, общее увеличение микроскопа равно произведению увеличения объектива на увеличение окуляра. Например, при работе с объективом 8 и окуляром 10 общее увеличение будет равно 80, с объективом 40 и окуляром 10 – 400 и при работе с объективом 90 и окуляром 10 – 900. Пользуясь оптическим микроскопом, можно рассмотреть предмет величиной не менее 0,2 мкм (1 мкм – 1 микрометр, равный 0,001 мм), так как разрешающая способность объектива не может быть больше половины длины волны воспринимаемого глазом света. Реальная разрешающая способность объектива равна частному от деления средней длины волны воспринимаемого глазом света на числовую апертуру данного объектива, которая указана на нем и характеризует количество проходящего через объектив света. Например, разрешающая способность объектива 8 0,55 мкм: 0,20 – 2,75 мкм; объектива 40 0,55 мкм: 0,65 – 0,85 мкм, объектива 90 0,55 мкм: 1,25 – 0,44 мкм.

Методика приготовления неокрашенных препаратов

Препараты микроорганизмов готовят на чистых и обезжиренных предметных стеклах длиной 76 мм, шириной 26 мм и толщиной 1–2 мм. Часто используют и покровные стекла 18×18 или 20×20 мм и толщиной 0,15–0,17 мм.

Если нужно исследовать микроорганизмы в живом виде, готовят препараты «раздавленная капля» или «висячая капля». Для приготовления первого препарата на середину предметного стекла наносят каплю жидкой культуры (бактерий, дрожжей) или стерильной водопроводной воды, в которую бактериологической петлей вносят немного исследуемых микробов из их колоний на плотной

среде. Каплю осторожно накрывают (раздавливают) покровным стеклом. Капля должна тонким слоем заполнить пространство между предметным и покровным стеклами, но не должна выступать за края покровного стекла. Излишек выступившей жидкости удаляют фильтровальной бумагой.

Для приготовления препарата «висячая капля» взвесь микробов петлей наносят на центральное место покровного стекла и к нему прикладывают предметное стекло с «луночкой» (углублением) так, чтобы капля оказалась под центром «луночки». Перед этим вокруг «луночки» наносят тонким слоем вазелин. После перевертывания предметного стекла луночкой вверх капля будет «висеть» над ней. Для изучения грибов с помощью двух препаратных игл берут небольшой кусочек мицелия, который вносят в каплю воды или ее смеси с глицерином, осторожно расщепляя иглами. Неокрашенные препараты бактерий и дрожжей микроскопируют, используя объектив 40, а плесневых грибов – объективы 8 и 40.

Для приготовления препарата дрожжей или бактерий с прижизненной (витальной) окраской клеток на предметное стекло наносят крупную каплю красителя метилового голубого по Лефферу или каплю фуксина Пфейффера и в эту каплю вносят суспензию микроорганизмов. Затем петлей или пипеткой краску перемешивают с суспензией микроорганизмов, кладут на эту каплю покровное стекло и слегка его придавливают. Получают «раздавленную каплю» живых окрашенных микробов, которую микроскопируют так же, как и обычную «раздавленную каплю».

В окрашенном виде клетки микробов видны более ясно и четко, чем в неокрашенном, при этом мертвые клетки окрашиваются быстро, а живые – плохо. Применяя специальные красители – флуорохромы (например, примулин) и люминесцентную микроскопию, можно дифференцировать (различать) живые и мертвые клетки дрожжей.

Техника микроскопирования неокрашенных препаратов

Микроскоп вынимают из футляра и переносят, не наклоняя, на рабочее место, держа его одной рукой за тубусодержатель, а другой – за ножку штатива. Помещают микроскоп на рабочем столе тубусодержателем к себе от края стола на расстоянии 3–5 см.

Устанавливают хорошее равномерное освещение поля зрения микроскопа, для чего, глядя в окуляр, зеркалом направляют луч света от источника в объектив, настройку освещения производят, используя объектив 8. Конденсор должен быть поднят вверх, а диафрагма открыта. Поле зрения микроскопа должно быть хорошо и равномерно освещено во всех точках.

На предметный столик помещают исследуемый препарат мазком или каплей вверх и закрепляют клеммами. Рассматривают препарат, используя объектив 8, а затем переходят к большим увеличениям. При работе с объективом 8 расстояние между препаратом и объективом (фокусное расстояние) составляет около 9 мм, с объективом 40 – 0,65 мм и с объективом 90 – около 0,15 мм. Тубус микроскопа вместе с центрированным объективом осторожно опускают вниз с помощью макрометрического винта, наблюдая сбоку, с таким расчетом, чтобы фокус объектива был ниже рассматриваемого препарата. При работе с объективами 40 и 90 необходимо приблизить объектив почти вплотную к препарату, не касаясь его. Затем, глядя в окуляр, с помощью того же винта, медленно вращая его на себя, поднимают тубус до тех пор, пока в поле зрения не появится изображение объекта. После этого вращением микрометрического винта точно фокусируют объектив, чтобы изображение предмета было четким. Микрометрический винт можно поворачивать не более чем на пол-оборота.

Для получения наилучшего изображения препарата необходимо регулировать интенсивность его освещения, опуская или поднимая конденсор, открывая или прикрывая диафрагму. Обычно при рассматривании препарата в объектив 8 конденсор несколько опускают, при работе с объективом 90 – поднимают вверх.

Препарат рассматривают в нескольких местах, передвигая предметный столик с помощью боковых винтов. В процессе микроскопирования препарата медленно (на 1/4 оборота) вращают микрометрический винт по часовой стрелке и против нее так, чтобы можно было рассмотреть препарат во всей его толще. Если какое-либо место препарата, рассматриваемое при малом увеличении, требуется просмотреть при большем увеличении, то необходимо это место поставить в центре поля зрения, а затем центрировать соответствующий объектив.

Неокрашенные препараты («раздавленная» и «висячая» капли) микроскопируют с объективами 8 и 40. Для этого устанавливают освещение поля зрения как указано выше, а затем опускают конденсор на 1–0,5 см, добиваясь наилучшей видимости неокрашенных клеток.

При микроскопировании «висячей капли» сначала находят ее край, проводя микроскопирование с объективом 8; препарат устанавливают таким образом, чтобы центр капли был в центре поля зрения объектива. После этого производят микроскопирование с объективом 40.

Приготовление окрашенных препаратов

Приготовление мазка заключается в следующем. На середину чистого обезжиренного стекла наносят стерильной петлей жидкую бактериальную культуру или каплю стерильной водопроводной воды и вносят в нее бактерии, взятые из колоний кончиком стерильной бактериологической петли. Полученную слабомутную бактериальную суспензию равномерно распределяют тонким слоем на поверхности предметного стекла на площади 2 см².

Высушивание мазка осуществляют при комнатной температуре или (для ускорения) в потоке теплого воздуха над небольшим пламенем горелки (мазком вверх), не допуская нагрева стекла.

Фиксацию мазка осуществляют термическим и химическим способами. При термическом способе стекло с высушенным мазком проводят 3–4 раза через пламя горелки той стороной, где нет мазка. При химическом способе мазки микробов фиксируют метиловым спиртом, этиловым спиртом, смесью этилового спирта и эфира в пропорции 1 : 1 и другими веществами погружением предметного стекла с мазком в жидкость на определенное время. Цель фиксации – убить клетки микроорганизмов и прикрепить их к стеклу. Мертвые клетки окрашиваются лучше, чем живые.

Окрашивание мазка можно осуществить разными способами, которые делят на простые и сложные. При простом окрашивании препарата на охлажденный зафиксированный мазок наносят 2–3 капли раствора какой-либо краски. После окрашивания мазка в течение 30–60 с краску смывают струёй воды из промывалки.

Окрашенный препарат высушивают фильтровальной бумагой, прикладывая ее к мазку с обеих сторон. Микроскопируют окрашенный препарат в иммерсионной системе микроскопа. При сложных способах окрашивания применяют два или более красящих веществ. Эти способы эффективны при выявлении деталей строения микроорганизмов и их дифференциации.

Окраска по Граму имеет большое практическое значение для изучения микроорганизмов и их дифференциации.

Техника окрашивания по Граму.

1. На предметном стекле готовят фиксированный мазок (так же, как и для простой окраски).

2. На фиксированный мазок наносят 2–3 капли краски Грама (карболово-спиртовой раствор генцианового фиолетового) через полоску фильтровальной бумаги. Через 1–2 мин ее снимают, а краситель сливают и аккуратно смывают водой. Если имеется фильтровальная бумага, заранее подготовленная и пропитанная краской Грама, то ее накладывают на мазок и наносят 2–3 капли воды. Через 1–2 мин ее снимают и препарат аккуратно промывают водой.

3. Наносят 3–4 капли раствора Люголя и через 1 мин его сливают, не смывая водой.

4. Обесцвечивают препарат этиловым спиртом в течение 30–60 с до прекращения отхождения фиолетовых струек красителя.

5. Промывают препарат водой.

6. Докрашивают мазок водным раствором фуксина в течение 1–2 мин, промывают водой и высушивают фильтровальной бумагой.

7. Микроскопируют препарат.

В результате окрашивания препарата по методу Грама одни виды бактерий (также дрожжи и актиномицеты) окрашиваются в фиолетовый цвет (Грам+), а другие в красный цвет (Грам–). В фиолетовый цвет окрашиваются те микроорганизмы, в цитоплазме и цитоплазматической мембране которых содержатся вещества, прочно связывающие краску Грама+ йод (из раствора Люголя). Клетки таких микробов не обесцвечиваются спиртом за 20–30 с. В красный цвет окрашиваются микроорганизмы, в цитоплазме которых нет веществ, прочно фиксирующих краску Грама+ йод. Такие клетки обесцвечиваются при обработке спиртом, поэтому окрашиваются фуксином Пфейфера.

Отношение бактерий к окраске по Граму определяется их способностью удерживать образовавшийся в процессе окраски комплекс генцианового фиолетового с йодом. Это зависит от различий в химическом составе и в проницаемости клеточной стенки грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также от соотношения РНК и ДНК в их цитоплазме. В клеточной стенке грамположительных бактерий наиболее выражен муреиновый (мукопептидный) слой, содержащий гликопептиды и тейхоевую кислоту. Пептидогликаны грамположительных бактерий структурно отличаются от грамотрицательных бактерий. Тейхоевые кислоты стабилизируют ионы магния на поверхности клеток. У грамположительных бактерий на поверхности клетки имеется комплекс протеин–рибонуклеат магния; соотношение РНК и ДНК в их цитоплазме составляет 8:1; у грамотрицательных бактерий это соотношение равно 1:1. Изoeлектрическая точка цитоплазмы у грамположительных бактерий находится при рН 2,0–3,0; у грамотрицательных – около 5,0. После обработки раствором йода, являющегося окислителем, происходит сдвиг изoeлектрической точки в кислую сторону, выраженный у грамположительных бактерий в большей степени, чем у грамотрицательных.

Кроме того, проницаемость клеточной стенки у грамположительных бактерий меньше, чем у грамотрицательных. Таким образом, у грамположительных бактерий создаются оптимальные условия для прочной фиксации красителя и резистентности к обесцвечиванию спиртом.

К грамположительным бактериям относятся стафилококки, стрептококки, коринебактерии дифтерии, микобактерии туберкулеза и другие, к грамотрицательным – гонококки, менингококки, кишечная палочка и т.д.. Некоторые виды бактерий могут окрашиваться по Граму вариabельно в зависимости от возраста, особенностей культивирования и других факторов, изменяющих структуру клеточной стенки.

Основная ошибка, допускаемая при окраске по Граму, состоит в переобесцвечивании или недообесцвечивании мазка спиртом. В первом случае грамположительные бактерии могут утрачивать первоначальную окраску генциановым фиолетовым и приобретать красный цвет (характерный для грамотрицательных бактерий) в результате последующей докраски мазка фуксином. Во втором

случае грамотрицательные бактерии могут сохранять синевioletовый цвет генцианового violetового. Для правильной окраски следует строго соблюдать технику обесцвечивания. Микроскопируют препарат в иммерсионной системе.

Техника микроскопирования окрашенных препаратов

Особенностью микроскопирования окрашенных препаратов является следующее: препарат кладут на предметный столик так, чтобы мазок был на верхней стороне стекла; микроскопирование производят при наилучшем освещении поля зрения (конденсор поднят вверх до предела) с иммерсионным объективом 90.

При работе с иммерсионным объективом 90 на препарат наносят каплю иммерсионного масла, а затем с помощью микрометрического винта осторожно опускают тубус с центрированным объективом 90 так, чтобы его фронтальная линза погрузилась в каплю масла, фокус был ниже препарата (мазка). Затем, глядя в окуляр, тем же винтом очень медленно поднимают тубус (на сотые доли миллиметра), пока не увидят изображение микробов. Точную остановку препарата в фокус объектива производят с помощью микрометрического винта.

По окончании работы удаляют салфеткой из мягкой ткани иммерсионное масло с фронтальной линзы объектива 90, для более полного удаления масла фронтальную линзу протирают салфеткой, смоченной смесью спирта и эфира в пропорции 1:1, или экстракционным бензином, а затем протирают объектив досуха. Только после этого можно ставить микроскоп в шкаф или ящик для хранения.

Контрольные вопросы

1. Какое лабораторное оборудование используется для изучения морфологических свойств микроорганизмов?
2. Какова цель приготовления окрашенных препаратов?
3. Какие краски применяют для окраски бактерий?

4. Каков порядок приготовления препарата (мазка) для окрашивания?

5. Каковы сущность и техника окраски препаратов по методу Грама?

Оформление отчета

Отчет должен содержать:

1. Цель работы.

2. Наблюдаемую микроскопическую картину исследуемых препаратов окрашенных микроорганизмов.

Приложение А

К лабораторной работе № 2 Приготовление растворов красок, применяемых для окрашивания препаратов микроорганизмов

Для окрашивания мазков применяют растворы различных красок.

Карболовый фуксин Циля готовят смешиванием 100 мл 5 %-го раствора кристаллической карболовой кислоты и 10 мл насыщенного спиртового раствора фуксина основного.

Фуксин Пфейффера готовят в день его использования; одну часть фуксина Циля смешивают с девятью частями дистиллированной воды.

Метиленовый синий (голубой) по Леффлеру: к 100 мл водного раствора КОН (0,01 %) добавляют 30 мл насыщенного спиртового раствора метилового голубого (10 г краски на 100 мл 96 %-го этилового спирта).

Краску Грама готовят растворением 1 г генцианвиолета в 10 мл 96 %-го этилового спирта; полученный раствор добавляют к 100 мл 5 %-го раствора очищенной карболовой кислоты и после выдержки в течение 24 ч фильтруют.

Удобно пользоваться генцианвиолетом на бумажках (по Синеву); тонкие листы фильтровальной или газетной бумаги (на стекле) обливают 1–2 %-м спиртовым раствором этой краски, листы высушивают при температуре 18–20 °С и разрезают на прямоугольники 2×4 см. Хранят бумажки в банке с притертой пробкой.

Раствор Люголя: 2 г йодистого калия растворяют в 5 мл дистиллированной воды, затем вносят 1 г йода и доводят объем дистиллированной водой до 300 мл.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 3

ИЗУЧЕНИЕ СТРОЕНИЯ И СВОЙСТВ МИКРООРГАНИЗМОВ, ПРИМЕНЯЕМЫХ В ПИЩЕВОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ

Цель занятия – ознакомиться с морфологическим составом и характеристиками микроорганизмов, применяемых в пищевой биотехнологии.

Ход работы. *Выполняются задания:*

Задание 1. Ознакомиться со свойствами микроорганизмов, применяемых в пищевой биотехнологии.

Задание 2. Ознакомиться с морфологическими особенностями чистых культур пропионовокислых, уксуснокислых микроорганизмов, бифидобактерий и дрожжей, применяемых при производстве пищевых продуктов, и маслянокислых микроорганизмов, используя простой метод окраски.

Задание 3. Ознакомиться с морфологическими особенностями чистых культур микроорганизмов и отношением к окраске по Граму содержащихся в исследуемой смеси бактериальных культур.

Выполнение лабораторной работы предусматривает опережающую теоретическую подготовку и использование учебно-методической литературы на занятии.

Теоретическое обоснование

Пропионовокислые бактерии. Пропионовокислые (*Propionibacterium*) бактерии – род грамположительных факультативных анаэробных неподвижных бактерий, синтезирующих в процессе метаболизма пропионовую кислоту. *Propionibacterium* обычно имеют вид палочек размером 0,5–0,8 на 1,0–1,5 мкм; реже, в зависимости от условий и цикла развития, – кокковидной, изогнутой или булаво-видной формы. *Propionibacterium* размножаются бинарным делением и не образуют спор. Пропионовокислые бактерии являются возбудителями пропионовокислого брожения, при котором углеводы ферментируются с образованием главных продуктов брожения – пропионовой кислоты и ее солей – пропионатов. Кроме пропионовой кислоты, пропионовокислые бактерии продуцируют уксусную кислоту, углекислый газ и др. *Propionibacterium* обитают в желу-

дочно-кишечном тракте жвачных животных, часто обнаруживаются в сыром молоке. Микроскопический препарат микроорганизмов представлен на рис. 3.



Рис. 3. Пропионовокислые бактерии

Большинство пропионибактерий не могут развиваться при значениях pH менее 5,0–4,5. *Propionibacterium* переносят лишь низкое парциальное давление кислорода. Оптимальная температура их развития 30–35 °С. *Propionibacterium* кроме сахаров и молочной кислоты способны сбраживать пировиноградную кислоту, глицерин и другие вещества. Ряд видов *Propionibacterium* способны продуцировать витамин В₁₂. В микробиологической промышленности в качестве продуцентов витамина В₁₂ используют штамм *Propionibacterium Shermanii*.

Пропионовокислые бактерии используют в сыроделии при производстве полутвердых сыров с высокой температурой второго нагревания. После окончания молочнокислого брожения в сырах начинается стадия развития пропионовокислых бактерий, сбраживающих молочную кислоту с образованием уксусной и пропионовой кислот и диоксида углерода. Летучие кислоты придают сырам специфический вкус и запах, а диоксид углерода участвует в формировании рисунка сыра.

Уксуснокислые бактерии. Уксуснокислые бактерии – грамотрицательные, палочковидные бесспорные, строго аэробные организмы, развивающиеся в тех же условиях, что и дрожжи. К числу окисляемых соединений относятся одноатомные спирты, содержащие от 2 до 5 углеродных атомов, а также многоатомные спирты –

производные сахаров. Окисление первичных спиртов приводит к образованию кислот. Бактерии способны окислять этиловый спирт в уксусную кислоту, пропиловый спирт – в пропионовую кислоту, бутиловый спирт – в масляную кислоту. Некоторые виды бактерий способны окислять также глюкозу в глюконовую кислоту, ксилозу и арабинозу – в ксилоную и арабановую кислоты. Этиловый спирт является главным источником жизнедеятельности уксуснокислых бактерий. Довольно требовательны к субстратам для роста. Почти все виды нуждаются в отдельных витаминах, в первую очередь в пантотеновой кислоте, но есть формы, способные к синтезу всех факторов роста. Микроскопический препарат микроорганизмов представлен на рис. 4.

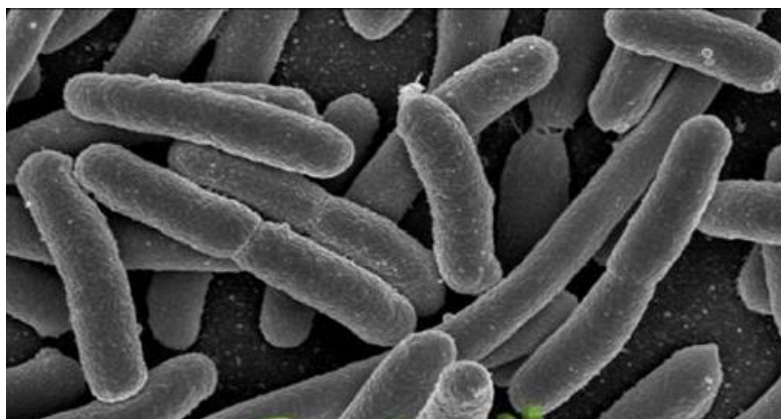


Рис. 4. Уксуснокислые бактерии

Наиболее распространенные виды бактерий – *Acetobacter aceti*, *Acet. Pasteurianum*, *Acet. oxydans*. Они имеют форму палочек длиной 1–3 мкм, часто соединены в цепочки. Оптимальная температура для роста 20–35 °С. *Acetobacter aceti* выдерживает концентрацию спирта 10–11 %. Уксуснокислые бактерии часто развиваются вслед за дрожжами, используя продукт спиртового брожения как субстрат для роста. При накоплении в сбраживаемом сусле 0,01 % уксусной кислоты задерживается жизнедеятельность дрожжей, а при 0,2 % подавляется. Применяются в микробиологической промышленности для получения столового уксуса и в производстве аскорбиновой кислоты (на этапе окисления сорбита в сорбозу).

Бифидобактерии. Бифидобактерии (лат. *Bifidobacterium*: *bifidus* – разделенный надвое и *bacteria* – бактерия) – род грамполо-

жительных анаэробных бактерий, представляющих собой слегка изогнутые палочки длиной 2–5 мкм, иногда ветвящиеся на концах, спор и капсул не образуют. Оптимальная температура развития 37–41 °С, оптимальное значение pH 6–7, при pH ниже 4,5 и выше 8,5 рост микроорганизмов прекращается. Для размножения бифидобактерий необходимы значительные количества факторов роста. Многие виды нуждаются в биотине, пантотеновой кислоте, цистеине, рибофлавине, пуриновых и пиримидиновых основаниях, пептидах, аминасахарах, коферменте А, олигосахаридах, некоторых ненасыщенных жирных кислотах и др. Отдельные штаммы нуждаются в углекислом газе, аммиаке, гистидине. Из аминокислот требуются лизин, пролин, серин, аланин, аспарагиновая и глутаминовая кислоты. Некоторые штаммы бифидобактерий растут при наличии азотфиксирующих олигосахаридов – N-ацетил-глюкозамина, N-ацетил-галактозамина, N-ацетил-маннозамина и др., которые отсутствуют в коровьем молоке (содержатся в женском молоке).

