

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
КРЕМЕНЧУЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ МИХАЙЛА ОСТРОГРАДСЬКОГО



МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ
ЩОДО ЛАБОРАТОРНИХ РОБІТ
З НАВЧАЛЬНОЇ ДИСЦИПЛІНИ
«БІОТЕХНОЛОГІЯ БРОДІННЯ»
ДЛЯ СТУДЕНТІВ ДЕННОЇ ФОРМИ НАВЧАННЯ
ЗА НАПРЯМОМ 6.051401– «БІОТЕХНОЛОГІЯ»

КРЕМЕНЧУК 2017

Методичні вказівки щодо лабораторних робіт з навчальної дисципліни «Біотехнологія бродіння» для студентів денної форми навчання за напрямом –6.051401 «Біотехнологія»

Укладачі: к.т.н., доц. А. В. Пасенко

старш. викл. О. О. Никифорова

Рецензент: д.б.н., проф. В. В. Никифоров

Кафедра біотехнології та здоров'я людини

Затверджено методичною радою Кременчуцького національного університету імені Михайла Остроградського

Протокол №__ від_____2017 р.

Голова методичної ради

проф. В. В. Костін

ЗМІСТ

Вступ.....	4
1 Перелік лабораторних робіт.....	6
Лабораторна робота № 1 Дослідження зернового субстрату для біотехнологій бродіння.....	6
Лабораторні роботи № 2–3 Комплексне вивчення <i>Saccharomyces</i> як основного біологічного агента бродильних технологій.....	8
Лабораторні роботи № 4–5 Вивчення процесу спиртового бродіння.....	19
Лабораторні роботи № 6–7 Вивчення процесу неповного окислення органічних речовин мікроорганізмами.....	23
Лабораторна робота № 8 Вивчення процесу маслянокислого бродіння.....	26
Лабораторні роботи № 9–10 Вивчення процесу молочнокислого бродіння.....	28
2 Критерії оцінювання знань студентів.....	35
Список літератури.....	37

ВСТУП

Сучасний стан харчової біотехнології вимагає від спеціалістів знання біологічних властивостей і процесів життєдіяльності мікроорганізмів, вміти керувати мікробіологічними процесами.

Для цього спеціаліст – біотехнолог харчової промисловості повинен мати чітке уявлення про мікроби – збудники всіляких процесів бродіння, з якими йому прийдеться мати справу, а також вміти своєчасно виявляти мікроорганізми, які наносять шкоду виробництву, передбачити заходи, які запобігають їх розвитку.

Мікробіологія бродильних виробництв розглядає мікроорганізми з точки зору можливості використання їх біохімічної діяльності для одержання цінних продуктів. Це основа розвитку бродильної промисловості, виробництва ферментів, вітамінів, антибіотиків.

Мікробіологія бродильних виробництв розробляє методи одержання харчових продуктів за допомогою різноманітних організмів, а також способи запобігання псуванню харчових продуктів. Діяльність деяких мікроорганізмів призводить до утворення пива, вина, спиртів, органічних кислот. У цих галузях мікробіологія становить основу виробництва.

Знання, одержані студентами при вивченні дисципліни будуть широко застосовуватись у технології виробництва, виробничих режимах, контролю якості продукції.

Метою курсу є надати студентам знання теоретичних основ, мікробіології, вивчити схеми мікробіологічного контролю і заходи боротьби з мікробами, які є збудниками псування сировини, вміти керувати діяльністю мікроорганізмів.

Основні задачі дисципліни

В результаті вивчення дисципліни **студенти повинні знати** :

– мікроорганізми, які використовуються у виробництві спирту, пива, вина, дріжджів;

- властивості мікроорганізмів;
- методи інтенсифікації технологічних процесів;

Студенти повинні уміти:

- розробляти принципи організації нових виробництв, пов'язаних з застосуванням мікроорганізмів;
- селекція і використання практично цінних культур мікробів.
- керувати діяльністю мікроорганізмів.
- вдосконалювати технологічний процес.
- замінювати харчову сировину для деяких виробництв нехарчовою.
- оперативно виявляти і усувати джерела інфекції на виробництві.
- розробляти і впроваджувати схеми мікробіологічного контролю з метою підвищення якості продукції.

1 ПЕРЕЛІК ЛАБОРАТОРНИХ РОБІТ

Лабораторна робота № 1

Тема. Дослідження зернового субстрату для біотехнологій бродіння

Мета роботи: контроль виробничих процесів і готової продукції, своєчасне виявлення джерел шкідливих мікроорганізмів і боротьба з ними.

Обладнання та реактиви: мікроскоп, предметні та накривні скельця, чашки Петрі, термостат, колби з дистильованою водою, МПА, стерильні піпетки (10 мл), водяна баня, колба на 500 мл, спиртівки, NaOH 0,1 н. розчин, індикатор метил червоний, терези і важки, заводські дріжджі.

Навчальні елементи: мікрококкі, гомоферментативні молочнокислі бактерії, неспороносні палички.

Короткі теоретичні відомості

Сировина в спиртовому виробництві є найголовнішим джерелом поширення шкідливих мікроорганізмів. Встановлено, що на одній зернині ячменю, взятій з зернесховища, налічується до одного мільйона різних мікробів. На ступінь зараження зерна різними мікроорганізмами впливає його вологість, наявність пошкоджених зерен, засміченість під час збирання та умови зберігання.

На поверхні зерна найбільш часто зустрічаються неспороносні палички із роду *Pseudomonas*. Особливо велика кількість *Pseudomonas herbicola*. При зниженні якості зерна *Ps. herbicola* витісняється іншими видами мікроорганізмів. Іноді на зерні знаходять пігментні бактерії із групи *Ps. fluorescens*, мікрококкі (*Micrococcus luteolus* та інш.), гетеро- і гомоферментативні молочнокислі бактерії.

В зерні може бути так зване внутрішнє зараження (*Sacch. Ellipsodeus*, *Torulla*, *Oidium*, *Monilia*). В середину зерна мікроорганізми попадають під час цвітіння, тривалого зберігання у вологому стані або при значній зміні хімічного складу насіння, яка приводить до ослаблення життєвої сили.

Плісняві гриби повільно розмножуються на поверхні доброякісного зерна

та їх число рідко перевищує декілька тисяч на 1 г. Видовий склад пліснявої мікрофлори зерна наступний: *Rhizopusnigricans*, *Mucorracemosus*, *Mucorracemosus*, *Mucormucedo*, *Aiternaria*, *Aspergillusfumigatus*, *Aspergillusclavatus*, *Cladosprum*, *Thrichothcium*, *Citromycesidea*які види *Penicillum*. Із бактерій – маслянокислі, дикі молочнокислі, картопляна сінна палички, пігментні бактерії з групи *Bact. Flurescens*, типово-грунтові бактерії з групи *Coli aerognes*, *Bact. Proteus vulgaris* та дикі дріжджі.

Хід роботи

Відбір проби

З партії зерна, що надходить на завод або в солодовню, відбирають середню пробу звичайним способом. З середньої проби відважують по 10 г зерна в стерильні чашки Петрі і швидко закривають їх. Зерно, що є в зерносховищі, аналізують через кожні 50–60 днів при нормальних умовах зберігання; при різкій зміні якості зерна аналіз проводять частіше.

Визначення мікробіологічної зараженості зерна

Відлічують 100 зерен і розтирають їх в стерильній ступці. Розтерту масу змивають стерильною водою в стерильну колбу ємкістю 500 мл, потім старанно збовтують, додають води до мітки і закривають обпаленою ватною пробкою. Для посіву роблять попереднє розведення в 100, 1000 або 10000 раз, старанно збовтавши вміст колби.

1 мл досліджуваної рідини необхідного розведення стерильною піпеткою висівають в чашки Петрі з суловим агаром. Чашки ставлять для пророщування протягом 3–4 діб в термостаті при температурі 25° С, після чого підраховують кількість колоній, що вирости.

Біохімічне дослідження зерна

Суть біохімічного методу полягає у визначенні якісної характеристики мікрофлорі досліджуваного об'єкта проведенням дослідних бродінь. По зростанню кислотності в дослідах судять про шкідливість всієї сукупності мікроорганізмів, які є в даному випадку на зерні, для виробництва.

Завдання до теми

1. У чотирьох колбах стерилізують по 500 мл солодкого затору. Після охолодження до температури 25° С у дві колби швидко всипають по 10 г заздалегідь зваженого зерна з чашок Петрі, дві другі колби залишають контрольними (без зерна). Колби ставлять у водяну баню на 30 хв. при температурі 55° С і на 15 хв при температурі 60° С; потім їх швидко – охолоджують до 25° С, в кожену колбу задають по 25 мл дріжджів і залишають для бродіння в термостаті на 48 годин (температура 28–30° С).

