

Міністерство освіти і науки України  
ОДЕСЬКА НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Кафедра біохімії, мікробіології  
та фізіології харчування

## **МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ**

до виконання лабораторних робіт з дисципліни

### **“ЗАГАЛЬНА БІОТЕХНОЛОГІЯ”**

для студентів спеціальності 162 «Біотехнологія та біоінженерія» ступеня бакалавр усіх форм навчання

Схвалено  
радою спеціальності 162  
«Біотехнологія та біоінженерія»  
галузі знань 16 «Хімічна та біоінженерія»  
протокол № 2 від 03.10. 2022р.

Одеса ОНТУ 2023

Методичні вказівки до виконання лабораторних робіт за курсом “Загальна біотехнологія” для студентів спеціальності 162 «Біотехнологія та біоінженерія» ступеня бакалавр усіх форм навчання /Укл. Л.В.Капрельянц, О.О. Килименчук, Т.О.Велічко, Л.Г. Пожіткова, Т.М.Воловик. За ред. Л.В. Капрельянца. – Одеса: ОНАХТ, 2023. - 61с.

Укладачі: Л.В. Капрельянц, д.т.н., професор  
О.О. Килименчук, к.т.н., доцент  
Т.О. Велічко, к.т.н., доцент  
Л.Г. Пожіткова, к.т. н., асистент  
Т.М. Воловик, к.т.н., асистент

Відповідальний за випуск  
Зав.каф. біохімії, мікробіології та фізіології харчування  
Л.В. Капрельянц, д.т.н., професор

Підписано до друку р. Формат 60×90/16  
Об'єм друк. арк 0,9. Замовлення № . Тираж прим.

---

Віддруковано з готового оригінал-макету у ПП “Ксерокс”,  
65039, м. Одеса-39, вул. Канатна, 112,

## ОСНОВНІ ПРИНЦИПИ ЗДІЙСНЕННЯ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ПРОЦЕСІВ

Всю різноманітність біотехнологічних процесів, які застосовуються в промисловості можна розділити на дві великі групи у залежності від кінцевого продукта, який отримується:

- виробництво біомаси;
- отримання метаболітів.

Метою виробництва у першому разі є одержання клітинної маси продуцента, незалежно від того чи буде далі використовуватися жива культура (наприклад: сахароміцети для харчових цілей, спори з токсинами, з метою захисту рослин) або біомаса нежиттєздатних клітин як джерело білка, вітамінів та цінних речовин для кормовиробництва.

До другої групи відносять всі процеси, де цільовим продуктом стає один або кілька метаболітів, а клітина продуцента не потрібна або й навіть стає шкідливою після завершення фази біосинтезу: наприклад, при одержанні продуктів бродіння, ферментів, амінокислот, антибіотиків та різноманітних видів мікробних трансформацій.

Однак, подібний розподіл за кінцевим – цільовим продуктом не відображає найбільш суттєвих з технологічної точки зору аспектів біотехнологічних процесів, які з *однієї сторони споріднені* з хімічними технологіями, а з іншої різко відрізняють їх від останніх.

Саме тому біотехнологічні процеси розглядають поетапно, щоб врахувати особливості і відмінності кожної стадії у залежності від кінцевої мети виробництва.

Типовими для переважної більшості біотехнологічних виробництв є п'ять стадій, які тісно пов'язані між собою, але й відрізняються в залежності від мети та принципів її досягнення:

- трансформація сировини у поживне середовище;
- підготовка мікроорганізма – продуцента;
- ферментація (культивування);
- виділення та очищення цільового продукта;
- приготування товарної форми кінцевого продукта.

Перші дві стадії включають *підготовку сировини та біологічно діючого джерела*. У процесах інженерної ензимології вони, як правило складаються з приготування розчину субстрату із заданими властивостями (рН, температура, концентрація та ін.) та підготовки партії ферментного препарату даного типу, нативного чи імобілізованого. При здійсненні мікробіологічного синтезу, необхідними є стадії приготування поживного середовища і підготовка чистої куль-

тури, яка змогла б постійно та в міру необхідності використовуватись у процесі. Підтримання чистої культури штама – продуцента – насправді, ключове завдання будь-якого мікробіологічного виробництва, оскільки високоактивний штам, який **не потерпає** від небажаних змін, може бути гарантією одержання цільового продукту.

Третьою виявляється стадія **ферментації**, тобто основна стадія під час якої відбувається утворення цільового продукту за рахунок перетворення компонентів поживного середовища спочатку в біомасу, а потім, якщо це необхідно, в цільовий метаболіт.

Особливе місце у промисловій біотехнології займає **четверта стадія загального виробничого циклу, виділення і очищення цільового продукту**. Для виробничих мікробіологічних процесів характерно, як правило, утворення дуже розведених водних розчинів або суспензій, які містять окрім цільового продукту велику кількість супутніх речовин, часто дуже близької природи. Тому складність цієї стадії полягає в тому, щоб розділити суміш речовин, як правило, лабільних, які легко піддаються термічній деструкції.

