

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
Національний університет «Чернігівська політехніка»

Біотехнологічні процеси у харчових технологіях

Методичні вказівки до виконання лабораторних робіт
здобувачів другого рівня вищої освіти
за освітньою програмою «Харчові технології»

ЗАТВЕРДЖЕНО
на засіданні кафедри
харчових технологій
протокол № 11 від 11.05.2021 р.

НУ «Чернігівська політехніка 2021

Біотехнологічні процеси у харчових технологіях. Методичні вказівки до виконання лабораторних робіт здобувачів другого рівня вищої освіти за освітньою програмою «Харчові технології»/ Ж.В. Замай, І.О.Сироштан – Чернігів: НУ «Чернігівська політехніка», 2021. – 38 с.

Укладач: **Замай Жанна Василівна**, кандидат технічних наук, доцент
Сироштан Ірина Олексіївна, кандидат ветеринарних наук

Відповідальний за видання: **Хребтань Олена Борисівна**, завідувач кафедри харчових технологій, кандидат технічних наук, доцент

Рецензент: **Гуменюк Оксана Леонідівна**, кандидат хімічних наук, доцент кафедри харчових технологій Національного університету «Чернігівська політехніка»

Зміст

Вступ.....	4
Техніка безпеки при роботі в лабораторії мікробіології та біотехнології	5
Правила надання домедичної допомоги.....	7
Лабораторна робота №1 Характеристика дріжджів як об'єкту біотехнології.....	8
Лабораторна робота № 2. Дослідження маслянокислого бродіння..	17
Лабораторна робота №3. Дослідження молочнокислого бродіння	23
Рекомендована література.....	34
Додатки.....	36

ВСТУП

Лабораторний практикум з ОК 10 «Біотехнологічні процеси у харчових технологіях» надає студентам можливість оволодіти основними мікробіологічними та біохімічними методами дослідження, які необхідні майбутньому спеціалісту для роботи на виробництвах та в лабораторіях харчової та біотехнологічної промисловості.

ЗВО вивчають умови отримання та відбору високопродуктивних штамів, які володіють цінними біосинтетичними властивостями, знайомляться з практичним використанням мікроорганізмів у промисловості, отримують в лабораторних умовах ряд біологічно активних речовин – продуктів мікробного синтезу. Студенти навчаються працювати з промисловими штамми мікроорганізмів, підбирати оптимальні середовища для культивування, зберігати штами-продуценти промислово важливих речовин., засвоюють принципи роботи приладів для культивування мікроорганізмів у лабораторних та виробничих умовах. ЗВО оволодівають класичними та сучасними методиками вивчення фізіолого-біохімічних властивостей мікроорганізмів, що переважно використовують у харчових технологіях.

Мінімальний набір приладів і обладнання для повноцінного функціонування лабораторії мікробіологічного профілю складається з: автоклава (прилад, який працює під тиском і застосовується для стерилізації різних матеріалів), сухо-жарової шафи (прилад, який може підтримувати температуру до 200°C і використовується для стерилізації скляного посуду), термостата (прилад, який підтримує постійну задану температуру протягом значного інтервалу часу), мікроанаеростата (прилад для вирощування анаеробних мікроорганізмів), ламінарний бокс (прилад, який використовують для пересіву культур мікроорганізмів), водяної бані, люміностантної камери для вирощування фотоавтотрофних мікроорганізмів, терезів, електричних шейкерів; мікробіологічних пробірок, колб, циліндрів різної форми й об'єму, піпеток різного об'єму, чашок Петрі, скляних лійок, предметних скелець з лункою та без - всі ці предмети повинні бути виготовлені з термостійкого скла,

оскільки підлягають нагріванню; бактеріальних петель, голок, шпателів металевих і скляних; ватно-марлевих та гумових пробок; засобів для фільтрування (прибор Зейтца, бактеріальні фільтри різної конструкції тощо). Якщо використовується одноразовий пластиковий мікробіологічний посуд (пробірки, піпетки, чашки Петрі), необхідно мати спеціальне обладнання для його дезінфекції та утилізації.

У мікробіологічній лабораторії навчального закладу заборонено працювати з патогенними мікроорганізмами I—III класів патогенності, робота з якими вимагає відповідної кваліфікації і дотримання строгих правил безпеки. Такі роботи виконуються у спеціалізованих мікробіологічних лабораторіях різного профілю. Однак під час виконання більшості лабораторних робіт студенти працюють з живими мікроорганізмами, виділеними з об'єктів довкілля, або з музейними культурами. Робота з ними теж вимагає дотримання суворих правил безпеки поводження з культурами мікроорганізмів.

Правила поводження і техніки безпеки у мікробіологічній лабораторії.

1. У лабораторію заборонено входити у верхньому одязі та класти на лабораторні столи сумки й інші особисті речі, які можуть заважати роботі.
2. У приміщенні лабораторії необхідно підтримувати порядок і чистоту, працювати в халатах.
3. У лабораторії категорично заборонено споживати їжу, пити воду, палити.
4. Робоче місце має бути обладнане всім необхідним для проведення лабораторних занять: мікроскопом, лампою, штативом для пробірок з культурами, бактеріологічною петлею тощо. За справність приладів несе відповідальність студент.
5. Інструменти, які використовували для роботи з культурами мікроорганізмів (петля, пінцет, пастерівські піпетки, необхідно фламбувати або поміщати у дезінфекційну рідину.
6. У разі потрапляння досліджуваного матеріалу на шкіру, халат, стіл

- необхідно негайно повідомити про це викладача і під його контролем провести дезінфекцію.
7. Усі живі мікропрепарати після мікроскопування, а також піпетки і шпателі, якими користувалися, необхідно занурити у склянку з дезінфекційною рідиною (2%-ний розчин хлораміну або ін.).
 8. Після закінчення роботи засіяні чашки та пробірки поставити в термостат, культури мікробів і залишки дослідного матеріалу ставлять у холодильник або знешкоджують. Всі використані матеріали спалюють або знешкоджують стерилізацією в автоклаві. Цю роботу проводять співробітники лабораторії.
 9. Не залишати без догляду прилад, що працює або розпочатий дослід.
 10. Не виливати у раковину залишки кислот, лугів, вогнебезпечних та отруйних рідин, а також кидати папір, пісок та інші тверді залишки.
 11. Не можна нагрівати закупорені посудини або апарати, крім спеціально призначених для такого процесу.
 12. Необхідно чітко дотримуватися правил роботи і зберігання легкозаймистих, отруйних та шкідливих речовин.
 13. З отруйними та шкідливими речовинами працювати тільки у витяжній шафі.
 14. Якщо відібрано занадто багато реактиву, то його висипають або виливають у новий чистий посуд, роблять на ньому напис і використовують надалі.
 15. Не можна плутати корки від посуду з різними реактивами, також зберігати реактиви без корків або кришок. Розкривати закритий посуд з реактивами треба обережно, щоб у середину не потрапили парафін і бруд із корка.
 16. Не можна брати реактиви руками.
 17. Не можна брати гарячий посуд незахищеними руками.
 18. Якщо на посудині з реактивом немає етикетки або напису, то користуватися цим реактивом заборонено.

19. За необхідності визначення запахів, потрібно рухом долоні направити струмінь газу від отвору реакційної посудини до себе і обережно вдихнути.
20. Розлитий водяний розчин кислоти або лугу засипати сухим піском, совком перемістити адсорбент від країв розливу до середини, зібрати в поліетиленовий мішечок і щільно зав'язати. Місце розливу обробити нейтралізуючим розчином, а потім промити водою.
21. У разі розливання легкозаймистих рідин або органічних речовин об'ємом до $0,05 \text{ дм}^3$ погасити відкритий вогонь і провітрити приміщення.
22. Якщо розлито більш як $0,1 \text{ дм}^3$, студентам потрібно вийти з лабораторії. Викладачу та/або лаборантам погасити відкритий вогонь і відключити систему газо- та електропостачання приміщення. Розливу рідину засипати сухим піском, вологий адсорбент зібрати дерев'яним совком у тару, що закривається, і провітрити приміщення до повного зникнення запаху.
23. У випадку розливання легкозаймистої рідини та її займанні негайно повідомити в найближчу пожежну частину та приступити до гасіння осередку загоряння первинними засобами пожежогасіння, спочатку відключивши систему електропостачання приміщення.
24. У випадку, якщо розбився лабораторний посуд або прилади зі скла, не збирати уламки незахищеними руками. Для цієї мети використати щітку або совок.
25. Після закінчення занять необхідно навести порядок на робочому місці.

Правила надання домедичної допомоги

1. Кожен повинен знати, де знаходяться засоби протипожежного захисту і аптечка.
2. При виникненні пожежі негайно відключити газ, вимкнути електроприлади в лабораторії. Швидко забрати всі горючі речовини подалі від вогню, а полум'я гасити вогнегасником, піском або використовувати протипожежну ковдру. Не можна заливати вогонь

водою.

3. Якщо на комусь спалахне одяг, необхідно того, хто постраждав, повалити на підлогу і швидко накрити вовняною ковдрою, при цьому бігати по лабораторії забороняється, так як полум'я це більше підсилиться.
4. При термічних опіках негайно роблять примочки спиртовим розчином таніну, етанолом або розчином перманганату калію.
5. При опіках кислотами необхідно відразу ж промити уражене місце проточною водою, потім 5% розчином гідрокарбонату натрію
6. При опіках лугами необхідно відразу ж промити уражене місце проточною водою, потім 3% розчином борної або оцтової кислоти.
7. При потраплянні кислоти або лугу в очі потрібно швидко промити невеликим струменем води з-під крану на протязі 3-5 хвилин, потім очі промивають розчином гідрокарбонату натрію (у випадку кислоти) або розчином борної кислоти (у випадку лугу). Після цього треба звернутися до лікаря.
8. Шкіру, уражену органічною речовиною (наприклад фенолом) необхідно промити великою кількістю спирту або іншого нейтрального розчинника. Обов'язково здобувача, що постраждав, слід відправити до медпункту.
9. У випадку термічного опіку – остудити уражене місце, для чого помістити його під струмінь холодної води. Після охолодження – змазати маззю від опіків.
10. У разі одержання травми – надати першу допомогу потерпілому і повідомити адміністрації установи, за необхідності відправити потерпілого в найближчу лікувальну установу.