2. Після закінчення бродіння визначають кислотність шляхом титрування 0,1 н розчином лугу в присутності індикатора метилчервоного. Якщо зростання кислотності в дослідних і контрольних колбах буде однаковим і не більше 0,2°, то зерно можна використовувати для виготовлення солоду. Для визначення видів мікроорганізмів, які викликають кислоутворення зброджений затор мікроскопують.

Контрольні запитання

1. Шляхи потрапляння мікроорганізмів в зернову масу.
2. Мікрофлора зерна.
3. Фітопатогенні мікроорганізми зерна. Хвороби зерна.
4. Роль мікроорганізмів в самозігріванні зерна.

Література: [1, с. 44–45; 4, с. 51–53; 5, с. 18–19; 6, с. 6–8; 7, с. 54–56; 14, с. 43–44; 28, с. 32–33; 32, с. 64–66.].

Лабораторні роботи № 2-3

Тема. Комплексне вивчення *Saccharomyces* як основного біологічного агента бродильних технологій

Мета роботи: вивчити і дослідити морфологічні ознаки дріжджів.

Обладнання та реактиви: штами дріжджів, предметні і покривні скельця, мікроскоп, культури дріжджів-сахароміцетів молодих (18–20 год), зрілих (36–48 год) і старих (більше 72 год), розчин метиленового синього, розчин Люголя, фільтрувальний папір, бактеріальна петля.

Навчальні елементи: дріжджі, аскоміцети, сахароміцети, мікроколонії, аск, псевдоміцелій, сахароміцети, шизосахароміцети, сахаромікоди.

Короткі теоретичні відомості

Дріжджі – одноклітинні еукаріотні мікроорганізми. Дріжджі належать до класу *Hemiascomycetes* (класу сумчастих грибів), порядку *Endomycetales*. Для них властива відсутність міцелію і плодових тіл. Клітина перетворюється на сумку (аск), у середині якої формуються аскоспори. Аски можуть розвиватися в результаті злиття двох гаплоїдних клітин-гамет. Копуляційне ядро ділиться шляхом мейозу. Навколо кожного ядра концентрується цитоплазма. Вона покрита щільною оболонкою. Кількість утворених аскоспор може досягати 12 (найчастіше їх 4–8). У диплоїдних дріжджів аски утворюються безстатевим способом з однієї клітини. Дріжджові клітини розмножуються вегетативним способом – брунькуванням, поділом або брунькуванням-поділом, а також безстатевим і статевим способами.

Серед **дріжджів-аскоміцетів** найбільше практичне значення мають такі роди:

1 Saccharomyces (сахароміцети) – форма клітин різноманітна, найчастіше кругла, овальна або еліпсоїдна. У дріжджовій клітині можна виявити оболонку, цитоплазму, ядро (після фарбування) і вакуолі. Застосовуючи різноманітні способи вітального фарбування, в клітині можна розрізнити волютин (метахроматин), глікоген, краплини жиру. Розміри клітин, мкм: довжина 2,5–10, діаметр 2,5–6,8. Дріжджі добре зброджують моносахариди, дисахариди.

Сахароміцети мають велике значення у промисловості. Це значення ґрунтується на їх здатності спричиняти бродіння цукру, кінцеві продукти бродіння – вуглекислий газ і спирт. Такі дріжджі належать до культурних, їх застосовують у хлібопеченні, пивоварінні, спиртовій промисловості, виноробстві, виробництві квасу та в інших галузях.

Представники роду *Saccharomyces* розмножуються брунькуванням. При цьому на молодій клітині утворюється пагорбок брунька, що поступово

збільшується в розмірі. Із зростанням бруньки між нею і клітиною утворюється перетяжка, яка поступово звужує канал з'єднання створеної дочірньої клітини з материнською. За сприятливих умов цей процес зазвичай триває близько 2 годин. Часто молода клітина залишається на материнській і в свою чергу починає брунькуватися, в результаті чого виникають мікроколонії дріжджів.

Сумки з 1–4 спорами виникають з окремих диплоїдних клітин безстатевим способом. Спори безбарвні, з гладкими оболонками, мають кулясту або овальну форму.

Рід Saccharomyces об'єднує багато видів. Найважливіше значення для промисловості мають такі види:

Saccharomyces cerevisiae – дріжджі зброджують глюкозу, галактозу, сахарозу, на 1/3 рафінозу, мальтозу, прості декстрини. Застосовуються в спиртовому виробництві, у переробці крохмалистої сировини та м'яса, в хлібопекарському виробництві.

Saccharomyces carlsbergensis – спричиняє бродіння глюкози, галактози, сахарози, рафінози, мелібіози, мальтози і простих декстринів. Застосовується в пивоварінні.

Saccharomyces minor – зброджує глюкозу, галактозу, сахарозу, рафінозу на 1/3, мальтозу не зброджує. Використовується в хлібопекарському виробництві для приготування житнього хліба.

Saccharomyces vini – застосовується у виноробстві.

2 *Schizosaccharomyces (шизосахароміцети)* об'єднують одноклітинні, паличкоподібні клітини, які розмножуються поділом; за несприятливих умов утворюють 4, рідше – 8 аскоспор.

Під час поділу (частіше ізоморфного) спочатку ділиться ядро, потім посередині клітини починає рости клітинна стінка від периферії до центра. Із зростанням стінки цитоплазматична мембрана вистилає її зсередини. Коли нова клітинна стінка повністю розділить материнську клітину на дві нові, вона посередині лізує, в результаті чого нові клітини відокремлюються одна від одної.

Schizosaccharomyces pombe – дріжджі паличкоподібної форми завдовжки 4–18, діаметром 3–5 мкм. У кінці розвитку в статевій сумці утворюються чотири еліптичні спори з гладкими оболонками. Шизосахароміцети поширені в південних країнах, у межах СНД зустрічаються досить рідко.

Schizosaccharomyces pombe розмножується в оцукрених крохмалистих субстратах, які використовуються в тропічних країнах для виготовлення пива «помбе». Зброджує не лише сахарозу, глюкозу, мальтозу, рафінозу на 1/3, а й декстрини. Широко використовується на спиртових заводах Аргентини та Мексики. Інші види шизосахароміцетів зустрічаються в країнах помірного клімату в плодово-ягідних соках, які самі забродили.

3 *Saccharomyces (сахаромікоди)* мають спільні ознаки: лимоноподібну або черевичкоподібну форму клітин; характерний спосіб вегетативного розмноження – брунькування-поділ. На материнській клітині утворюється брунькоподібний виріст з широкою основою, який потім відокремлюється поперечною перегородкою. Утворення дочірніх клітин починається за типом брунькування, а закінчується за типом поділу. З настанням несприятливих умов дріжджові клітини перетворюються на сумки з аскоспорами.

Saccharomyces ludwigii – великі лимоноподібні дріжджі, добре зброджують глюкозу, сахарозу, рафінозу на 1/3. Розвиваються у виноградних і плодово-ягідних соках, які самі забродили, в промисловому виробництві, в слизотечі дерев, у чайному грибку.

Для виробництва білкової біомаси використовують такі дріжджі:

Родина *Cryptococcaceae* охоплює 15 родів. Серед них для одержання кормових дріжджів на відходах харчових виробництв, гідролізатах деревини, соняшникового й рисового лушпиння, соломи, стеблин бавовнику, качанів кукурудзи та інших целюлозовмісних матеріалів, на парафінах, метанолі застосовуються деякі види родів *Candida*.

Рід *Candida* – форма клітин куляста, овальна, циліндрична, видовжена. Розмножується багатостороннім брунькуванням, а також без статевим способом – бластоспорами. Утворює псевдоміцелій, а іноді істинний міцелій.

Candida albicans(mycoderma) – форма клітин циліндрична, довгаста, рідше овальна, довжина 4–18, діаметр 2–4 мкм, на поверхні рідких субстратів утворює плівки: молоді – білі, гладкі, старі – зморшкуваті. Асимілює глюкозу, сахарозу, мальтозу, лактозу. Окислює етиловий спирт у CO₂ і воду шляхом дихання. Шкідник спиртового виробництва, пивоваріння, виноробства, виробництва квасу, безалкогольних напоїв. На спеціалізованих дріжджових заводах у дріжджоростильних апаратах розмножується з набагато більшою швидкістю, ніж дріжджі-сахароміцети. Подібними шкідниками є *Candida crusei*, *Candida guilliermondii* і *Candida pulcherrima*.