П'ятою стадією біотехнічного виробництва є **виготовлення товарних форм продуктів**. Однією із особливостей цього процесу є те, що препарати для медичинських, харчових, лікувально-профілактичних цілей мають бути стерильними, що вимагає спеціальних рішень на стадії розфасовування та укупорювання продуктів. Загальними властивостями більшості продуктів мікробіологічного синтезу є їх недостатня стійкість при зберіганні, оскільки самі вони здатні до розкладання, наприклад, лізису і у такому вигляді можуть бути прекрасним середовищем для розвитку сторонньої мікрофлори, частіше гнилісної. Це примушує технологів приймати спеціальні міри для підвищення стійкості препаратів промислової біотехнології.

#### **Мета лабораторного практикуму:**

- вивчити окремі процеси основних стадій біотехнологічних виробництв в лабораторних умовах;
- засвоїти практичні навички виконання біохімічного та мікробіологічного аналізу сировини, біологічного агента та готової продукції.

## **СИРОВИНА ДЛЯ ПРОМИСЛОВОЇ БІОТЕХНОЛОГІЇ**

Для культивування біомаси мікроорганізмів або одержання їх метаболітів у промислових масштабах, необхідні поживні середовища, які містять велику кількість необхідних компонентів. Основним компонентом вважають той, який служить мікроорганізмам джерелом вуглецю та енергії. Цю речовину або ж суміш речовин називають **субстратом**; а всі інші компоненти – допоміжними речовинами. Тому при вивченні сировини для подальшої біотехнологічної переробки

оцінюють її саме з цієї точки зору. До основних показників відносять: вологість, золу, білок, жир, вуглеводи (крахмаль, клітковину, целюлозу, легко-та важкогідролізовані полісахариди, моносахариди), лігнін, окремі хімічні сполуки, органічні кислоти, вітаміни. Якщо, як сировину, досліджують рідкі відходи різних виробництв, соки, стічні води, то визначають сухі речовини.

Сировину оцінюють також і за технологічними (насіпна маса, вологість, можливість транспортування, тощо) та економічними показниками (вартість, локалізація, термін зберігання, багатотонажність тощо).

На сучасних біотехнологічних виробництвах використовують сировину для конструювання різних поживних середовищ. Відходи харчових та переробних підприємств (м'ясокомбінатів, молочних, спиртових, консервних, зернопереробних), відходи сільськогосподарських культур, які не придатні для годівлі тварин (кукурудзяні осередки, соломі, коробочки та стебла бавовни, соняшникові луски тощо), відходи деревообробних виробництв (опилки, тріски, обрізки, кору), відходи целюлозно-паперових комбінатів. Постійно йде пошук нових альтернативних джерел дешевої сировини.

## **Аналіз сировини для приготування поживних середовищ**

### **Лабораторна робота № 1**

#### **Визначення крохмалю поляриметричним методом**

##### **Загальні відомості**

У біотехнологічних виробництвах, як багатотонажну сировину, дуже часто використовують зернові сільськогосподарські культури та відходи їх переробки, які містять крохмаль, основний резервний полісахарид у клітинах рослин. Крохмаль – суміш полісахаридів амілози і амілопектину, побудованих із залишків  $\alpha$ -D глюкози, який може служити важливим джерелом вуглецю для приготування поживних середовищ. Визначення масової частки крохмалю є одним з важливих біохімічних показників, який поряд з іншими показниками дає уявлення про можливість використання сировини для біотехнологічної переробки.

Принцип методу полягає у гідролізі крохмалю з соляною кислотою і визначенні кута обертання у розчині. В основі аналізу лежить метод Еверса.

##### **Апаратура та реактиви**

1%-ний і 5%-ний розчин соляної та фосфорно-вольфрамової кислоти; мірні колби на 50 та 100 см<sup>3</sup>; водяна баня; поляриметр.

##### **Хід аналізу**

Пробу тонкоподрібненого зерна ( ячменю, пшениці, вівса) масовою часткою  $5\text{г} \pm 0,001\text{г}$  переносять в мірну колбу на  $100\text{ см}^3$  і доливають  $12,5\text{ см}^3$  1%-ної соляної кислоти. Старанно розмішують і додають знову  $12,5\text{ см}^3$  1%-ної соляної кислоти. Колбу нагрівають на киплячій водяній бані 15 хв. Під час кипіння колбу старанно перемішують. Спочатку суміш у колбі згусає за рахунок клейстеризації крохмалю, а потім розріджується. Після закінчення гідролізу у колбу доливають  $30\text{ см}^3$  води і дають охолонути. Потім додають  $5\text{ см}^3$  розчину 5%-ної фосфорновольфрамової кислоти і після перемішування доводять об'єм водою до риски. На цій стадії дослід можна перервати, залишити у холодильнику до ранку. Екстракт фільтрують у суху колбу перед визначенням кута обертання. Перед початком роботи поляриметр перевіряють по дистильованій воді. Прозорий фільтрат наливають в поляризаційну трубку (звернути увагу на її довжину) і визначають кут обертання. Всі умови проведення дослідів мають бути однаковими для всіх проб. Наважки зразків можуть бути зменшені в 2 рази, і тоді відповідно зменшують розведення ( $2,5\text{г} \rightarrow 50\text{ см}^3$ ).