В синтетических средах бифидобактериям для роста необходимы железо, магний, фосфаты, хлориды калия и натрия, в некоторых случаях – марганец. Бактерии составляют 80–90 % кишечной флоры детей, находящихся на грудном вскармливании, и молодняка млекопитающих в подсосном периоде. Микроскопический препарат микроорганизмов представлен на рис. 5.



Рис. 5. Бифидобактерии

Присутствие бифидобактерий в кишечнике полезно для ребенка и молодых животных, так как бифидобактерии подавляют развитие различных гнилостных и болезнетворных микроорганизмов. По окончании молочного вскармливания бифидофлора сменяется обычной кишечной микрофлорой, характерной для взрослых организмов. Живые бифидобактерии обладают высокой антагонистической активностью против широкого спектра патогенных и условно-патогенных микроорганизмов кишечника (включая стафилококки, протей, энтеропатогенную кишечную палочку, шигеллы, некоторые дрожжеподобные грибы); восстанавливают равновесие кишечной микрофлоры; нормализуют пищеварительную и защитную функции кишечника; активизируют обменные процессы; повышают неспецифическую резистентность организма.

В молоке бифидобактерии развиваются медленно, так как коровье молоко не является естественной средой их обитания. Одной из причин плохого роста бифидобактерий в молоке служит растворенный в нем кислород. Рост бифидобактерий в коровьем молоке стимулируют экстракты дрожжей, гидролизованное молоко, а также увеличение соотношения белок: лактоза. Сильный стимулирующий эффект роста бифидобактерий получают при использовании гидролизатов казеина. Растительными стимуляторами роста бифидобактерий в молоке являются обезжиренная соя, экстракт картофеля, тростниковый сахар, кукурузный экстракт, морковный сок. В качестве стимуляторов роста применяют также соли железа, сорбит, микроэлементы в виде сернистой меди и лактата железа.

Бифидобактерии в процессе жизнедеятельности вырабатывают ряд органических кислот. В основном это уксусная и молочная кислоты (в молярном отношении 3:2), а также муравьиная и янтарная. Бифидобактерии синтезируют аминокислоты, белки, витамины В1, В2 (рибофлавин), В6 (пиридоксин), В12, биотин, никотиновую и фолиевую кислоты.

Бифидофлора человека представлена пятью видами: *B.bifidum*, *B.longum*, *B.adolescentis*, *B.breve* и *B.infantis*. Первые три вида встречаются в биоценозе кишечника с наибольшей частотой – в 39–75 % случаях. Виды *B.breve* и *B.infantis* обнаруживаются реже – в 16–36 % случаях и только у детей грудного возраста. Поскольку эти виды свойственны детям раннего возраста, то и использование одного из них, *Bifidobacterium breve*, при разработке препаратов-

эубиотиков на его основе весьма перспективно. Положительные эффекты бифидобактерий позволили в свое время рассматривать эти микроорганизмы как эффективный биокорректор и основу для создания препаратов, обладающих многофакторным регулирующим и стимулирующим воздействием на организм, а также как одну из основных категорий функционального питания.

Маслянокислые бактерии. Маслянокислые бактерии относятся к сахаролитическим клостридиям; строгие анаэробы, имеющие подвижные крупные спорообразующие, грамположительные палочки длиной до 10 мкм. Споры их цилиндрической или эллипсоидальной формы, похожи на теннисную ракетку. Наряду с масляной кислотой они могут образовывать (в меньших количествах) уксусную, молочную, капроновую, каприловую и другие кислоты, а также этиловый и бутиловый спирты. Возбудители этого брожения развиваются главным образом в трубопроводах, насосах и других скрытых местах. Оптимальная температура для роста бактерий 30–40 °С, при pH ниже 4,9 они не развиваются. Наиболее распространены следующие виды маслянокислых бактерий: Клостридиум бутирикум (*Clostridium butyricum*), Клостридиум ацетобутиликум (*Clostridium acetobutylicum*), *Clostridium pasteurianum*, *Clostr. saccharobutyricum*. Микроскопические препараты микроорганизмов представлены на рис. 6.

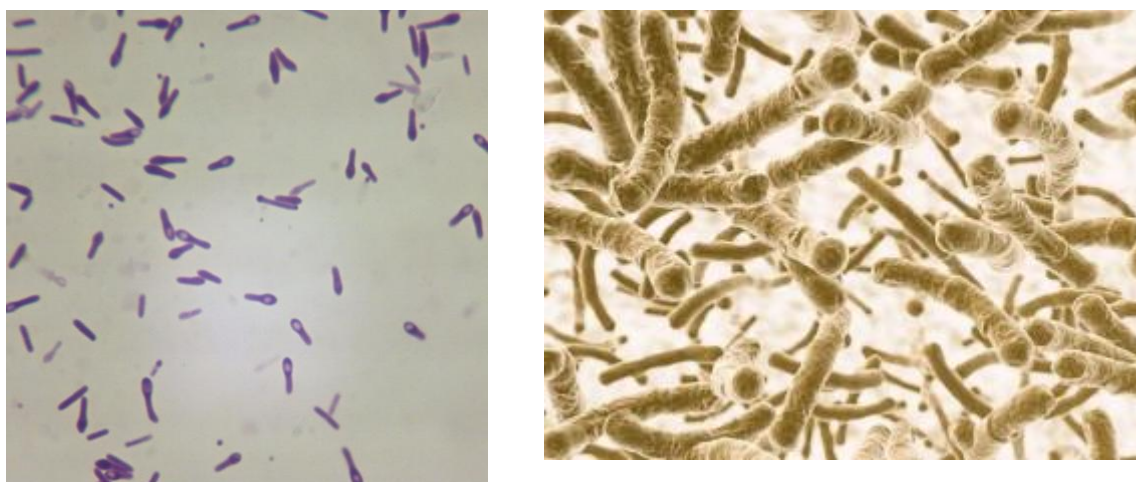


Рис. 6. Маслянокислые бактерии

Маслянокислые бактерии опасны для спиртового производства, так как вырабатываемая ими масляная кислота даже в очень малых концентрациях (0,0005 %) подавляет развитие дрожжей. Особенно опасно маслянокислое брожение в производстве сыра, так как оно вызывает порок «позднее вспучивание» сыров. Борьба с маслянокислыми бактериями затруднена тем, что при тепловой обработке молока не уничтожаются споры маслянокислых бактерий.

Возбудителями порока «позднее вспучивание» в сыроделии являются масляно-кислые бактерии *Clostridium tyrobutyricum*, которые развиваются в созревающем сыре после прекращения молочнокислого процесса и повышения pH сыра вследствие накопления продуктов белкового распада при его созревании.

Маслянокислые бактерии попадают в сыр с молоком при кормлении коров некачественным силосом. Споры полностью выдерживают высокотемпературную кратковременную обработку и при пастеризации молока-сырья не погибают. Они прорастают в сырах и могут расти при температуре выше 7 °С в анаэробных условиях, продуцируя главным образом масляную кислоту, CO₂ и H₂ путем расщепления молочной кислоты. Для позднего вспучивания характерны: неправильный, щелевидный рисунок сыра; размягченная, губчатая консистенция; резкий запах масляной кислоты; неприятный сладковатый и даже салистый вкус. Основной путь предупреждения вспучивания сыров состоит в соблюдении чистоты при получении молока на ферме. Применяют также специально подобранные антагонистические закваски.

Методические указания

Оборудование и материалы: биологические объекты, микроскоп, предметные стекла, иммерсионное масло, бактериологические петли, фильтровальная бумага, покровные стекла, спиртовки, растворы основных красок: фуксин Пфейффера, краска Грама, раствор Люголя, раствор метиленовой сини, вода дистиллированная, спирт 96 %.

Подготовить препараты чистых культур пропионовокислых, уксуснокислых микроорганизмов, маслянокислых и бифидобактерий, дрожжей в соответствии с методикой (см. лабораторную работу № 2).

Ознакомиться с морфологическими особенностями микроорганизмов, используя простой метод окраски. Зарисовать микроскопическую картину.

Подготовить препараты смеси бактериальных культур и окрасить по Граму в соответствии с методикой (см. лабораторную работу № 2). Определить отношение к окраске по Граму содержащихся в исследуемой смеси микроорганизмов. Зарисовать микроскопическую картину. Сделать выводы.

Контрольные вопросы

1. Назовите основные виды бактерий и их использование в пищевой биотехнологии.
2. Назовите морфологические особенности культур пропионовокислых бактерий и бифидумбактерий.
3. Как характеризуются исследуемые виды чистых культур микроорганизмов по отношению к краске Грама?

Оформление отчета

Отчет должен содержать:

1. Цель работы.
2. Описание одного вида микроорганизмов из списка, используемых в промышленности для получения целевых продуктов.
3. Наблюдаемую микроскопическую картину исследуемых микроорганизмов.
4. Выводы.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 4

ИЗУЧЕНИЕ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК И СПОСОБОВ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МОЛОЧНОКИСЛЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Цель работы – изучить биотехнологические характеристики молочнокислых бактерий и их применение в пищевой биотехнологии на примере йогуртовой и ацидофильной заквасок.

Ход работы. *Выполняются задания:*

Задание 1. Ознакомиться с биотехнологическими характеристиками молочнокислых микроорганизмов.

Задание 2. Ознакомиться с составом и свойствами заквасок: йогуртовой, ацидофильной, для производства сметаны и сыров.

Задание 3. Приготовить препараты заквасок и исследовать их состав.

Теоретическое обоснование

Молочнокислые бактерии широко распространены в природе. По морфологическим признакам их делят на стрептококки и палочки. В каждой группе имеются гомо- и гетероферментативные бактерии.

Молочнокислые стрептококки. Молочнокислые стрептококки относятся к семейству *Streptococcaceae*, родам *Lactococcus* и *Leuconostoc*. К гомоферментативным относятся молочный (*Lactococcus lactis*) и сливочный (*Lactococcus cremoris*) стрептококки. Гетероферментативными являются ароматобразующие стрептококки, способные продуцировать ароматические вещества (диацетил, ацетоин) и усваивать соли лимонной кислоты – цитраты. В эту группу входят *Lactococcus diacetylactis*, *Leuconostoc cremoris*, *Leuconostoc dextranicum*. Промежуточное положение между гомоферментативными и гетероферментативными стрептококками занимает термофильный стрептококк *Str. thermophilus*.

Молочнокислые стрептококки представляют собой шаровидные или овальные клетки размером до 1–2 мкм, располагающиеся в виде коротких цепочек или попарно; неподвижны, спор и капсул не образуют, по Граму красятся положительно. В молодых культурах некоторые штаммы сливочного стрептококка образуют слизистую

капсулу. Клетки ароматобразующих стрептококков несколько мельче, чем клетки *Lactococcus lactis* и *Lactococcus cremoris*, а клетки термофильного стрептококка крупнее, чем сливочного.

Молочнокислые стрептококки по отношению к кислороду являются факультативными анаэробами, т. е. растут не только в анаэробных условиях, но и при доступе молекулярного кислорода. Однако в присутствии кислорода у них не изменяется тип дыхания, так как не проявляется аэробное дыхание, а продолжается процесс брожения. Поэтому молочнокислые бактерии можно отнести к категории аэротолерантных (воздухотерпимых) анаэробов.

Температурные границы жизнедеятельности этих микроорганизмов довольно широки. Для мезофильных видов оптимальная температура составляет 25–30 °С, для термофильных – 38–43 °С. Минимальной температурой развития для мезофильных молочнокислых бактерий являются 10 °С, для термофильных – 20–22 °С. Некоторые молочнокислые бактерии способны расти при очень низких плюсовых температурах (до 3 °С). По потребности в питательных веществах молочнокислые бактерии относятся к наиболее сложным микроорганизмам. В качестве источника углерода они могут использовать моно- и дисахариды, органические кислоты.

Большинству видов молочнокислых бактерий для развития необходимы аминокислоты: аргинин, цистеин, глутаминовая кислота, лейцин, фенилаланин, триптофан, тирозин, валин. Только некоторые виды молочнокислых стрептококков могут расти на средах, содержащих аммонийные соли в качестве единственных источников азота.

Большинству молочнокислых бактерий необходимы витамины – рибофлавин (В₂), тиамин (В₁), пантотеновая (В₃), никотиновая (РР), фолиевая (В₉) кислоты, пиридоксин (В₆) и др. Этим объясняется положительное влияние на рост микроорганизмов добавок к питательным средам различных экстрактов (кукурузы, моркови, картофеля), дрожжевого автолизата и других витаминсодержащих соединений. Рост молочнокислых бактерий стимулируют и некоторые пептиды, пурины (аденин, гуанин, гипоксантин), пиримидины (урацил, тимин и др.), жирные кислоты (уксусная, олеиновая), а также лимонная кислота. Молочнокислые бактерии культивируют на обезжиренном стерильном молоке или на плотных и жидких искусственных питательных средах с использованием гидролизо-

ванного молока и других питательных веществ, получаемых из молока.

Развитие молочнокислых стрептококков в молоке вызывает его свертывание (за исключением *Leuconostoc demons*) с образованием ровного, без обильного отделения сыворотки плотного сгустка, имеющего приятные кисломолочные вкус и запах. Ароматобразующие стрептококки образуют сгусток, в котором можно обнаружить в небольшом количестве пузырьки углекислого газа. На питательной среде (агар с гидролизированным молоком и мелом) молочнокислые стрептококки образуют мелкие (0,5–1 мм) каплевидные колонии с ровным краем, с зонами просветления мела. Колонии в толще питательной среды (глубинные колонии) имеют форму лодочки или зерна чечевицы. *Lactococcus diacetylactis* на 3 %-м агаре может образовывать глубинные колонии в виде паучков или комочков ваты, похожих на колонии молочнокислых палочек.

Молочнокислые бактерии растут в средах с низким значением рН – от 5,5 до 8,8. Характерным свойством молочнокислых бактерий является высокая спиртоустойчивость. Они могут развиваться на питательных средах, содержащих 15–18 % этилового спирта, реже – при 24 %. Биохимические свойства молочнокислых бактерий изучают по энергии кислотообразования, предельной кислотности, способности сбраживать соли лимонной кислоты, по качеству сгустка, возможной протеолитической активности бактерий и др. Энергию кислотообразования определяют по времени образования сгустка молока (кислотность около 60 °Т) при внесении 0,5 см³ молодой (12–20-часовой) культуры в 10 см³ стерильного обезжиренного молока и выращивании посевов при оптимальной температуре.

Протеолитическую активность бактерий изучают на мясо-пептонном желатине, молоке или определяют с помощью специальных биохимических исследований и судят о ней по общему количеству образовавшихся водорастворимых продуктов распада белка, образованию аммиака, сероводорода, индола, которые характеризуют глубокий распад белковых веществ. Способность сбраживать соли лимонной кислоты (цитраты) определяют посевом бактерий на плотную среду с цитратом кальция. Появление зон просветления вокруг колоний свидетельствует об образовании водорастворимых продуктов брожения при наличии фермента

цитритазы. Активность образования ароматических веществ устанавливают по количеству образовавшихся летучих соединений (методом возгонки) и четырехуглеродных соединений (диацетила и ацетоина). Молочнокислые стрептококки обладают различной активностью.

Lactococcus lactis является первым микроорганизмом, который выделен в чистой культуре (в 1873 г. Листером). *Lactococcus lactis* (рис. 7) встречается на растениях, с пылью и растительными частицами попадает на доильное оборудование, а затем в молоко. Он встречается в виде коротких цепочек из двух–шести звеньев. Оптимальная температура развития около 30 °С. Отдельные штаммы *Lactococcus lactis* могут медленно размножаться при низких температурах (ниже 7 °С). При температуре 25 °С за счет образования молочной кислоты показатель pH снижается примерно до 4,5 и молоко свертывается вследствие кислотной коагуляции казеина. *Lactococcus lactis* является активным кислотообразователем.

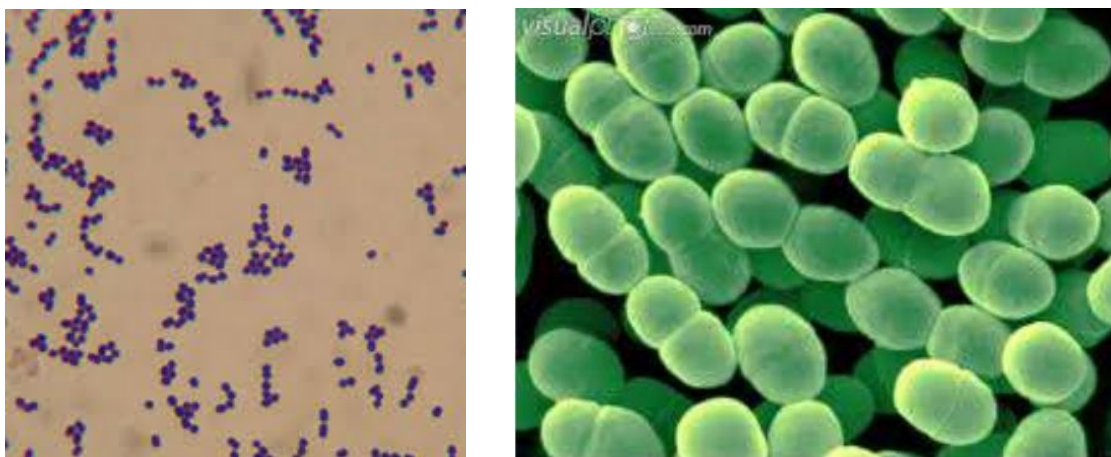


Рис. 7. *Lactococcus lactis*

Активные штаммы свертывают молоко за 4–7 ч. Предельная кислотность при его развитии достигает 120 °Т. Не развивается в среде, содержащей 6,5 % NaCl, и в щелочной среде при pH 9,5. Многие штаммы продуцируют антибиотик низин, который является полипептидом с молекулярной массой 3500. Он подавляет большинство стрептококков (но не энтерококков), стафилококков, микрококков, некоторые виды бацилл, лактобактерий, клостридий, актиномицетов. При этом в отношении грамотрицательных бактерий низин бактерицидным действием не обладает.

Lactococcus cremoris (рис. 8) в отличие от молочного стрептококка не сбраживает мальтозу и декстрин, лишен способности дезаминировать аргинин. Не растет на средах, содержащих 4 % KCl, а также при температуре 39–40 °С. При пониженных температурах культивирования (15–20 °С) некоторые штаммы образуют значительное количество летучих кислот. Имеются слизеобразующие штаммы, формирующие сгустки молока при температуре 10–18°С. Их используют в заквасках для производства сметаны. Энергия кислотообразования у *Lactococcus cremoris* слабее, чем у *Lactococcus lactis*, и составляет 6–8 ч, предельная кислотность 110–115 °Т. образует длинные цепочки. Оптимальная температура развития *Lactococcus cremoris* 20–25 °С. В течение 24 ч при этой температуре наблюдается свертывание молока при значении рН, равном 5,0–5,2.

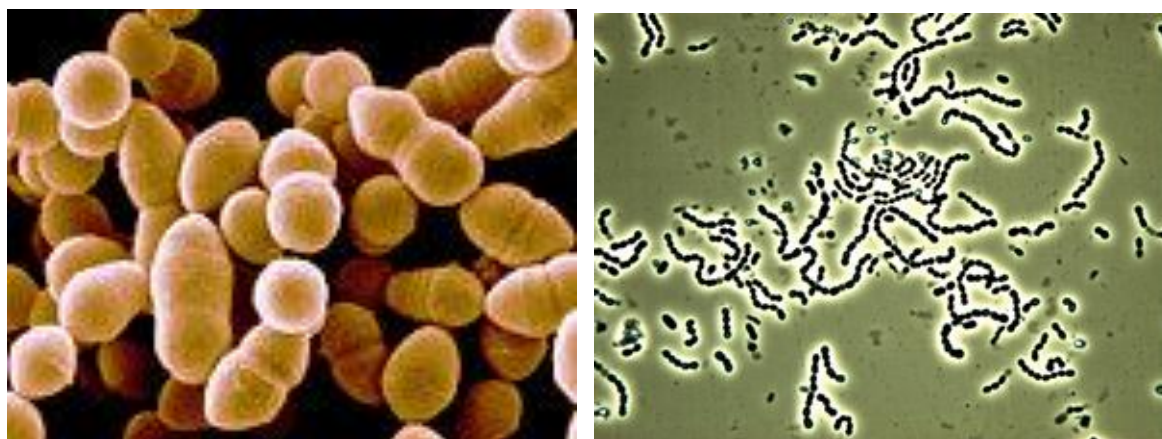


Рис. 8. *Lactococcus cremoris*

В заквасках *Lactococcus cremoris* в сочетании с *Lactococcus lactis* способствует образованию более густой консистенции продукта.

Ароматобразующие стрептококки ***Lactococcus diacetylactis***, выделяют фермент цитритазу, которая расщепляет цитраты с образованием диоксида углерода и ароматических веществ – ацетона и диацетила. Сравнительно слабый кислотообразователь, но образует диацетил в значительном количестве. Имеет слабую энергию кислотообразования (более 16 ч), предельная кислотность в молоке достигает 70–100 °Т. Сгусток молока часто содержит пузырьки газа (CO₂). При созревании сыров CO₂ участвует в формировании рисунка

сыра, в образовании глазков в сырной массе. При развитии *Lactococcus diacetylactis* в молоке сгусток приобретает специфический приятный запах и аромат, обусловленные накоплением диацетила. Ацетоин не обладает выраженным ароматом, но тесно связан с диацетилом. Для образования диацетила необходима лимонная кислота. Поэтому обогащение питательной среды лимонной кислотой способствует продуцированию ароматического вещества. Оптимальной температурой ароматообразования являются 25 °С. Многие штаммы разлагают аргинин с выделением аммиака, устойчивы к содержанию в среде 4 % NaCl. Штаммы *Lactococcus diacetylactis* вводят в состав заквасок для творога, сметаны, простокваши обыкновенной.