Candida utilis – форма клітин овальна, клітини поодинокі, іноді з'єднані по дві-три, рідше утворюють гілочки або невеликі ланцюжки. Псевдоміцелій та істинний міцелій не виражені. Застосовується для одержання кормових дріжджів на післяспиртовій барді.

Під Trichosporon – клітини тонкі, видовжені, з тупими кінцями, а також овальні, поодинокі або з'єднані в ланцюжки. Часто зустрічаються міцелієподібні клітини різної довжини з поперечними перегородками. у клітинах добре помітні жирові включення. Діаметр клітин 2–5, довжина 10–15 мкм і більше.

Псевдоміцелій та істинний міцелій розвинуті добре. *Trichosporon cutaneum* використовується для одержання кормових дріжджів на відходах спиртових заводів.

Під Rhodotorula – форма клітин овальна, кругла або трохи видовжена, довжина 3–4, діаметр 2–3 мкм, розмножується брунькуванням. Псевдоміцелію та істинного міцелію не утворює. Синтезує каротиноїди, внаслідок чого колонії забарвлюються в червоний колір. Відомі такі види, як *Rhodotorula rubra*, *R. flava*, *R. aurantiaes*, *R. glutinis*.

Вікові особливості дріжджів-сахароміцетів

Морфологічні ознаки дріжджової клітини та її внутрішній вміст змінюються з віком.

Молоді дріжджі (12–16 год культивування) інтенсивно розмножуються

(70–80 % клітин, що брунькуються). У них тонка оболонка, гомогенна (однорідна) цитоплазма, вакуолі відсутні або лише намічаються. Запасні речовини відсутні.

У зрілих дріжджів (24–48 год культивування) в цитоплазмі з'являється зернистість, вакуолі збільшуються, процес розмноження уповільнюється (не більш як 5–10 % клітин, що брунькуються), з'являються мертві клітини. Зрілі дріжджі під час перероблення крохмалистої сировини мають містити не більш як 1 % мертвих клітин, меляси – не більше 5 %. У засівних дріжджах пивоварного виробництва допускається до 5 % мертвих клітин. Ознака зрілості дріжджів – наявність глікогену і метахроматину, які відкладаються в клітині як резервний матеріал і витрачаються у міру її старіння. Дріжджі з високою бродильною активністю містять не менш як 60–70 % клітин з глікогеном.

Старі дріжджі (72 год і більше) мають потовщену оболонку, яку добре видно під час мікроскопування. Цитоплазма гетерогенна (зерниста), вакуолі великі, іноді в клітині їх декілька. Глікоген і метахроматин відсутні. Культура містить значну кількість клітин із жировими включеннями, клітини не розмножуються. Характерна ознака – наявність великої кількості мертвих клітин.

При відмиранні дріжджів цитоплазма скупчується в грудочку, в центрі клітина поступово деформується, оболонка розпадається, і клітина гине.

Виявлення в дріжджових клітинах ліпідних включень, глікогену, мертвих клітин

Глікоген виявляють за допомогою методу прижиттєвого фарбування дріжджових клітин розчином йоду, від чого він забарвлюється в червоно-бурий колір. У разі відсутності глікогену дріжджові клітини забарвлюються в солом'яно-жовтий колір.

Жирові включення забарвляють суданом III або 1 % розчином осмієвої кислоти. На предметне скло наносять невелику краплю 40 % розчину формаліну, в яку петлею вносять культуру дріжджів. Формалін вбиває клітини і робить оболонку більш проникною. Через 5 хв додають краплю метиленового

синього, це через 10 хв – краплю судану III. Препарат накривають покривним склом, надлишок рідини видаляють фільтрувальним папером. Мікроскопують з імерсією. Цитоплазма забарвлюється в синій колір, гранули й краплини жиру – в рожевожовтогарячий.

Мертві клітини виявляють фарбуванням метиленовим синім. До краплі дріжджової суспензії на предметному склі додають краплю розчину метиленового синього, через 1–2 хв мікроскопують при збільшенні в 400–600 разів. Метиленовий синій дифундує через оболонку мертвої клітини всередину і забарвлює цитоплазму в синьо-блакитний колір. Живі клітини при цьому залишаються безбарвними. Підраховують загальну кількість синіх (мертвих) клітин не менш як у п'яти полях зору, визначають середній відсоток мертвих клітин.

Культуральні ознаки дріжджів

Культуральні ознаки дріжджів визначають на щільних і рідких середовищах. Під час росту на щільних середовищах клітини дріжджів утворюють різноманітні колонії залежно від їх родової (видової) належності. Описують колонії, звертаючи увагу на такі культуральні ознаки:

- поверхня – гладка, шорстка, складчаста, горбкувата, з радіальними колами та ін.;
- профіль – плоский, опуклий, кратероподібний, конусоподібний та ін.;
- край колоній – рівний, хвилястий, торочкуватий, лопатевий, зубчастий та ін.;
- консистенція – масляниста, плівкова, в'язка та ін.

Опис культуральних ознак деяких родів дріжджів

Рід Saccharomyces. Колонії невеликих розмірів діаметром 2–3 мм, іноді точкові діаметром не менше 1 мм, білі, кремкові. Опуклі, здіймаються над поверхнею субстрату. Краї колоній рівні, консистенція масляниста, пастоподібна. Гладкі, матові або з тьмяно-блискучою поверхнею.

Рід Schizosaccharomyces. Колонії кремкові або білі, матові, великі, з лопатевими краями, круто піднесеним конусом, на поверхні колоній –

концентричні кола. Рідше – гладкі, консистенція пастоподібна.

Pid Saccharomyces. Колонії білі або сірі, сплющені, розпливчасті ($d \geq 5$ мм), з трохи піднесеним куполом, дрібно вищербленими краями. На поверхні видніються радіальні брижки. Консистенція пастоподібна.

Pid Candida. Колонії округлі, правильної форми, білувато-кремові, матові. Поверхня в дрібних складках, часто вкрита ворсинками, край дрібно порізаний (дрібнофестончастий). Профіль колоній опуклий. Структура дрібнозерниста, консистенція м'яка. Краї колоній врастають вагар.

Pid Trichosporon. Колонії великі, круглі, білувато-жовтуваті, опуклі. Поверхня у великих зморшкуватих брижках, вкрита ворсинками, краї зрізані, видніються радіальні складки. По краю рясна зона міцелію, центр трохи піднятий. При старінні поверхня колоній стає слизуватою, блискучою, жирною. Погано береться петлею, консистенція щільна, волокниста.

Pid Rhodorula. Колонії жовтогарячі або червоні, м'які, гладенькі, блискучі, правильної круглої форми, великі та дрібні з рівними краями, консистенція пастоподібна.

Хід роботи

1. Методи кількісного обліку клітин мікроорганізмів

Підрахунок клітин у лічильних камерах

У камерах Горяєва, Тома-Цейса, Бюркера та інших можна підрахувати великі мікробні клітини дріжджів, спори грибів, великі бактерії, одноклітинні водорості.

Лічильна камера – це товсте предметне скло, поділене чотирма прорізами на три поперечно розташовані площадки. Центральна площадка маленьким поздовжнім прорізом поділяється на дві рівні частини.

На кожній половинці вигравійована сітка. Бічні площадки розташовані на 0,1 мм вище, ніж центральна (глибина камери), і слугують для протирання покривного скла. Сітка камери Горяєва поділена на 225 великих квадратів (15 рядків по 15 квадратів у рядку). Площа великого квадрата дорівнює $1/25$ мм² і поділена на 16 малих квадратів. Сторона малого квадрата – $1/20$ мм,

площа – $1/400 \text{ мм}^2$, об'єм при глибині $1/10 \text{ мм}$ – $1/4000 \text{ мм}^3$.

Частина великих квадратів розграфлена вертикально, горизонтально або не розграфлена.

Дріжджові клітини у рідких субстратах підраховують після попереднього розбавлення водою. у мірну колбу ємністю 100 см^3 вносять $2,4$ або 10 см^3 дріжджової суспензії залежно від передбаченої концентрації клітин. Для забарвлення мертвих дріжджових клітин додають $20\text{--}30 \text{ см}^3$ метиленового синього (1:5000) або $1\text{--}5 \text{ см}^3$ концентрації 1:40.

Камеру та спеціальне шліфоване покривне скло добре промити і висушити. На поверхню сітки нанести по невеликій краплині підготовленого розбавлення і накрити покривним склом. Рідина під покривним склом має розтікатися рівномірно по всій сітці, без пухирців.