Лабораторна робота №1

Характеристика дріжджів як об'єкту біотехнології

Мета__ : ознайомитися з морфологічними особливостями дріжджів, отриманих з різних джерел, дослідити наявність включень та процес спороутворення, одержати гігантські колонії та поставити бродильні проби.

Обладнання та реактиви

Заняття 1. Пресовані дріжджі (осад вина і пива, кефіру, розсолу), чисті музейні культури дріжджів різних видів. Середовище, збагачене фосфатами (6°Б сусло-агар + 3 г/л KH_2PO_4). Середовище, багате вуглеводами (12°Б сусло-агар або м'ясо-пептонний агар із 2% глюкози). Рідке 6°Б сусло; фуксин. Середовище Городкової (у г/л): пептон – 10; глюкоза – 12,5; м'ясний екстракт – 10; агар-агар – 10; NaCl – 5; дист. вода – 1000. Стерилізують середовище при 0,5 атм. 20 хвилин.

Метод Бейєринка. Молоду культуру дріжджів, що добре харчувалися, висівають на середовище наступного складу (г/л): вилужений агар-агар – 40; дистильована вода – 1000. Стерилізують середовище при 1 атм. 20 хвилин.

Заняття 2.

20%-й розчин сахарози, ряд пробірок з напіврідкими стандартними середовищами, що містять різноманітні джерела вуглецю – глюкозу, сахарозу, мальтозу, левульозу та ін.; метиленова синь, приготована за Леффлером; карболовий фуксин Циля; 1%-й розчин сульфатної кислоти; слабкий розчин метиленової сині (1:40); фізіологічний розчин і Судан III (70% спиртовий розчин Судану); 40%-й формалін; метиленова синь (1:40); суміш спирт : ефір, змішаних у співвідношенні 1:2; розчин йоду в калій йодиді; солянокислий спирт (етиловий спирт 96% - 97 мл, конц. хлоридна кислота-3 мл); розведений розчин метиленової сині (1:40).

Теоретичні відомості

Терміном «дріжджі» позначають одноклітинні еукаріотичні мікроорганізми, які в залежності від наявності та типу полового процесу відносять до відділів грибів: *Ascomycota* та *Basidiomycota*. Термін «дріжджі» не має таксономічного значення. *Saccharomyces cerevisiae*, які найбільш часто застосовуються, відносяться до аскоміцетів (клас *Hemiascomycetes*; порядок *Saccharomycetales*; родина *Saccharomycetaceae*; рід *Saccharomyces*; вид *S. cerevisiae*).

Форма дріжджових клітин різноманітна: кулеподібна, овальна, циліндрична, витягнута, еліпсоподібна, трикутна.

Дріжджі – органотрофи, здебільшого аероби чи факультативні анаероби. Вони мають сформований апарат дихання. При доступі кисню клітини дріжджів здійснюють аеробне дихання, тобто пірвиноградна кислота, що утворилася з вуглеводів при гліколітичному їх розкладі, окислюється у циклі трикарбонних кислот з утворенням CO_2 та H_2O . В анаеробних умовах дріжджі отримують енергію від зброджування вуглеводів за рахунок субстратного фосфорилування в процесі спиртового бродіння. Явище пригнічення спиртового бродіння в аеробних умовах носить назву «ефекту Пастера».

Аеробне дихання дає значно більше енергії, ніж бродіння, тому для отримання такої ж кількості молекул АТФ при такому диханні необхідно менше вуглеводів. Отже, коефіцієнт використання вуглеводів збільшується. Для отримання більшої маси дріжджів, наприклад при виробництві пекарських дріжджів, живильне середовище, в якому відбувається їх розмноження, аерують. Навпаки, при виробництві спирту процес ведеться в анаеробних умовах, щоб повністю виключити потрапляння O_2 , який гальмує утворення етилового спирту.

Зброджування вуглеводів дріжджами з утворенням етанолу і CO_2 йде гліколітичним шляхом (Ембдена-Мейергофа-Парнаса). Піруват, що утворився в результаті, під впливом піруватдекарбоксілази перетворюється на ацетальдегід, який потім відновлюється НАД $\cdot\text{H}_2$ -алкогольдегідрогеназою до етанолу.

У природі дріжджі знаходяться в ґрунті, на поверхні рослин, плодів, ягід. Розмножуються дріжджі статевим і нестатевим шляхом. Способи нестатевого розмноження наведені на рис. 2.

Статева стадія у дріжджів може бути представлена асками або базидіями. Спори у дріжджів утворюються тільки при нестачі поживних речовин у присутності достатньої кількості кисню. Кількість спор в клітині різних видів дріжджів різна. Їх може бути дві, чотири, а іноді вісім і навіть дванадцять.

Клітини дріжджів можуть містити у великій кількості запасні речовини:

- **Волютин** (метахроматин) накопичується в вакуолях у вигляді колоїдного розчину або гранул. Гранули можуть бути локалізовані безпосередньо в цитоплазмі. Волютин – джерело фосфору і акумулятор енергії.

- **Жирові включення.** У молодих дріжджових клітинах жиру зазвичай немає, в зрілих він міститься лише в небагатьох клітинах у вигляді дрібних крапель, а в старих – у вигляді великих.

- **Глікоген** - накопичується при культивування дріжджів на середовищах, багатих цукром. При нестачі харчування глікоген швидко витрачається. У молодих клітинах глікогену мало, в зрілих – до 40%.

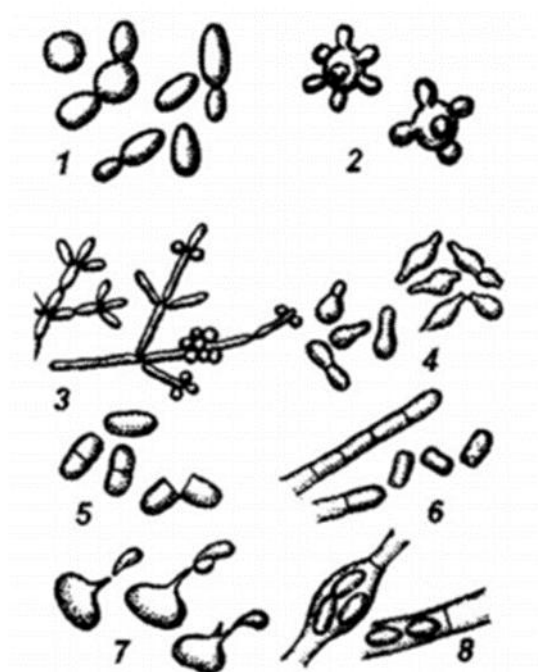


Рис. 1. Способи нестатевого розмноження дріжджів: 1 – брунькування;

2 – множинне брунькування; 3 – утворення псевдоміцелію з

бластоспорами у представників роду *Candida*; 4 – брунькування з подальшим поділом у представників роду *Nadsonia*; 5 – поділ; 6 – поділ і утворення псевдоміцелію у представників роду *Schizosaccharomyces*; 7 – утворення балістоспор у представників роду *Sporobolomyces*; 8 – ендоспори.

Найбільше практичне значення має вид дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*, які відносяться до аскоміцетів. До цього роду відносять раси, що використовуються в харчовій промисловості: хлібопеченні, виробництві

спирту, пивоварінні, виноробстві, виробництві квасу. Корисні фізіологічні властивості дріжджів *S. cerevisiae* дозволяють використовувати їх і у виробництві ферментів, ліпідів, вітамінів, харчових домішок, пробіотиків та харчового білку.

На діяльності дріжджів роду *Candida*, таких як *C. utilis*, *C. scottii* та *C. tropicalis* засноване отримання кормового білку та БВК. При культивуванні цих дріжджів на середовищах з дешевим джерелом вуглецевого живлення (меляса, відходи целюлозної або текстильної промисловості, метанол, етанол тощо) вдається отримувати значну біомасу, яка містить повноцінний білок. Дріжджі сепарують і використовують для кормових цілей. Розроблено й спосіб вирощування кормових дріжджів на відходах нафтової промисловості.

Типовими ліпідуютворювачами є дріжджі *Cryptococcus terricolus*. Вони можуть синтезувати велику кількість ліпідів (до 60% від сухої маси) в будь-яких умовах, навіть найбільш сприятливих для синтезу білка. З інших ліпідуютворюючих дріжджів промисловий інтерес мають дріжджі *C. guilliermondii*, що утилізують алкани. *C. guilliermondii* синтезують в основному фосфоліпиди. Подібні організми, які отримали технічну назву «жирові», запропоновано застосовувати для мікробіологічного отримання цінних технічних жирів.

Існують форми дріжджів, що накопичують значні кількості вітамінів, на основі даної властивості побудовані виробництва вітамінів для медицини і сільського господарства.

Не всі дріжджі приносять користь людині. Серед дріжджів є шкідники харчових продуктів та збудники мікозів.

Завдання до лабораторної роботи:

1. Дослідити морфологію дріжджів.
2. Виявити у клітинах різноманітні включення – волютин, жир, глікоген.
3. Дослідити спороутворення у дріжджів.
4. Поставити бродильні проби.

5. Одержати гігантські колонії.
6. Занотувати в протокол відомості про особливості морфології та метаболізму дріжджів. Практичне значення дріжджів.

Хід роботи

Вивчення морфології дріжджів. Одержання включень.

Морфологія дріжджів.

Для ознайомлення з морфологією дріжджів готують ряд мазків із різноманітних субстратів – пресованих дріжджів, осаду вина і пива, кефіру, розсолу, а також 5-6 мазків із чистих музейних культур дріжджів різних видів. Препарати фіксують, фарбують простим методом за допомогою фуксину і вивчають морфологію дріжджової клітини. Замальовують розташування і форму клітин.