Вміст крохмалю (%) на суху речовину обчислюють за однією із формул: при використанні поляриметра (сахариметра) з прямою шкалою

$$X = c \cdot a \cdot 100$$

При використанні поляриметра з круглою шкалою

$$X = k \cdot a \cdot 100 / 0,3468 - b$$

Де  $k$  – перевідний коефіцієнт, який для пшениці складає – 1,898; кукурудзи – 1,879; жита – 1,885; ячменю – 1,912; вівса – 1,914; рису – 1,866; проса – 1,818; гречки – 1,876;

$a$  – показання поляриметра в градусах шкали;

$b$  – вологість розмеленого зерна, %.

Перевідні коефіцієнти  $k$  розраховані на довжину трубки 200мм (2дм). Знаючи питоме обертання крохмалю  $[\alpha]$ , можна розрахувати коефіцієнти.

## Лабораторна робота № 2

### Визначення масової частки сухих речовин рефрактометричним методом

#### Загальні відомості

Рефрактометричний метод використовують при визначенні масової частки сухих речовин в різноманітних соках, цукровому буряці, субтратів, змивних водах та інших розчинах, що могли бути поживними середовищами у біотехнологічних виробництвах. В лабораторному рефрактометрі РЛ заломлююче тіло складається з двох скляних призм, поміщених в пустотілий кожух. Верхня призма

відкидається в сторону на шарнірі і дозволяє помістити декілька крапель рідини, що досліджується, на поверхні нижньої призми.

Для отримання різкої межі між темною та світлою половинками поля зору (усунення райдуги) служить компенсатор, розташований на одній осі з важелем окуляра. Пересуванням важеля усувають світлорозсіювання та розпливчатість межі.

**Апаратура та матеріали, які застосовуються:** бюкси з кришками, рефрактометри типу ПРЛ – 3; УРЛ, мірні циліндри місткістю 10...25см<sup>3</sup>, скляні стаканчики – 50см<sup>3</sup>, скляні палички, термометр зі шкалою 100<sup>0</sup> С, з ціною поділки 1<sup>0</sup>, марля.

### **Техніка визначення**

Перед початком роботи рефрактометр перевіряють по дистильованій воді (при 20<sup>0</sup>С). Якщо пунктирна лінія або центр кружка відхиляється від нуля, необхідно відрегулювати прилад за допомогою спеціального ключа.

Після цього на центральну частину площини грані призми за допомогою сплавленої скляної палички наносять декілька крапель рідини, яка досліджується, верхню частину призми опускають та щільно прикладають до нижньої рухомої частини. Дивлячись в окуляр та пересуваючи його, знаходять найбільш різку межу між темною та світлою половинками поля зору. Цю межу встановлюють так щоб вона співпадала з пунктирною лінією або центром кружка, після чого визначають по шкалі масову частку сухих речовин.

При відліку показань приладу необхідно відзначити температуру, при якій проводилося визначення, та ввести відповідну поправку згідно з таблицею. Роблять не менше трьох визначень.

### **Хід роботи**

В зважену бюксу з кришкою беруть наважку продукту (від 5 до 10г кукурудзяної крупи грубого та тонкого помолу) з точністю до 0,01г та приливають мірним циліндром воду в кількості, приблизно рівній взятій наважці. Наважку розчиняють у відкритій бюксі, прискорюючи розчинення нагріванням до температури 50...60<sup>0</sup>С, після чого рідину охолоджують до 15...30<sup>0</sup>С, закривають бюксу кришкою та зважують з точністю до 0,01г та результати вносять в таблицю. При необхідності, розчин фільтрують через марлю в скляний стаканчик.

Масовий вміст сухих речовин в отриманому розчині визначають на рефрактометрі, вводять температурну поправку з таблиці № 1 і результати вносять в таблицю № 2.