Для того щоб об'єм рідини точно відповідав розрахунковому об'єму камери, покривне скло притерти до бічних площадок камери, допоки не з'являться так звані кільця Ньютона. Можна, спочатку притерти покривне скло, потім за допомогою піпетки заповнити камеру суспензією мікроорганізмів. Клітини підраховувати через $3\text{--}5$ хв після заповнення камери, щоб клітини осіли і були видними водній площині. Рухливі форми мікроорганізмів перед нанесенням на сітку слід знищити нагрівання або додати $0,5 \text{ см}^3$ 40% розчину формаліну.

Камеру поставити на предметний столик мікроскопа і розглядати спочатку з об'єктивом 8^X , потім 40^X . Клітини підраховувати в п'яти (можна в десяти) великих квадратах по діагоналі,) або по кутках сітки і в центрі. Врахувати всі клітини, які містяться всередині великого квадрата і на суміжних лініях, якщо вони більш як наполовину лежать у середині квадрата. Клітини, які перетинаються суміжною лінією навпіл, слід рахувати на двох з чотирьох сторін квадрата; клітини, розміщені за межами квадрата, не враховувати. Кількість клітин у 1 см^3 :

$$X = \frac{a \cdot 4000 \cdot \frac{b}{c}}{1000},$$

16

де a – сума клітин, підрахована в п'яти (або в десяти) великих квадратах сітки; b – розбавлення вихідного субстрату; c – кількість малих квадратів, у яких проводився підрахунок.

Визначення кількості клітин, методом посіву на агаризовані середовища в чашки Петрі (чашковий метод)

Метод знайшов широке застосування для визначення кількості мікроорганізмів у природних та виробничих субстратах (воді, ґрунті, сировині, напівфабрикатах і готових продуктах). Вважають, що кожна жива клітина при висіві на агаризоване середовище утворює колонію.

2. Приготування розбавлень

Розбавлення робити у стерильній водопровідній воді або стерильному 0,5 % водному розчині NaCl. у процесі одного досліду користуватися постійним коефіцієнтом розбавлення, найчастіше – десятковим. Для цього стерильну воду розлити стерильною піпеткою по 9 см³ у стерильні сухі пробірки, потім перенести стерильною піпеткою 1 см³ досліджуваного матеріалу в пробірку з 9 см³ стерильної водопровідної води. Якщо досліджуваний зразок уже розбавили в 10 разів (10 г наважки внесли в колбочку з 90 см³ стерильної води), одержують розбавлення 1:102. Суспензію одержаного розбавлення ретельно перемішати за допомогою стерильної піпетки, вбираючи в піпетку і випускаючи з неї отриману завись. Цю процедуру повторити 3–5 разів, що дає можливість перемішувати суспензію і зменшити адсорбцію клітин на її стінках. Потім цією самою піпеткою 1 см³ одержаного розбавлення перенести у другу пробірку (це розбавлення 1:103), з другої – в третю (1:104) і т. д.

3. Посів на агаризовані середовища в чашки Петрі

В стерильні чашки Петрі налити по 10–15 см³ розплавленого у киплячій водяній бані агаризованого середовища, залишити на горизонтальній поверхні доти, поки агар не застигне.

Посів робити з певних розбавлень залежно від передбаченої кількості мікроорганізмів у досліджуваному зразку. Стерильною піпеткою нанести

певний об'єм (0,05; 0,1 або 0,2 см³) відповідного розбавлення на поверхню агарової пластинки чашки Петрі розтерти по поверхні середовища стерильним шпателем

З кожного розбавлення так само зробити чотири-шість паралельних висівів. Для паралельних посівів з одного розбавлення можна користуватися однією стерильною піпеткою і одним шпателем. Для посівів з різних розбавлень використовувати нову стерильну піпетку і новий шпатель.

Чашки із засіяними середовищами перевернути догори дном і помістити у термостат, відрегульований на температуру, сприятливу для розвитку тих мікроорганізмів, які виділяють у досліді.

Колонії, що вирости, підрахувати через певний час після посіву, який залежить від швидкості росту мікроорганізмів на середовищі, використаному в досліді. Описати колонії, мікроскопувати їх і визначити основні групи мікроорганізмів, що інфікують середовище. Підрахувати кількість колоній, які вирости при посіві з певного розбавлення на одній або кількох чашках Петрі. Результати паралельних посівів підсумувати і визначити середнє число колоній, які вирости при посіві даного розбавлення.

Завдання до теми

1. Приготувати препарати «роздавлена крапля» сахароміцетів, шизосахароміцетів, сахаромікодів. Визначити під мікроскопом розмір, форму і стан цитоплазми клітин кожної родини. Препарати замалювати.

2. Приготувати препарати дріжджів родів *Candida*, *Trichosporon*, *Rhodorula*. Звернути увагу на форму, розмір, розгалуження клітин, наявність жирових включень. Препарати замалювати.

3. Ознайомитися з віковими особливостями сахароміцетів.

4. Вивчити способи розмноження дріжджів, звертаючи увагу на бруньки й перегородки. Препарати замалювати.

5. Виконати вітальне фарбування дріжджів метиленовим синім (визначити відсоток мертвих клітин) і розчином Люголя (визначити відсоток клітин з глікогеном).

6. Скласти паспорт розглянутих дріжджів за такою формою:

Клас	Родина	Рід	Вид і раса	Форма клітин	Спосіб розмноження	Утворення спор	Розмір клітин	Примітки

Контрольні запитання

1. Які розміри мають клітини дріжджів?
2. Які способи вегетативного розмноження дріжджів?
3. Галузі застосування дріжджів роду *Saccharomyces*.
4. Особливості шизосахароміцетів і сахаромікодів.
5. Застосування дріжджів роду *Candida*, *Trichosporon*, *Rodotorula*.
6. За якими ознаками відрізняються молоді, зрілі й старі дріжджові клітини?
7. Як виявляють резервні речовини у дріжджових клітинах?
8. Культуральні особливості дріжджів.
9. Будова камери Горяєва.
10. Методика підрахунку дріжджів у камері Горяєва.
11. Визначення кількості клітин за методом Коха.

Література: [2, с. 19–21; 3, с. 12–13; 8, с. 8–14; 9, с. 6–8; 24, с. 11–33; 25, с. 34–36; 26, с. 45; 27, с. 112; 28, с. 65–66; 32, с. 23–25.].

Лабораторні роботи № 4–5

Тема. Вивчення процесу спиртового бродіння

Мета: Ознайомитися з процесом спиртового бродіння, проаналізувати кінцеві продукти бродіння.

Обладнання та реактиви: пекарські дріжджі (пресовані), мікроскоп, предметні і покривні стекла, барвник (метиленовий синій), колби на 250 мл, мірні циліндри, пробки з вигнутими скляними трубками, пробки з прямими скляними трубками, пробірки, піпетки (на 10 мл, 5 мл, 1 мл), скляні палички,

пінцет, штатив, груша гумова, водяна баня, термометр, електрична плитка, спиртівка, спирт, лоток, фільтрувальний папір, бактеріологічна петля, 20 % розчин сахарози, баритова вода – $\text{Ba}(\text{OH})_2$, концентрована сірчана кислота – H_2SO_4 , біхромат калію – $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, водопровідна вода.

Навчальні елементи: анаеробній процес, культуральна рідина, спиртове бродіння.

Короткі теоретичні відомості

Вуглець входить до складу всіх органічних речовин у природі. Розкладання органічних речовин здійснюється мікроорганізмами шляхом окислювання або бродіння.

Спиртове бродіння викликається різними мікроорганізмами: дріжджами роду *Saccharomyces*, грибами роду *Oidium*, *Monilia* і *Mucor*, а також бактеріями *Sarcina ventriculi*, деякими видами роду *Enterobacteriaceae* і *Clostridium*. Для більшості перерахованих вище мікроорганізмів спирт є побічним продуктом і тільки для дріжджів роду *Saccharomyces* він – головний продукт бродіння.

Спиртове бродіння – анаеробній процес, при якому з однієї молекули вуглеводу утворюються дві молекули етилового спирту, дві молекули вуглекислого газу і невелика кількість енергії. Сумарно процес спиртового бродіння, який ведеться дріжджами, що використовують як джерело вуглецю сахарозу виражається наступним рівнянням:



Оптимальна температура для спиртового бродіння знаходиться в межах 28–35° С. На спиртовому бродінні засновані такі виробництва: виноробство, пивоварство, випікання хліба й ін.