Одержання включень.

Для одержання різноманітних включень культуру дріжджів *S. cerevisiae* висівають на наведені нижче середовища та вирощують при температурі 28°C. З вирослих культур готують необхідні препарати для мікроскопічного дослідження та розглядають їх в імерсійній системі.

Волютин. Культуру дріжджів вирощують на середовищі, збагаченому фосфатами (6°Б сусло-агар + 3 г/л $\text{K}_2\text{H}_2\text{P}_4$).

Жир. Для одержання включень жиру культуру дріжджів вирощують на середовищі, багатому вуглеводами. Для цього використовують 12°Б сусло-агар або м'ясо-пептонний агар із 2% глюкози.

Глікоген. Для збагачення дріжджів глікогеном їх спочатку вирощують на рідкому 6°Б суслі, а через добу зливають культуральну рідину з осаду дріжджів і додають до них 20%-вий розчин сахарози. Ще через добу клітини дріжджів переповнюються глікогеном.

Спороутворення у дріжджів. Для дослідження спороутворення у культурі дріжджів необхідно створити певні умови. Спори утворюють молоді дріжджові клітини, які вирощувалися на багатих середовищах в аеробних умовах за значної вологості з подальшим переведенням культури на

середовища з нестачею джерел живлення.

Для визначення здатності дріжджів до споруутворення роблять посів 2–3-добової культури дріжджів на сусло-агар і витримують при 28°C протягом доби. З цієї одностодової культури роблять посів на поверхню бідного вуглеводами поживного середовища. З цією метою можливо використовувати середовище Городкової, гіпсові блоки, а також метод Бейєринка.

Середовище Городкової (у г/л): пептон – 10; глюкоза – 12,5; м'ясний екстракт – 10; агар-агар – 10; NaCl – 5; дист. вода – 1000. Стерилізують середовище при 0,5 атм. 20 хвилин.

Гіпсові блоки готують у такий спосіб: 2 частини порошку гіпсу замочують у 3 частинах води до консистенції густої сметани і виливають цю масу в паперові формочки, розташовані на рівному склі. Через якийсь час паперову форму видаляють, твердий гіпсовий блок поміщають у чашку Петрі гладкою поверхнею до гори, наливають до половини блоку воду. На гладкій поверхні петлею розмазують краплю культури дріжджів і витримують у термостаті 2-3 доби.

Метод Бейєринка. Молоду культуру дріжджів, що добре харчувалися, висівають на середовище наступного складу (г/л): вилужений агар-агар – 40; дистильована вода – 1000. Стерилізують середовище при 1 атм. 20 хвилин.

Культури дріжджів із метою виявлення споруутворення засівають одним з трьох або всіма трьома описаними вище методами. Посіви вирощують у термостаті протягом 2-3 діб.

Бродильна проба. Готують ряд пробірок з напіврідкими стандартними середовищами, що містять різноманітні джерела вуглецю – глюкозу, сахарозу, мальтозу, левульозу та ін. (можна використовувати рідке середовище із канюлями). Стерильні середовища засівають дріжджами уколом і поміщають у термостат при температурі 28°C на 7 діб.

Гігантські колонії дріжджів. Для одержання гігантських колоній, морфологія, яких є таксономічною ознакою, на скошений 6°Б сусло-агар, розлитий у чашки Петрі, наносять петлею культури дріжджів. Посіви

витримують при 28°C протягом 7 діб.

Визначення включень, спор, гігантських колоній дріжджів.

Волютин. Препарати для дослідження включень волютину готують із старої культури дріжджів двома наведеними нижче методами.

1) Препарат, зафіксований у полум'ї пальника, забарвлюють метиленовою синню, приготованою за Леффлером, витримують 2 хвилини. Барвник змивають, препарат переглядають у імерсійній системі. Волютинові зерна забарвлені у фіолетовий колір, протоплазма – у блакитний.

2) Метод Омелянського. Препарат, зафіксований у полум'ї пальника, забарвлюють протягом 30 секунд карболовим фуксином Циля. Промитий водою препарат знебарвлюють 1%-вим розчином сірчаної кислоти протягом 20-30 секунд, знову промивають водою і додатково фарбують слабким розчином метиленової сині (1:40) протягом 15-20 хвилин. Барвник змивають, препарат переглядають у імерсійній системі. Зерна волютину мають червоний колір, протоплазма – синій.

Жир. Препарати для дослідження включень жиру готують із культури дріжджів двома наведеними нижче методами.

1) На предметному скельці готують суспензію дріжджів у краплі фізіологічного розчину і Судану III, накривають покривним скельцем та переглядають у імерсійній системі. Цитоплазма клітини залишається незабарвленою, а краплі жиру забарвлюються в помаранчево-червоний колір.

2) Метод Мейєра. Краплю суспензії дріжджів змішують на предметному склі з краплею 40%-вого формаліну і залишають на 5 хвилин. Фіксований в такий спосіб препарат забарвлюють розчином метиленової сині (1:40) протягом

10 хвилин, потім туди ж додають краплю розчину Судану III. Препарат переглядають у імерсійній системі. Цитоплазма клітини забарвлюється в синій колір, а краплі жиру – у рожевий або жовтогарячий.

Глікоген. Препарат для дослідження включень глікогену готують із

культури дріжджів наведеним нижче методом.

Препарат дріжджів на предметному скельці фіксують сумішшю спирт:ефір, змішаних у співвідношенні 1:2. Потім препарат фарбують розчином йоду в йодистому калії. Барвник змивають, препарат переглядають у імерсійній системі. При взаємодії з розчином йоду глікоген набуває червоно-бурого забарвлення.

Спороутворення у дріжджів. Препарати для дослідження спороутворення дріжджів готують наведеним нижче методом.

Забарвлення спор у дріжджів. Препарат, зафіксований у полум'ї пальника, фарбують карболовим фуксином протягом 5-10 хвилин при нагріванні над полум'ям пальника. Вся клітина і її включення забарвлюються в червоний колір. Препарат занурюють на 0,5-1 хвилину в кислий спирт, у якому всі частини клітини, крім спор, знебарвлюються. Для диференціації спор препарат забарвлюють при нагріванні над полум'ям пальника розведеним розчином метиленової сині (1:40). При цьому клітина забарвлюється у світло-блакитний колір, спори залишаються червоними.

Бродильна проба. Посіви переглядають і реєструють газоутворення (за появою бульбашок газу в товщі напіврідкого середовища або заповненням канюлі CO₂) і кислотоутворення (за зміною забарвлення середовища).

Гігантські колонії дріжджів. Описують і замальовують зовнішній вигляд гігантських колоній і їх будову (спостереження ведуть у біноккулярний мікроскоп).

Результати проведених дослідів заносять у протокол, усі мікроскопічні картинки замальовують.

Контрольні питання:

1. Охарактеризуйте таксономічне положення дріжджів.
2. Наведіть систематику *Saccharomyces cerevisiae*.
3. У чому особливості метаболізму дріжджів?
4. Яким шляхом дріжджі зброджують вуглеводи?
5. Як розмножуються дріжджі?

6. Які запасні речовини можуть накопичуватися в клітинах дріжджів? Які умови необхідно створити для їх дослідження?
7. Практичне значення дріжджів?
8. За яким умов відбувається спороутворення у дріжджів?
9. Методи виявлення різноманітних включень.
10. З якою метою досліджують гігантські колонії дріжджів?
11. У чому особливості забарвлення спор у дріжджів?

Лабораторна робота № 2

Дослідження маслянокислого бродіння

Мета: провести маслянокисле бродіння та за якісними реакціями встановити наявність у бражці масляної кислоти. Ознайомитись з морфологічними та біохімічними ознаками збудників маслянокислого бродіння.

Теоретичні відомості

Клостридії – грампозитивні (старіюча культура може забарвлюватися як грамнегативна), рухливі, паличкоподібні форми, які можуть досягати розміру $1-2 \times 10$ мкм. Рух клостридій здійснюється за допомогою перитрихіально розташованих джгутиків. У міру старіння в процесі циклу розвитку клітини втрачають рухливість, накопичують гранульозу (запасна речовина типу крохмалю) і переходять до спороутворення. Утворені спори мають овальну або сферичну форму. Діаметр їх, як правило, перевищує діаметр вегетативної клітини. При утворенні спор клітини набувають веретеноподібну форму (клостридіальний тип спороутворення), іноді форму барабанної палички (плектридіальні форми). Спори терморезистентні. Вони гинуть при автоклавованні протягом 24 хвилин при температурі 120°C при тиску 1 атм. У висушеному стані спори гинуть при нагріванні до $150-160^{\circ}\text{C}$ протягом декількох годин. Вегетативні клітини втрачають життєздатність при 80°C за 10

хвилини.

Клостридії облигатні анаероби. Однак спектр чутливості клостридій до молекулярного кисню достатньо широкий, що пов'язано з функціонуванням ферменту супероксиддисмутази або іншими механізмами, що допомагають клітинам нейтралізувати токсичні ефекти O_2 і його похідних. Джерело енергії клостридій в більшості випадків – маслянокисле бродіння.

Більшість бактерій роду клостридій сапрофіти, що мешкають у ґрунті. Деякі види клостридій живуть в кишечнику людини і тварин. До цього роду належать вельми небезпечні патогенні форми: *Clostridium tetani* – збудник правця, *C. perfringens* – збудник газової гангрені, *C. botulinum* – збудник ботулізму.

В біотехнологічних виробництвах в якості продуцентів масляної кислоти використовують штами *C. butyricum*, а в якості продуцентів нейтральних продуктів *C. acetobutylicum*.