Вміст сухих речовин (X) у відсотках у зразку який досліджується обчислюють за формулою:

$$X = a \cdot m_1 / m$$

Де,  $a$  – відлік по шкалі рефрактометра з урахуванням температурної поправки, %

$m_1$  – маса розчину з наважкою, г

$m$  – маса наважки виробу, г

Таблиця № 1 - Поправки до вмісту сухих речовин

Поправки на температуру при вмісті сухих речовин, %	Температура, °C									
	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Від знайденого вмісту сухих речовин потрібно відняти										
0	0,5	0,46	0,42	0,37	0,33	0,27	0,22	0,17	0,12	0,06
5	0,54	0,49	0,45	0,4	0,35	0,29	0,24	0,18	0,13	0,06
10	0,58	0,53	0,48	0,42	0,37	0,31	0,25	0,19	0,13	0,06
15	0,61	0,55	0,5	0,44	0,39	0,33	0,26	0,2	0,14	0,07
20	0,64	0,58	0,52	0,46	0,4	0,34	0,27	0,21	0,14	0,07
25	0,66	0,6	0,54	0,46	0,41	0,34	0,28	0,21	0,14	0,07
30	0,68	0,62	0,56	0,48	0,42	0,35	0,28	0,22	0,14	0,07
35	0,72	0,64	0,57	0,49	0,43	0,36	0,29	0,22	0,15	0,08
40	0,72	0,65	0,58	0,5	0,44	0,37	0,3	0,22	0,15	0,08
45	0,73	0,66	0,59	0,51	0,45	0,37	0,3	0,23	0,15	0,08
50	0,74	0,67	0,6	0,52	0,45	0,38	0,3	0,23	0,15	0,08
55	0,75	0,68	0,61	0,53	0,46	0,39	0,31	0,23	0,16	0,08
60	0,76	0,69	0,61	0,54	0,46	0,39	0,31	0,23	0,16	0,08
65	0,78	0,7	0,63	0,54	0,47	0,4	0,32	0,24	0,16	0,08
70	0,79	0,71	0,63	0,55	0,48	0,4	0,32	0,24	0,16	0,08
Поправки на температуру при вмісті сухих речовин, %	Температура, °C									
	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
До знайденого вмісту сухих речовин потрібно додати										
0	0,06	0,13	0,19	0,26	0,33	0,4	0,48	0,56	0,64	0,72
5	0,07	0,13	0,2	0,27	0,35	0,42	0,5	0,57	0,66	0,74
10	0,07	0,14	0,21	0,28	0,36	0,43	0,52	0,6	0,68	0,77
15	0,07	0,14	0,22	0,29	0,37	0,44	0,53	0,61	0,69	0,78
20	0,07	0,15	0,23	0,3	0,38	0,45	0,54	0,62	0,71	0,79
25	0,08	0,15	0,23	0,3	0,38	0,46	0,55	0,63	0,72	0,8
30	0,08	0,15	0,23	0,31	0,39	0,47	0,56	0,64	0,73	0,8
35	0,08	0,15	0,23	0,31	0,4	0,48	0,56	0,64	0,73	0,81
40	0,08	0,15	0,24	0,31	0,4	0,48	0,56	0,64	0,73	0,81
45	0,08	0,16	0,24	0,31	0,4	0,48	0,56	0,64	0,73	0,81
50	0,08	0,16	0,24	0,31	0,4	0,48	0,56	0,64	0,73	0,81
55	0,08	0,16	0,24	0,32	0,4	0,48	0,56	0,64	0,73	0,81



Поправки на температуру при вмісті сухих речовин, %	Температура, °С									
	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
60	0,08	0,16	0,24	0,32	0,4	0,48	0,56	0,64	0,73	0,81
65	0,08	0,16	0,24	0,32	0,4	0,48	0,56	0,64	0,73	0,81
70	0,08	0,16	0,24	0,32	0,4	0,48	0,56	0,64	0,73	0,81

Таблиця № 2 - Результати досліджень

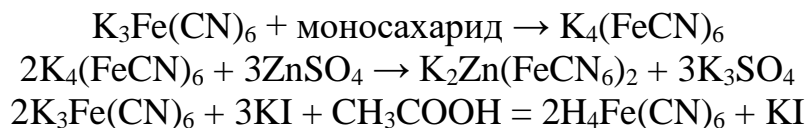
Найменування продукту	Маса порожнього бюксу, г	Маса бюксу з наважкою, г	Маса бюксу з розчином, г	Відлік по шкалі рефрактометра, %	Температурна поправка, °С	Вміст С.Р. за ф-лою, %

### Лабораторна робота № 3 Мікровизначення моносахаридів за Хагедорном- Ієнсеним

#### Загальні відомості

Біологічні агентів, які застосовуються у біотехнологічних виробництвах асимілюють моносахариди як вуглецеву складову поживних середовищ. Від концентрації моносахаридів (субстрату) та додаткових компонентів у значній мірі залежать тривалість фаз розвитку, фізіологічний стан культури та врешті і якість кінцевого продукту. Цей показник обов'язково визначають у сировині, у готовому поживному середовищі, у культуральній рідині, на протязі всього періоду культивування, що дозволяє контролювати перебіг процесу.