Хід роботи

У колбу місткістю 250 мл наливають 50 мл 20 % розчину сахарози і близько 1г пекарських дріжджів, розведених у 10 мл розчину сахарози (20 %) (дріжджі варто розвести за годину до занять і поставити в тепле місце, щоб підвищити їхню активність). Колбу закривають пробкою з вигнутою скляною трубкою. Нижній кінець трубки занурюють у пробірку з баритовою водою

(замість баритової води можна використовувати вапняну воду).

Колбу з рідиною, що бродить, поміщають на водяну баню, у якій періодичним підігріванням підтримують температуру близько 35–40° С.

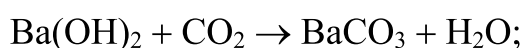
По закінченні бродіння у культуральній рідині визначають продукти бродіння і вивчають морфологію мікроорганізмів, що викликають цей процес.

Довести утворення спирту на тім же занятті не вдається, тому що його накопичується за цей час недостатньо. Колби з рідиною, що бродить, закривають ватяними пробками і залишають до наступного заняття в кімнаті. На наступному занятті в рідині виявляють спирт.

Виявлення вуглекислого газу, що виділяється в ході спиртового бродіння

Через кілька хвилин після установаження приладу на водяну баню в пробірку з баритом починають надходити пухирці газу. Спочатку вони виділяються нерівномірно, поштовхами, тому що з колби виходить нагріте повітря.

Через якийсь час (10–15 хв) пухирці починають виходити рівномірним ланцюжком. Можна вважати, що до цього часу все повітря з колби витиснуто і через трубку виходить один із продуктів бродіння – вуглекислий газ. Баритова вода інтенсивно каламутніє внаслідок утворення осаду BaCO_3 .

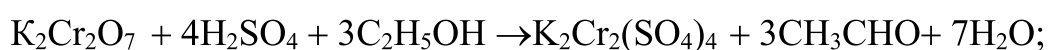


Виявлення спирту в бродильній рідині

З метою виявлення спирту в бродильній рідині використовують один із запропонованих методів:

У пробірку до 2–3 мл досліджуваної рідини додають кристалик біхромату калію і кілька крапель концентрованої сірчаної кислоти, нагрівають суміш на спиртівці.

Колір рідини при цьому змінюється до зеленого внаслідок окислювання хрому. Оцтовий альдегід, що виділяється, відчуємо по запаху. Реакція йде по наступному рівнянню:



Виявлення спирту відгоном

Колбу з бродильною рідиною закривають пробкою, у яку вставлена направлена нагору пряма скляна трубка довжиною 40–50 см. Колбу нагрівають до рівномірного кипіння рідини і до кінця скляної трубки підносять палаючу лучинку. Пари спирту, що виділяються, займаються, над трубкою виникає ефективний факел, що спостерігається протягом декількох секунд. Кипіння не повинне бути занадто бурхливим, інакше рідина буде вихлюпуватися через трубку і гасити факел.

Вивчення морфології збудників спиртового бродіння

Для мікроскопічного вивчення клітин дріжджів готують з культуральної рідини препарат «роздавлена крапля», забарвлюючи клітини розчином метиленового синього, і мікроскопують за допомогою об'єктива 40^x. Переглянутий препарат замальовують.

Завдання до теми

1. Провести спиртове бродіння.
2. Промікроскопувати краплю культуральної рідини. Вивчити морфологію дріжджів. Замалювати переглянутий препарат.
3. Провести якісні реакції на виявлення кінцевих продуктів бродіння(вуглекислого газу, спирту).

Контрольні питання

1. Дати визначення процесу спиртового бродіння.
2. Назвати мікроорганізми – збудників цього процесу.
3. Привести сумарне рівняння спиртового бродіння.
4. Проаналізувати продукти спиртового бродіння та методи якісного визначення їх у культуральній рідині.
5. Назвати культуру мікроорганізмів, яку використовували для проведення роботи.
6. Охарактеризувати морфологічні особливості дріжджів.

Література: [1, с. 61–64; 10, с. 41–43; 11, с. 68–72; 12, с. 66–68; 13, с. 71–73; 18, с. 43–46; 19, с. 65–67; 23, с. 98–105; 29, с.75–78; 32, с. 112–114.].

Лабораторні роботи № 6–7

Тема. Вивчення процесу неповного окислення органічних речовин мікроорганізмами

Мета: Ознайомитися з процесом окислення етилового спирту бактеріями в оцтову кислоту. Вивчити морфологію оцтовокислих бактерій.

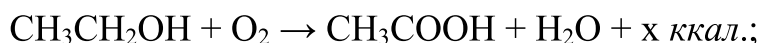
Обладнання та реактиви: мікроскоп МБИ-1, предметні та накривні стекла, термостат, свіже пиво, ерленмейєрівські колби на 150 мл з ватяно-марлевими пробками, бактеріологічні петлі, спиртівки, спирт, піпетки (на 5 мл, 1 мл), пробірки, скальпель, пінцет, гумова груша, фільтрувальний папір, лоток, розчин йоду в йодистому калію, розчин хлорного заліза, оцтова кислота, етиловий спирт, сода, HCl.

Навчальні елементи: аероби, оцтовокислі бактерії, бродильна рідина, неповне окислення.

Короткі теоретичні відомості

Окислення бактеріями етилового спирту в оцтову кислоту є неповним процесом окислення органічних вуглецевих сполук в аеробних умовах. Процес неповного окислення органічних речовин для мікробів енергетично вигідний. У природних умовах продукти неповного окислення, що утворюються внаслідок життєдіяльності одних мікроорганізмів, можуть використовуватися іншими видами мікробів.

Процес окислення етилового спирту в оцтову кислоту відбувається за таким рівнянням:



Біохімічну природу цього процесу вперше встановив Л. Пастер у 1862 р. Викликає процес окислення етилового спирту велика група бактерій, які належать до строгих аеробів. Вони широко поширені в природі і всі відносяться до роду *Acetobacter*. За формою це паличкоподібні, не спороносні, грамнегативні мікроорганізми. Типовий вид *Acetobacter aceti* представлений слабо рухливими паличкоподібними еліптичними клітками 0,6–0,8 x 1,0–3,0 мкм, одиночними, у парах чи ланцюжках.

Нерідко утворює інволюційні форми у вигляді роздутих, розгалужених чи нитковидних утворень.

Найкраще вивчені і найбільше практичне значення мають такі види оцтовокислих бактерій: *Acetobacter aceti*, *Acetobacter pasteurianum*, *Acetobacter orleanense* та інші.

Оцтовокислі бактерії використовуються для промислового одержання оцту з натурального вина або яблучного соку. В інших випадках оцтовокислі бактерії приносять шкоду, оскільки можуть псувати вино, пиво та інші продукти.

Хід роботи

Одержання накопичувальної культури оцтовокислих бактерій

Для одержання елективної культури оцтовокислих бактерій беруть свіже пиво і розливають його в ерленмейєрівські колби шаром заввишки 2 см. До пива додають (10 % від його об'єму) 6 % оцтової кислоти і 0,5–1 мл етилового спирту. Після цього колби закривають ватою і ставлять у термостат при температурі 25–30° С.

За 4–5 днів на поверхні пива утворюється сірувато-біла плівка оцтовокислих бактерій. Важливим фактором при вирощуванні різних видів оцтовокислих бактерій є температура. Наприклад, при температурі 15–25° С краще розвивається *Acetobacter aceti*, при температурі 25–35° С – *Acetobacter pasteurianum*.

Вивчення морфології оцтовокислих бактерій роду *Acetobacter*

З одержаної плівки (на поверхні пива) виготовляють мікропрепарат 'роздавлена крапля' і вивчають його під мікроскопом. Фарбування препаратів йодом дає можливість відрізнити *Acetobacter aceti* від *Acetobacter pasteurianum*, оскільки клітини першого виду бактерій забарвлюються у жовтий колір, а другого – в синій.

Результати мікроскопічного дослідження культури оцтовокислих бактерій записують і зарисовують у протоколі проведення роботи.

Визначення оцтової кислоти у бродильній рідині

Для визначення оцтової кислоти беруть в пробірку 5 мл бродильної рідини, додають трохи соди (на кінець скальпеля) і кілька краплин розчину хлорного заліза (довільної концентрації). Суміш нагрівають. В присутності оцтової кислоти при нагріванні утворюється оцтовокисле залізо, що має темно-червоне забарвлення. При додаванні соляної кислоти темно-червоне забарвлення змінюється на жовте.

Виявити присутність оцтової кислоти можна і за допомогою етилового спирту (утворюється оцтовоетиловий ефір – грушева есенція).