Leuconostoc dextranicum является также слабым кислотообразователем. Он свертывает молоко при оптимальной температуре через 2–3 суток. Предельная кислотность составляет 70–80 °Т. Оптимальная температура кислотообразования 18–20 °С при низком значении рН (менее 6), т. е. при накоплении молочной кислоты в процессе брожения. Часто входит в состав заквасок для сыров.

Leuconostoc cremoris молоко не свертывает, предельная кислотность 40–50 °Т. Входит в состав заквасок для производства кисло-сливочного масла и способствует сохранению аромата при его хранении.

Для развития *Leuconostoc dextranicum* и *Leuconostoc cremoris* большое значение имеет марганец, повышенное содержание которого в молоке в летне-осенний период стимулирует их рост и ароматообразование. Штаммы молочнокислых стрептококков: *L.lactis*, *L.cremoris*, *Leu. cremoris*, *L.diacetylactis*, *Leu.dextranicum* входят в состав заквасок для производства творога, сметаны, простокваши обыкновенной, кисломолочного масла, сыров.

Streptococcus thermophilus (рис. 9) по энергии кислотообразования превосходит все молочнокислые стрептококки, достигая уровня термофильных лактобактерий. Он сквашивает молоко через 3,5–6 ч, предельная кислотность составляет 110–115 °Т. Термофильный стрептококк не растет на средах пенициллина 0,01 МЕ/см³ и стрептомицина 5 мкг/см³, что используют в качестве тест-культуры при выявлении антибиотиков в молоке. Чувствителен к действию специфических бактериофагов. Более интенсивный рост термофильных стрептококков наблюдается при добавлении

к питательным средам основных аминокислот: валина, лейцина, изолейцина, лизина, аргинина, метионина, гистидина и пролина.

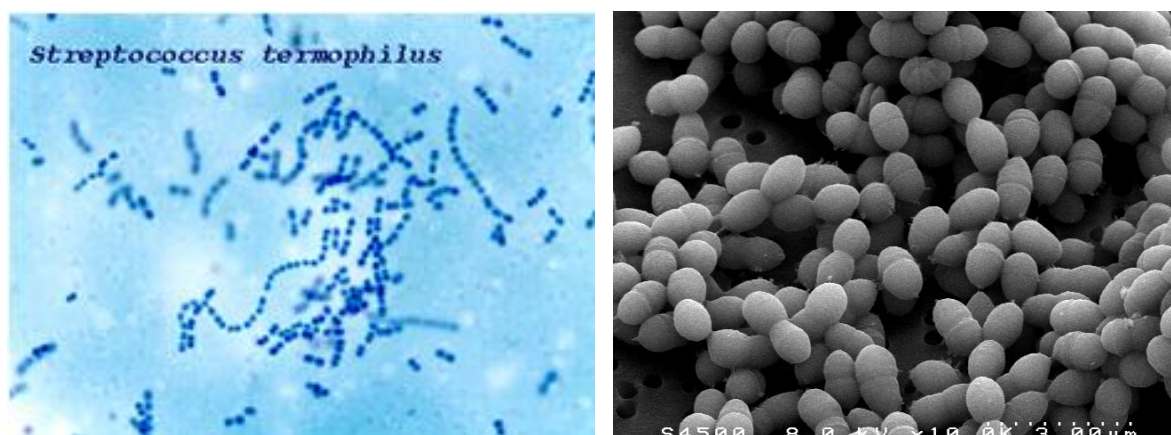


Рис. 9. *Streptococcus thermophiles*

S. thermophilus обладает относительно высокой термоустойчивостью. Он выдерживает температуру 75 °С в течение 15 мин и 65 °С в течение 30 мин, вследствие чего составляет значительную часть остаточной микрофлоры в молоке после пастеризации. В жидкой среде, содержащей глюкозу и 4 % NaCl, термофильный стрептококк кислоту не образует, а при содержании 2 % MgCl₂ молочную кислоту синтезируют отдельные штаммы. При наличии в среде 0,1 % метиленового голубого *S. thermophilus* не развивается. Некоторые штаммы образуют диацетил, в небольшом количестве синтезируют ацетоин.

Молочнокислые палочки. Молочнокислые палочки (лактобактерии) относят к семейству *Lactobacteriaceae*, роду *Lactobacterium*, включающему три подрода: *Thermobacterium*, *Streptobacterium* и *Betabacterium*. Термобактерии и стрептобактерии являются гомоферментативными, а бета-бактерии – гетероферментативными молочнокислыми палочками.

К **термобактериям** относятся 8 видов палочек, среди которых наиболее часто применяют *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. bulgaricum*, *L. lactis*. Длинные палочки, не образуют цепочек, при температуре ниже 15 °С не развиваются, оптимальный рост при температуре около 40 °С, гомоферментативные.

Подрод **стрептобактерии** включает 7 видов, среди которых в молочной промышленности используют *L. plantarum* и *L. rhamnosus*.

Образуют длинные цепочки, состоящие из коротких палочек, развиваются и при температуре ниже 15 °С, оптимальный рост при температуре 30 °С, гомоферментативные.

В подрод **бета-бактерий** входят 11 видов палочек, наиболее изученными среди них являются *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. fermentum*. Гетероферментативные.

Лактобактерии представляют собой палочки, одиночные или соединенные попарно, размером (4...10) x (0,5...0,6) мкм. Они неподвижны, спор и капсул не образуют, по Граму красятся положительно. Клетки стрептобактерии мельче, чем клетки термобактерий, и часто располагаются в виде цепочек. Бета-бактерии имеют наиболее мелкие и тонкие клетки.

Молочнокислые палочки являются факультативными анаэробами или микроаэрофилами. По отношению к температуре стрептобактерии и бета-бактерии являются мезофилами, термобактерии – термофилами. На обычных средах они не растут, их выращивают на средах с молоком. При развитии в молоке вызывают образование однородного плотного сгустка с приятными кисло-молочными запахом и вкусом.

На плотной питательной среде лактобактерии формируют мелкие гладкие блестящие колонии со сферической поверхностью серо-белого цвета. Колонии лактобактерий разных видов почти не различаются. Однако в некоторых случаях наблюдаются волокнистые, врастающие в субстрат колонии R-формы в отличие от гладких колоний, относящихся к S-формам. Глубинные колонии термобактерий могут быть темными, желтовато-бурыми, иногда с короткими отходящими нитями. В отличие от глубинных колоний поверхностные колонии более крупные, локонообразные или зернистые. Глубинные колонии стрептобактерий имеют лодочкообразную форму, иногда с выростом.

Температурные границы роста для термобактерий составляют 20–55 °С, для мезофилов – 15–38 °С. Оптимальной температурой развития для *L. helveticus* являются 40 °С, для *L. bulgaricus*, *L. Lactis* – 45 °С, *L. acidophilus* – 37–38 °С. Для мезофилов оптимальной является температура 30 °С.

Лактобактерии обладают слабой протеолитической активностью, поэтому не растут в субстратах, где единственным источником азота является белок, т. е. где отсутствуют различные

аминокислоты. В то же время имеются молочнокислые бактерии, которые могут расщеплять белки.

Молочнокислые бактерии не восстанавливают нитраты в нитриты, не образуют пигментов. Цитохромы и пероксидазу не образуют, но некоторые продуцируют каталазу, разлагающую пероксид водорода (H_2O_2). Лактобактерии обладают хорошо выраженными сахаролитическими свойствами. Кроме глюкозы и лактозы они сбраживают и другие сахара. Так, многие гомо- и гетероферментативные виды (*L. plantarum* и *L. brevis* и др.) интенсивно используют пентозы, иногда даже активнее, чем глюкозу.

Гетероферментативные молочнокислые бактерии сбраживают фруктозу, поскольку у них имеется маннитдегидрогеназа, осуществляющая восстановление фруктозы до маннита. Продуктами сбраживания фруктозы также являются лактаты, ацетаты и углекислый газ.

Термофильные молочнокислые палочки являются активными кислотообразователями, они сквашивают молоко через 4–5 ч, предельная кислотность достигает 200–350 °Т,

Lactobacillus helveticus (рис. 10) является самым активным кислотообразователем, предельная кислотность молока при его развитии достигает 350 °Т. Эта палочка сбраживает мальтозу и декстрин, не сбраживает сахарозу, раффинозу, салицин. Некоторые штаммы развиваются в субстратах, содержащих до 5 % поваренной соли. Штаммы *L. helveticum* можно выделить из сычуга телят или кислого сырого молока. Используется вместе с *Streptococcus thermophilus* для приготовления эмментальского и грюйерского сыров. Не только образует молочную кислоту, но и участвует, благодаря наличию протеолитического эндофермента, в созревании сыров. Ее использование придает сыру выраженный пряный вкус.

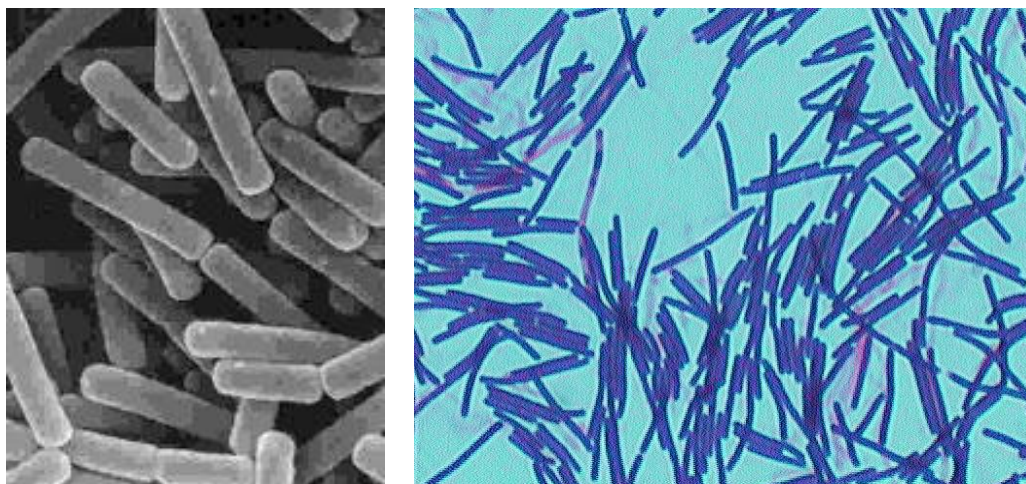


Рис. 10. *Lactobacillus helveticus*

Lactobacillus bulgaricus (рис. 11) образует длинные палочки и является гомоферментативной, доводит предельную кислотность молока до 200–300 °Т. Штаммы болгарской палочки образуют ацетальдегид – ароматическое вещество, придающее специфические вкус и запах, и антибиотические вещества, подавляющие нежелательную микрофлору кишечника. Болгарская палочка чувствительна ко многим антибиотикам, устойчива к бактериофагу. Штаммы *L. bulgaricus* выделяют, как правило, из сырого молока. Совместно с *Streptococcus thermophilus* она применяется для приготовления йогурта.

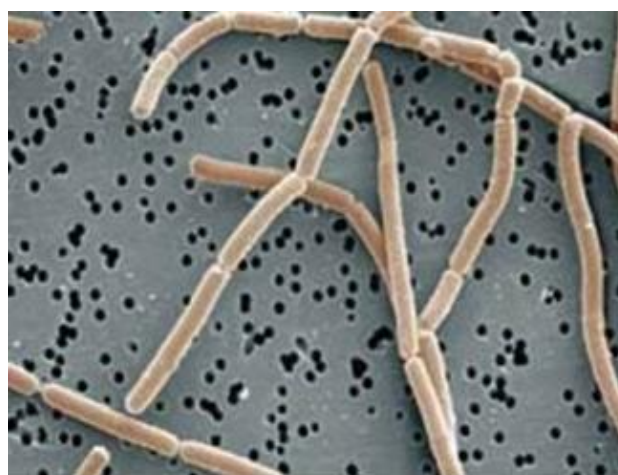
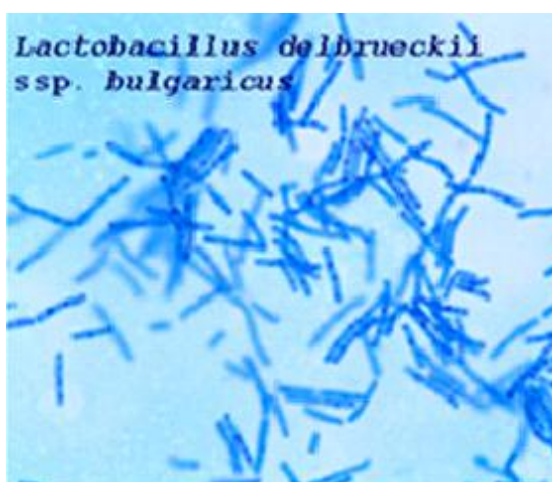


Рис. 11. *Lactobacillus bulgaricus*

Lactobacillus delbrueckii ssp. *bulgaricus* входит в состав заквасок для приготовления многих кисломолочных продуктов, таких как мечниковская простокваша, айран, кумыс, напитки «Снежок» и «Южный». Ее используют также в составе специально разработанных заквасок для производства итальянских мягких сыров (Горгонзола Дольче и Горгонзола Пиканта), итальянских вытяжных сыров семейства Паста Филата (Моцарелла, Качокавалло, Проволоне, Сулугуни), для производства швейцарского сыра Грюйер с высокой температурой второго нагревания.

L. acidophilus (рис. 12) является кишечным микробом, который можно выделить из содержимого пищеварительного тракта человека и различных животных. Ацидофильная палочка способна после культивирования в молоке вновь приживаться в кишечнике человека и подавлять там развитие патогенных и нежелательных микроорганизмов (сальмонеллы, шигеллы, стафилококки, эшерихии и др.). Антагонистическое действие *L. acidophilus* обусловлено продуцируемыми антибиотиками — ацидофилином и лактоцидином.

Ацидофильные бактерии устойчивы к щелочной реакции (рН 8,3), наличию в среде фенола (0,25–0,4 %), желчи (20 %), KCl (2 %). Предельная кислотность ацидофильной палочки достигает 200–250 °Т. *L. acidophilus* сбраживает сахарозу, мальтозу, салицин, часто раффинозу, декстрин. Имеются слизеобразующие штаммы ацидофильной палочки.

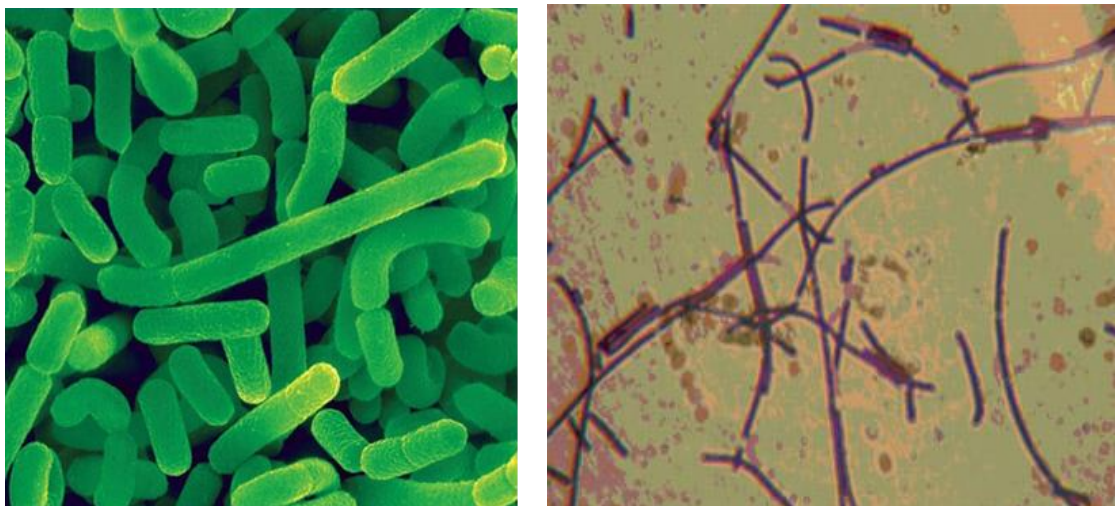


Рис. 12. *Lactobacillus acidophilus*

Lactobacillus delbrueckii ssp. lactis (**L. Lactis**) по своим свойствам и поведению в закваске проявляют большое сходство с *L.bulgaricus*. Сбраживают глюкозу, лактозу, мальтозу, сахарозу, галактозу, раффинозу, декстрин и салицин. Предельная кислотность молока, сквашенного *L.lactis*, достигает 120–180 °Т. В результате жизнедеятельности палочек происходит интенсивное кислотообразование, обуславливающее порок творога, сметаны, обыкновенной простокваши, – излишне кислотный вкус. Могут вызывать тягучесть и нечистый, неприятный вкус.

Стрептобактерии (рис. 13) обладают хорошо выраженными сахаролитическими свойствами. Они сбраживают фруктозу, галактозу, маннит, маннозу, раффинозу, рибозу, салицин, сорбит, трегалозу, эскулин и др. Глюкозу сбраживают без образования газа.

Лактобактерии продуцируют ряд гидролитических ферментов, в частности лактазу, расщепляющую лактозу (молочный сахар) и препятствующую развитию лактазной недостаточности. Лактобактерии поддерживают кислотность толстой кишки на уровне 5,5–5,6 рН.

Лактобактерии казеи (*Lactobacillus casei*) – вид грамположительных палочкообразных анаэробных неспорообразующих бактерий. *Lactobacillus casei* – нормальный резидент ротовой полости, кишечника.

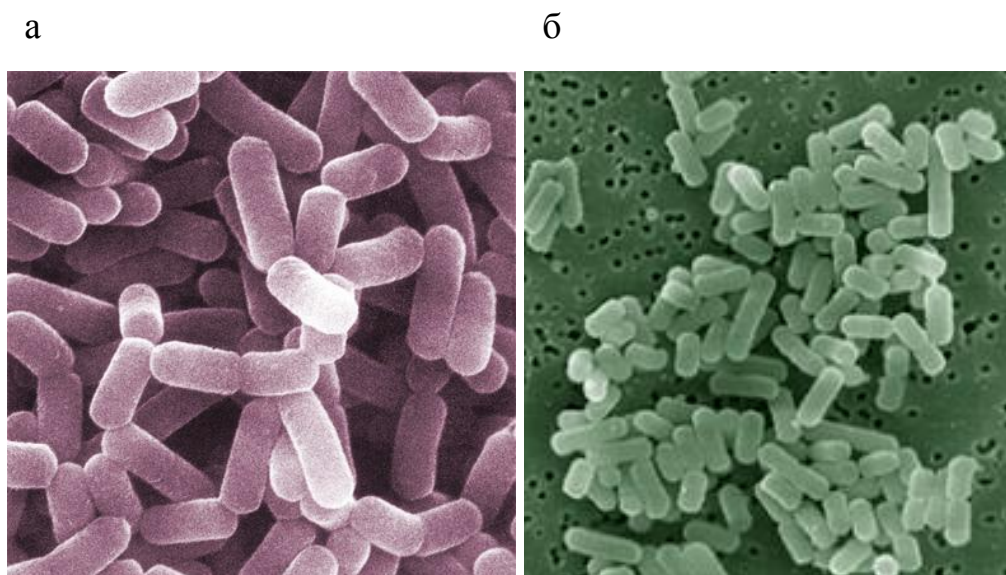


Рис. 13. Стрептобактерии:
а – *Lactobacillus plantarum*; б – *Lactobacillus casei*

Бактерии видов *Lactobacillus casei* и *plantarum* являются гомоферментативными и сбраживают лактозу с преимущественным образованием молочной кислоты. В молоке развиваются медленно, предельная титруемая кислотность 80–180 °Т. Мезофильные лактобациллы обладают сравнительно низкой терморезистентностью: они не выдерживают нагревания при 60 °С в течение 10 мин. Однако часть популяции выдерживает кратковременную пастеризацию при 72 °С и немного выше. *Lactobacillus casei subsp. casei* (сырная палочка) постоянно обнаруживается в различных сырах, особенно на поздних стадиях созревания последних. В молочной культуре популяция этого вида представлена слегка изогнутыми палочками толщиной 0,3–0,9 мкм и длиной 0,8–4,0 мкм, расположенными одиночно, парами или в виде цепочек. Характерной особенностью *Lactobacillus casei subsp. casei* является способность образовывать цепочки с разным количеством клеток. *Lactobacillus casei* отличается от *Lactobacillus plantarum* способностью образовывать газ из цитрата натрия. Оптимальная температура роста 30–32 °С, минимальная – 10 °С, максимальная – 45 °С.

Lactobacillus plantarum используется в составе микрофлоры антагонистических заквасок и для производства пробиотических напитков, так как является представителем резидентной микрофлоры кишечника. В морфологическом плане микроорганизмы этого вида чрезвычайно изменчивы. Они представляют собой палочки с закругленными концами толщиной от 0,5 до 1,0 мкм и длиной от 0,6 до 8 мкм; располагаются поодиночке, парами или в виде коротких цепочек. Размер палочек и расположение зависят от индивидуальных свойств штаммов, фазы развития культуры, состава питательных сред, условий выращивания.

Штаммы, используемые в составе заквасок и концентратов для сыров с низкими температурами второго нагревания, обычно состоят из клеток, по форме приближающихся к коккам (длиной 0,8–3,0 мкм; толщиной 0,5–0,6 мкм). При развитии в молоке значительным изменениям подвержена длина клеток. В частности, в благоприятных условиях роста популяции клетки *Lactobacillus plantarum* представлены в основном короткими палочками, нередко располагающимися парами и реже в цепочках по три клетки; при ухудшении условий (например, в кислых средах, что наблюдается при длительной выдержке заквасок) в микропрепарате преобладают длинные

клетки. Оптимальная температура роста 30–32 °С, минимальная – 10 °С, максимальная – 45 °С. *Lactobacillus plantarum* обладает специфической антагонистической активностью к маслянокислым бактериям. Исследования природы антагонизма показали, что данные культуры образуют в средах перекись водорода в концентрациях, ингибирующих или подавляющих развитие споровых анаэробных бактерий. В нашей стране закваски, содержащие *Lactobacillus plantarum* со специфической антагонистической активностью к маслянокислым и энтеробактериям, широко применяются в промышленности с начала 1970-х годов и получили высокую оценку производителей. В настоящее время биологические методы борьбы с вредной для сыроделия микрофлорой появились и за рубежом (так называемые защитные культуры). Мезофильные гомоферментативные лактобациллы нечувствительны к бактериофагам лактококков. Они стимулируют развитие лактококков в совместных культурах, поэтому включение в концентраты специально отобранных штаммов мезофильных лактобацилл, заведомо не образующих пороки в сырах, может в определенной степени повысить стабильность молочнокислого брожения при выработке сыра, что является необходимым условием получения сыров высокого качества.