Джерелом Карбону для маслянокислих бактерій можуть служити моно- і дисахариди, деякі полісахариди (декстрин, крохмаль), лактат і піруват, маніт, гліцерин та ін. Можливість розвиватися на крохмалистих середовищах без попереднього їх гідролізу пов'язано зі здатністю маслянокислих бактерій утворювати фермент амілазу. У складних білкових середовищах при відсутності вуглеводу, що зброджується, маслянокислі бактерії ростуть погано або не ростуть зовсім. Джерелом азоту для них виступають різноманітні речовини: амінокислоти, аміачні сполуки і навіть молекулярний азот.

Маслянокисле бродіння починається з трансформації цукрів у піруват шляхом Ембдена-Мейєргофа-Парнаса. Кінцеві продукти з пірувату утворюються в ланцюзі послідовних реакцій, каталізуємих кількома ферментними системами. Нове у маслянокислому бродінні – виникнення реакцій конденсації типу $C_2 + C_2 = C_4$, в результаті чого утворюється C_4 -акцепторна кислота - ацетоацетіл Ко-А, що відновлюється НАДН(H^+). Кінцевим C_4 -продуктом бродіння є масляна кислота.

Схема перетворення пірувату, що утворюється в процесі гліколізу,

представлена на рис.1.

Піруват перетворюється на ацетил-КоА, CO_2 і H_2 за участі ферментної системи: піруват:ферредоксин-оксидоредуктази. З ацетил-КоА через ацетилфосфат синтезується ацетат. Синтез бутирату починається з конденсації двох молекул ацетил-КоА, що виникли в результаті декарбоксілювання пірувату. Це призводить до утворення ацетоацетил-КоА. Останній відновлюється у β -оксибутирил-КоА. З відщеплення від молекули β -оксибутирил-КоА молекули води виникає кротоніл-КоА, який ферментативно відновлюється в бутирил-КоА. Після гідролізу бутирил-КоА і перенесення КоА на ацетат у цьому відновлювальному шляху утворюється масляна кислота.

Процес розкладу пірувату може здійснюватися і по окисному шляху. Перетворення ацетил-КоА в ацетилфосфат, а потім в ацетат супроводжується синтезом АТФ. Таким чином, в процесі субстратного фосфорилування при маслянокислому бродінні синтезується третя молекула АТФ (дві інші утворилися в процесі гліколітичного розщеплення глюкози). Напрямо біохімічного розпаду пірувату залежить від ряду причин: віку культури, умов культивування, складу середовища, тощо.

Сумарне рівняння маслянокислового бродіння:



Маслянокисле бродіння – не завжди бажаний процес. Наприклад, при його розвитку у кормах, що заквашуються, білкова частина корму розкладається, а накопичена масляна кислота надає продукту неприємний запах. Разом з тим для деяких промислових цілей потрібна чиста масляна кислота. Її отримують на заводах, спеціально зброджуючи підготовлені середовища чистою культурою маслянокислих бактерій. Утворену кислоту відокремлюють і очищують хімічним методом.

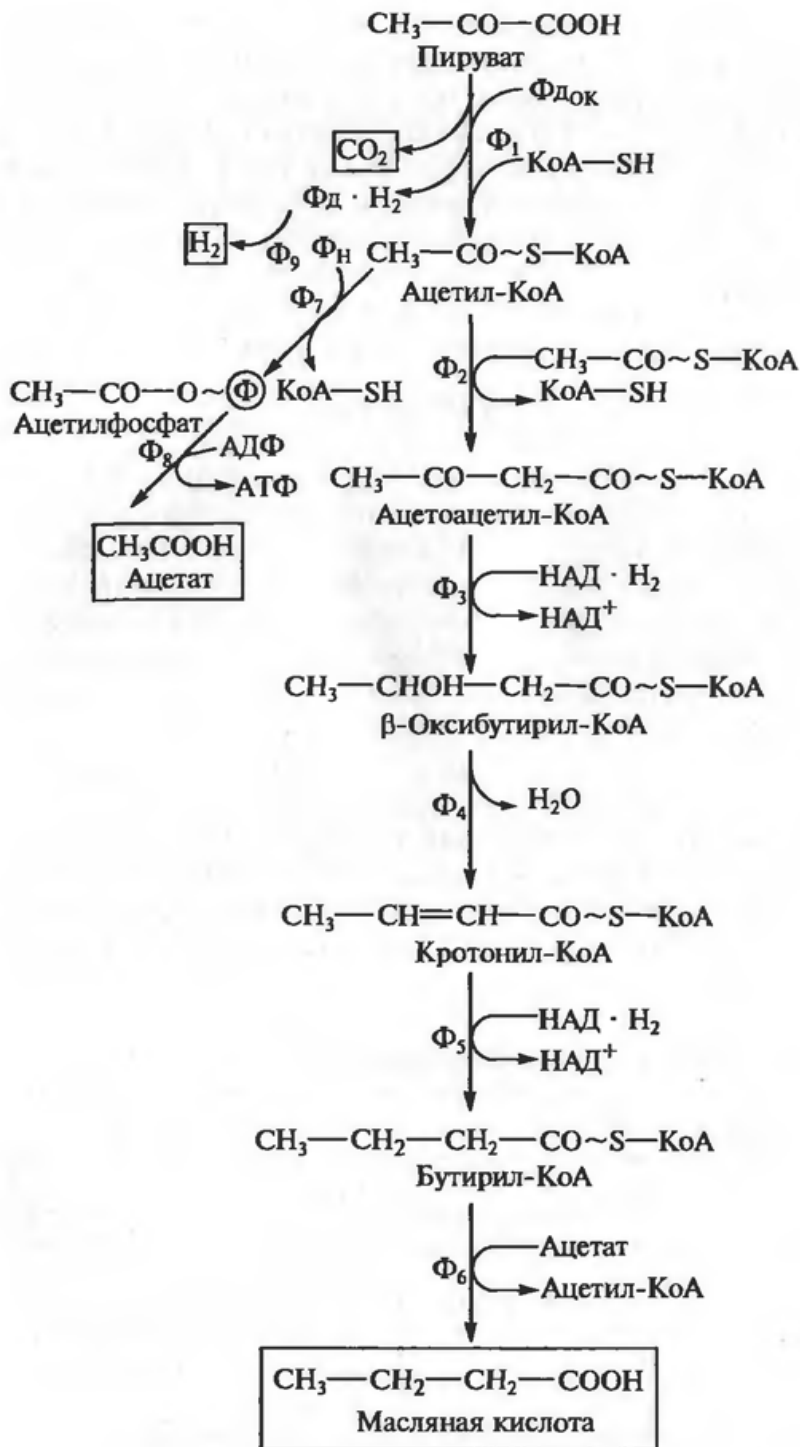


Рис. 2. Шляхи перетворення пірувату в маслянокислому бродінні, що здійснюється *Clostridium butyricum*:

Φ_1 – піруват:ферредоксин-оксидоредуктаза; Φ_2 – ацетил-КоА-трансфераза (тіолаза); Φ_3 – β-оксибутирил-КоА-дегідрогеназа; Φ_4 – кротоназа; Φ_5 – бутирил-КоА-дегідрогеназа; Φ_6 – КоА-трансфераза; Φ_7 – фосфотрансацетилаза; Φ_8 – ацетаткиназа; Φ_9 – гідрогеназа; $\Phi_{\text{ок}}$ – окислений, $\Phi_{\text{д}}\cdot\text{H}_2$ – відновлений ферредоксин; $\Phi_{\text{н}}$ – неорганічний фосфат

Завдання до лабораторної роботи:

1. Одержати накопичувальну культуру маслянокислих бактерій і ознайомитися з їхніми морфологічними особливостями.
2. Провести спостереження за процесом бродіння.
3. Поставити якісні реакції на масляну кислоту.
4. Простежити за зміною форми клітин і спороутворенням, а також накопиченням гранульози в бактерій.
5. Занотувати в протокол морфологічні та біохімічні особливості збудників маслянокислого бродіння. Занести в протокол схему маслянокислого бродіння. Практичне значення маслянокислого бродіння та його збудників.

Хід роботи

Заняття 1. Селективне виділення маслянокислих бактерій з природних джерел існування

Збудники маслянокислого бродіння – анаеробні маслянокислі бактерій – широко розповсюджені в природі. Відмінною морфологічною особливістю їх є здатність до спороутворення і синтезу гранульози. Крім того маслянокислі бактерії утворюють фермент амілазу, що забезпечує їм можливість розвиватися на крохмалистих середовищах без попереднього їх гідролізу.

Для проведення дослідження **сиру і неочищену** картоплю нарізають дрібними шматочками, заповнюють нею 1/3 об'єму широкої і високої пробірки, заливають водопровідною водою до 2/3 загального об'єму пробірки. Зважують на вагах та додають до пробірки 0,5 г крейди. Пробірку ставлять у киплячу водяну баню на 2 хвилини, після чого охолоджують під проточною водою. Охолоджену пробірку поміщають у термостат з температурою 35-37°C. Протягом 1-2 діб (до 10 діб) у пробірці буде йти маслянокисле бродіння.

Крейдю додають для того, щоб реакція у ферментуючій рідині залишалась нейтральною (процес типового маслянокислого бродіння іде нормально тільки в нейтральному середовищі), Саме вона зв'язує масляну кислоту, яка утворюється в результаті життєдіяльності внесених маслянокислих бактерій, і, таким чином, реакція залишається нейтральною. Потім кальцієву

сіль масляної кислоти розкладають, додаючи соляну кислоту. В результаті утворюється хлористий кальцій і вільна масляна кислота, яка спливає на поверхню у вигляді маслянистого шару.

Заняття 2. Дослідження морфології та біохімічної активності маслянокислих бактерій

Про факт проходження маслянокислого бродіння свідчить неприємний запах масляної кислоти з дослідної пробірки. У процесі бродіння утворюються гази (водень, CO₂), що піднімають картопляний затвор вгору.

Морфологія маслянокислих бактерій.

Готують препарат живих клітин на предметному склі зі зброженої рідини, взятої з дна пробірки. У препарат додають 1-2 краплі розчину Люголя, накривають покривним склом, досліджують мікроскопічну картину у імерсійній системі. Ті місця клітини, де міститься гранульоза, забарвлюються у синій колір. При спороутворенні форма клітин змінюється; утворюються кластридальні, а іноді плектридальні форми.