Завдання до теми

1. Одержати накопичувальну культуру оцтовокислих бактерій.
2. Приготувати з бродильної рідини і промікроскопувати мікропрепарати клітин оцтовокислих бактерій. Вивчити морфологію бактерій роду *Acetobacter*. Замалювати переглянуті препарати.
3. Провести якісне визначення присутності продукту неповного окислення етилового спирту – оцтової кислоти – у бродильній рідині.

Контрольні питання

1. Визначити, який процес називають неповним окисленням органічних речовин.
2. Назвати продукт неповного окислення етилового спирту мікроорганізмами.
3. Вказати групу бактерій, які ведуть цей процес.
4. Привести рівняння цього процесу.
5. Охарактеризувати морфологічні особливості бактерій роду *Acetobacter*.
6. Проаналізувати метод якісного визначення оцтової кислоти у бродильній рідині.
7. Використання оцтовокислих бактерій у господарській діяльності людини.

Література: [1, с. 112–114; 14, с. 86–88; 15, с. 68–71; 16, с. 163–165; 17, с. 85–87; 20, с. 56–58; 21, с. 254–256; 22, с. 72–76; 30, с. 58–59.].

Лабораторна робота № 8

Тема. Вивчення процесу маслянокислого бродіння

Мета: ознайомитися з процесом маслянокислого бродіння, проаналізувати кінцеві продукти бродіння.

Обладнання та реактиви: бульби картоплі, термостат, мікроскоп, предметні і покривні стекла, розчин Люголя, великі пробірки з гумовими пробками, піпетки (5 мл, 2 мл), скляні палички, гумова груша, пробірки, штатив, пінцет, скальпель (чи ніж), лоток, водяна баня, електрична плитка, термометр, спиртівка, спирт, лоток, бактеріологічна петля, фільтрувальний папір, крейда (порошок), 5 % розчин хлориду заліза (III), водопровідна вода.

Навчальні елементи: облігатні анаероби, елективна культура, анаеробні умови, безспоріві форми, культуральна рідина.

Короткі теоретичні відомості

Розпад вуглеводів з утворенням масляної кислоти, вуглекислого газу, водню й інших продуктів одержав назву маслянокислого бродіння. Хімізм маслянокислого бродіння складний і до цього часу недостатньо з'ясований. Схематично процес може бути представлений у наступному вигляді:



Збудники маслянокислого бродіння – бактерії роду *Clostridium* (*Clostridium butyricum*, *Clostridium pasteurianum*) і інші облігатні анаероби. Вони широко поширені в природі (у ґрунті, перегної, забруднених водах, молоці й ін.). Характерними морфологічними рисами маслянокислих бактерій є їхня здатність утворювати спори і синтезувати в клітках полісахарид – гранульозу.

Процесу маслянокислого бродіння піддаються не тільки сахари, але й інші, більш складні вуглеводи. Маслянокислі бактерії мають різні активні ферменти, здатні робити розщеплення складних вуглеводів. Масляна кислота, що утвориться, у невисоких концентраціях є речовиною, що стимулює ріст вищих рослин. Також встановлено, що деякі види маслянокислих бактерій мають здатність фіксувати молекулярний азот атмосфери.

Хід роботи

Визначення масляної кислоти в бродильній рідині

Неочищені бульби картоплі нарізають дрібними скибочками, що можуть легко ввійти в пробірку. Заповнюють ними пробірку на 1/3 об'єму, додають шіпку крейди (0,5–1 г) і заповнюють водою майже доверху. Пробірки ставлять на водяну баню при температурі 80° С на 10–15 хв. Потім пробірки закривають пробками і переносять у термостат з температурою 25° С. У цих умовах вже через 2–3 дня в рідині виявляють бактерії маслянокислого бродіння.

Культура маслянокислих бактерій при цьому є елективною. Для їхнього переважного розвитку створені анаеробні умови, безспоріві форми вбиті попереднім прогріванням, додавання крейди нейтралізує кислоти, що утворюються, і сприяє розвитку маслянокислих бактерій.

Вивчення морфології маслянокислих бактерій і продуктів бродіння проводять на наступному занятті після закінчення процесу бродіння.

З культуральною рідиною проводять якісну реакцію на масляну кислоту. Для цього до 5 мл культуральної рідини додають 2 мл 5 % хлориду заліза (III). Суміш нагрівають. При нагріванні утворюється маслянокисле залізо коричневого кольору.

Вивчення морфології маслянокислих бактерій

Для мікроскопічного вивчення клітин маслянокислих бактерій з культуральної рідини готують препарат «роздавлена крапля». Виявляються головним чином *Cl. Pasteurianum* – рухливі палички (веретеноподібної форми) із закругленими кінцями, одиночні і парні. У старих культурах в одного з кінців клітки виявляють спори. При мікроскопуванні додати до краплі культуральної рідини краплю розчину Люголя. Маслянокислі бактерії містять у своїх клітках гранулозу, що забарвлюється розчином Люголя в синій колір.

Переглянутий препарат замальовують.

Завдання до теми

1. Провести маслянокисле бродіння.
2. Промікроскопувати краплю культуральної рідини. Вивчити

морфологію маслянокислих бактерій. Замалювати переглянутий препарат.

3. Провести якісну реакцію на виявлення кінцевого продукту бродіння – масляної кислоти.

Контрольні питання

1. Дати визначення процесу маслянокислого бродіння.
2. Назвати мікроорганізми – збудників цього процесу.
3. Дати аналіз складу елективного середовища для отримання накопичувальної культури маслянокислих бактерій.
4. Привести сумарне рівняння маслянокислого бродіння.
5. Проаналізувати продукти маслянокислого бродіння та метод якісного визначення масляної кислоти в культуральній рідині.
6. Охарактеризувати морфологічні особливості бактерій роду *Clostridium*.

Література: [1, с. 231–232; 4, с. 111–113; 8, с. 102–104; 13, с. 163–165.].

Лабораторні роботи № 9–10

Тема. Вивчення процесу молочнокислого бродіння

Мета: ознайомитися з процесом молочнокислого бродіння, проаналізувати кінцеві продукти бродіння; спостерігати процес молочнокислого бродіння, розглянути його збудників, визначити продукти бродіння.

Обладнання та реактиви: хімічна склянка, кисломолочний продукт, 0,1 н NaOH, фенолфталеїн, пробірки, свіже молоко, ватні корки, термостат, колба на 100 мл, скляна паличка, карболова кислота, хлорне залізо, фарфорові чашки, сироватка, бактеріологічна петля, спирт, ефір, предметне скло.

Навчальні елементи: гомоферментативні молочнокислі бактерії, гетероферментативні молочнокислі бактерії, аеротолеранти, анаероби, денатурація, гіфальні гриби, пропіоновокислі бактерії, каталаза.

Короткі теоретичні відомості

Здавна людина використовує діяльність молочнокислих бактерій.

Молочнокислі бактерії здійснюють найбільш розповсюджений у природі процес молочнокислого бродіння, який, завдяки консервуючій і стерилізуючій дії, що ґрунтується на підкисленні середовища до значення рН < 5 широко використовується в сільському та домашньому господарстві, у молочній промисловості. Їх представники, що наведені у табл. 8.1 мають такі основні властивості:

- утворюють молочну кислоту;
- позитивно фарбуються за Грамом;
- не утворюють спори;
- нерухливі;
- коки чи палички;
- вимогливі до джерела азоту;
- не утворюють каталазу;
- анаероби (мають бродильний тип метаболізму);
- аеротолерантні.

Усі мікроорганізми, що спричиняють молочнокисле бродіння, поділяються на дві великі групи:

– I група – гомоферментативні молочнокислими бактеріями – мікроорганізми, подібні *Streptococcus lactis*, що є істинними анаеробами і які зброджують гексози в точній відповідності з наведеним вище сумарним рівнянням молочнокислого бродіння. Їх називають.

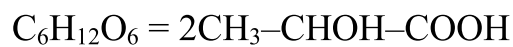
– II група – гетероферментативні молочнокислі бактерії – це бактерії, які, окрім молочної кислоти, утворюють значні кількості інших продуктів, зокрема, оцтової кислоти і етилового спирту.

Характерним представником другої групи молочнокислих бактерій є мікроб *Bacterium lactis aerogenes*, що утворює молочну, оцтову кислоти, етиловий спирт, вуглекислий газ, водень і метан. Зокрема, помітний вміст молочної і оцтової кислот в житньому тісті (і житньому хлібі) пояснюється тим, що під час його бродіння, разом зі спиртовим бродінням, відбувається також молочнокисле бродіння, в результаті чого накопичується як молочна, так і

оцтова кислоти.