Lactobacillus rhamnosus (Лактобактерии рамнозус) – вид грамположительных анаэробных неспорообразующих бактерий. Раньше *Lactobacillus rhamnosus* как подвида относился к виду *Lactobacillus casei*, однако по современной систематике *Lactobacillus rhamnosus* считается отдельным видом рода Лактобактерии.

Стрептобактерии обладают менее выраженной кислотообразующей способностью. Они сквашивают молоко через 2–3 суток, предельная кислотность составляет 180 °Т. Стрептобактерии *L. plantarum*, *L. rhamnosus* способны усваивать кроме лактозы также соли молочной кислоты, т. е. лактаты. Они растут в гидролизованном молоке, содержащем 6 % NaCl и 20–40 % желчи, восстанавливают и свертывают лакмусовое молоко и не образуют аммиак из аргинина. Обладают высокой протеолитической активностью (в 2 раза выше, чем у мезофильных молочнокислых стрептококков), содержание свободных аминокислот в молоке повышают с 10 до 60 мг %. *L. rhamnosum* в отличие от *L. plantarum* образует CO_2 из цитрата натрия. *L. plantarum* продуцирует пероксид водорода и синтезирует

бактериоцин плантарицин, действующий угнетающе на кишечную микрофлору и маслянокислые бактерии. Бактериоцины – вещества белковой природы, продуцируемые бактериями многих видов, угнетающие развитие родственных микроорганизмов. *Lactobacillus plantarum* используется в составе заквасок для приготовления силоса, квашеной капусты, сыров с низкой температурой второго нагревания.

Lactobacillus casei используются в различных БАДах и продуктах для придания им пробиотических свойств. На российском рынке кисломолочных продуктов наиболее известны Actimel компании Данон, содержащие штамм *Lactobacillus casei* Imunitass (или штамм DN-11400) и Imunele компании Вимм-Билль-Данн. За рубежом широко применяется штамм *Lactobacillus casei* Shirota (кисломолочный напиток Yakult), штаммы F19 (продукт Cultura фирмы Arla Foods), CRL431 (продукты фирмы Chr. Hansen).

К группе **бета-бактерий** (рис. 14) относятся *Lactobacillus brevis*, *L. buchneri* и *L. fermenti*. В молочных продуктах чаще встречается *L. brevis*. По виду и расположению клеток эти микроорганизмы не различаются. Клетки их представляют собой мелкие палочки. На поверхности плотных питательных сред они образуют круглые по форме колонии. Бета-бактерии являются очень слабыми кислотообразователями, они не свертывают молоко. Температурный оптимум их роста составляет 30 °С. При добавлении дрожжевого автолизата рост бактерий значительно усиливается и кислотность достигает 150–160 °Т. По своим свойствам они близки к ароматообразующим стрептококкам. Бета-бактерии растут при 15 °С и не растут при 48 °С, некоторые виды бета-бактерий не растут даже при 45 °С. Бета-бактерии образуют аммиак из аргинина и углекислый газ из глюкозы. Этими свойствами они отличаются от других молочнокислых палочек. Бета-бактерии не свертывают лакмусовое молоко и лишь частично его восстанавливают (порозовение). Они могут развиваться в среде, содержащей 4 % NaCl. Бета-бактерии имеют низкую терморезистентность. Входят в состав микрофлоры кефирных грибков.

Lactobacillus fermentum является грамположительным видом бактерий в роду *Lactobacillus*. Отличительная особенность этого вида заключается в том, что температурный оптимум роста у него значительно выше – в пределах 37–40 °С. При 15 °С рост не наблю-

дается. Вид *L. fermenti* часто встречается в заквасках и, по-видимому, является специфичным для хлебопекарного производства.

Исследование антиоксидантных свойств штамма показало, что он может предотвратить порчу мягких сырных продуктов. Эксперименты, проведенные путем введения штамма *Lactobacillus fermentum* в молочные продукты как пробиотического компонента, показали, что он был в состоянии подавить предполагаемых загрязнителей пищевых продуктов, таких как патогенные *Salmonella* SPP, *Shigella* SPP.

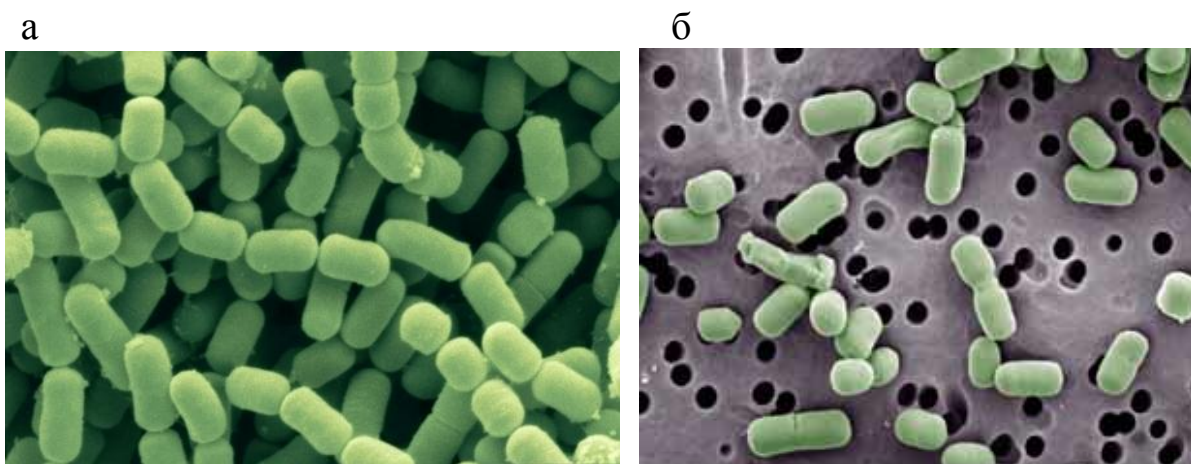


Рис. 14. Бета-бактерии:
а – *Lactobacillus fermentum*; б – *Lactobacillus brevis*

Lactobacillus buchneri – грамположительные, неспорообразующие, анаэробные. *L.buchneri* являются гетероферментативными бактериями, обладающими наибольшей антагонистической активностью против дрожжей и плесневых грибов. Они способны наряду с молочной продуцировать значительное количество уксусной кислоты в процессе ферментации, что улучшает аэробную стабильность силоса. Исследованиями выявлено, что *Lactobacillus buchneri* подавляют нежелательную микрофлору и эффективно борются с накоплением микотоксинов.

Общие методы идентификации молочнокислых бактерий

Для идентификации молочнокислых бактерий используют морфологические, культуральные и биохимические методы. Существуют также общие методы, которые учитывают биохими-

ческие отличия в обмене веществ и химическом составе клеток. В частности, молочнокислые бактерии можно идентифицировать по способности к сбраживанию углеводов и спиртов, а также по потребности в витаминах, необходимых для роста бактерий. *S. thermophilus* в отличие от других гомоферментативных молочнокислых стрептококков сбраживает, как правило, сахарозу. Более широким спектром сбраживания углеводов обладают гетероферментативные молочнокислые стрептококки, лейконостоки и мезофильные молочнокислые палочки, стрептобактерии и бета-бактерии. Имеются различия в сбраживании углеводов и у термофильных молочнокислых палочек. Считается, что *L. bulgaricus* сбраживают мальтозу. Однако отмечена способность сбраживать мальтозу и у штаммов *L. acidophilus*, которая зависит от активности их кислотообразования: она более выражена у слабых по кислотообразованию штаммов. Способность молочнокислых бактерий к сбраживанию углеводов сильно варьирует при изменении условий культивирования. Поэтому данный признак рассматривают как вспомогательный. При идентификации молочнокислых бактерий учитывается также их потребность в витаминах. Этот признак тоже может быть полезным лишь при очень тщательном проведении экспериментов на строго определенных питательных средах и при стандартных условиях. Для идентификации молочнокислых бактерий в качестве таксономического признака используется специфичное для каждого вида содержание гуанина и цитозина (Г+Ц), которое измеряется в процентах от общего содержания оснований в ДНК клетки.

Методические указания

Оборудование и материалы: биологические объекты, микроскоп, предметные стекла, иммерсионное масло, бактериологические петли, фильтровальная бумага, покровные стекла, спиртовки, растворы основных красок: фуксин Пфейффера, краска Грама, раствор Люголя, раствор метиленовой сини, вода дистиллированная, спирт 96 %.

Подготовить препараты заквасок: йогуртовой, ацидофильной, для сметаны и производства сыров и окрасить по Граму в соответствии с методикой (см. лабораторную работу № 2). Зарисовать микроскопическую картину. Определить вид микроорганизмов в составе исследуемых заквасок, используя приемы сравнения с

наглядными материалами (рис. 15). Сделать выводы о соответствии вида заквасочных культур составу заквасок.

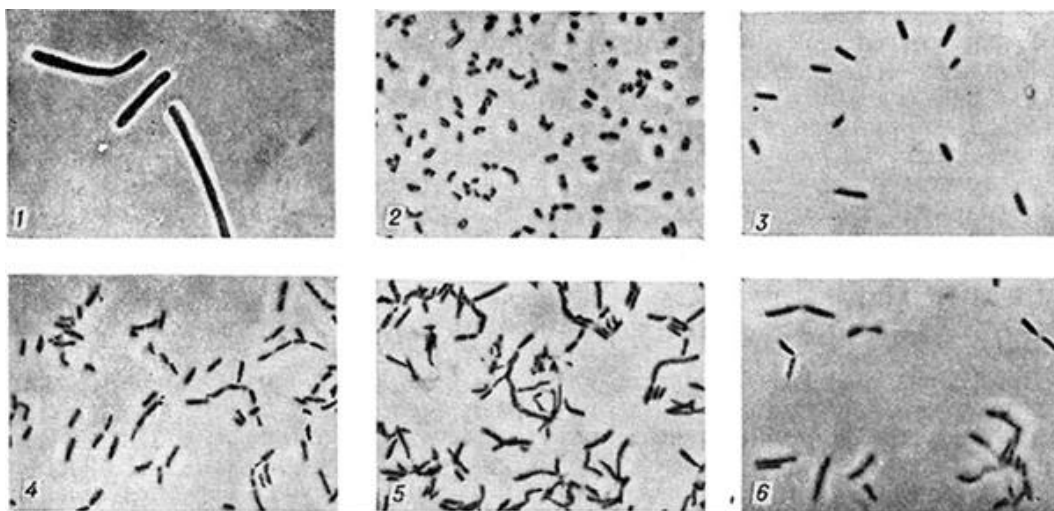


Рис. 15. Клетки некоторых видов молочнокислых бактерий, бульонная культура (96 ч):
1 – *L. acidophilus*; 2 – *L. fermentum*; 3 – *L. plantarum*; 4 – *L. casei*;
5 – *L. buchneri*; 6 – *L. brevis*; X 1680

Контрольные вопросы

1. Назовите основные группы молочнокислых микроорганизмов и примеры их применения в биотехнологическом производстве.
2. Назовите основные свойства молочнокислых микроорганизмов.
3. Какими биотехнологическими характеристиками обладают молочнокислые микроорганизмы?
4. Каковы основные методы идентификации молочнокислых бактерий?

Оформление отчета

Отчет должен содержать:

1. Цель работы.
2. Описание состава основных заквасок.
3. Наблюдаемую микроскопическую картину исследуемых препаратов заквасочных микроорганизмов.
4. Выводы.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 5

ИЗУЧЕНИЕ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ХЛЕБОПЕКАРНЫХ И ПИВНЫХ ДРОЖЖЕЙ

Цель работы – изучить биотехнологические характеристики дрожжей и их применение в пищевой биотехнологии на примере хлебопекарных и пивных дрожжей.

Ход работы. *Выполняются задания:*

Задание 1. Ознакомиться с составом и свойствами хлебопекарных и пивных дрожжей.

Задание 2. Изучить технологический процесс приготовления засевной дозы дрожжей.

Задание 3. Приготовить препараты дрожжей и исследовать их морфологический состав.

Задание 4. Исследовать свойства пивных и прессованных хлебопекарных дрожжей.

Выполнение лабораторной работы предусматривает опережающую теоретическую подготовку и использование учебно-методической литературы на занятии.

Теоретическое обоснование

Дрожжи являются одноклеточными неподвижными микроорганизмами, широко распространенными в природе; они встречаются в почве, на листьях, стеблях и плодах растений, в разнообразных пищевых субстратах растительного и животного происхождения. Они относятся к одному большому подразделению растительного царства *Mycophyta*. Микофиты отличаются от водорослей и высших растений тем, что они не содержат хлорофилла и, следовательно, не способны создавать для себя пищу путем фотосинтеза.

Дрожжи, используемые в хлебопечении и в бродильных производствах, относятся к семейству сахаромикетов, роду *Saccharomyces*. Формы клеток дрожжей разнообразны: шаровидная, полушаровидная, овальная, удлинённо-овальная, цилиндрическая, лимоновидная (апикулярная), стрелчатая, вытянутая. Размеры дрожжевых клеток варьируют в широких пределах: мелкие клетки имеют диаметр 1,5–2,0 мкм, длину 3–5 мкм; диаметр крупных клеток 8–10 мкм, длина 11–18 мкм; вытянутые клетки достигают в длину

20–25 мкм. Величина дрожжевых клеток зависит от расы, физиологического состояния дрожжей и состава питательной среды. Прессованные дрожжи содержат около 30 % сухих веществ и 70 % воды. В сухих веществах дрожжей содержится 90–95 % органических веществ и 5–10 % неорганических веществ. Среди органических веществ имеются белки и азотсодержащие вещества – 54–56 %, углеводы – 24–40 %, жиры – 2–4 % (к массе сухих веществ). Основная часть углеводов представлена гликогеном (запасное вещество), сходным по химическому строению с амилопектином крахмала. Среди неорганических веществ около половины фосфорной кислоты и 1/3 калия. Фосфорные соединения имеют важное значение в обмене веществ дрожжевых клеток, так как входят в состав промежуточных веществ спиртового брожения, а калий играет первостепенную роль в построении молекул белков и углеводов. Дрожжи богаты витаминами группы В, содержат эргостерин (провитамин D) и др. В дрожжах содержатся различные ферментные системы, участвующие в процессах гидролиза и синтеза, а также в процессах брожения и дыхания.

Температурный оптимум для размножения дрожжей находится в пределах 25–30 °С. Низкие температуры дрожжи переносят хорошо, хотя размножение их приостанавливается (минимальная температура развития дрожжей 2–3 °С). При температуре 40 °С рост и развитие дрожжей прекращается, дрожжи отмирают.

Дрожжи чувствительны к высокой концентрации растворенных в среде веществ. При высокой концентрации сахара в среде жизнедеятельность дрожжей прекращается, так как при этом увеличивается осмотическое давление среды и наступает плазмолиз клеток. Величина предельной концентрации сахара для различных рас дрожжей неодинакова.

Культурные дрожжи относятся к ацидофилам, т. е. развиваются в кислой среде, оптимальное значение рН для дрожжей 4,5–5,0. Являются факультативными анаэробами. Дрожжи могут получать свою энергию в присутствии кислорода (аэробно) путем дыхания и в отсутствие кислорода (анаэробно) путем брожения. Широкое использование дрожжей в промышленности основано на их способности вызывать спиртовое брожение.

Использование микроорганизмов в хлебопечении

Изготовление хлеба представляет собой цикл сложных биохимических процессов, происходящих в тесте с момента смешивания муки с водой и заканчивая его выпечкой. В состав муки, используемой для выпечки пшеничного и ржаного хлеба, входят компоненты, необходимые для развития многих микроорганизмов. Кроме крахмала в муке содержится до 2 % сбраживаемых сахаров – глюкозы, фруктозы, мальтозы, сахарозы, раффинозы. Мука хороших сортов пшеницы содержит до 14 % белка, до 2 % жиров и жироподобных веществ и до 2 % минеральных веществ, в том числе микроэлементы. Решающую роль в приготовлении хлеба наряду с ферментами муки играет жизнедеятельность микроорганизмов. Наиболее важное значение имеют дрожжи и молочнокислые бактерии, для развития которых в тесте есть все необходимые условия: влажность 40–50 %, незначительное содержание молекулярного кислорода и наличие питательных веществ.

Ведущая роль в формировании качества хлеба принадлежит дрожжам. Микробиологические процессы и связанные с ними биохимические изменения в тесте определяют пористость, окраску и сохранение свежести хлеба, придают ему вкус и аромат, несколько повышают его пищевую ценность.

Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* (рис. 16) различных рас являются главными разрыхлителями теста. Для хлебопечения особенно важны такие свойства дрожжей, как высокая потенциальная активность гликолитических ферментов, стойкость их хранения, способность переносить высокие концентрации сахаров и NaCl в среде. В хлебопечении чаще всего используют быстрорастущие расы сахаромикетов верхового брожения. У полноценных рас дрожжей подъемная сила, т. е. длительность подъема теста на стандартную высоту 70 мм в стандартной форме, должна быть не более 45 мин. На хлебозаводах применяют прессованные и сухие дрожжи.

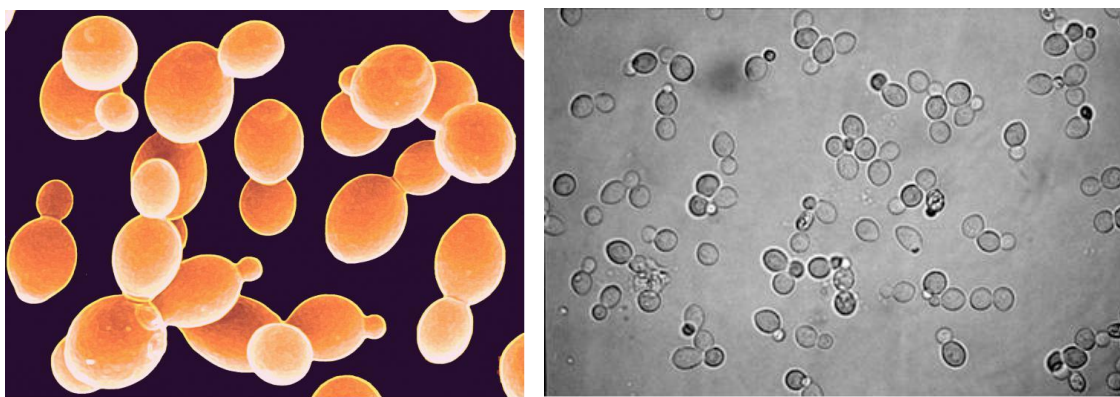


Рис. 16. Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*

Схема приготовления жидких дрожжей из прессованных и сухих включает в зависимости от сорта хлеба заквашивание осахаренной и охлажденной до 50 °С мучной заварки молочно-кислыми бактериями, например *Lactobacillus delbrueckii*. Они ускоряют процесс брожения в тесте и обладают высокой протеолитической активностью, которая позволяет накапливать в тесте значительное количество аминного азота, положительно влияющего на скорость роста и подъемную силу дрожжей. Наряду с сахаромикетами в тесто могут спонтанно попадать дрожжи родов *Candida* и *Pichia* – *C. krusei*, *C. utilis*, *C. guilliermondii*, *P. xylosa*, *P. vini*. В пшеничных и ржаных заквасках преобладают молочнокислые бактерии, а не дрожжи. По микробиологическому составу закваски ржаные и пшеничные различаются. Молочнокислые бактерии в зависимости от влажности и температуры – в заквасках пшеничных и ржаных преобладают: в густых – *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. paracasei*; в жидких – *L. fermentum*, *L. casei*, *L. plantarum*. Дрожжи: пшеничные закваски – преимущественно *S. cerevisiae*; ржаные – преимущественно *C. milleri* и незначительно – *S. cerevisiae*, при использовании заварок – преимущественно *S. cerevisiae*.

Использование микроорганизмов в пивоварении

Отличительная особенность пивных дрожжей – функциональная способность питаться жидкими гидратными растворами сахаров (трисахарида раффинозы) и к выработке в процессе брожения спиртов и двуокиси углерода. Дрожжевая клетка на 75 %

состоит из воды. В сухом веществе дрожжей содержатся 90 % органики: белков – 40–60 %; углеводов – 25–35 % и липиды. Минеральная составляющая клетки – калий, фосфор, кальций и др.

Метаболизм дрожжей в пивном сусле оказывает тонкое влияние на вкусовые качества и характерный аромат пива, поэтому подбор культурных рас дрожжей является привилегией и очень сложной проблемой любого пивовара.

Среди чистых культур пивоваренных дрожжей имеется много штаммов или рас. Эти дрожжи встречаются лишь в условиях низового брожения, в других субстратах их нет. Штаммы пивоваренных дрожжей различаются физиологическими признаками.

В отечественной промышленности применяют в основном пивоваренные дрожжи низового брожения Сахаромицес Карлсбергензис. Эти дрожжи имеют общие свойства: овальную или эллиптическую форму, размеры (длина 8–10 мкм, ширина 4–6 мкм); являются факультативными анаэробами; споры образуют редко; размножаются почкованием; по Граму окрашиваются положительно (рис. 17).