Мікроскопічну картину замальовують у протоколі.

Якісні реакції на масляну кислоту:

1) в пробірку до 5 мл відцентрифугованої культуральної рідини додають 0,5 мл 96%-вого етилового спирту і 1-2 краплі концентрованої сірчаної кислоти. Суміш нагрівають у полум'ї пальника, обережно збовтуючи, при цьому виділяється характерний запах масляно-етилового ефіру – запах ананаса;

2) до 5 мл зброженого субстрату додають 2 мл 5%-вого розчину хлорного заліза. Суміш нагрівають у полум'ї пальника. При нагріванні утворюється коричневе забарвлення внаслідок утворення маслянокислого заліза;

3) масляна кислота легко розпізнається за характерним для неї запахом прогірклої олії.

Результати проведених дослідів заносять у протокол та роблять висновок стосовно проходження маслянокислого бродіння.

Контрольні питання

1. Назвіть типових представників маслянокислих бактерій та наведіть їх морфологічні та біохімічні ознаки.
2. Якої форми набувають клітини при утворенні спор та чому? Як ці форми називаються?
3. З якого біохімічного процесу починається маслянокисле бродіння?
4. Які нові реакції зустрічаються у маслянокислому бродінні у порівнянні з іншими видами бродіння?
5. Що дає можливість маслянокислим бактеріям використовувати в якості сировини негідролізований крохмаль?
6. Що у проведеному досліді виступає джерелом маслянокислих бактерій?
7. З якою метою у проведеному досліді до поживного середовища додають крейду?
8. З якою метою дослідну пробірку попередньо поміщають до киплячої водяної бані? Як цей процес називається?

Лабораторна робота №3.

Дослідження молочнокислого бродіння

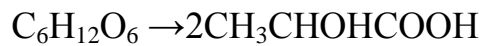
Мета роботи: виділити чисті культури молочнокислих мікроорганізмів, визначити основні показники середовища для молочнокислого бродіння, провести дослідне бродіння, визначити показники, що його характеризують.

Короткі теоретичні відомості

При молочнокислому бродінні, що викликається специфічною групою бактерій, відбувається розпад глюкози до молочної кислоти.

Відомі три типи бродіння, що викликаються молочнокислими бактеріями:

- **гомоферментативне молочнокисле бродіння**, при якому з глюкози утворюється лише молочна кислота:



- **гетероферментативне молочнокисле бродіння**, коли з глюкози крім молочної кислоти утворюються етанол і карбон діоксид, або молочна кислота, ацетат та карбон діоксид:



- **біфідобродіння**, що викликається біфідобактеріями, при якому з глюкози утворюються ацетат і лактат:



В основі *гомоферментативного* молочнокислого бродіння лежать реакції гліколізу (шлях Ембдена-Мейєргофа-Парнаса). Утворений в результаті піруват відновлюється до лактату воднем, що відщепився при дегідруванні гліцеральдегід-3-фосфату (рис. 3).

Утворення D(-) - , L(+) - або DL - форм молочної кислоти визначається наявністю у молочнокислих бактерій стереоспецифічних D- , L- або DL-лактатдегідрогеназ. Незначна частина пірувату піддається декарбоксилюванню, що призводить до утворення ацетату, етанолу і CO₂, а також ацетону.

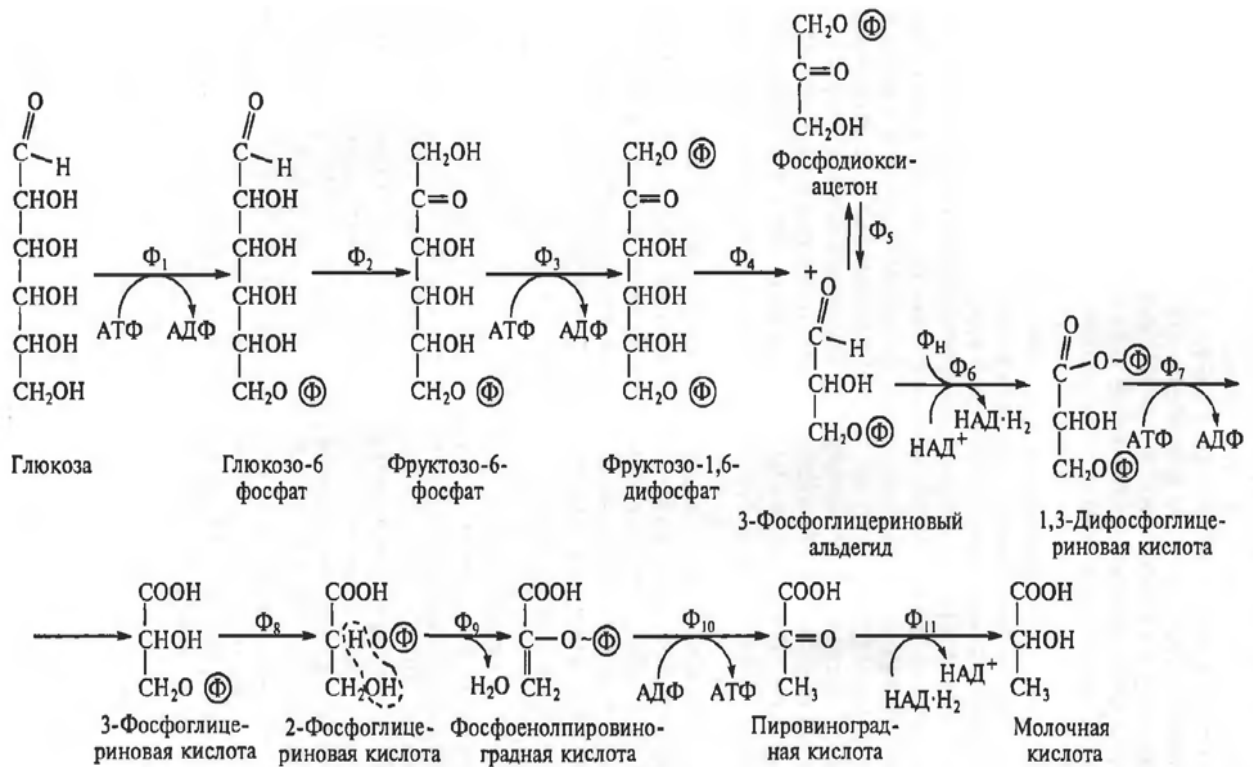


Рис. 3. Гомоферментативне молочнокисле бродіння:

Φ_1 – гексокіназа, Φ_2 – глюкозофосфатізомераза, Φ_3 – фосфофруктокіназа, Φ_4 – фруктозо-1,6- дифосфатальдолаза, Φ_5 – тріозофосфатізомераза, Φ_6 – 3-ФГА-дегідрогеназа, Φ_7 – фосфогліцераткіназа, Φ_8 – фосфогліцеромутаза, Φ_9 – енолаза, Φ_{10} – піруваткіназа, Φ_{11} – лактатдегідрогеназа

У *гетероферментативних* молочнокислих бактерій відсутні головні ферменти гліколізу -фруктозобісфосфатальдолаза і тріозофосфатізомераза. Тому початкове перетворення глюкози йде у даних бактерій виключно по пентозофосфатному шляху до утворення рибулозо-5-фосфату (рис. 4). Останній під дією ферменту епімерази перетворюється на ксилулозо-5-фосфат.

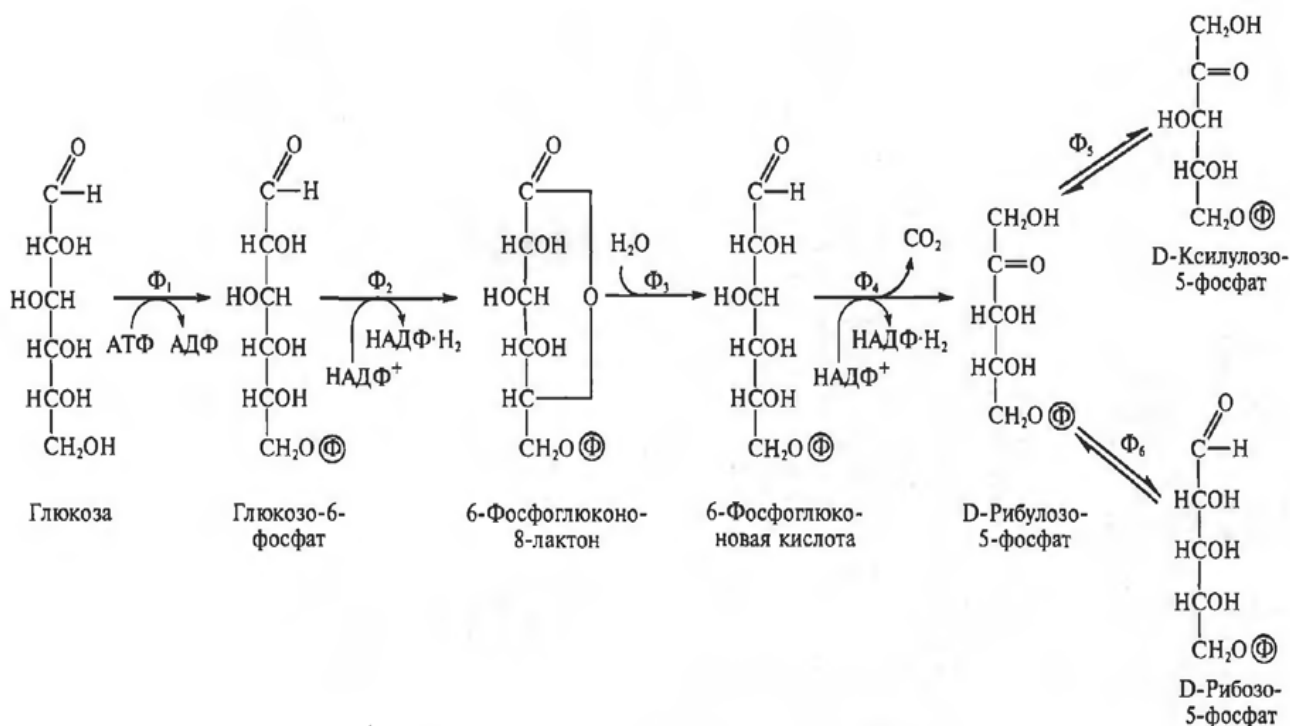


Рис. 4. Перші етапи гетероферментативного молочнокислого бродіння (окислювальний пентозофосфатний шлях):