Мікровизначення моносахаридів базується на їх здатності у лужному середовищі відновлювати червону кров'яну сіль за наступними реакціями



#### Матеріали та реактиви:

Колби на 100, 50 см<sup>3</sup>, піпетки, стакан на 500 см<sup>3</sup>;

1. Заліzosинеродистий калій ( $1,65\text{гK}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  точно,  $10,6\text{г}$  безводного  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  розчинити в  $1000\text{ см}^3$  дистильованої води)
2. Гіпосульфїт –  $0,005\%$ -ний готується щоденно з  $0,1\text{N}$   $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$
3.  $\text{ZnSO}_4$  –  $5\%$ -ний
4.  $\text{KI}$  готується щоденно  $2,5\text{г}$  в  $1000\text{см}^3$  води
5. Розчин оцетової кислоти  $3\%$ -ний
6. Розчин крохмалю  $1\%$ -ний

### Хід роботи

У чотири пробірки діаметром  $20\text{ мм}$  наливають по  $5\text{ см}^3$  дистильованої води. Досліджуваний розчин, що містить моносахариди (солодове сусло, гідролізати рослинної сировини, вода після замочування зерна, сої, сік, тощо) видувають з мікропіпетки по  $0,02 - 0,05\text{ см}^3$  у три пробірки. Четверту залишають тільки з водою як контрольну. У всі пробірки вносять по  $2\text{ см}^3$   $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  (точно), нагрівають їх на водяній бані  $15$  хвилин. Потім швидко охолоджують під водою з крану, у кожену додають по  $3\text{ см}^3$   $\text{KI}$  в  $\text{ZnSO}_4$  і по  $2\text{ см}^3$   $3\%$  - ної оцетової кислоти і титрують до обезбарвлення з мікробюретки на  $2\text{ см}^3$   $0,005\%$  -ним розчином  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  (позначки –  $0,001\text{ см}^3$ ). Як індикатор використовують  $1-2$  краплі  $1\%$  крохмалю.

### Розрахунок

Знаходять різницю у титруванні між контрольною пробіркою і дослідною. Знаходять відповідну кількість редуруючих речовин у  $\text{мг}$  за таблицею (надають інженери). Якщо об'єм внесеного зразка  $0,05\text{ см}^3$ , а розчину в якому визначають редуруючі речовини –  $50\text{ см}^3$ , то розрахунок наступний:

$$\begin{array}{l} 0,05\text{ см}^3 \quad - \quad 0,235\text{ мг} \\ 50\text{ см}^3 \quad \quad - \quad x \end{array} \qquad x = 50 \cdot 0,235 / 0,05 = 235\text{ мг}$$

$$\text{РВ} = 0,235 \cdot 100 / 50 = 0,47\%$$

Після розрахунку роблять висновок про доцільність використання досліджуваного зразка як джерела вуглецю для культивування мікроорганізмів (якщо це сировина) або інші висновки.

## **Лабораторна робота № 4**

### **Ебуліостатичний метод визначення редукуючих речовин**

### **Нізовкіна та Ємельянової**

#### **Загальні відомості**

Метод базується на здатності редукуючих речовин відновлювати мідь з низьколуужних розчинів. Метод менш точний порівняно з вище наведеним, але широко використовувався раніше на біотехнологічних підприємствах.

#### **Матеріали та реактиви:**

Досліджуваний розчин (гідролізат сировини, сік, водна витяжка рослинних відходів, змивна вода, тощо) колби, піпетки, ебуліостат, електрична плитка, розчин Фелінга 1 (10г  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  і 0,04г метилевої сині в  $1000\text{cm}^3$ ), Фелінга 2 (50г сегнетової солі, 75г  $\text{NaOH}$  і 4г  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ ).

Ебуліостат (рис. 1) складається з зовнішньої колби 5, та внутрішньої 3, яка має вигляд широкої пробірки з впаяною у бокову стінку трубочкою, через яку в середину проходить пара.

Верхній отвір ебуліостата закривається під час титрування пробкою, у яку вставлена бюретка. Для виходу пари зроблено отвір на боковій стінці у верхній частині ебуліостату. Внутрішня посудина встановлена у зовнішню на резиновій пробці, в якій встановлена скляна трубка для відведення зайвої пари з колби 5. Для регулювання потоку пари на трубці закріплена гумова трубка з гвинтовим зажимом.

Титр міднолуужних розчинів встановлюють за глюкозою. Титром називають масову частку глюкози у мг, що іде на відновлення  $10\text{cm}^3$  міднолуужного розчину вище приведенного складу (встановлює навчально-допоміжний персонал).