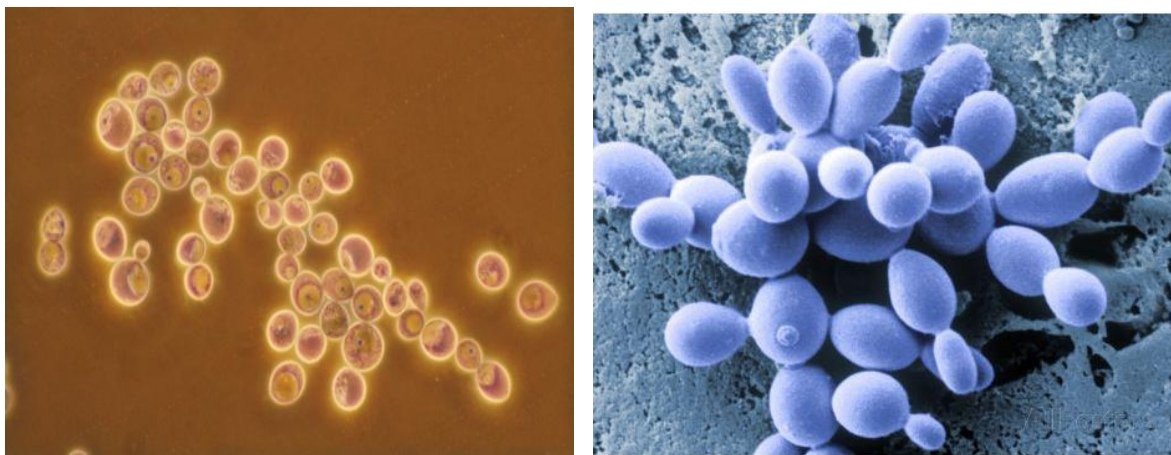


Рис. 17. Форма клеток пивоваренных дрожжей

Уровень жизнедеятельности дрожжей зависит от различных условий:

– углеводного состава сусла. Определяется наличием в сусле сбраживаемых и несбраживаемых сахаров. Содержание сбраживаемых сахаров в сусле составляет 70–80 % сухих веществ. Это мальтоза (60–70 %), мальтотриоза (15–20 %), глюкоза (10–15 %).

Быстрее всего сбраживаются моносахара, медленнее мальтоза и хуже всего мальтотриоза;

– азотистого состава сусла. Азотистые вещества необходимы клеткам для синтеза компонентов, обеспечивающих их рост и размножение. Наиболее ценными и важными источниками азота являются аминокислоты, пуриновые и пиримидиновые основания. От биосинтеза и распада аминокислот зависит образование ароматических веществ. Образующиеся при биосинтезе дрожжей аминокислоты придают пиву бархатистую консистенцию. При неблагоприятных условиях культивирования они могут быть причиной дрожжевого привкуса и помутнения пива;

– температуры и наличия в среде кислорода. При низкой температуре и анаэробных условиях размножение дрожжей замедляется, но вырастают они более крупными с большим запасом резервных веществ и высокой бродильной активностью. При повышении температуры и аэрации увеличивается потребность дрожжей в питательных веществах, размеры клеток уменьшаются, они не содержат запасных веществ и вырастают более слабыми.

Сахара сусла при производстве пива сбраживаются дрожжами в спирт. Среди дрожжей вида *Saccharomyces cerevisiae*, применяемых преимущественно в пивоварении в качестве культурных дрожжей, различают многочисленные штаммы. В пивоваренной практике эти штаммы делят на две большие группы – дрожжи верхового и низового брожения. Между ними существуют морфологические, физиологические и технологические различия (рис. 18).

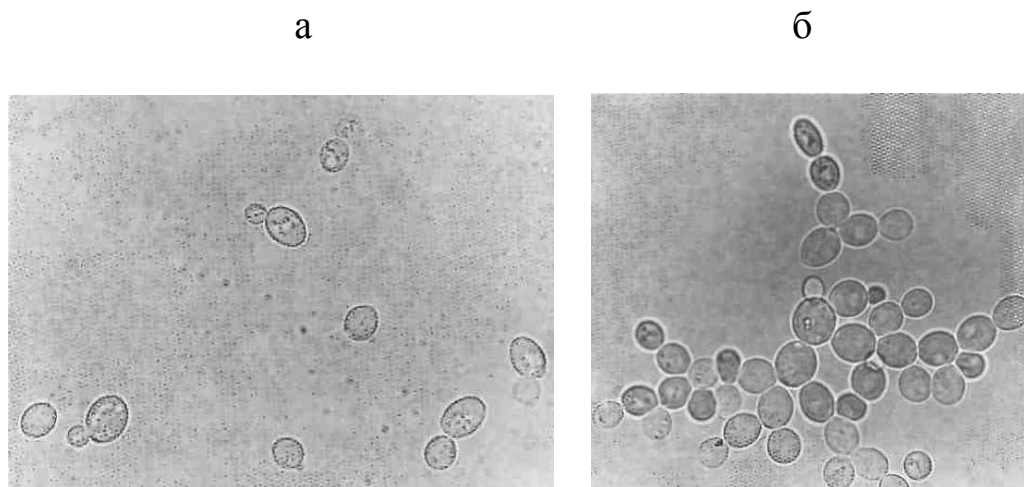


Рис. 18. Пивные дрожжи низового (а) и верхового (б) брожения под микроскопом

Морфологические признаки. Дрожжи верхового и низового брожения можно отличить под микроскопом по картине их почкования. Дрожжи низового брожения представляют собой почти исключительно отдельные клетки или их пары, тогда как дрожжи верхового брожения образуют почечные сообщества. У дрожжей верхового брожения материнская и дочерняя клетки, как правило, долго между собой связаны, благодаря чему образуются разветвленные сообщества клеток. У дрожжей низового брожения материнские и дочерние клетки после размножения отделяются друг от друга. Форма же клеток у тех и других дрожжей одинакова.

Физиологические различия. Важнейший физиологический отличительный признак дрожжей верхового и низового брожения состоит в сбраживании трисахарида раффинозы. Дрожжи низового брожения со своим набором ферментов могут полностью перерабатывать раффинозу, тогда как дрожжи верхового брожения сбраживают трисахарид лишь на 1/3. Другие отличительные признаки касаются обмена веществ при дыхании и брожении, а также способности к спорообразованию. В то время как дрожжи низового брожения в основном используют обмен веществ путем брожения, дрожжи верхового брожения отличаются выраженным обменом веществ путем дыхания. В соответствии с этим после брожения прирост биомассы у верховых дрожжей больше, чем низовых. Дрожжи низового брожения беднее ферментами, чем верховые. У них ограничена способность образовывать аскоспоры, по сравнению с верховыми они образуют споры реже и спорообразование продолжается дольше.

Технологические различия при сбраживании. Название штаммов дрожжей верхового или низового брожения происходит от характерной картины их поведения при брожении.

Дрожжи верхового брожения в процессе брожения в основном поднимаются на поверхность, тогда как низового брожения по окончании опускаются на дно. Дрожжи верхового брожения также опускаются на дно по окончании брожения, но значительно позже низовых. К моменту сбора дрожжей в конце главного брожения они еще находятся наверху и продолжают размножаться (если используются открытые чаны).

Другим существенным признаком дрожжей низового брожения является особенность хлопьеобразования, по этому признаку

пивные дрожжи низового брожения разделяют на пылевидные и хлопьевидные. У пылевидных дрожжей клетки тонко распределены в бродящем сусле и медленно опускаются на дно лишь в конце брожения. Клетки хлопьевидных дрожжей через некоторое время собираются в большие хлопья и затем быстро оседают. Способность дрожжей образовывать хлопья обусловлена генетически и передается по наследству. Дрожжи верхового брожения хлопья не образуют. Способность штаммов дрожжей образовывать хлопья имеет большое практическое значение. Хлопьевидные дрожжи дают пиво лучше осветленное, но с более низкой степенью сбраживания, чем пылевидные и дрожжи верхового брожения, тогда как верховые пылевидные дрожжи дают не такое прозрачное пиво, но с повышенной степенью сбраживания. Дрожжи верхового и низового брожения различаются также по применяемым температурам брожения. Низовыми дрожжами сбраживают сусло при температурах от 4 до 12 °С, а с верховыми штаммами дрожжей работают при температурах от 14 до 25 °С. Температуры брожения устанавливает пивовар.

К виду дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* относятся не только культурные штаммы, но также дикие дрожжи, опасные для пивоварения. Например, для пива вредителями являются винные дрожжи, а также дрожжи некоторых других видов и родов (рис. 19).



Рис. 19. Винные дрожжи *Saccharomyces chevalieri*

Попадание таких микроорганизмов в пиво называется контаминацией (инфицированием). Эти микроорганизмы, называемые, в отличие от культурных дрожжей, дикими дрожжами, попадают в пивоваренное производство главным образом с сырьем и всегда нежелательны. Они могут вызывать в пиве неприятные вкус и запах, а также помутнение.

Методические указания

Оборудование и материалы: микроскоп, предметные стекла, иммерсионное масло, бактериологические петли, фильтровальная бумага, покровные стекла, спиртовки, растворы основных красок: фуксин Пфейффера, краска Грама, раствор Люголя, раствор метиленовой сини, вода дистиллированная, спирт 96 %, весы лабораторные аналитические, водяная баня, термостат, влагомер «Эликс», пипетки на 5 и 10 см³, мерный цилиндр на 100 см³, колбы на 50–100 см³, бюретки на 25 см³, стаканы на 50 см³, чашка фарфоровая, пестик, шпатель, термометр со шкалой 0–100 С, 1 %-й раствор фенолфталеина, 0,1 н. раствор гидроксида натрия, 2,5 %-й водный раствор NaCl, мука пшеничная 2-го сорта с базисной влажностью 14,5 %, пакеты из газетной бумаги.

Подготовить препараты дрожжей.

Исследовать свойства пивных и прессованных хлебопекарных дрожжей. Определить влажность и кислотность дрожжей. Сделать вывод о соответствии полученных показателей требованиям ГОСТ Р 54731–2011.

Определить подъёмную силу прессованных хлебопекарных дрожжей. Подготовить и исследовать образцы теста, приготовленные на водном растворе поваренной соли, воде, молочной сыворотке и обезжиренном молоке.

Сравнить полученные результаты и сделать выводы.

Техника определения

Дрожжи разводят в стерильной среде с таким расчетом, чтобы в небольшой капле были одиночные клетки микроорганизмов. Для исследования взять каплю суспензии дрожжей.

Приготовить препараты «раздавленная капля», окрашенные препараты – простым методом с применением метиленовой сини и по методу Грама в соответствии с методикой (см. лабораторную работу № 2).

Рассмотреть препарат «раздавленная капля» в микроскоп. Сначала рассмотреть на малом увеличении; найти участок, где клетки лежат не густо, и перевести на большое увеличение. На основе наблюдений найдите разные штаммы дрожжей, отличающиеся видом клеток. В пекарских дрожжах обычно присутствуют две расы: одна представлена округло-эллипсоидными клетками, быстро разъединяющимися при почковании; другая – удлинённо-цилиндрическими, образующими при почковании кустики. Рассмотреть окрашенные препараты. Зарисовать микроскопическую картину.

Определение содержания влаги в пищевых системах с помощью влагомера «Эликс» (прибор Чижовой)

Определение влажности на этом приборе основано на прогревании испытуемого материала инфракрасными (тепловыми) лучами, излучаемыми темным нагретым телом. Скорость высушивания в приборе обеспечивается быстрым прогревом до относительно высоких температур при кратковременной выдержке исследуемого продукта, распределенного тонким слоем в бумажном пакете. Прибор состоит из двух металлических плит круглой или четырехугольной формы с электрическим обогревом, скрепленных шарнирами, имеющих приспособление для регулирования зазора между плитами. Применяют слабый и сильный обогрев: при слабом (100 Вт для каждой пластины) нагревание до 160 °С достигается за 100–110 мин, при сильном (400–500 Вт для каждой пластины) – за 20–25 мин. С сильного обогрева на слабый переключают с помощью переключателя. В каждую плиту прибора вмонтированы термометры для измерения температуры греющих поверхностей. При рабочем состоянии прибора расхождение в температуре верхней и нижней пластин не должно превышать 5 °С.

Расстояние между нагревательными поверхностями прибора не должно превышать 2 мм, что регулируется специальным приспособлением. При закладке и выемке пакетиков с исследуемым продуктом верхний блок прибора не следует поднимать выше, чем

под углом 45° . Нагревательные поверхности прибора должны быть всегда чистыми.

Для определения влаги в продукте применяют пакеты (одно- или двухслойные) из слабо проклеенной бумаги типа газетной. При работе на приборе круглой формы для изготовления пакетов берут бумагу размером 150x150 мм, складывают по диагонали, загибают углы и затем края примерно на 15 мм. При работе на приборе прямоугольной формы берут листы бумаги размером 200x140 мм, складывают пополам и загибают края примерно на 15 мм (рис. 20).

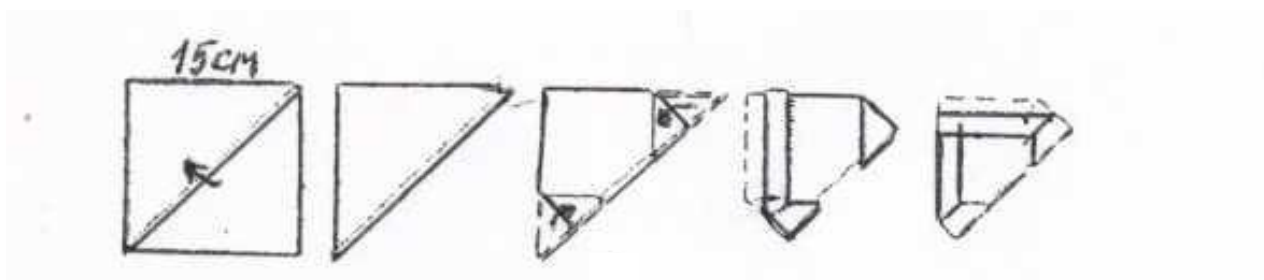


Рис. 20. Схема приготовления бумажных пакетов

Техника определения

При определении влажности прессованных дрожжей **пакет из газетной бумаги вкладывают в листок пергамента** несколько большего размера, чем первый пакет, не загибая краев. Готовые пакеты высушивают в приборе в течение 3 мин при температуре, при которой должен высушиваться исследуемый продукт, после чего их охлаждают и хранят в эксикаторе. Одновременно можно высушивать до шести пакетов.

Подготовленный пакет взвешивают с точностью до 0,01 г и помещают в него 4–5 г исследуемого продукта, который по возможности распределяют равномерно по всей внутренней поверхности пакета, быстро взвешивают. Вес пустого пакета и с навеской удобно записать на бортике пакета. Пакет с навеской закрывают, помещают в прибор, включенный на слабый нагрев и нагретый до требуемой температуры, после чего выдерживают при этой температуре необходимое время. Температура 150–152 °С и продолжительность выдержки 2 мин.

Одновременно можно высушивать 2 пакета. При высушивании продуктов с относительно высокой влажностью, таких как дрожжи, в связи с интенсивным выделением паров в первые моменты сушки пакет вздувается, поэтому верхнюю плиту прибора в начале сушки, во избежание разрыва пакета, приподнимают и поддерживают в таком положении до прекращения обильного выделения паров, которое обычно длится 30–50 с. Затем плиту опускают и продолжают высушивание в течение времени, установленного для данного продукта. Пакеты с высушенными пробами охлаждают в эксикаторе 3–5 мин и взвешивают.

Содержание влаги в продукте X в процентах определяют по формуле

$$X = \frac{100 \times (m_1 - m_2)}{m_1 - m_0},$$

где m_0 – масса пакета, г; m_1 – масса пакета с навеской до высушивания, г; m_2 – масса пакета с навеской после высушивания, г.

Результат записать.

Определение кислотности прессованных дрожжей

Повышение кислотности, прежде всего, свидетельствует о зараженности дрожжей кислотообразующими бактериями. Кислотность выражают в миллиграммах уксусной кислоты на 100 г дрожжей.

Техника определения

Навеску дрожжей (10 г) перенести в фарфоровую ступку и растереть в 50 мл дистиллированной воды комнатной температуры.

Прибавить 3 капли фенолфталеина и оттитровать 0,1 н. раствором NaOH (перемешивая содержимое пестиком) до появления слабо-розовой окраски, не исчезающей в течение 1 мин.

Обработать результаты.

Кислотность дрожжей в пересчете на уксусную кислоту (Н) в миллиграммах на 100 г дрожжей вычисляют по формуле

$$H = \frac{V \cdot 6 \cdot 100 \cdot K}{10},$$

где V – объем 0,1 моль/дм³ раствора щелочи, израсходованный на титрование, см³; 6 – объем уксусной кислоты, соответствующий 1 см³ 0,1 н. раствора NaOH, мг; 100 – переводной коэффициент; K – поправочный коэффициент 0,1 моль/дм³ раствора NaOH.

Вычисления проводят с точностью до целого числа.

Ускоренный метод определения подъемной силы дрожжей (по шарик)

Метод основан на определении скорости всплывания в воде шарика теста, замешанного в строго определенных условиях. Быстротой подъема теста читают количество минут, прошедших со времени опускания шарика теста в воду до момента его всплывания. Всплывание происходит тем скорее, чем быстрее увеличивается объем в результате накопления углекислого газа дрожжами. Плотность свежесмешанного теста около 1,4 г/см³. В процессе брожения она уменьшается; когда плотность шарика станет меньше единицы, он всплывает. Хорошие дрожжи поднимают шарик за 14–20 мин. Если подъем шарика происходит после 24 мин, дрожжи считаются неудовлетворительного качества.

Техника определения

От средней пробы отбирают и на лабораторных весах взвешивают 0,31 г дрожжей; переносят в фарфоровую чашку и приливают 4,8 см³ приготовленного раствора поваренной соли, нагретого до 35 °С; тщательно перемешивают шпателем или пестиком.

К полученному раствору добавляют 7 г муки, замешивают тесто и придают ему форму шарика.

Шарик опускают в стакан с водой, нагретой до температуры 35 °С, и помещают в термостат с той же температурой.

Обрабатывают результаты.

Подъемная сила дрожжей характеризуется временем, прошедшим с момента опускания шарика в воду до момента его всплывания.

Время подъема шарика в минутах умножают на коэффициент 3,5, полученный эмпирически, для определения подъемной силы.

Повторяют эксперимент в соответствии с методикой и определяют подъёмную силу дрожжей, используя для замешивания теста вместо раствора поваренной соли дистиллированную воду, молочную сыворотку и обезжиренное молоко.

Сравнивают результаты исследования и делают выводы.

Контрольные вопросы

1. Опишите свойства дрожжей, важные для хлебопечения.
2. Каковы условия среды, благоприятные для развития дрожжей?
3. Назовите морфологические признаки дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.
4. Охарактеризуйте благоприятные условия жизнедеятельности пивных дрожжей.
5. Каковы морфологические особенности дрожжей верхового и низового брожения?
6. Назовите технологические различия при сбраживании среды дрожжами верхового и низового брожения.
7. Каким методом определяется подъемная сила дрожжей? Что характеризует этот показатель?
8. Почему дрожжевым организмам отводится важная роль в пищевой промышленности?
9. Почему молочная сыворотка часто используется в качестве питательной среды?

Оформление отчета

Отчет должен содержать:

1. Цель работы.
2. Описание основных характеристик хлебопекарных и пивных дрожжей
3. Наблюдаемую микроскопическую картину исследуемых дрожжей.
4. Результаты исследования свойств дрожжей.
5. Выводы.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 6

ИЗУЧЕНИЕ ТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЕФИРНЫХ ГРИБКОВ

Цель работы – изучить состав и свойства кефирных грибков, процесс приготовления, применение кефирной грибковой закваски в пищевой биотехнологии.

Ход работы. *Выполняются задания:*

Задание 1. Ознакомиться с составом микрофлоры и свойствами кефирных грибков.

Задание 2. Изучить технологический процесс приготовления кефирной грибковой закваски.

Задание 3. Приготовить кефирную грибковую закваску.

Задание 4. Приготовить микроскопические препараты кефирного грибка и грибковой закваски.

Выполнение лабораторной работы предусматривает опережающую теоретическую подготовку и использование учебно-методической литературы на занятии.

Теоретическое обоснование

Для производства кефира используется закваска, приготовленная на кефирных грибах (рис. 21).

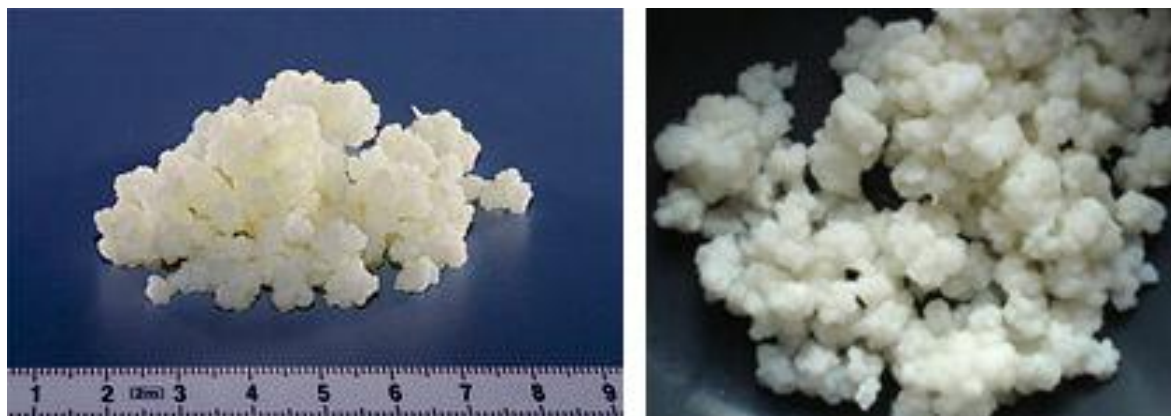


Рис. 21. Кефирные грибки

Кефирные грибки представляют естественную закваску для получения кефира. Кефирные грибки имеют всегда определенную

структуру и ведут себя биологически как живой организм: растут, делятся и передают свои свойства и структуру последующим поколениям. На практике новые порции кефирных грибков получают в результате роста и размножения ранее существовавших. При микроскопировании микротомных срезов кефирного грибка обнаруживаются тесные переплетения палочковидных нитей, которые образуют строну грибка, удерживающую остальные группы микроорганизмов.