Φ_1 – гексокіназа, Φ_2 – глюкозо-6-фосфат-дегідрогеназа, Φ_3 – лактоназа, Φ_4 – фосфоглюконатдегідрогеназа (декарбоксилююча), Φ_5 – фосфопентозоепімераза, Φ_6 – фосфопентозоізомераза

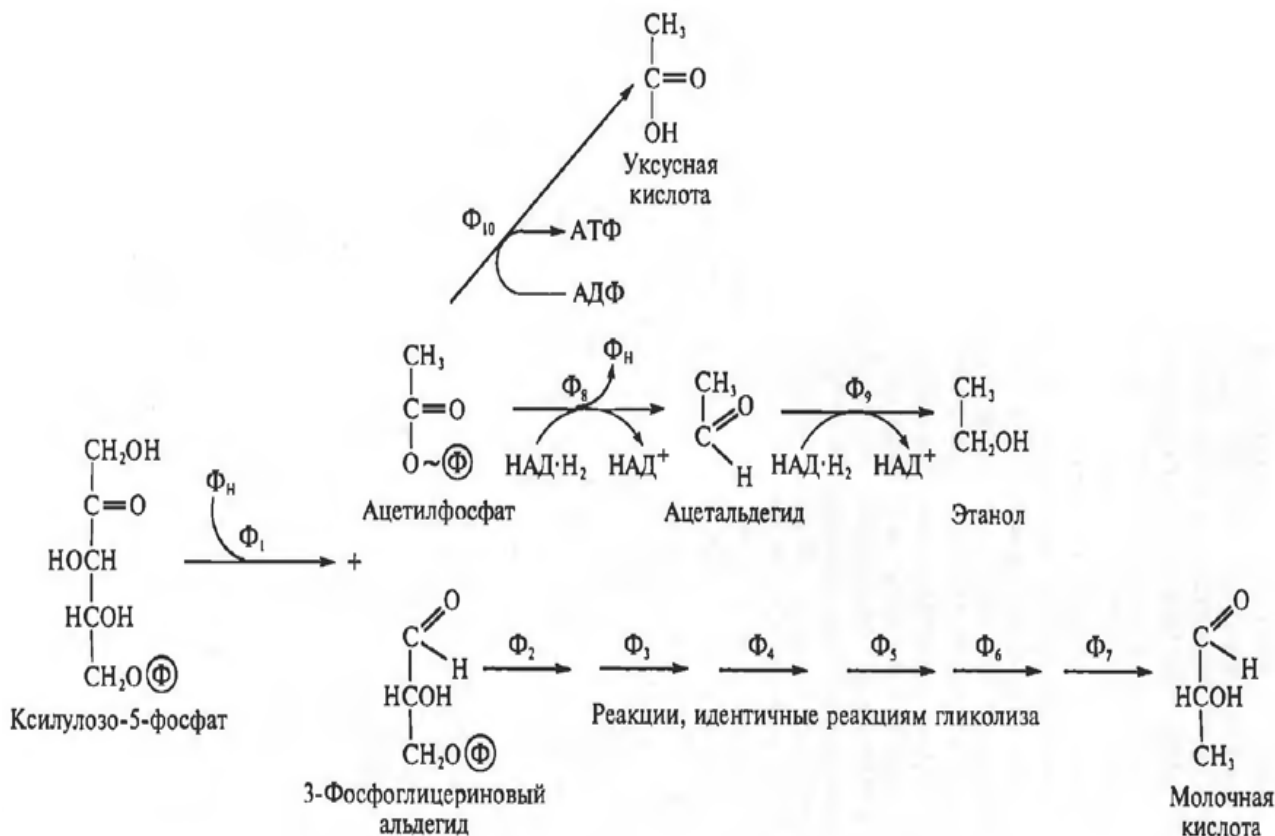


Рис. 5. Заключні етапи гетероферментативного молочнокислого бродіння: Φ_1 – пентозофосфокетоксилаза, Φ_2 – 3-ФГА-дегідрогеназа, Φ_3 – фосфогліцераткіназа, Φ_4 – фосфогліцеромутаза, Φ_5 – енолаза, Φ_6 – піруваткіназа, Φ_7 – лактатдегідрогеназа, Φ_8 – ацетальдегіддегідрогеназа, Φ_9 – алкогольдегідрогеназа, Φ_{10} – ацетаткіназа

Ксилулозо-5-фосфат в результаті реакції, що каталізується пентозофосфаткетоксилазою, розщеплюється на гліцеральдегід-3-фосфат і ацетилфосфат. Гліцеральдегід-3-фосфат перетворюється на піруват, а потім в лактат, як і при гомоферментативному молочнокислому бродінні, а з ацетилфосфату утворюються або ацетат, або етанол (рис. 5).

Біфідобродіння здійснюється за пентозофосфатним шляхом або ха шляхом Ентнера-Дудорова з кінцевими продуктами у вигляді ацетату і лактату.

За формою клітини молочнокислі бактерії є палички (довгі і короткі) і коки; які можуть утворювати парні або ланцюгові скупчення. Клітини грампозитивні, нерухомі, не утворюють спор (за винятком бактерій р. *Sporolactobacillus*). Молочнокислі бактерії – анаероби, але відносяться до групи аеротолерантних або факультативних анаеробів, тобто можуть рости при доступі кисню.

Молочнокислі бактерії виявляють високу бродильну здатність і відрізняються відсутністю більшості біосинтетичних шляхів. Це обумовлює високу вимогливість розглянутих бактерій до джерел живлення, яка задовольняється лише на таких середовищах, як тканини рослин, молоко, вміст шлунково-кишкового тракту людини та тварин. Джерелом енергії для цих бактерій служать головним чином моно- і дисахариди.

Молочнокислі бактерії вимогливі до джерел азотного харчування – вони використовують органічні форми Нітрогену. Більшість молочнокислих бактерій можуть асимілювати білки, хоча краще розвиваються на амінокислотах, пептидах і поліпептидах.

Крім речовин, що містять Карбон і Нітроген, молочнокислим бактеріям необхідні Фосфор, Калій, Кальцій та інші елементи, які зазвичай надходять в середовище з різними мінеральними сполуками. Більшість молочнокислих

бактерій потребує речовин. Окремим бактеріям для розвитку потрібен рибофлавін.

Молочнокислі бактерії розвиваються в досить широкому діапазоні температур. Для більшості видів підходять температури від 7 до 42°C при оптимумі 30-40°C. Проте в природі зустрічаються форми, здатні розмножуватися в зоні більш низьких (мінімум 3°C) або більш високих (максимум 57°C) температур.

Більшість молочнокислих бактерій ростуть в діапазоні рН 5,5 - 8,8, проте краще розмножуються за нейтральної реакції середовища. У результаті життєдіяльності вони значно підкислюють поживне середовище, тому пристосувалися до існування в зоні досить високої кислотності середовища. Це кислотолюбиві організми, оптимум для них зазвичай становить рН 5,5-5,8 і менш, як правило, вони ростуть при рН 5, деякі при рН 2,9-3,2.

Кокові форми молочнокислих бактерій, які здійснюють **гомоферментативне бродіння**, представлені родами *Streptococcus* і *Pediococcus*.

Бактерії роду *Streptococcus* мають круглі або злегка овальні клітини діаметром 0,5 - 1 мкм, розташовані поодинокі, парами або в ланцюжках. Вони широко поширені в природі на рослинах, у ґрунті, гної, молоці та інших субстратах. Бактерії роду *Streptococcus* використовуються у ряді харчових виробництв. До даного роду відносять види *S. lactis*, *S. lactis* var. *diacetylactis*, *S. cremoris*, *S. thermophilus*.

Представники роду *Pediococcus* – грампозитивні неспороутворюючі нерухомі коки, що розташовуються купками, тетрадами, парами або поодинокі. Оптимальне для видів роду значення рН 5. Бактерії схильні до анаеробних умов. Зустрічаються в рослинній сировині, що зброджується, – квашених овочах, силосі, а також в сирі, молоці, в травному тракті тварин і т.д. Серед видів роду найбільш цікаві *P. damnosus*, *P. acidilactici*, *P. dextrinicus*, *P. halophilus*.

Паличкоподібні бактерії, які здійснюють молочнокисле бродіння, відносяться роду *Lactobacillus*. Характеризуються значною різноманітністю форм від короткої кокоподібної до довгої ниткоподібної. Розташовуються поодинокі,

парами або ланцюжками. Бактерії цього роду виявляють в молочних, зернових і м'ясних продуктах, пиві, вині, соліннях й маринадах, у воді та стічних водах, а також в ротовій порожнині і кишковому тракті людини і тварин. Для *Lactobacillus* оптимум рН 5,5-5,8, але вони можуть розвиватися при рН 5 і нижче.

Серед **гомоферментативних молочнокислих паличок** можна виділити дві групи – *Thermobacterium* і *Streptobacterium*.

Перша група представлена організмами, які, як правило, ростуть при 45°C і вище, зазвичай не розвиваються за 20°C і ніколи не ростуть за 15°C. Це *L. delbrueckii*, *L. leichmannii*, *L. lactis*, *L. bulgaricus*, *L. helveticus* і *L. acidophilus*. Представники другої групи при розвитку в молоці утворюють короткі ланцюжки. Це група менш активних молочнокислих паличок. Вони добре розвиваються за температури 15-38°C, оптимум для них становить 30°C. У молоці, молочних продуктах і на рослинах зазвичай виявляють кілька видів бактерій другої групи: *L. casei*, *L. xylosum*, *L. plantarum*, *L. curvatus*. *L. casei* відіграє важливу роль у дозріванні сирів. *L. plantarum* бере участь у молочнокислому бродінні при квашенні овочів і силосуванні.