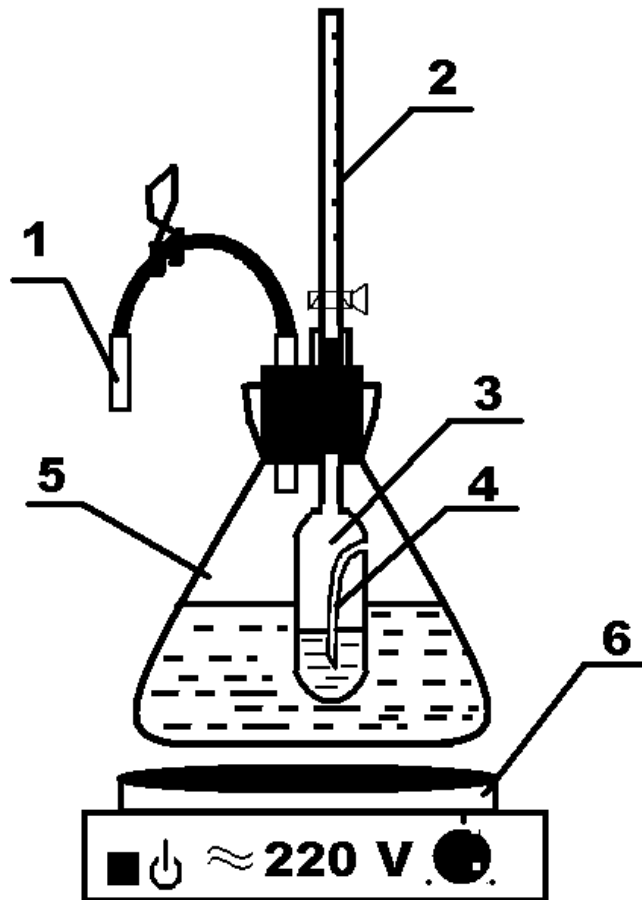


Рис. 1- Прилад для визначення концентрації моносахаридів ебуліостатичним методом: 1-трубка з зажимом; 2 - мікробюретка; 3 - внутрішня посудина пристрою; 4 - скляна трубка для проходження пари; 5 - зовнішня колба; 6 – електроплитка.

### Хід роботи

У зовнішню колбу приладу наливають дистильовану воду і ставлять на електричну плитку. Коли вода закипить, внутрішню посудину виймають і вливають по  $5\text{ см}^3$  розчинів Фелінга. Суміш розмішують і обережно вставляють у колбу з водою. Верхній отвір ебуліостату закривають пробкою надітою на кінчик бюретки. У бюретку наливають розчин у якому мають визначити редуруючі речовини (гідролізат рослинної сировини, сік, промислові стічні води тощо). Якщо пара довго не проходить через суміш у внутрішній посудині то за допомогою зажима зменшують її вихід через гумову трубку. Спочатку виконують орієнтовне визначення. Як тільки пара починає проходити через міднолужний розчин, поступово додають досліджуваний розчин (приблизно 1 капля за 1-2с) до появи світло-жовтого кольору. Фіксують об'єм розчину, який пішов на титрування. Друге

заключне визначення проводять наступним чином: після того як суміш у внутрішній посудині закипить, з бюретки виливають приблизно 80% того об'єму досліджуваного розчину, який пішов на перше орієнтовне титрування; чекають 2 хвилини (пісочний годинник); потім титрують зі швидкістю 1 капля за 6-7 секунд до появи жовтого кольору.

Розраховують вміст редуруючих речовин (РР) у розчині:

$$PP = T \cdot 100 / V \cdot 1000 = T / V \cdot 10; \%, \text{ де}$$

100 – об'єм досліджуваного розчину, см<sup>3</sup>

T – титр міднолужного розчину, мг

V – об'єм гідролізату, який пішов на титрування, см<sup>3</sup>

Якщо розраховувати РР у гідролізаті певного об'єму, одержаного з відомої наважки сировини, яку перед гідролізом обезжирювали, то  
100мл - 2г/100

$$PP = T \cdot 500 \cdot 100 \cdot K_{\text{оф}} / V \cdot a \cdot 1000 \cdot 50 = T \cdot 100 \cdot K_{\text{эф}} / V \cdot a; \%, \text{ де}$$

500 – об'єм гідролізату, у см<sup>3</sup>

a – наважка досліджуваного матеріалу, г

K<sub>оф</sub> - коефіцієнт ефірної екстракції

50 – об'єм досліджуваного розчину, см<sup>3</sup>

Роблять висновок

## ПОЖИВНІ СЕРЕДОВИЩА ТА ПРИНЦИП ЇХ СКЛАДАННЯ

Потреби мікроорганізмів в тих чи інших сполуках визначаються фізіологічними особливостями їх видів, але у будь-якому випадку, поживне середовище має бути водним розчином цих сполук, щоб забезпечити їх потік у клітину.

У приближеному вигляді фізіологічні потреби мікроорганізмів у поживних речовинах можна встановити, визначивши хімічний склад мікробної клітини. У табл. 1. Наведено елементарний склад біомаси деяких груп мікроорганізмів.