В состав микрофлоры кефирных грибков (рис. 22) входят следующие группы микроорганизмов:

- молочнокислые и ароматобразующие лактококки;
- лейконостоки;
- гомо- и гетероферментативные молочнокислые палочки;
- бета-бактерии;
- дрожжи;
- уксуснокислые бактерии.



Рис. 22. Микроскопическая картина грибковой кефирной закваски

В кефирных грибах обнаружены дрожжи, как сбраживающие, так и не сбраживающие лактозу. Дрожжи, сбраживающие лактозу, обладают значительно более высокой антибиотической активностью по отношению к *Escherichia coli*, что определяет их большую роль в формировании свойств продукта.

Мезофильные молочнокислые стрептококки кефирного грибка – неоднородная группа. Она состоит из активных кислотообразователей (*L. lactis*, *L. cremoris*) и ароматобразующих стрептококков (*Leuconostoc dextranicum*, *L. Diacetylactis*, *Leu.mesenteroides*).

В настоящее время *L. lactis* и *L. cremoris* рассматриваются как постоянная и наиболее активная часть микрофлоры кефирного грибка, обеспечивающая быстрое нарастание кислотности закваски в первые часы сквашивания. Ароматобразующие стрептококки участвуют в формировании специфического вкуса и аромата кефира, а при излишнем развитии могут вызывать газообразование.

Термофильный стрептококк *S. thermophilus*. Эти лактобактерии запускают процесс сквашивания, формируют приятный кисломолочный аромат у продукта.

Термофильные молочнокислые палочки. *L. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. lactis* известны своей способностью подавлять нежелательную микрофлору в кишечнике. Эта группа микроорганизмов длительное время игнорировалась исследователями микрофлоры кефирных грибков. Считалось, что, поскольку продукт вырабатывают при сравнительно низких температурах, термофильных микроорганизмов в нем не должно быть. Количество этих микроорганизмов резко возрастает при повышении температуры культивирования. Роль термофильных молочнокислых палочек в кефирной закваске и кефире достаточно существенна. Эта группа проявляет себя во всех случаях нарушения режимов культивирования грибков – повышения температуры, увеличения выдержки и т. д. Интенсивное развитие ее в закваске приводит к излишнему повышению кислотности и к подавлению мезофильных молочнокислых стрептококков.

Уксуснокислые бактерии *Acetobacter aceti*. Уксуснокислые бактерии играют важную роль в симбиозе микроорганизмов кефирного грибка при умеренном развитии. При наличии уксуснокислых бактерий в закваске кефир имеет более типичные консистенцию и вкус. Однако при излишнем развитии уксуснокислых бактерий наблюдается порок – ослизнение.

Дрожжи *Saccharomyces lactis* и рода *Torulopsis* (*Saccharomyces* *Torulopsis holmii*) принимают участие в производстве ферментированных молочных продуктов в качестве биологических агентов, вызывающих спиртовое брожение. Эти дрожжи в симбиозе с лактобактериями помогают им правильно развиваться и вырабатывают комплекс естественных антибиотических веществ, что помогает организму лучше справляться с различными видами заболеваний и воспалений.

В состав микрофлоры кефирных грибков входят бета-бактерии, в основном *Lactobacillus brevis*, *L. Fermenti*.

Кроме постоянных микроорганизмов, в составе типичной микрофлоры кефирных грибков и закваски могут находиться посторонние микроорганизмы, попадающие при недостаточно тщательном культивировании грибков. К таким микроорганизмам относятся бактерии группы кишечной палочки, *Oidium lactis* и *Mycoderma sp.* Токсичные виды дрожжей (*Candida Albicans*) никогда не были обнаружены в кефирных грибках. Культура грибка делает невозможным размножение этого вида дрожжей. Некоторые дрожжи в кефире относятся к виду *Candida* (*Candida kefir*, *Pichia fermentans*, *Candida firmetaria*). Однако эти дрожжи не являются патогенными. Исследования показали, что некоторые виды дрожжей могут заселять кишечник и вытеснять Кандиду Албиканс, сдерживая ее рост в результате жизнедеятельности дрожжей и лактобактерий микрофлоры кефирного грибка.

Для получения закваски с однородной микрофлорой большое значение имеет постоянный микробиологический и органолептический контроль грибков и закваски. Грибки контролируют по вкусу, запаху, внешнему виду; закваску – по вкусу, запаху, консистенции, кислотности, микроскопическому препарату и по бро-дильной пробе. Нормальные активные грибки имеют кислый, специфический вкус, упругую консистенцию, белый или слегка желтоватый цвет; при помещении в молоко всплывают на поверхность. Хорошая грибковая закваска обладает кислым, выраженным вкусом кефирных грибков и имеет жидкую пенистую консистенцию. Кислотность закваски колеблется в пределах 90–110 °Т. В микроскопическом препарате грибковой кефирной закваски обнаруживают большое количество диплококков, коротких и длинных цепочек (стрептококков) и не в каждом поле зрения – дрожжи и палочки, часто в виде скоплений.

Методические указания

Оборудование и материалы: микроскоп, предметные стекла, иммерсионное масло, бактериологические петли, фильтровальная бумага, покровные стекла, спиртовки, растворы основных красок: фуксин Пфейффера, краска Грама, раствор Люголя, раствор

метиленовой сини, вода дистиллированная, спирт 96 %; термостат, пипетки на 5 и 10 см³, колбы на 50–100 см³, бюретки на 25 см³, стаканы на 50–100 см³, термометр со шкалой 0–100 °С, 1 %-й раствор фенолфталеина, 0,1 н. раствор гидроксида натрия, 2,5 %-й водный, кефирные грибки, сито металлическое.

При культивировании кефирных грибов и получении грибковой закваски на состав ее микрофлоры влияют следующие основные факторы: регулярность смены молока; продолжительность и условия выдержки закваски с грибами; температура культивирования; соотношение между грибами и молоком; перемешивание; промывка грибов.

Кефирная закваска. Для приготовления закваски на предприятиях применяют живые и сухие кефирные грибки. Сухие кефирные грибки перед использованием восстанавливают. Для этого кефирные грибки выдерживают в кипяченой охлажденной воде, а затем в охлажденном пастеризованном молоке до всплытия их на поверхность.

Для получения кефирной закваски активные грибки помещают в обезжиренное молоко, пастеризованное при температуре 92–95 °С в течение 20–30 мин, затем охлажденное до температуры 18–20 °С летом и 20 °С зимой в соотношении 1 часть грибов на 30–50 частей молока. Выращивание проводят при температуре 18–22 °С.

Полученную закваску перемешивают сначала через 15–18 ч, а затем через 5–7 ч. Перемешивание предотвращает развитие плесени на поверхности грибов, способствует более равномерному распределению в среде продуктов обмена микрофлоры, усиливает развитие дрожжей и уксуснокислых бактерий. В то же время некоторые исследователи указывают, что при интенсивном и частом перемешивании наблюдается чрезмерное развитие дрожжей, что отрицательно влияет на качество закваски. Постоянные механические воздействия на грибки при перемешивании приводят к их измельчению.

Готовую закваску процеживают через металлическое сито. Грибки, оставшиеся на сите после процеживания грибковой закваски, помещают в свежее пастеризованное и охлажденное молоко. Они представляют собой упругие комочки округлой формы различных размеров. При выдерживании в молоке грибки быстро размножаются. Мелкие грибки постепенно вырастают в крупные, которые затем

делятся на несколько мелких грибков, также разрастающихся. Их рост обусловлен активным размножением молочнокислых бактерий и дрожжей, находящихся в кефирных грибках. Грибковая закваска представляет собой уже культуральную жидкость, содержащую ту же микрофлору, что и кефирный грибок.

По мере роста грибки отделяют один-два раза в неделю с таким расчетом, чтобы соотношение грибков и закваски оставалось постоянным (от 1:30 до 1:50). Температура помещения, где культивируют грибки, также должна быть постоянной – 18–22 °С. При ослаблении активности закваски необходимо проверить соотношение между грибами и молоком.

Промывать грибки не допускается, так как это приводит к вымыванию полезной микрофлоры и снижению активности закваски. Микробиологические исследования показывают, что в результате промывки резко изменяется микрофлора кефирных грибков: с их поверхности удаляется значительная часть активных кислотообразователей (молчнокислых стрептококков). Для восстановления нормальной микрофлоры грибков и закваски требуется не менее 2–3 дней, следовательно, принцип постоянства состава закваски при этом нарушается.

Полученную закваску кислотностью 95–110 °Т используют для приготовления производственной кефирной закваски либо сразу для изготовления кефира.

Производственную кефирную закваску готовят следующим образом. В пастеризованное и охлажденное до 18–20 °С молоко добавляют 2–3 % грибковой закваски и сквашивают в течение 10–12 ч. Для улучшения органолептических показателей производственную кефирную закваску рекомендуется выдерживать для созревания 12–24 ч при температуре 10–12 °С. Кислотность производственной закваски должна быть 95–100 °Т.

Техника выполнения

Приготовить кефирную закваску в соответствии с указаниями. В подготовленную емкость налить пастеризованное при 95 °С в течение 20–30 мин и охлажденное до 20 °С обезжиренное молоко. Активные кефирные грибки поместить в соотношении 1:30 в молоко и культивировать в термостате при температуре 18–22 °С в тече-

ние 18 ч. Перемешать и продолжать культивирование еще 5–6 ч. Снова перемешать и определить значение титруемой кислотности. Кислотность готовой закваски 95–110 °Т. Готовую закваску процедить через металлическое сито в отдельную емкость. Грибки снова поместить в подготовленное молоко. **Грибки не промывать!**

Приготовить микроскопические препараты кефирного грибка и грибковой закваски в соответствии с методикой (см. лабораторную работу № 2). При приготовлении препарата кефирного грибка необходимо отсоединить небольшой кусочек грибка и тщательно растереть его на предметном стекле при помощи бактериологической петли. Применить простой метод окрашивания и рассмотреть под микроскопом. Микроскопические препараты грибковой закваски окрасить по Граму, рассмотреть их под микроскопом и зарисовать. Указать, какие группы микроорганизмов преобладают, а какие из них встречаются редко.

Контрольные вопросы

1. Охарактеризуйте состав микрофлоры кефирного грибка.
2. Каковы основные этапы приготовления закваски на основе кефирных грибков?
3. Назовите основные показатели, контролируемые в процессе культивирования кефирных грибков
4. Каковы особенности продуктов, вырабатываемых с применением кефирных грибков?

Оформление отчета

Отчет должен содержать:

1. Цель работы.
2. Описание основных характеристик кефирных грибков.
3. Основные этапы приготовления кефирной закваски и контролируемые параметры технологического процесса.
4. Наблюдаемую микроскопическую картину исследуемых препаратов кефирного грибка и закваски.
5. Выводы.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 7

ИЗУЧЕНИЕ ПРОЦЕССА БРОЖЕНИЯ МОЛОЧНОГО САХАРА

Цель работы – изучить процесс брожения молочного сахара молочнокислыми микроорганизмами.

Ход работы. *Выполняются задания:*

Задание 1. Ознакомиться с видами брожения молочного сахара.

Задание 2. Изучить процессы ферментативного гидролиза лактозы в молочных продуктах.

Задание 3. Исследовать влияние различных факторов на процесс брожения молочного сахара молочнокислыми микроорганизмами.

Теоретическое обоснование

Брожение – одна из разновидностей биологического окисления субстрата у гетеротрофных микробов с целью получения энергии, когда акцептором электронов или атомов водорода является органическое вещество.

Катаболизм углеводов и продукты брожения

Все типы брожения до образования пировиноградной кислоты идут с получением одних и тех же промежуточных продуктов и по одному и тому же пути – пути Эмбдена–Мейергофа. Дальнейшие превращения пировиноградной кислоты могут идти в разных направлениях, которые будут определяться специфическими особенностями данного микроорганизма и условиями среды. Конечными продуктами брожения могут быть молочная, уксусная, пропионовая, масляная кислоты, спирты, ароматические вещества, диоксид углерода и другие соединения. Всем истинным процессам брожения свойственно общее правило: восстановленная на первой стадии форма НАД (за счет окисления 3-фосфоглицеринового альдегида) снова окисляется на второй стадии, передавая водород любому акцептору. Это может быть пировиноградная кислота, ацетилфосфат, ацетальдегид, диацетил, ацетоин и т. д. Таким образом, наблюдается

сопряжение стадий окисления и восстановления с точным соблюдением эквивалентности.

В основе изготовления целого ряда молочных продуктов лежат процессы глубокого распада молочного сахара под действием микроорганизмов, называемые брожением. Молочнокислое брожение является основным процессом при изготовлении заквасок, сыра и кисломолочных продуктов, а молочнокислые бактерии – наиболее важной группой микроорганизмов для молочной промышленности. Существует несколько типов брожения лактозы, различающихся составом конечных продуктов. Конечными продуктами брожения могут быть молочная, пропионовая, уксусная, масляная кислоты.

Начальным этапом всех типов брожения является расщепление молочного сахара на глюкозу и галактозу под влиянием фермента лактазы (β -галактозидазы) (рис. 23).

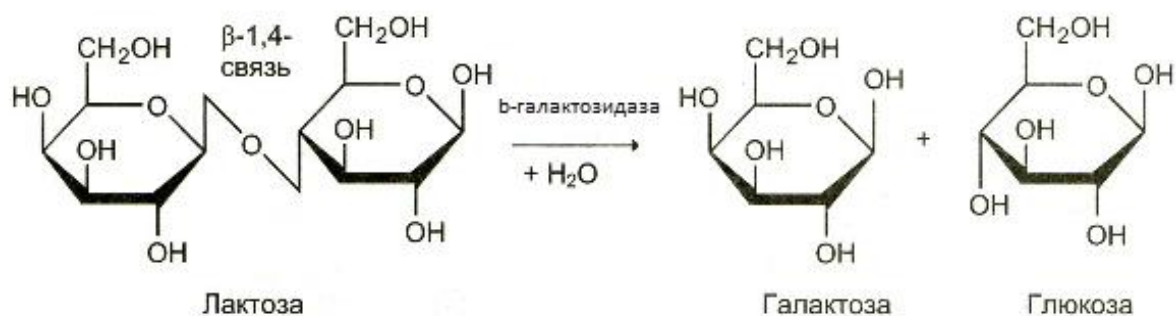


Рис. 23. Расщепление молочного сахара на глюкозу и галактозу

Далее брожению подвергается глюкоза. Превращение глюкозы в пировиноградную кислоту в результате ряда последовательных реакций происходит при участии 10 ферментов (рис. 24).

Галактоза при участии уридиндифосфатглюкозы переходит в глюкозо-1-фосфат, который после изомеризации в глюкозо-6-фосфат включается в схему превращения глюкозы:

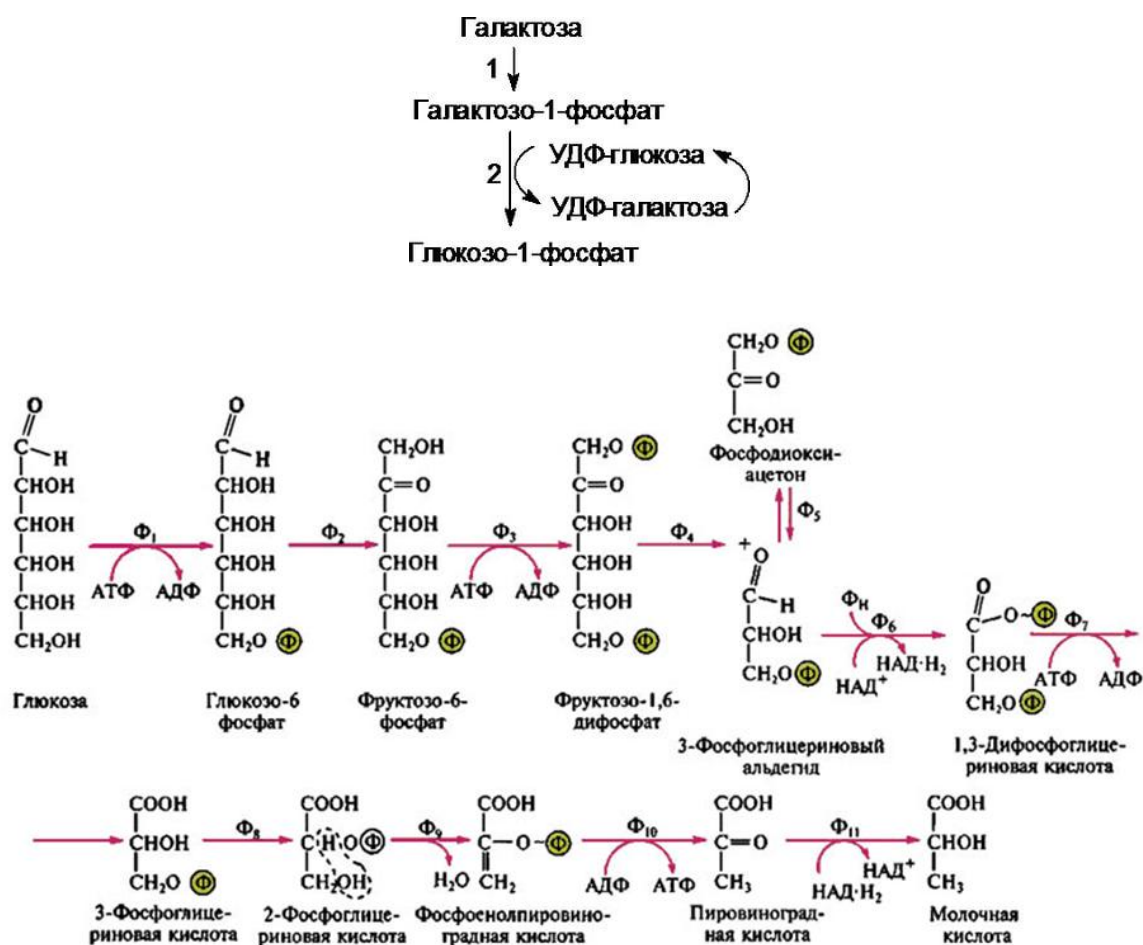


Рис. 24. Схема брожения молочного сахара

В зависимости от того, какие продукты образуются при сбраживании глюкозы (только молочная кислота или также другие органические продукты и CO_2), молочнокислые бактерии принято подразделять на гомоферментативные и гетероферментативные (рис. 25).

Гомоферментативные молочнокислые бактерии образуют практически только одну молочную кислоту (она составляет не менее 90 % всех продуктов брожения). Для гомоферментативных бактерий характерным является сбраживание глюкозы по **гликолитическому** (фруктозодифосфатному) **пути** Эмбдена–Мейергофа:



Из 1 моль глюкозы образуется 2 моль молочной кислоты с одновременным синтезом 2 моль АТФ (рис. 26).

Бактерии обладают всеми необходимыми для этого ферментами, включая альдолазу, а водород, отщепляющийся при дегидрировании глицеральдегид-3-фосфата, передается на пируват. От стереоспецифичности лактатдегидрогеназы и от наличия лактатрацемазы зависит, какой продукт образуется – D(-), L(+) или DL-молочная кислота. Лишь небольшая часть пирувата декарбоксилируется, превращаясь в уксусную кислоту, этанол и CO₂, а также в ацетон. Количество образующихся побочных продуктов зависит от доступа кислорода.

Кокки	Палочки
Гомоферментативное брожение: $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2CH_3-CHON-COOH$	
<i>Streptococcus lactis</i>	Термобактерии (температурный оптимум 40°C; при 15°C не растут)
<i>S. faecalis</i>	<i>L. lactis</i>
<i>S. salivarius</i>	<i>L. helveticus</i>
<i>S. pyogenes</i>	<i>L. acidophilus</i>
<i>S. cremoris</i>	<i>L. bulgaricus</i>
<i>S. thermophilus</i>	<i>L. delbrückii</i>
<i>S. diacetylactis</i>	
<i>Pediococcus cerevisiae</i>	Стрептобактерии (температурный оптимум 30–37°C; при 15°C растут)
	<i>Lactobacillus casei</i>
	<i>L. plantarum</i>
	<i>Sporolactobacillus inulinus</i>
Гетероферментативное брожение: $C_6H_{12}O_6 \rightarrow CH_3-CHON-COOH + CH_3-CH_2OH + CO_2$ (или CH_3-COOH)	
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Бетабактерии
(= <i>Betacoccus</i>)	<i>Lactobacillus brevis</i>
<i>L. cremoris</i>	<i>L. fermentum</i>
	<i>L. viridescens</i>
	<i>Bifidobacterium bifidum</i>

Рис. 25. Возбудители молочнокислого брожения

Большинство штампов молочнокислых бактерий преимущественно продуцируют L(+) – молочную кислоту. Болгарские палочки *L. bulgaricus* и лейконостоки – в основном D(-) форму, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. Plantarum* – оба

изомера в почти одинаковых количествах. Следовательно, соотношение между этими изомерами в кисломолочных продуктах будет зависеть от вида используемых для заквасок молочнокислых бактерий.

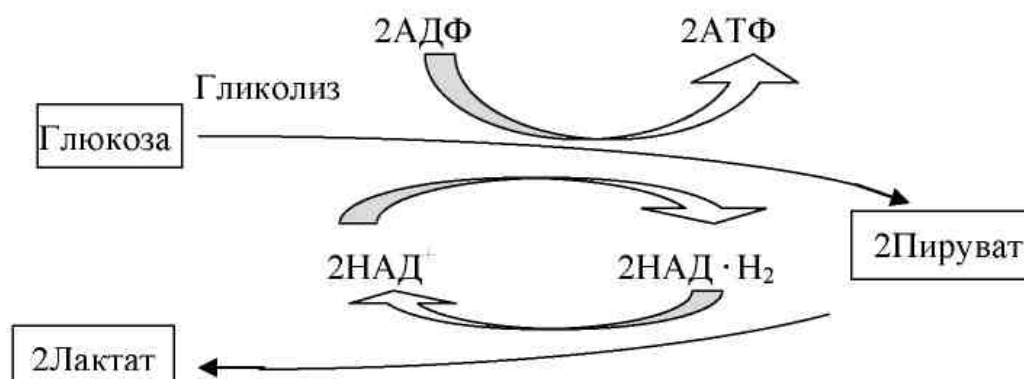


Рис. 26. Схема гомоферментативного молочнокислого брожения

Гетероферментативные бактерии около 50 % глюкозы превращают в молочную кислоту, а остальное количество – в этиловый спирт, CH_3COOH и CO_2 . У гетероферментативных молочнокислых бактерий отсутствует ключевой фермент альдолаза и триозофосфатизомераза. Начальное превращение глюкозы идет у них исключительно по **пентозофосфатному** пути:



В ходе реакций по пентозофосфатному пути из каждого моля глюкозы образуется моль молочной кислоты, моль этанола и CO_2 .