Гетероферментативне молочнокисле бродіння здійснюють представники родів *Leuconostoc*, *Lactobacillus* (підрид *Betabacterium*), *Bifidobacterium*.

Бактерії роду *Leuconostoc* мають вигляд сферичних або частіше сочевицеподібних клітин. Клітини розташовуються поодинокі, парами або в коротких ланцюжках, купкоподібних скупчень не виявлено. Грампозитивні. Спор не утворюють. Факультативні анаероби, оптимум температури для них становить 20-30°C. На середовищах з сахарозою в цих організмів з'являється товста зовнішня оболонка з слизу або декстранів.

Види роду виявляються головним чином на рослинних матеріалах (іноді в молоці). *L. mesenteroides* і *L. dextranicum* беруть активну участь у зброджуванні вуглеводів при квашенні капусти і силосуванні. *L. dextranicum* і *L. cremoris* зброджують лимонну кислоту з утворенням діацетилу, тому вони можуть бути

компонентами заквасок, застосовуваних у масло- і сироварінні.

Гетероферментативні лактобацили (бета-бактерії) – *Lactobacillus fermentum*, *L. brevis*, *L. cellobiosus*. Зазвичай зустрічаються на рослинах, виявлені в хлібних заквасках.

До роду *Bifidobacterium* відносяться бактерії, що мають нерухомі, прямі або розгалужені палички, клітини роздвоєної V-форми, булавовидної або лопатоподібної форми. Не утворюють спор, грампозитивні. Строгі анаероби, не переносять присутності O₂. Оптимум температури для них становить 36-38°C. Відомо більше 20 видів біфідобактерій; типовий представник роду *B. bifidum*.

Біфідобактерії – мешканці кишківника людини, тварин, комах і т.п. Встановлено, що представники роду *Bifidobacterium* складають від 50 до 90 % мікробного вмісту фекалій людини.

Молочнокислі бактерії мають величезне практичне значення. Їх широко використовують при виготовленні кисломолочних, квашених продуктів, сирів, кисловершкового масла тощо.

У виробничих умовах кисломолочні продукти готують, заражаючи молоко відповідними чистими культурами бактерій. З цією метою використовують молочнокислий стрептокок (*S. lactis*), болгарську паличку (*L. bulgaricus*), ацидофільну паличку (*L. acidophilus*) та ін.

Ряд молочнокислих продуктів готують, використовуючи закваску, яка містить симбіотичні комплекси мікроорганізмів. Наприклад, для приготування кефіру в молоко вносять так звані кефірні зерна, вони містять *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus lactis*, дріжджі *Saccharomyces kefir*, які зброджують лактозу. Продуктами бродіння виступають молочна кислота і спирт.

Lactobacillus plantarum і *L. coryneformis* використовують в хлібопеченні. Деякі лактобацили і стрептококи застосовуються при виготовленні сирокочених ковбас. Вони знижують рН середовища за рахунок утворення лактату, тим самим оберігаючи від псування ковбаси, які за технологією не піддаються варінню (салямі, сервелат та ін.).

Молочнокислі бактерії приймають участь у квашенні овочів та

силосуванні кормів, що зводяться головним чином до молочнокислого бродіння субстратів.

Молочнокисле бродіння, що здійснюється *L. delbrueckii*, лежить в основі отримання молочної кислоти. Для отримання декстранів використовують штами *Leuconoctoc mesenteroides*.

Завдання до лабораторної роботи:

1. Виділити чисті культури молочнокислих бактерій.
2. Поставити дослідне бродіння.
3. Провести аналіз молочнокислого бродіння.
4. Занести в протокол відомості про мікрофлору молока.
5. Занотувати в протокол морфологічні та біохімічні особливості мікроорганізмів, збудників молочнокислого бродіння. Особливості гомо- та гетероферментативного молочнокислого бродіння. Практичне значення молочнокислого бродіння та його збудників.

Хід роботи

Заняття 1. Отримання молочнокислих бактерій (виконується вдома).

Вивчення морфології клітин та аналіз середовища

Отримання молочнокислих бактерій. Для виділення молочнокислих бактерій використовують метод збагачення. Свіже молоко наливають у стерильні пробірки і залишають за $t=30^{\circ}\text{C}$ для розвитку бактерій протягом 48 годин. Ведуть щоденні спостереження. Для подальших досліджень відбирають пробірки з молоком, у яких утворився щільний згусток раніш, ніж в інших пробірках.

Вивчення морфології клітин. Готують мазок із сироватки зсілого молока, сушать, фіксують над полум'ям пальника. Жир знімають, поклавши фільтрувальний папір на гарячий мазок. Мазок фарбують метиленовою синю (барвник добре забарвлює мікроорганізми і слабо – казеїн молока), мікроскопують і замальовують в протоколі.

В якості посівного матеріалу використовують пробірки з молоком, у яких щільний згусток утворився раніш, та мікробіологічна картина яких складається

переважно з однорідної культури паличок або стрептококів.

Аналіз середовища. При постановці бродіння кращим живильним середовищем для розвитку молочнокислих бактерій є молоко. У стерильні колби Ерленмейера розливають по 100 мл знежиреного молока. У молоці визначають:

а) вміст цукру (за методом Бертрана, див. лабораторну роботу №3); б) кислотність, що титрується, у градусах Тернера.

Середовище стерилізують при 0,5 атм 30 хвилин.

Визначення кислотності, що титрується, в градусах Тернера. Кислотність молока за Тернером визначають титруванням децінормальним розчином лугу з індикатором фенолфталеїном. Для титрування у конічну колбу вносять 10 мл молока, розбавляють 20 мл дистильованої води і додають 2-3 краплі 1%-вого спиртового розчину фенолфталеїну. Суміш старанно перемішують і титрують при постійному збовтуванні 0,1 н розчином їдкого натрію (або калію) до рожевого забарвлення, що не змінюється протягом 1 хвилини.

Кількість 0,1 н розчину лугу, витрачену на титрування, множать на 10 і одержують градуси кислотності Тернера, що показують кількість (мл) 0,1 н їдкого натрію, що було витрачено на нейтралізацію 100 мл молока. 1° Тернера відповідає 9 мг молочної кислоти.

Постановка бродіння. Після аналізу поживного середовища його засівають культурою молочнокислих бактерій, поміщають у термостат за $t=37^{\circ}\text{C}$ на 2 доби.

Заняття 2. Аналіз бродіння

По закінченні бродіння у збродженому молоці визначають:

- 1) мікроскопічну картину збродженого молока (замальовують);
- 2) вміст остаточного цукру .

Визначення концентрації редукуючих цукрів за **методом Бертрана:**

Для визначення концентрації *редуючих цукрів* в середовищі необхідно провести спочатку гідроліз *нередукуючих цукрів до редукуючих*. Для гідролізу сахарози або інших нередукуючих цукрів до 20 мл досліджуваної рідини

додають 2 мл 5% розчину HCl та ставлять на киплячу водяну баню на 30 хв. Для аналізу відбирають 0,1-2 мл отриманої рідини.

Для визначення концентрації редуруючих цукрів, які отримані в результаті гідролізу, у конічну колбу на 200-300 мл вносять 0,1-2 мл досліджуваної рідини та дистильованої води, так щоб загальний об'єм дорівнював 20 мл; 20 мл реактиву Фелінга I і 20 мл реактиву Фелінга II.

Колбу нагрівають до кипіння на нагрівальному елементі електричної плити. Кип'ятять точно 3 хвилини, рахуючи з моменту появи бульбашок.

Червоний осад купрум(II) оксиду, що випав, переносять кількісно у центрифужну пробірку та центрифугують за 5000 об./хв. протягом 3 хвилин. Фугат обережно зливають, осад у пробірці промивають 20 мл гарячої дистильованої води, центрифугуючи за тих же умов.

Промитий осад кількісно переносять у конічну термостійку колбу на 250 мл незначною кількістю води, додають 15-20 мл кислого розчину ферум(III) сульфату та розчиняють, нагріваючи на водяній бані.

Отриманий розчин титрують калію перманганатом до появи слабо-рожевого забарвлення, стійкого протягом 1 хв.

Паралельно з основним аналізом проводять контрольне титрування для визначення поправки на реактиви. Визначення ведуть так само, але замість досліджуваного розчину для аналізу беруть 2 мл дистильованої води. Поправку виражають у мл розчину калію перманганату, і для розрахунку віднімають з кількості калію перманганату, що пішла на титрування досліджуваного.

Концентрацію цукрів розраховують за формулою:

$$\% \text{ глюкози} = A/10B,$$

де B – кількість досліджуваної рідини (мл), взята для визначення;

A – визначена за таблицею (див. додаток А) кількість глюкози (мг), що відповідає кількості відновленої міді M(Cu) (мг).

$$M(\text{Cu}) = (a-b) \cdot K,$$

де (a-b) – різниця (мл) розчину калію перманганату, що витрачено на титрування дослідної та контрольної проб;

K – титр розчину калію перманганату (10 мг).

- 3) кислотність, що титрується, за Тернером; якщо кислотність досягає 80-100°T, то бродіння пройшло добре;
- 4) якісні реакції на молочну кислоту.

Якісні реакції на молочну кислоту.

1. Переведення молочної кислоти в альдегід. Молочнокислий затор звільняють від осаду, фільтрують через паперовий складчастий фільтр або центрифугують, і супернатант (рідка фаза) у кількості 5-7 мл вносять у конічну колбу на 100-мілілітрів, додають туди 1 мл 10%-го розчину сульфатної кислоти і нагрівають до кипіння. Додають краплями 2%-вий розчин KMnO_4 . Молочна кислота переходить в оцтовий альдегід. Останній виявляють за допомогою фільтрувального паперу, просоченого аміачним розчином аргентум нітрату. Для цього фільтрувальним папером покривають шийку колби, у якій проводять визначення: від дії оцтового альдегіду на аміачний розчин срібла папірець чорніє.