При виготовленні кисломолочних продуктів мають місце процеси, в яких бактерії розщеплюють вуглеводи молока з утворенням молочної кислоти та деяких інших речовин. Молочна кислота денатурує білок казеїн, в результаті чого він випадає в осад. В залежності від виду молочнокислих бактерій, а також від властивостей вихідного матеріалу бродіння, одержують той чи інший продукт з характерним смаком, ароматом та іншими властивостями (табл. 8.2).

У випадку *молочнокислого бродіння* з однієї молекули гексози утворюються дві молекули молочної кислоти:



Молочнокисле бродіння відіграє дуже велику роль у виробництві молочнокислих продуктів (кислого молока, ацидофіліну, кефіру, кумису), у виготовленні квасу, хлібних заквасок і «рідких дріжджів» для хлібопечення, під час квашення капусти, огірків, під час силосування кормів.

При виробництві сиру тверді згустки, які складаються з білка і жирів, відокремлюють від сироватки і потім інокують різними видами молочнокислих бактерій і (або) мікроскопічними грибами. Деякі знамениті сорти сиру визрівають, набуваючи специфічних смакових властивостей, завдяки життєдіяльності різних видів *Penicillium*.

Молочнокислі бактерії застосовують також для приготування різноманітних солонин і маринадів, для сквашування овочів. При цьому рослинна сировина витримується у сольовому розчині, де під впливом спонтанної мікрофлори розпочинається молочнокисле бродіння.

Наприклад, у дрібно посіченій, посоленій та добре спресованій капусті бродіння проходить за участю *Leuconostoc* (з утворенням CO₂), а потім *Lactobacillus plantarum*. У розсолі огірків розвивається огіркова паличка *Lactobacillus cucumeris*.

Молочнокислі бактерії, що мешкають на рослинах відіграють основну роль при силосуванні кормів. Вони зброджують цукри рослин до молочної і частково оцтової кислот, знижуючи рН соковитих кормів до 4,2–4,0.

Таблиця 8.1 – Бактерії, що здійснюють молочнокисле бродіння

Форма клітин	Гомоферментативне		Гетероферментативне	
	Основний продукт – молочна кислота		Окрім молочної кислоти утворюють значну кількість оцтової, янтарної кислот, етиловий спирт та вуглекислий газ	
	Представники	Розповсюдження	Представники	Розповсюдження
Коки	<i>Streptococcus lactis</i> <i>Streptococcus cremoris</i> <i>Streptococcus thermophiles</i> <i>Streptococcus diacetylactis</i>	Молоко та молочні продукти	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> <i>Leuconostoc cremoris</i>	Рослини та рослинні залишки
	<i>Streptococcus salivarius</i> <i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Enterococcus faecalis</i>	Кишковик та слизові оболонки		
Палички	<i>Lactobasillus lactis</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus bulgaricus</i> <i>Lactobacillus casei</i>	Молоко та молочні продукти	<i>Lactobasillus brevis</i> <i>Lactobasillus fermentum</i> <i>Lactobasillus viridescens</i>	Рослини та рослинні залишки
	<i>Lactobacsillus delbrueckii</i> <i>Lactobacillus plantarum</i>	Рослини та рослинні залишки	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	Кишковик та слизові оболонки

Це призводить до пригнічення розвитку гнилісних та інших бактерій, що спричинюють псування кормів. Для силосування сировина повинна мати достатній вміст цукру, тому інколи додатково додають мелясу.

Таблиця 8.2 – Продукти молочнокислого бродіння

Продукт	Культури, що входять до складу заквасок
Вершкове масло	<i>Streptococcus lactis</i> <i>Streptococcus cremoris</i> <i>Leuconostoc cremoris</i>
Сметана	<i>Streptococcus diacetylactis</i> <i>Streptococcus lactis</i> <i>Streptococcus cremoris</i>
Йогурт	<i>Streptococcus thermophiles</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus bulgaricus</i>
Кефір, кумис	<i>Streptococcus lactis</i> <i>Lactobacillus bulgaricus</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> дріжджі <i>Torula</i>
М'які сири	<i>Streptococcus lactis</i> <i>Streptococcus cremoris</i> <i>Leuconostoc cremoris</i>
Тверді сири	<i>Streptococcus lactis</i> <i>Streptococcus cremoris</i> <i>Lactobacillus bulgaricus</i> <i>Lactobasillus lactis</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i>

Важливо також створити анаеробні умови шляхом пересування кормів. Недотримання умов силосування кормів, технології виготовлення та вимог до зберігання кисломолочних продуктів та сквашених овочів сприяє розвитку інших мікроорганізмів та пригніченню молочнокислих бактерій.

За таких обставин у складі мікрофлори розсолів тощо можлива присутність дріжджів, дріжджоподібних грибів (*Oidium lactis* – молочна цвіль), гіфальних грибів, пропіоновокислих та оцтовокислих бактерій, бацил, мікрококів та ін. Молочна цвіль окислює молочну кислоту, яку продукують бактерії, до CO₂ та H₂O. При цьому знижується кислотність, що створює сприятливі умови для розвитку гнилісних бактерій. Показниками якості молочнокислих продуктів є наявність активної мікрофлори та молочної кислоти.

Хід роботи

Визначення кількості молочної кислоти

У хімічну склянку налити 10 мл кисломолочного продукту і відтитрувати його 0,1 н NaOH у присутності фенолфталеїну до появи рожевого забарвлення. Визначити процентний вміст молочної кислоти та кислотність продукту в градусах Тернера (°Т).

Обчислення проводити, враховуючи, що 1 мл 0,1 н NaOH відповідає 0,009 г молочної кислоти, а 1 мл 0,1 н NaOH, що йде на титрування 100 мл продукту, відповідає 1° Т. Оцінити якість кисломолочного продукту (кислотність солодкого молока 15–18° Т, кисломолочних продуктів 65–95° Т).

Дослід на молочнокисле бродіння закласти у 2 широких пробірках, в які налити по 10 мл свіжого молока, закрити ватними корками і помістити в термостат при температурі 30° С на 4–5 днів.

На наступному занятті вміст однієї пробірки перелити в колбу на 100 мл (перемішуючи склянкою паличкою і поступово ополіскуючи в 20 мл дист. води). Додати 2–3 краплі фенолфталеїну і титрувати 0,1 н розчином NaOH.

Визначити градуси Тернера і кількість утвореної молочної кислоти. За різницею (мг) молочної кислоти в молоці до і після досліду розрахувати, яка її кількість утворилась при молочнокислому бродінні.

Якісна реакція на молочну кислоту

Для виявлення молочної кислоти використати реактив, який складається з суміші 5 % розчинів карболової кислоти і хлорного заліза (1:2), розведених подвійною кількістю води. Він має аметистово-синій колір. В присутності молочної кислоти це забарвлення переходить в солом'яно-жовте за рахунок утворення молочнокислого заліза. Реакцію проводять у фарфорових чашках, додаючи реактив до кількох крапель сироватки.

Мікроскопування молочнокислих бактерій

Для вивчення молочнокислих бактерій приготувати мазок з кислого молока. Набрати петлею згусток, розмазати по склі і висушити на повітрі. Мазок зафіксувати сумішшю спирту з ефіром (1:1), кілька разів наливаючи її на

предметне скло. При такій фіксації мікроорганізми прилипають до скла, а жир розчиняється і вимивається з мазка.

Після фіксації препарат зафарбувати.

Завдання до теми

1. Визначити кількість утвореної молочної кислоти.
2. Провести якісну реакцію на молочну кислоту.
3. Розглянути під мікроскопом молочнокислі бактерії.

Контрольні питання

1. Дати визначення процесу молочнокислого бродіння.
2. Назвати мікроорганізми – збудників цього процесу.
3. Привести сумарне рівняння молочнокислого бродіння.
4. Проаналізувати продукти молочнокислого бродіння.
5. Охарактеризувати морфологічні особливості культур, що входять до складу заквасок.

Література: [1, с. 243–244; 5, с. 201–203; 7, с. 218–220; 8, с. 376–378; 9, с. 187–189; 31, с. 34–37, 45–47, 67–70, 96–103, 176–179.].

КРИТЕРІЇ ОЦІНЮВАННЯ ЗНАНЬ СТУДЕНТІВ

Контроль знань і умінь студентів з дисципліни здійснюють згідно з кредитно-модульною системою організації навчального процесу. Рейтинг студента із засвоєння дисципліни визначається за 100 бальною шкалою. Він складається з рейтингу з навчальної роботи, для оцінювання якої призначається 70 балів, і рейтингу з атестації – 30 балів.