В аэробных условиях возможно образование двух молекул АТФ, тогда ацетилфосфат превращается не в этанол, а в уксусную кислоту. Бифидобактерии сбраживают глюкозу до уксусной и молочной кислот (уксусной в 1,5 раза больше, чем молочной).

Молочнокислое брожение используется в молочной промышленности для изготовления простокваши, творога, сметаны, кефира, сливочного масла, ацидофильного молока и ацидофильной простокваши, сыров, квашеных овощей, при приготовлении хлебных заквасок, молочной кислоты. Молочнокислые бактерии широко

применяют также при силосовании кормов, при выделке меховых шкурок и в производстве молочной кислоты.

Большое значение эти бактерии имеют при квашении овощей, силосовании кормов (растительной массы) для животных, в хлебопечении, особенно при изготовления ржаного хлеба. Положительные результаты дают исследования по использованию молочнокислых бактерий при изготовлении некоторых сортов колбас, соленовареных мясных изделий, а также при созревании слабосоленой рыбы для ускорения процесса и придания продуктам новых ценных качеств (вкуса, аромата, консистенции и др.). Промышленное значение имеет также применение молочнокислых бактерий для получения молочной кислоты, которую используют в безалкогольных напитках. Спонтанно (самопроизвольно) возникающее молочнокислое брожение в продуктах (молоке, вине, пиве, безалкогольных напитках и др.) приводит к их порче (прокисанию, помутнению, ослизнению).

Методические указания

Оборудование и материалы: термостат, лактоденсиметр, рефрактометр, цилиндр на 250 см³, пипетки на 5 и 10 см³, колбы на 50–100 см³, бюретки на 25 см³, стаканы на 100 см³, термометр со шкалой 0–100 °С, 1 %-й раствор фенолфталеина, 0,1 н. раствор NaOH, 2,5 %-й водный, закваски, соль поваренная «Экстра».

Возбудителями молочнокислого брожения являются молочнокислые микроорганизмы. Их активность зависит от ряда факторов: температуры, pH, химического состава питательной молочной среды, концентрации сахара, соли, жира, продуктов обмена и ряда других условий.

Для исследований используются следующие закваски:

Закваска № 1. Закваска на чистых культурах мезофильных молочнокислых стрептококков (*Lactococcus lactis*, *Lactococcus cremoris*) или закваска для сметаны и творога ($T_{\text{оптим}}$ 30–35 °С).

Закваска № 2. Закваска на чистых культурах термофильных молочнокислых палочек (*Lactobacillus acidophilus*) ($T_{\text{оптим}}$ 40–42 °С).

Закваска № 3. Йогуртовая закваска (*Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus delbrueckii ssp. Bulgaricus*) ($T_{\text{оптим}}$ 40–45 °С).

Закваска № 4. Кефирная закваска ($T_{\text{оптим}}$ 18–22 °С).

Изучение влияния температуры культивирования на процесс брожения молочного сахара

На одном занятии исследуются 2 вида заквасок на выбор. Подготовить образцы обезжиренного молока для исследования. Определить в них показатели: плотность, титруемую кислотность, массовую долю лактозы. В стаканы отмерить по 50 см³ пастеризованного молока, подогретого до температуры в соответствии с табл. 2. В каждый образец внести по 10 см³ исследуемой закваски, тщательно перемешать.

Таблица 2

Постановка опыта и результаты

Закваска	Образец	Температура, °С	Кислотность, °Т	
			Через 30 мин	Через 1 ч
Закваска № 1	1.1	30		
	1.2	40		
	1.3	22		
Закваска № 2	2.1	30		
	2.2	40		
	2.3	22		

Подготовленные образцы поместить в термостат с соответствующей температурой и культивировать в течение 30 мин. Образец с температурой 22–24 °С оставить при условиях окружающей среды в безопасном месте. Культивировать в течение 1 ч.

Через 30 мин от начала культивирования из каждого образца отобрать по 10 см³ среды для определения титруемой кислотности. Результат занести в таблицу. В конце культивирования определить кислотность образцов, результат занести в таблицу.

Сделать выводы об активности заквасок по нарастанию кислотности в процессе культивирования при разных температурах.

Изучение влияния химического состава питательной среды на процесс брожения молочного сахара

Подготовить образцы питательных сред для исследования в соответствии с табл. 3. Определить в них показатели: плотность,

титруемую кислотность, массовую долю лактозы. Результаты записать.

В стаканы отмерить по 50 см³ каждого образца питательной среды, подогреть до оптимальной температуры культивирования микроорганизмов закваски. Исследуется один вид закваски на выбор. В каждый образец внести по 10 см³ исследуемой закваски, в образцы 3.2 и 3.3 дополнительно внести поваренную соль NaCl, тщательно перемешать.

Таблица 3

Постановка опыта и результаты

Закваска №	Образец	Вид среды	Образец	С хлоридом натрия	Кислотность, °Т	
					Через 30 мин	Через 1 ч
Закваска №	3.1	Обезжиренное молоко	3.1	Контроль		
			3.2	5 %		
			3.3	10 %		
	4	Молоко жирностью 2,5 %		—		
	5	Молоко жирностью 3,2 %		—		
	6	Молочная сыворотка		—		

Подготовленные образцы поместить в термостат с соответствующей температурой и культивировать в течение 1 ч.

Через 30 мин от начала культивирования из каждого образца отобрать по 10 см³ среды для определения титруемой кислотности. Результат занести в таблицу. В конце культивирования определить кислотность образцов, результат занести в таблицу.

По нарастанию кислотности молока при молочнокислом брожении можно рассчитать, какое количество молочного сахара было сброжено.

Пример расчета

Сначала нужно рассчитать количество образовавшейся молочной кислоты. Молекулярная масса молочной кислоты равна 90. Количество миллилитров 0,1 н. NaOH, потраченное на титрование 100 см³ молока, следует умножить на 0,009, так как 1 см³ 0,1 н. NaOH нейтрализует эквивалентное количество молочной кислоты – 0,009 г молочной кислоты. Для расчета необходимо из конечного результата значения кислотности вычесть показатель кислотности исходного молока (сыворотки). Например, начальная кислотность молока перед внесением закваски составляла 16 °Т. По окончании культивирования – 60 °Т. Разница 60–16 = 44. Далее 44 × 0,009 = 0,396. Следовательно, образовалось 0,396 г молочной кислоты.

Из суммарной реакции молочнокислого брожения следует, что из 1 моль молочного сахара образуется 4 моль молочной кислоты. Масса 1 моль молочного сахара C₁₂H₂₂O₁₁ равна 342 г, т. е. из 342 г молочного сахара образуется 4 × 90 = 360 г молочной кислоты. Следовательно, для получения 0,396 г молочной кислоты потребовалось молочного сахара:

$$X = \frac{342 \times 0,396}{360} = 0,3762 \text{ г.}$$

Результаты расчетов записать.

Сделать выводы об активности заквасок при сбраживании молочного сахара по нарастанию кислотности в процессе культивирования в зависимости от состава питательной среды.

Контрольные вопросы

1. Назовите основные типы брожения молочного сахара. Какие факторы влияют на интенсивность брожения?
2. По какому пути идет сбраживание глюкозы при гомоферментативном и гетероферментативном брожении лактозы?
3. Назовите основных возбудителей гомоферментативного и гетероферментативного брожения лактозы.
4. Как используется молочнокислое брожение в пищевой промышленности?

5. Как рассчитать количество сброженного молочного сахара в процессе брожения?

Оформление отчета

Отчет должен содержать:

1. Цель работы.
2. Ход работы и основные результаты исследований.
3. Выводы и расчеты.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 8

ИЗУЧЕНИЕ ДЕЙСТВИЯ ФЕРМЕНТОВ ЖИВОТНОГО, РАСТИТЕЛЬНОГО И МИКРОБНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Цель работы – изучить действие ферментов животного, растительного и микробного происхождения на изменение пищевых систем в процессе переработки.

Ход работы. *Выполняются задания:*

Задание 1. Изучить характеристики ферментных препаратов и их использование в пищевой промышленности.

Задание 2. Изучить особенности процессов получения ферментов различного происхождения.

Задание 3. Исследовать процессы действия ферментов на пищевые системы и их активность.

Теоретическое обоснование

Биохимические процессы, протекающие при хранении сырья и при производстве пищевых продуктов, связаны с действием собственных ферментов пищевого сырья, а также ферментов, вносимых в ходе технологического процесса в виде ферментных препаратов. Последние могут быть животного, растительного или микробного происхождения.

Наиболее древние ферментативные процессы, освоенные человеком, – спиртовое и молочнокислое брожение, применение сычуга при приготовлении сыров, использование солода и плесневых грибов для осахаривания крахмалистого сырья, применение заквасок при изготовлении хлеба.

В настоящее время многие отрасли пищевой промышленности, в медицине и сельском хозяйстве основаны на использовании различных ферментативных процессов.

Ферменты – биологические катализаторы белковой природы. Ферменты ускоряют химические реакции в 100–1000 раз благодаря тому, что при взаимодействии с субстратом образуют фермент-субстратный комплекс, для этого требуется значительно более низкая энергия активации (по сравнению с протеканием реакции без фермента); на второй стадии этот комплекс распадается на продукты

реакции и свободный фермент, который может взаимодействовать с новой молекулой субстрата.

Многие ферменты являются двухкомпонентными, т.е. состоят из белковой части – апофермента и связанного с ним небелкового компонента – кофермента, участвующего в действии фермента в качестве обязательного кофактора. В качестве коферментов могут выступать витамины и их производные, нуклеотиды и нуклеозиды.

Для характеристики активности ферментов используются различные единицы:

Стандартная единица фермента – это такое количество фермента, которое катализирует превращение одного микромоля данного субстрата за одну минуту при заданных условиях. Стандартная единица фермента обозначается буквой E (единица) или буквой U (unit).

Катал – каталитическая активность, способная осуществлять реакцию со скоростью, равной 1 моль в секунду, в заданной системе измерения активности. Каталитическая активность в 1 катал (кат) при практическом применении оказывается слишком большой величиной, поэтому в большинстве случаев каталитические активности выражают в микрокаталах (мккат), нанокаталах (нкат) или пикокаталах (пкат). Стандартная единица фермента находится с каталом в следующем соотношении: $1 \text{ E (U)} = 16,67 \text{ нкат}$.

В большинстве случаев ферменты обладают строгой специфичностью, а также лабильны, т. е. могут изменять свою активность под действием pH, температуры, в присутствии активаторов и ингибиторов и др.

Активаторами называют вещества, которые повышают активность ферментов. В роли активаторов могут выступать некоторые металлы, аминокислоты и другие вещества. Ингибиторами называют вещества, снижающие активность ферментов.

При определении названия ферментного препарата учитывают только основной фермент, активность которого преобладает. Наименование ферментного препарата начинается с сокращенного названия основного фермента. Если основным ферментом является амилаза, то наименование препарата начинается с «амил», глюкоамилаза – «глюк», у протеолитических ферментов – «прот», у пектолитических – «пект», у цитолитических – «цит» и т. д. Затем следует измененное видовое название продуцента. Наименование препарата

оканчивается на «ин». Если продуцентом является *Aspergillus oryzae*, то вторая часть названия фермента звучит «оризин», если *Bacillus subtilis*, то «субтилин», если *Aspergillus awamori*, то «аваморин», если *Aspergillus foetidus*, то «фоетидин», если *Trichoderma viride*, то «виридин» и т. д. В наименовании препарата отражается также и способ культивирования микроорганизма-продуцента. При глубинном культивировании после названия ставится буква «Г», при поверхностном – «П».

Выпускаемые ферментные препараты представляют собой либо жидкости с содержанием сухих веществ не менее 50 %, либо порошки белого, серого или желтоватого цвета с определенной стандартной ферментативной активностью.

Производство ферментных препаратов осуществляется поверхностным или глубинным способом (рис. 27). В основе поверхностного способа лежит выращивание микроорганизмов на рыхлых питательных средах. Этот способ используется для культивирования микроскопических грибов. При глубинном способе культивирования микроорганизмы выращиваются в толще жидких питательных сред. В этих условиях культивируют как аэробные, так и анаэробные микроорганизмы. Из поверхностных культур труднее получить высокоочищенные препараты, так как они содержат много балластных веществ. Питательные среды подбирают в зависимости от физиолого-биохимических особенностей микроорганизма-продуцента и того фермента, который необходимо получить.

Ферментные препараты широко используются в различных отраслях промышленности. Отличаются они от чистых ферментов тем, что содержат один либо несколько ферментов с преобладанием какого-либо одного, а также балластные вещества среды, на которой были выращены микроорганизмы-продуценты ферментов. Для промышленного производства ферментных препаратов используют микроорганизмы, выделенные из природных источников, и мутантные штаммы.

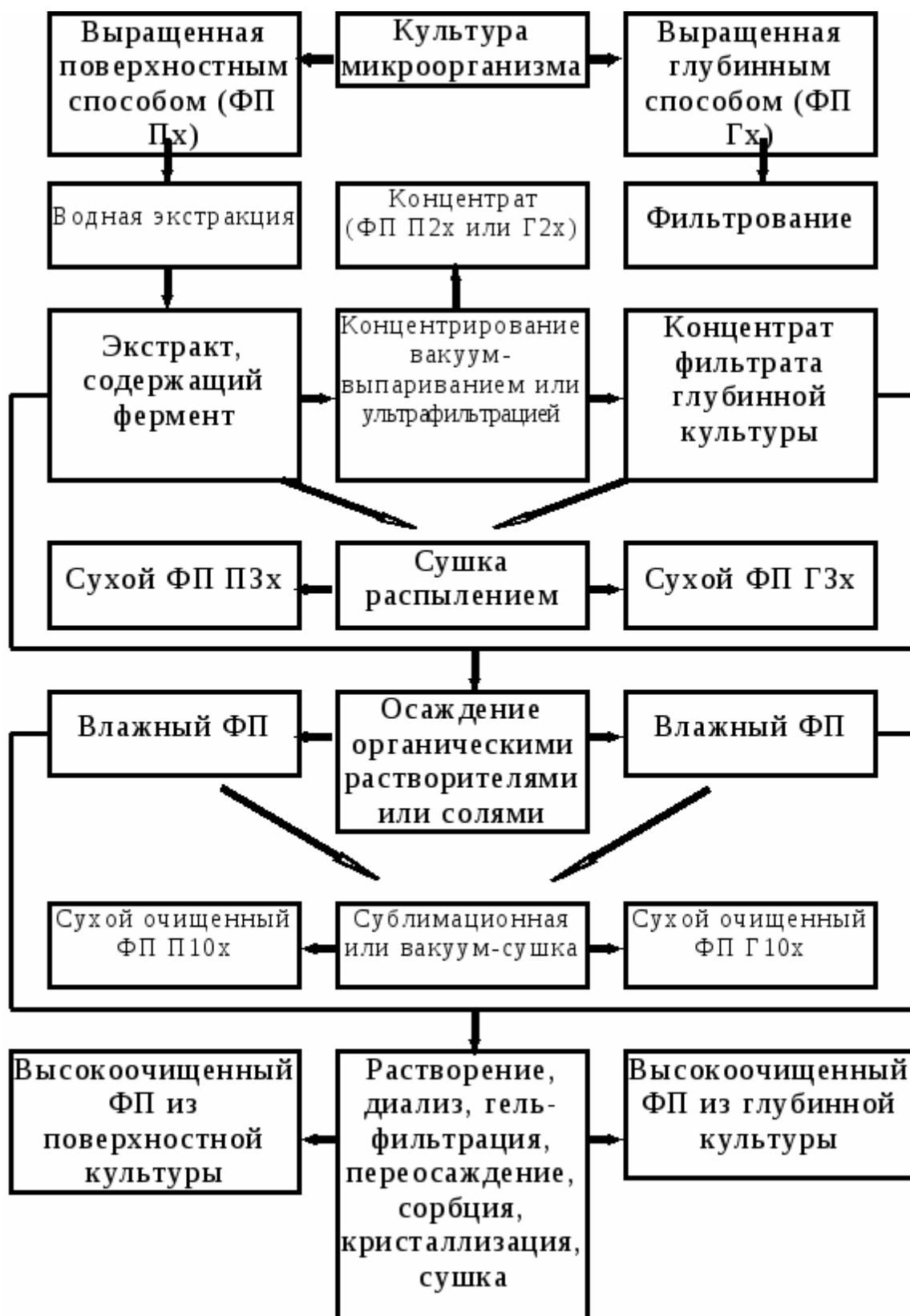


Рис. 27. Принципиальная схема получения ферментных препаратов

Основную часть ферментов, получаемых промышленным способом, составляют гидролазы. К ним относятся в первую очередь амилолитические ферменты: α -амилаза, β -амилаза, глюкоамилаза. Их основная функция – гидролиз крахмала и гликогена. Крахмал при гидролизе расщепляется на декстрины, а затем до глюкозы. Эти ферменты применяются в спиртовой промышленности, хлебопечении.

Продуцентами амилолитических ферментов являются микроскопические грибы родов *Aspergillus*, *Rhizopus* (видов *oryzae*, *niger*, *awamori*, *batatae*, *foetidus*, *flavus* и др). Большое количество амилолитических ферментов синтезируют также спороносные бактерии рода *Bacillus* (видов *subtilis*, *mesentericus*, *brevis* и др.).

Протеолитические ферменты образуют класс пептидгидролаз. Их действие заключается в ускорении гидролиза пептидных связей в белках и пептидах. Важная их особенность – селективный характер действия на пептидные связи в белковой молекуле. Например, пепсин действует только на связь с ароматическими аминокислотами, трипсин – на связь между аргинином и лизином. Среди продуцентов протеолитических ферментов практический интерес представляют грибы рода *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*. Спорозоносные бактерии рода *Bacillus* способны образовывать протеолитические ферменты. Протеазы находят широкое применение в разных отраслях промышленности: молочной – производство сыров, творога; мясной – для смягчения мяса; кожевенной – смягчение шкур; парфюмерной – добавки в зубную пасту, кремы, лосьоны; производство моющих средств – добавки для удаления загрязнений белковой природы; медицина – при лечении воспалительных процессов, тромбозов и т. д.

Пектолитические ферменты уменьшают молекулярную массу и снижают вязкость пектиновых веществ. Пектиназы делятся на две группы – гидролазы и трансэлиминазы. Гидролазы отщепляют метильные остатки или разрывают гликозидные связи. Трансэлиминазы ускоряют негидролитическое расщепление пектиновых веществ с образованием двойных связей. Применяются в текстильной промышленности (вымачивание льна перед переработкой); в виноделии – осветление вин; при консервировании фруктовых соков.

Продуцентами пектолитических ферментов являются бактерии, микроскопические грибы, дрожжи. Наибольшая продуцирующая способность обнаружена у грибов рода *Aspergillus*, *Penicillium*. Продуцентами пектиназы могут быть также анаэробы – спороносные бактерии рода *Clostridium*. Активными продуцентами

цитолитических ферментов являются грибы *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Trichoderma* (вид *viride*).

Целлюлолитические ферменты очень специфичны, их действие проявляется в деполимеризации молекул целлюлозы. Обычно используются в виде комплекса, доводящего гидролиз целлюлозы до глюкозы (в гидролизной промышленности). В медицинской промышленности их используют для выделения стероидов из растений; в пищевой – для улучшения качества растительных масел; в сельском хозяйстве – в качестве добавки в комбикорма для жвачных животных. Целлюлолитические ферменты синтезируются в основном грибами, относящимися к различным видам: *Aspergillus amstelodamy*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus terreus*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Penicillium notatum*, *Rhizopus oryzae*, *Trichoderma lignorum*, *Trichoderma virida*, *Trichoderma koningii* и многие другие. Они широко распространены в природе (в почве, в организмах животных, в растительных остатках).

Молокосвертывающие ферменты. В основе технологии производства сыров лежит способность казеина молока коагулировать под воздействием протеолитических ферментов, получивших название молокосвертывающих. Общее свойство молокосвертывающих ферментов, применяемых в сыроделии, – способность гидролизовать χ -казеин по связи Фен105–Мет106 называют молокосвертывающей активностью, в отличие от общей протеолитической активности – способности расщеплять другие связи в белках. Общая протеолитическая активность ферментов, применяемых в сыроделии, должна быть как можно более низкой по отношению к молокосвертывающей.

Реннин (химозин) – фермент из класса гидролаз, который вырабатывается в желудочных железах млекопитающих. У жвачных животных вырабатывается железами сычуга (4-го отдела желудка), отсюда одно из его названий – *сычужный фермент*. Вторым главным составляющими сычужного фермента являются пепсин.

Сычуг, полученный из желудка теленка молочного возраста (до 3 месяцев), содержит 88–94 % химозина и 6–12 % пепсина. Сычуг из желудка более взрослого животного, получающего обычный корм, содержит 90–94 % пепсина и всего 10 % химозина. Химозин, полученный из желудка молочного теленка, наиболее активен при pH

6,2–6,4, а активность пепсина располагается в области повышенной кислотности при рН 1,7–2,3, поэтому эти ферменты дополняют друг друга, и их смеси нашли широкое применение в сыроделии.