2. Проба з фенолом. Реактив готують шляхом змішування 5%-вих розчинів карболової кислоти (фенолу) і ферум(III) хлориду у співвідношенні 1:2 (розчини розбавляють подвійною кількістю води). В присутності молочної кислоти початковий аметистово-синій колір переходить у солом'яно-жовтий, що дає молочнокисле залізо.

Результати наводять у протоколі, зазначаючи показники всіх вимірів та наводячи всі розрахунки.

Контрольні питання та завдання:

1. Які типи бродіння викликаються молочнокислими бактеріями?
2. У чому особливості гомоферментативного молочнокислого бродіння?
3. Які ферменти відсутні у гетероферментативних молочнокислих бактерій?
4. У чому особливості гетероферментативного молочнокислого бродіння?
5. Чим обумовлена висока вимогливість молочнокислих бактерій до джерел живлення?
6. Яких джерел азотного та вуглецевого живлення вимагають молочнокислі

бактерії?

7. За яких температур здатні розвиватися молочнокислі бактерії? Які температури є оптимальними?
8. За яких значень рН здатні розвиватись молочнокислі бактерії? Які значення є оптимальними?
9. Дайте характеристику кокових форм молочнокислих бактерій, що здійснюють гомоферментативне бродіння.
10. Дайте характеристику паличкоподібних молочнокислих бактерій, що здійснюють гомоферментативне бродіння.
11. Дайте характеристику молочнокислих бактерій, що здійснюють гетероферментативне бродіння.
12. Практичне значення молочнокислого бродіння та його збудників.

Рекомендована література

Основна

1. Пирог, Т.П. Харчова біотехнологія [Текст] : підручник / Т. П. Пирог, М. М. Антонюк, О. І. Скроцька, Н. В. Кігель ; Нац. ун-т харч. технол. — К. : Ліра-К, 2016. — 408 с.
2. Плахотін, В.Я. Теоретичні основи технологій харчових виробництв / В.Я. Плахотін, І. С. Тюрікова, Г.П. Хомич – К.: Центр навч. літер., 2006. – 640 с.
3. Теоретичні основи харчових технологій : навч. посіб. / за ред. Л.Л. Товажнянського. – Харків: НТУ «ХП», 2010. – 720 с.
4. Горбатова, К.К. Физикохимические и биохимические основы производства молочных продуктов / К.К. Горбатова. – СПб.: ГИОРД, 2004. – 352 с.
5. Біотехнологія: Підручник / В.Г. Герасименко, М.О. Герасименко, М.І. Цвіліховський та ін.; Під ред. В.Г. Герасименка. – К.: Фірма «Інкос», 2006.– 647 с.
6. Лобанок, А. Г. Биотехнология микробных ферментов [Текст] / А. Г. Лобанок, Н. И. Астапович, Р. В. Михайлова ; АН БССР, Ин-т

микробиології. — Минск : Наука и техника, 1989. — 205 с.

Допоміжна

1. Біологічні та фізикохімічні основи харчових технологій: монографія / В.А. Домарецький, А.М. Куц, О.Ю. Шевченко та ін. // за ред. д-ра техн. наук, проф. В.А. Домарецького. — К.: Фенікс, 2011. — 704 с.
2. Теоретичні основи харчових технологій: навчальний посібник / за ред. П.П. Пивоварова. — Х.: ХДУХТ, 2010. — 363 с.
3. Харчова хімія: навчальний посібник / В.В. Євлаш, О.І. Торяник, В.О. Коваленко та ін. — Х.: Світ книг, 2012. — 504 с.
4. Загальна технологія харчових виробництв [Електронний ресурс] : навч. посібник / А. А. Дубініна, Ю. М. Хацкевич, Т. М. Попова, С. О. Ленерт. — Електрон. дані. — Х. : ХДУХТ, 2016. — 497 с.
5. Теоретичні основи харчових технологій : навч. посіб. / за ред. Л.Л. Товажнянського. - Харків: НТУ «ХПІ», 2010. — 720 с.
6. Чагаровський, О.П. Хімія молочної сировини: навч. посібник / О.П. Чагаровський, Н.А. Ткаченко, Т.А. Лисогор. — Одеса: «Сімекспрінт», 2013. — 268 с.
7. Варфоломеев, С. Д. Биотехнология [Текст] : Кинетические основы микробиологических процессов: Учеб. пособие / С. Д. Варфоломеев, С. В. Калюжный. — М. : Вища шк., 1990. — 296 с.

Визначення вмісту цукрів за кількістю відновленої міді за методом Бертрана.

Кількість цукру, мг	Кількість відновленої міді, мг			Кількість цукру, мг	Кількість відновленої міді, мг		
	глюкозою	інвертованою сахарозою	мальтозою		глюкозою	інвертованою сахарозою	мальтозою
10	20,4	20,6	11,2	56	105,8	105,7	61,4
11	22,4	22,6	12,3	57	107,6	107,4	62,5
12	24,3	24,6	13,4	58	109,3	109,2	63,5
13	26,3	26,5	14,5	59	111,1	110,9	64,6
14	28,3	28,5	15,6	60	112,8	112,6	65,7
15	30,2	30,5	16,7	61	114,5	114,3	66,8
16	32,2	32,5	17,8	62	116,2	115,9	67,9
17	34,2	34,5	18,9	63	117,9	117,6	68,9
18	36,2	36,4	20,0	64	119,6	119,2	70,0
19	38,1	38,4	21,1	65	121,3	120,9	71,1
20	40,1	40,4	22,2	66	123,0	122,6	72,2
21	42,0	42,3	23,3	67	124,7	124,2	73,3
22	43,9	44,2	24,4	68	126,4	125,9	74,3
23	45,8	46,1	25,5	69	128,1	127,5	75,4
24	47,7	48,0	26,6	70	129,8	129,2	76,5
25	49,6	49,8	27,7	71	131,4	130,8	77,6
26	51,5	51,7	28,9	72	133,1	132,4	78,6
27	53,4	53,6	30,0	73	134,7	134,0	79,7
28	55,3	55,5	31,1	74	136,3	135,6	80,8
29	57,2	57,4	32,2	75	137,9	137,2	81,8
30	59,1	59,3	33,3	76	139,6	138,9	82,9
31	60,9	61,1	34,4	77	141,2	140,5	84,0
32	62,8	63,0	35,5	78	142,8	142,1	85,1
33	64,6	64,8	36,5	79	144,5	143,7	86,1
34	66,5	66,7	37,6	80	146,1	145,3	87,2
35	68,3	68,5	38,7	81	147,7	146,9	88,3
36	70,1	70,3	39,8	82	149,3	148,5	89,4
37	72,0	72,2	40,9	83	150,9	150,0	90,4
38	73,8	74,0	41,9	84	152,5	151,6	91,5
39	75,7	75,9	43,0	85	154,0	153,2	92,6
40	77,5	77,7	44,1	86	155,6	154,8	93,7
41	79,3	79,5	45,2	87	157,2	156,4	94,8
42	81,1	81,2	46,3	88	158,8	157,9	95,8
43	82,9	83,0	47,4	89	160,4	159,5	96,9
44	84,7	84,8	48,5	90	162,0	161,1	98,0
45	86,4	86,5	49,5	91	163,6	162,6	99,0
46	88,2	88,3	50,5	92	165,2	164,2	100,1
47	90,0	90,1	51,7	93	166,7	165,7	101,1
48	91,8	91,9	52,8	94	168,8	167,3	102,2
49	93,6	93,6	53,9	95	169,9	168,8	103,2
50	95,4	95,4	55,0	96	171,5	170,3	104,2
51	97,1	97,1	56,1	97	173,1	171,9	105,3
52	98,9	98,9	57,1	98	174,6	173,4	106,3
53	100,6	100,6	58,2	99	176,2	175,0	107,4
54	102,3	102,3	59,3	100	177,8	176,5	108,4
55	104,1	104,0	60,3				

Рецептура барвників та реактивів

1. **Метиленова синь за Леффлером:** 30 мл насиченого спиртового розчину метиленового синього; 1 мл 1%-го водного розчину калій гідроксиду і 100 мл дистильованої води.
2. **Карболовий фуксин Циля** (карболовий фуксин): 100 мл 5%-го водного розчину свіжоперегнаного фенолу і 10 мл насиченого спиртового розчину фуксину основного; приготовану суміш через 48 годин відфільтровують; барвник стійкий.
3. **Судан III:** 0,1 г судану розчиняють у 20 мл 96%-го етанолу.
4. **Розчином йоду в калій йодиді:** 7 г йоду + 20 г KI на 106 мл води.
5. **Кислий спирт:** спирт + 3% хлоридної кислоти.
6. **Кислий розчин ферум(III) сульфату :** 50 г $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ розчиняють у воді, додають 200 мл сульфатної кислоти, об'єм доводять до 1 л.
7. **Реактив Фелінга I:** 40 г кристалічного мідного купоросу ($\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$) розчиняють у мірній колбі на 1 л у H_2O дист.
8. **Реактив Фелінга II:** 200 г сегнетовой солі (подвійної виннокислої солі калію-натрію) та 150 г KOH розчиняють у мірній колбі на 1 л у H_2O дист.
9. **Титрувальний розчин калію перманганату:** 5 г KMnO_4 на 1 л H_2O дист., титр за мідю буде 10 мг.
10. **Приготування аміачного розчину AgNO_3 :** у пробірку вносять 1-2 мл 10%-го розчину аргентум нітрату і додають до нього по краплях амоніак. Спочатку з'являється бура каламуть (Ag_2O), що потім розчиняється в NH_3 . Цим розчином і змочують папірець.