На лабораторних заняттях кожен студент з кожної теми виконує індивідуальні завдання. Рівень знань оцінюється:

«Відмінно»

Студент дає вичерпні, обґрунтовані, теоретично і практично вірні відповіді не менш ніж на 90 % запитань, рішення задач та лабораторні справи вірні, демонструє знання підручників, посібників, інструкцій, проводить узагальнення і висновки, акуратно оформляє завдання, був присутній на лекціях, має конспект лекцій чи реферати з основних тем курсу.

«Добре»

Студент володіє знаннями матеріалу, але допускає незначні помилки у формуванні термінів, категорій і розрахунків, проте за допомогою викладача швидко орієнтується і знаходить правильні відповіді, був присутній на лекціях, має конспект лекцій чи реферати з основних тем курсу.

«Задовільно»

Студент дає правильну відповідь не менше ніж на 60 % питань, або на всі запитання дає недостатньо обґрунтовані, невичерпні відповіді, допускає грубі помилки, які виправляє за допомогою викладача. При цьому враховується наявність конспекту за темою завдань та самостійність.

«Незадовільно

з можливістю повторного складання»

Студент дає правильну відповідь не менше ніж на 35 % питань, або на всі запитання дає необґрунтовані, невичерпні відповіді, допускає грубі помилки. Має неповний конспект лекцій.

Підсумкова оцінка виставляється після повного вивчення навчальної дисципліни, яка виводиться як сума проміжних оцінок за змістовні модулі. Остаточна оцінка рівня знань складається з рейтингу з навчальної роботи, для оцінювання якої призначається 70 балів, і рейтингу з атестації – 30 балів.

Сума балів за всі види навчальної діяльності	Оцінка ECTS	Оцінка за національною шкалою для екзамену (для заліку)
90–100	A	відмінно
82–89	B	добре
74–81	C	
64–73	D	задовільно
60–63	E	
35–59	FX	незадовільно з можливістю повторного складання
0–34	F	незадовільно з обов'язковим повторним вивченням дисципліни

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

Основна література

1. Пирог Т. П. Харчова біотехнологія : підручник / Т. П. Пирог, М. М. Антонюк, О. І. Скроцька, Н. Ф. Кігель. – Київ : Видавництво Ліра-К, 2016. – 408 с.
2. Грачева И. М. Технология ферментных препаратов / И. М. Грачева, А. Ю. Кривова. – Москва : Элевар, 2000. – 512 с.
3. Безбородов А. М. Ферментативные процессы в биотехнологии / А. М. Безбородов, Н. А. Загустина, В. О. Попов. – Москва : Наука, 2008. – 335 с.
4. Сассон А. Биотехнология: свершения и надежды : [пер. с англ.] ; под ред., с предисл. и дополн. В. Г. Дебабова. – Москва : Мир, 1987. – 422 с.
5. Герасименко В. Г. Биотехнология : учеб. пособие / В. Г. Герасименко. – Киев : Выща шк. Головное изд-во, 1989. – 343 с.
6. Бірюков В. В. Основи промислової біотехнології / В. В. Бірюков. – Москва : Колос, 2004. – 296 с.
7. Бекер М. Е. Биотехнология / М. Е. Бекер, Г. К. Лиепиньш, Е. П. Райпулис. – Москва : Агропромиздат, 1990. – 334 с.
8. Бейли Дж. Основы биохимической инженерии / Дж. Бейли, Д. Оллис. – Ч. 2. – Москва : Мир, 1989. – 590 с.
9. Варфоломеев С. Д. Биотехнология. Кинетические основы микробиологических процессов / С. Д. Варфоломеев, С. В. Калюжный. – Москва : Высш. шк., 1990. – 296 с.
10. Ильинич В. В. Технология спирта и спиртпродуктов / В. В. Ильинич, Б. А. Устинников, И. И. Бурачевский, С. И. Громов ; под ред В. В. Ильинича. – Москва : ВО «Агропромиздат», 1987. – 383 с.
11. Технология спирта ; под ред. В. Л. Яровенко. – Москва : Колос, 1996. – 464 с.
12. Фараджева Е. Д. Общая технология бродильных производств / Е. Д. Фараджева, В. А. Федоров. – Москва : Колос, 2002. – 408 с.

13. Мальцев П. М. Технология бродильных производств / П. М. Мальцев. – Москва : Легкая и пищевая промышленность, 1980. – 560 с.
14. Манаков М. Н. Теоретические основы микробиологических производств / М. Н. Манаков, Д. Г. Победимский. – Москва : Агропромиздат, 1990. – 272 с.
15. Ковалевский К. А. Технология и техника виноделия / К. А. Ковалевский, Н. И. Ксенжук, Г. Ф. Слезко. – Киев : Фирма «ИНКОС», 2004. – 560 с.
16. Соболев Э. М. Технология натуральных и специальных вин / Э. М. Соболев. – Майкоп : ГУРИПП «Адыгея», 2004. – 400 с.
17. Мехузла Н. А. Плодово-ягодные вина / Н. А. Мехузла, А. Л. Панасюк. – Москва : Легкая и пищевая промышленность, 1984. – 237 с.
18. Славуцкая Н. И. Технология ликеро-водочного производства / Н. И. Славуцкая – Москва : Легкая и пищевая промышленность, 1982. – 184 с.
19. Справочник технолога ликеро-водочного производства ; под ред. В. Л. Яровенко, И. И. Бурачевского. – Москва : Агропромиздат, 1988. – 207 с.
20. Тихомиров В. Г. Технология пивоваренного и безалкогольного производств / В. Г. Тихомиров. – Москва : Колос, 1998. – 447 с.
21. Калунянц К. А. Технология солода, пива и безалкогольных напитков / [К. А. Калунянц, В. Л. Яровенко, В. А. Домарецкий, Р. А. Колчева]. – Москва : Колос, 1992. – 446 с.
22. Рудольф В. В. Производство безалкогольных напитков : справочник / В. В. Рудольф, П. М. Яшнова, А. В. Орещенко. – СПб. : Изд-во «Профессия», 2000. – 360 с.
23. Рудольф В. В. Производство кваса / В. В. Рудольф. – Москва : Легкая и пищевая промышленность, 1982. – 152 с.
24. Фараджева Е. Д. Производство хлебопекарных дрожжей : практическое руководство / Е. Д. Фараджева, Н. А. Болотов. – СПб. : Изд-во «Профессия», 2002. – 167 с.

25. Новаковская С. С. Производство хлебопекарных дрожжей : справочник / С. С. Новаковская, Ю. И. Шишацкий. – Москва : Агропромиздат, 1990. – 335 с.

Додаткова

26. Глазко В. И. Русско-англо-украинский толковый словарь по прикладной генетике, ДНК-технологии и биоинформатике / В. И. Глазко, Г. В. Глазко. – Киев : Нора-принт, 2000. – 464 с.

27. Сытник К. М. Словарь-справочник по экологии / К. М. Сытник и др. ; под ред. К. М. Сытника. – Киев : Наукова думка, 1994. – 665 с.

28. Самсон А. Биотехнология: свершения и надежды. – Москва : Мир, 1987. – 180 с.

29. Валуйко Г. Технология виноградных вин. – Севастополь : Таврида, 2001. – 298 с.

30. Домарецький В. Технологія солоду та пива. – Київ : Урожай, 1999. – 250 с.

31. Технология молока и молочных продуктов / И. Гисин, В. Сирик и др. – Москва : Пищевая промышленность, 1983. – 198 с.

32. Домарецький В. А. Технология пищевых продуктов учебник для студентов высших учебных заведений / В. А. Домарецький. – Київ : Издательський дом Асканія, 1996 – 625 с.

Методичні вказівки щодо лабораторних робіт з навчальної дисципліни «Біотехнологія бродіння» для студентів денної форми навчання за напрямом 6.051401 «Біотехнологія»

Укладачі: к.т.н., доц. А. В. Пасенко
старш. викл. О. О. Никифорова

Відповідальний за випуск заст. зав. кафедри к.х.н., доц. О. В. Новохатько

Підп. до др. _____ 2017 р. Формат 60x84 1/16. Папір тип. Друк ризографія.
Ум. друк. арк. _____. Наклад _____ прим. Зам. № _____. Безкоштовно.

Видавничий відділ
Кременчуцького національного університету
імені Михайла Остроградського
вул. Першотравнева 20, м. Кременчук, 39600