Таблиця 3 - Хімічний склад мікробної клітини

Компоненти	Склад біомаси, % на абсолютно суху речовину		
	бактерії	дріжджі	гриби (міцелій зі спорами)
Вуглець	50,4	49,8	47,9
Азот	12,3	12,4	5,2
Кисень	30,5	31,1	40,2
Водень	6,8	6,7	6,7
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	4,95	3,54	4,85
K <sub>2</sub> O	2,41	2,34	2,81
S O <sub>3</sub>	0,29	0,04	0,11
Na <sub>2</sub> O	0,07	----	1,12
Mg O	0,82	0,42	0,38
Ca O	0,89	0,38	0,19
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0,08	0,03	0,16
Si O <sub>2</sub>	0,03	0,09	0,04

Крім елементів, вказаних в табл.3., до складу клітини завжди входять мікроелементи: бор, молібден, марганець, цинк, мідь, бром, йод, кобальт та ін. Частіше всього мікроелементи, які входять до складу клітини, мають обов'язково входити до складу поживного середовища. Відсутність навіть одного з них призводить до сповільнення росту культури або й до її загибелі.

Джерела вуглецю. Переважна більшість продуцентів, які використовуються у біотехнологічних виробництвах асимілюють органічні речовини нескладної будови: гексози, пентози, низькомолекулярні олігосахариди, органічні кислоти, спирти, жирні кислоти, амінокислоти та інші вуглецевмісні сполуки. Полісахариди (целюлоза, геліцелюлоза, пектинові речовини, крохмаль), слизові і гумінові речовини можуть бути джерелом вуглецю після перетворення їх у форму доступну для засвоєння мікроорганізмами.

Джерела азоту. До складу поживних середовищ азот може входити у формі неорганічних солей, кислот або органічних сполук – амінокислот, сечовини і т.п. Вміст азоту має бути порівняно високим, оскільки біомаса, наприклад дріжджів складається приблизно на 45-55 % сухої маси з білка, в якому біля 6% азоту. Тому, для вирощування дріжджів необхідно 100 мг азоту на 1 дм<sup>3</sup> поживного середовища. Під час вибору джерела азоту слід пам'ятати, що при введенні аніону чи катіону, до яких входить азот, може відбуватися підкиснення або залужнення поживного середовища, що обов'язково позначиться на обміні речовин мікроорганізму. Підтримання рН на певному рівні і вплив цього параметра на життєдіяльність мікроорганізма вивчається і встановлюється експериментально.

Недостатня масова частка азоту у середовищі призводить до “ожиріння” клітин, тобто підвищення вмісту ліпідів за рахунок зменшення білкової і амінокислотної фракцій. Це має негативне значення на виробництвах, де одержують білкову біомасу.

**Джерела фосфору.** Фосфор вноситься у середовище у вигляді солей фосфорної кислоти з різними субстратами природного походження – відварами рослинних тканин, борошном, кукурудзяним екстрактом і т.д., рідше з органічними сполуками (наприклад фітином).

Фосфор – важливий елемент у поживному середовищі. Він входить до складу АТФ, АДФ, АМФ і забезпечує нормальне протікання енергетичного обміну у клітині, а також найважливіших біосинтетичних процесів, таких як синтез білків, нуклеїнових перетворень. Вміст фосфору у біомасі та швидкість росту культури особливо у початковій фазі в значній мірі залежать від концентрації фосфору у поживному середовищі.

### **Джерела вітамінів та мікроелементів.**

В залежності від потреби у цих сполуках мікроорганізми ділять на два типи:

- ауксоавтотрофи (не потребують введення до середовища вітамінів і синтезують їх самостійно)
- ауксогетеротрофи (нездатні синтезувати ряд вітамінів і потребують введення їх до складу середовища).

Якщо продуцент – ауксотрофний мікроорганізм, то введення навіть невеликої масової долі вітамінів помітно прискорює їх ріст та розвиток. На жаль багато продуцентів є ауксогетеротрофами.

Наприклад, для культивування дріжджів, які використовуються як продуценти білкових речовин та ліпідів, необхідні водорозчинні комплекси вітамінів групи В, до складу яких входять тіамін, нікотинова кислота, пантотенова кислота, пиридоксин, інозит і біотин.

Потреба мікроорганізмів у вітамінах встановлюється експериментально, конкретно для кожного штама. Як правило, недостачі вітамінів у поживних середовищах нема, так як вони вводяться разом з рослинними субстратами, котрі являються одночасно основним джерелом вуглецю у поживному середовищі. В різних видах рослинної сировини, яке використовують у виробництві білкових речовин, амінокислот, ліпідів, масова частка вітамінів у мг/100г складає:

Біотин	– 0,0034 – 0,0061
Пантотенова кислота	– 0,06 – 0,22
Інозит	- 89 - 120
Тіамін	- 0,18 – 0,25
Пиридоксин	- 0,29 – 0,46
Нікотинамід	- 5,0 - 5,15

Цієї кількості вітамінів достатньо для більшості мікроорганізмів і тільки в особливих випадках доводиться додавати до поживних середовищ автолізати мікробних біомас, кукурудзяний екстракт і т.п.

Макро- і мікроелементи обов'язково мають входити до складу поживних середовищ. Більшість йонів металів входять до складу активного центру ферментів, забезпечують обмін речовин мікроорганізмів. Ферменти, які містять метали активізують процеси дихання, окисновідновні реакції, синтез амінокислот, жирних кислот, сахаридів, нуклеотидів, піримідинових основ, регулюють утворення складних молекул білків, глікогену, нуклеїнових кислот.