В настоящее время в связи с дефицитом сычужного фермента из-за нецелесообразности забоя молодняка в молочный период жизни и снижения поголовья скота при резком возрастании его продуктивности широко используются другие ферменты, близкие по действию к сычужному: пепсины свиной, говяжий, птичий, а также энзимы, продуцируемые некоторыми микроорганизмами.

Разработаны методы генной инженерии, позволяющие включать гены, осуществляющие синтез сычужного фермента, в геномы микроорганизмов и тем самым осуществлять синтез сычужного энзима микроорганизмами. Сычужный фермент, полученный методами генной инженерии, уже вырабатывается и применяется в промышленных масштабах (табл. 4).

Таблица 4

**Номенклатура, продуценты и производители микробиальных
молокосвертывающих ферментов**

Название фермента/ КФ*	Продуцент	Торговое название	Производитель
Аспергиллопепсин I (aspergillopepsin I) КФ 3.4.23.18	<i>Aspergillus niger var. awamori</i>	CHY-MAX M Liquid	Chr. Hansen, Дания
Эндофиапепсин (endothiapepsin) КФ 3.4.23.22	<i>Endothia parasitica</i>	Суперен	Pfizer, США
Мукопепсин (mucorpepsin) КФ 3.4.23.23	<i>Mucor miehei</i>	Реннилаза	Novo Rennet, Дания
		Фромаза	Wallerstein, США
		Микробиальн ый ренин	Meito Sangyo, Япония
		Marzyme	Danisco, Франция
		Milase	CSK food enrichment, Нидерланды

*КФ – код фермента по Международной классификации ферментов (энзимов).

Наряду с ферментными препаратами животного и микробного происхождения для сквашивания молока используются также препараты растительного происхождения. Экстракты растений, которые традиционно считались ферментными коагулянтами молока, такими не являются, так как они имеют другой механизм действия или, возможно, они содержат микробы, обладающие способностью к свертыванию молока. Примером использования растительного экстракта может служить выработка португальского сыра *Sena da Estrela* из овечьего молока с помощью водной вытяжки цветков кардона (артишока).

Известно, что использование ферментов, как сычужного, так и микробиального происхождения, производится однократно, в связи с этим являются актуальными использование и разработка приемов, позволяющих многократно использовать ферменты. Одним из таких приемов является иммобилизация, т. е. включение молекул фермента в какую-либо изолированную фазу, которая отделена от фазы свободного раствора, но способна обмениваться с находящимися в ней молекулами субстрата, эффектора или ингибитора.

Иммобилизованные ферменты имеют ряд преимуществ в сравнении со свободными молекулами. Прежде всего, такие ферменты, представляя собой гетерогенные катализаторы, легко отделяются от реакционной среды, могут использоваться многократно и обеспечивают непрерывность каталитического процесса. Кроме того, иммобилизация ведет к изменению свойств фермента: субстратной специфичности, устойчивости, зависимости активности от параметров среды. Иммобилизованные ферменты долговечны и в десятки тысяч раз стабильнее свободных энзимов.

Методические указания

Оборудование и материалы: весы лабораторные аналитические, водяная баня, термостат, секундомер, ФЭК, рН-метр, пипетки на 5 и 10 см³, мерный цилиндр на 100 см³, колбы на 50–100 см³, бюретки на 25 см³, стаканы на 100 см³, чашка фарфоровая, пестик, шпатель, термометр со шкалой 0–100 С, 1 %-й раствор фенолфталеина, 0,1 н. раствор гидроксида натрия, 3 %-й раствор сычужного фермента, препарат амилазы, 1 %-й раствор крахмала, ацетатный буферный раствор с рН 4,7, 0,1 М раствор соляной кислоты, основной раствор йода.

Подготовить образцы к исследованию.
Приготовить рабочие растворы ферментных препаратов.
Исследовать влияние температуры и дозы протеолитического фермента на процесс свертывания молока.
Исследовать амилалитическую активность ферментов.
Сравнить полученные результаты и сделать выводы.

Техника определения

Изучение влияния температуры и дозы протеолитического фермента на процесс свертывания молока

Для свертывания молока в сыроделии применяют препараты сычужного фермента и пепсин, который содержит два компонента – химозин (реннин) и пепсин (А и В), оба свертывают молоко, но химозин более активен. Молокосвертывающая активность сычужного фермента зависит от соотношения компонентов и от свойств молока: кислотности, температуры и содержания в нем ионов кальция. Фермент стабилен при рН 5,3–6,3, имеет оптимальную активность при рН 6,2 и температуре 40 °С. Увеличение дозы фермента ускоряет процесс сычужного свертывания молока – сокращается общая продолжительность гелеобразования и его отдельных стадий.

Приготовление рабочего раствора фермента. Рабочий 0,03 %-й раствор сычужного фермента (пепсина) готовят непосредственно перед проведением исследования из 3 %-го. Для приготовления рабочего раствора отмеряют 1 см³ 3 %-го раствора фермента, вносят в мерную колбу на 100 см³ и доводят дистиллированной водой до метки.

Подготовить образцы сырого молока для исследований.
Определить титруемую и активную кислотность молока.

В стаканы отмерить по 50 см³ молока и подготовить по схеме, представленной в табл. 5. Ставятся 2 серии параллельных опытов с применением сычужного фермента и пепсина.

Молоко подогреть до требуемой температуры и в каждый образец внести раствор фермента. Тщательно перемешать стеклянной палочкой. Палочку после каждого образца сполоснуть водой, протереть сухим бумажным фильтром или салфеткой.

Схема исследования и результаты

Образец молока	Температура свертывания, °C	Количество 0,03 %-го раствора фермента, см ³	Продолжительность свертывания молока с применением, мин	
			препарата сычужного фермента	препарата пепсина
8.	40	10		
9.		5		
10.	30	10		
11.		5		
12.	20	10		
13.		5		

После внесения фермента молоко тщательно перемешать и оставить в покое до готовности сгустка. Готовность определяют визуально. Через каждые 2–3 мин стакан с образцом слегка наклоняют, чтобы определить начало свертывания молока. Затем оставляют в покое. Окончание процесса свертывания молока определяют: через каждые 2–3 мин аккуратно надавливают на поверхность шпателем или стеклянной палочкой у стенки сосуда. Если при незначительном разрушении сгустка начинает отделяться прозрачная сыворотка, процесс закончен.

Продолжительность свертывания отмечают по секундомеру и записывают в таблицу. Рассчитать дозу фермента, вносимую в каждый образец молока. Построить графики зависимостей продолжительности свертывания молока от дозы ферментных препаратов при разных температурах свертывания.

Сделать выводы.

Определение амилолитической активности ферментов (АС)

Метод основан на гидролизе крахмала ферментами амилолитического комплекса до декстринов различной молекулярной массы.

Амилолитическая активность характеризует способность ферментов катализировать гидролиз крахмала до декстринов

различной молекулярной массы и выражается числом единиц указанных ферментов в 1 г препарата (или на 1 мг белка).

За единицу активности амилолитического фермента (АС) принято такое количество фермента, которое в строго определенных условиях температуры, рН и времени действия катализирует до декстринов различной молекулярной массы 1 г растворимого крахмала, что составляет 30 % от введенного в реакцию.

За единицу амилолитической активности (АС) принято такое количество фермента, которое при определенных значениях рН (6,0 – для бактериальных и 4,7 – для грибных амилаз) и температуре 30 °С за 1 ч катализирует гидролиз 1 г крахмала до декстринов различной молекулярной массы, что составляет 30 % крахмала, введенного в реакцию. Активность выражается в ед. АС/г (для порошкообразного) или в ед. АС/см³ (для жидкого) анализируемого ферментного препарата.

Техника определения

В 2 пробирки наливают по 5 мл 1 %-го раствора крахмала, ставят в термостат с температурой 30 °С и выдерживают 5–10 мин. Не вынимая пробирки из термостата, наливают в первую пробирку 2,5 см³ дистиллированной воды (контрольная), а во вторую – 2,5 см³ ферментного раствора (опытная). Смеси быстро перемешивают и выдерживают в термостате 10 мин. Через 10 мин из контрольного и опытного растворов отбирают по 0,25 см³ и переносят в одну из колб с предварительно налитыми 25 см³ рабочего раствора йода. Содержимое колб перемешивают. Полученные растворы приобретают следующую окраску: контрольный – синюю, опытный – фиолетовую различной интенсивности в зависимости от количества непрогидролизованного крахмала.

Непосредственно после смешивания растворов определяют их оптическую плотность на ФЭК с максимумом поглощения 656 нм, пользуясь кюветами с толщиной поглощающего слоя 10 см³. Контрольным раствором при колориметрировании является дистиллированная вода. Оптическая плотность контрольного раствора (D_1) соответствует количеству исходного субстрата – крахмала. Оптическая плотность опытного раствора (D_2) соответствует количеству крахмала, оставшегося после действия фермента. Разница

между значениями оптической плотности соответствует прогидролизованному количеству крахмала.

Расчет активности фермента

Количество прогидролизованного крахмала C в граммах определяют по формуле

$$C = \frac{(D_1 - D_2)0,05}{D_1},$$

где D_1 – оптическая плотность контрольного раствора; D_2 – оптическая плотность опытного раствора; 0,05 – количество крахмала, взятое для испытания в качестве субстрата, г.

Если количество прогидролизованного крахмала меньше 0,02 или больше 0,04 г, испытание повторяют. При приготовлении рабочего раствора фермента берут большее или меньшее количество исходного раствора для разбавления.

Амилолитическую активность (ед/г) препарата бактериального происхождения (AC) определяют по формуле

$$AC = \frac{(5,885C + 0,001671)1000}{n},$$

где C – количество прогидролизованного крахмала, г; n – количество ферментного препарата, взятое для испытания, мг; 1000 – коэффициент пересчета мг в г; 5,885 и 0,001671 – коэффициенты расчетного уравнения.

Коэффициенты расчетного уравнения получены при математической обработке экспериментальных данных зависимости количества прогидролизованного крахмала от количества фермента, взятого для испытания. В коэффициенты введен множитель для пересчета на 1 ч действия фермента.

Выполнить расчеты и сделать выводы.

Контрольные вопросы

1. Какими способами осуществляется производство ферментных препаратов?
2. Какие единицы используются для характеристики активности ферментов?
3. Назовите основные продуценты амилалитических ферментов.
4. Назовите основные продуценты протеолитических ферментов.
5. Назовите основные продуценты пектолитических и целюлолитических ферментов.
6. Дайте характеристику молокосвертывающих ферментов и назовите особенности их применения.
7. Назовите области применения ферментов.
8. В чем заключается преимущество применения иммобилизованных ферментов?

Оформление отчета

Отчет должен содержать:

1. Цель работы.
2. Описание основных групп ферментов и их продуцентов.
3. Описание факторов, влияющих на молокосвертывающую способность ферментов и их активность.
4. Расчеты амилалитической активности фермента.
5. Выводы.

Приложение

Приготовление реактивов для определения амилолитической активности ферментов

1. Приготовление 1 %-ного раствора крахмала (субстрат).

1 г крахмала помещают в мерную колбу вместимостью 100 см³, добавляют 25 см³ воды и перемешивают. Затем добавляют в колбу еще 25 см³ воды, помещают колбу в кипящую водяную баню, непрерывно перемешивая до полного растворения крахмала. После этого содержимое колбы охлаждают, добавляют 10 см³ ацетатного буферного раствора рН 4,7 и доводят объем жидкости до метки дистиллированной водой. Раствор крахмала готовят в день проведения анализа.

2. Приготовление ацетатного буферного раствора с рН 4,7.

Раствор А – 1 М раствор уксусной кислоты. 58 см³ ледяной уксусной кислоты наливают в мерную колбу вместимостью 1000 см³ и доводят объем до метки дистиллированной водой.

Раствор Б – 1 М раствор уксуснокислого натрия. 82 г уксуснокислого натрия помещают в мерную колбу вместимостью 1000 см³ и доводят объем до метки дистиллированной водой.

Ацетатный буферный раствор с рН 4,7 готовят смешиванием равных объемов растворов А и Б. Проверяют значение рН на рН-метре.

3. Приготовление 0,1 М раствора соляной кислоты.

8,2 см³ соляной кислоты наливают в мерную колбу вместимостью 1000 см³ и доводят объем до метки дистиллированной водой.

4. Приготовление основного раствора йода.

0,5 г йода и 5 г йодистого калия растворяют в бюксе с притертой крышкой в малом количестве воды. Содержимое осторожно перемешивают при плотно закрытой крышке бюкса. После полного растворения йода раствор переносят в мерную колбу с притертой пробкой вместимостью 200 см³ и доводят объем до метки дистиллированной водой. Раствор хранят в темноте и используют в течение 1 месяца.

5. Приготовление рабочего раствора йода.

2 см³ основного раствора йода разводят 0,1 М раствором соляной кислоты в мерной колбе вместимостью 100 см³. Перед применением рабочего раствора проверяют на фотоэлектроколориметре его оптическую плотность,

пользуясь светофильтром с максимумом пропускания при длине волны 453 нм и толщине пропускающего слоя 1 см. Оптическая плотность раствора йода должна составлять 0,21–0,23. В случае отклонения оптической плотности раствора от этой величины ее приводят к необходимой, добавляя несколько капель кислоты или основного раствора йода.

6. Приготовление основного раствора ферментного препарата. 0,1 г исследуемого препарата взвешивают в стаканчике вместимостью 25 – 30 см³. Навеску тщательно растирают стеклянной палочкой с небольшим количеством воды, количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 см³, доводят дистиллированной водой до метки, перемешивают и при необходимости фильтруют. Раствор ферментного препарата может храниться в течение 1 суток при температуре от 0 до минус 4 °С.

7. Приготовление рабочего раствора ферментного препарата. Рабочий раствор фермента готовят из основного раствора, разбавляя его так, чтобы в 5 см³ рабочего раствора содержалось такое количество фермента, которое обеспечивает в принятых условиях гидролиз крахмала от 20 до 70 %. Для этого берут различные количества основного раствора в зависимости от активности исследуемого препарата и разбавляют водой до 50 см³ (при испытании препарата с активностью от 20 до 700 ед/г) и до 200 см³ (при активности от 700 ед/г и выше). Количество основного раствора препарата, которое необходимо взять для приготовления рабочего раствора фермента, находят по таблице:

Амилолитическая активность (АС) препарата, ед/г (предполагаемая)	Количество препарата в 5 см ³ рабочего раствора, мг	Количество основного раствора, необходимое для вторичного разбавления, см ³	Общий объем разбавленного раствора, см ³
От 20 до 80	5,0	50	50
От 80 до 150	2,0	20	50
От 150 до 300	1,0	10	50
От 300 до 700	0,5	5	50
От 700 до 1200	0,25	10	50
От 1200 до 2500	0,125	5	200
От 2500 до 5000	0,05	2	200
Свыше 5000	0,025	1	200

ТЕМЫ КОНТРОЛЬНЫХ РАБОТ

Вариант 1

1. Основные направления и перспективы развития биотехнологии.
2. Объекты биотехнологии. Бактерии и цианобактерии.
3. Биотехнологические процессы в пивоварении. Перспективы развития пивоварения.

Вариант 2

1. Современные методы биотехнологии. Генная инженерия.
2. Продукты микробного брожения и метаболизма.
3. Применение ферментов в пищевой промышленности.

Вариант 3

1. Основные типы биотехнологических процессов.
2. Простейшие в биотехнологии.
3. Биотехнологические процессы в виноделии.

Вариант 4

1. Производство биомассы. Продуценты белка.
2. Использование водорослей и растений в биотехнологии.
3. Применение заквасок в производстве кисломолочных продуктов.

Вариант 5

1. Стадии биотехнологического производства.
2. Использование грибов в биотехнологии
3. Получение хлебопекарных дрожжей, биотехнологические процессы в хлебопечении.

Вариант 6

1. Технология приготовления питательных сред.
2. Требования, предъявляемые к микроорганизмам-продуцентам.
3. Биотехнология молочных продуктов.

Вариант 7

1. Ферментация. Устройство биореактора.
2. Технология ферментных препаратов. Глубинный метод производства ферментов.
3. Производство белка микроорганизмов. Субстраты для культивирования микроорганизмов.

Вариант 8

1. Получение засевной дозы.
2. Процессы биотрансформации.
3. Биотехнологические процессы в получении мясных продуктов. Требования к применяемым ферментным препаратам.

Вариант 9

1. Принципы разделения веществ.
2. Сырье и состав питательных сред для биотехнологического производства.
3. Технология ферментных препаратов. Поверхностный метод производства ферментов.

Вариант 10

1. Получение готовых товарных форм.
2. Биоконверсия лигноцеллюлозных объектов.
3. Особенности стадии выделения и очистки в зависимости от целевого продукта.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Борисова, С.В. Использование дрожжей в промышленности: Учеб. пособие для вузов. [Текст] /С.В. Борисова. – СПб.: ГИОРД, 2008. – 215 с.

Голенко, В.А. Научные основы биотехнологии. Часть I. Нанотехнологии в биологии: Учеб. пособие: Учеб. изд. [Текст] / С.К. Пятунина, В.А. Горленко. – М.: Прометей, 2013. – ISBN 978-5-7042-2445-7.

Волова, Т.Г. Введение в биотехнологию. Версия 1.0 [Электронный ресурс]: электрон. учеб. пособие / Т.Г. Волова. – Электрон. дан. (2 Мб). – Красноярск: ИПК СФУ, 2008. http://files.lib.sfu-kras.ru/ebibl/umkd/143/u_course.pdf

Волова, Т.Г. Введение в биотехнологию: Учеб. пособие [Текст] / Т.Г. Волова. – Красноярск: ИПК СФУ, 2008. – 188 с.

Джей, Дж. М. Современная пищевая микробиология [Текст] / Джей, Дж.М., Лесснер, М.Дж., Д.А. Гольден. – Пер. с англ. изд. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2012. – 886 с.

Желдакова, Р.А. Механизмы биосинтеза антибиотиков и их действие на клетки микроорганизмов: Учеб.-метод. комплекс для студентов спец. «Биология». [Текст] / Р.А. Желдакова. – Минск: БГУ, 2004. – 111 с.

Красникова, Л.В. Микробиология. [Текст] / Л.В. Красникова. – СПб.: Троицкий мост, 2012. – 296 с.

Красникова, Л.В. Микробиология молока и молочных продуктов: Лабораторный практикум. [Текст] /Л.В. Красникова, П.И. Гунькова, В.В. Маркелова: Учеб.-метод. пособие. – СПб.: НИУ ИТМО; ИХиБТ, 2013. – 85 с.

Катлинский А.В., Сазыкин Ю.О., Орехов С.Н., Чакалева И.И. Курс лекций по биотехнологии. [Электронный ресурс] http://www.fptl.ru/biblioteka/biotehnologiya/katlinskyj_biotehnology.pdf.

Кузьмина, Н.А. Основы биотехнологии. Электронный учебник: [Электронный ресурс] <http://www.biotechnolog.ru/.htm>.

Нетрусов, А.И. Введение в биотехнологию. Учеб. [Текст] / А.И. Нетрусов – М.: Академия, 2015. – 288 с. ISBN 978-5-4468-2293-5.

Орехов, С.Н., Биотехнология. [Текст] / С.Н. Орехов, И.И. Чакалева: М.: Академия, 2014. – 282 с. ISBN: 978-5-4468-0788-8.

Сушкова, В.И. Безотходная конверсия растительного сырья в биологически активные вещества. [Текст] /В.И. Сушкова, Г.И. Воробьева – М.: ДеЛи принт, 2008. – 215 с.

Уайтхерст, Р.Дж. Ферменты в пищевой промышленности. [Текст] /Уайтхерст, Р.Дж., М. ван Оорст. – СПб.: Профессия, 2013. – 408 с.

Цикуниб, А.Д. Молокосвертывающие ферменты: Сравнительная характеристика / А.Д. Цикуниб, С.А. Гончарова // Наука: комплексные проблемы. – 2014. – № 4. [Электронный ресурс] <http://nigniikp.adygnet.ru/index.php/vypuski-2014/vypusk-4-noyabr/19-stati-k-4-mu-vypusku/56-molokosvertyvayushchie-fermenty-sravnitelnaya-kharakteristika>.

Шмелева, В.Г. Методы определения активности ферментов: Метод. указания. [Текст] / В.Г. Шмелева. – СПб: Изд-во СПбГУ, 1997. – 42 с.

Электронные ресурсы

<http://www.twirpx.com/files/food/quality/>
<http://www.standartization.com; vse gost.com>
<http://mppnik.ru/>

СОДЕРЖАНИЕ

Лабораторная работа № 1. Требования, предъявляемые к микроорганизмам-продуцентам	3
Лабораторная работа № 2. Приготовление и микроскопирование препаратов микроорганизмов	11
Лабораторная работа № 3. Изучение строения и свойств микроорганизмов, применяемых в пищевой биотехнологии...	24
Лабораторная работа № 4. Изучение биотехнологических характеристик и способов культивирования молочнокислых микроорганизмов.....	32
Лабораторная работа № 5. Изучение биотехнологических характеристик хлебопекарных и пивных дрожжей	50
Лабораторная работа № 6. Изучение технологического процесса культивирования кефирных грибков	64
Лабораторная работа № 7. Изучение процесса брожения молочного сахара	71
Лабораторная работа № 8. Изучение действия ферментов животного, растительного и микробного происхождения.....	81
Темы контрольных работ.....	96
Список литературы.....	98

Сучкова Елена Павловна

ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ

Учебно-методическое пособие

Ответственный редактор
Т.Г. Смирнова

Титульный редактор
Е.О. Трусова

Компьютерная верстка
И.В. Гришко

Дизайн обложки
Н.А. Потехина

*Печатается
в авторской редакции*

Подписано в печать 27.12.2016. Формат 60×84 1/16
Усл. печ. л. 6,05. Печ. л. 6,5. Уч.-изд. л. 6,25
Тираж 50 экз. Заказ № С 58

Университет ИТМО. 197101, Санкт-Петербург, Кронверкский пр., 49

Издательско-информационный комплекс
191002, Санкт-Петербург, ул. Ломоносова, 9