Найбільший вплив на ріст і розвиток мікроорганізмів виявляють йони заліза, міді, марганцю, цинку, бора, молібдена та інших металів. Якщо ці ж речовини знаходяться у поживному середовищі у надмірних дозах, чим це необхідно для їх розвитку, то впливають як інгібітори. Подавляє ріст мікроорганізмів, присутність навіть у мільйонних частках, ртуть, хлор, формальдегід, кадмій, мідь, двоокис сірки, фенол.

Таким чином, для забезпечення процесу культивування мікроорганізмів необхідно мати у складі поживного середовища у певному співвідношенні джерела вуглецю, азота, фосфора, вітамінів, макро- і мікроелементів. Склад поживного середовища для кожного продуцента встановлюється експериментально.

## **ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНИХ СЕРЕДОВИЩ**

### **Лабораторна робота № 4**

#### **Ебуліостатичний метод визначення редуруючих речовин Нізовкіна та Ємельянової**

#### **Загальні відомості**

Дріжджі, порівняно з іншими мікроорганізмами, відіграють значну роль у харчовій промисловості. З давніх часів дріжджі використовувались у заквасках для одержання хліба та кисломолочних продуктів, при виготовленні пива, сидра, виноградних і ягідних вин, спирту та міцних напоїв. Із дріжджів одержують ліпіди та полісахариди, вітаміни, органічні кислоти та ферменти, окремі амінокислоти. Дріжджові препарати знаходять застосування в медицині, фармакології, як кормова добавка у раціонах тварин.

Стандартні поживні середовища використовують з метою найбільш повного обліку та виділення більшості видів дріжджів. Найчастіше як повноцінне середовище для вирощування дріжджів, використовується солодове сусло. До його складу входять глюкоза, фруктоза, сахароза, мальтоза, мальтотриоза і мальтотетроза а також невелика кількість пентоз: арабіноза, ксилоза, рибоза, азотні компо-



ненти складають 6-7% сухих речовин (СР) , серед них амонійного азоту 2,18-2,44мг на 100см<sup>3</sup>.

У суслі є амінокислоти, всі основні вітаміни групи В і мінеральні речовини. Сусло одержують з пивоварних заводів неохмелене, після фільтрації. Його розводять водопровідною водою до концентрації 6-8% СР.

### **Матеріали та реактиви:**

Ячмінний солод, 10%-ний КОН , 1%-ний розчин йоду, колби, термометри, водяна баня, вата, марля.

### **Хід роботи**

Для приготування сусла у лабораторних умовах використовують ячмінний солод крупного помолу. В 1л води вносять 250г солоду і нагрівають до 50<sup>0</sup>С, через 30хв температуру підвищують до55<sup>0</sup>С, а ще через 30хв поступово підіймають до 62,5-63<sup>0</sup>С і не знижують до кінця реакції на крохмаль(йодна проба) . одержане сусло відділяють від дробини шляхом фільтрації через марлю і вату , розводять водою до необхідної концентрації , розливають у колби і стерилізують при 112<sup>0</sup>С 30хв . якщо рН нижче 5,5 то сусло підлужають 10%-ним розчином NaOH або їдкого калію до рН 5,6-6,0.

Сусло очищують від домішок кизельгуром, або відстоюванням у холодильнику і фільтрацією. Для приготування густих середовищ до сусла перед стерелізацією додають 2% агара або 20%желатину.

Сусло-агар можна приготувати з сухого солодового екстрату. 20г порошка розчиняють в 400см<sup>3</sup> гарячої дистильованої води , яка містить 12г агара і стерелізують при 121<sup>0</sup>С 15хв.

Як синтетичне середовище найчастіше для дріжджів використовують агар Сабуро , наступного складу (в г 1л водопровідної води):

Глюкоза	20,0	MgSO <sub>4</sub>	0.5
(NH <sub>4</sub> )	5.0	NaCl	0.1
KN <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.85	CaCl <sub>2</sub>	0.1
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.15	агар	20,0

Для забезпечення факторами росту до цих середовищ додають дріжджовий (0,2%) і м'ясний (0,3%) екстракти та виноградний сік (3%).

## **КУЛЬТИВУВАННЯ МІКРООРГАНІЗМІВ**

Центральна стадія кожного біотехнологічного виробництва – **культивування** мікроорганізмів на поживних середовищах відбувається за двома принципово

різними, з технологічної точки зору, способами – глибинним та поверхневим. Спосіб культивування та апаратурне оформлення процесу залежить від цільового продукту та фізіологічних особливостей біологічно діючого джерела.

### **Глибинне культивування**

Глибинний спосіб культивування полягає у вирощуванні мікроорганізмів в рідкому поживному середовищі. Він технічно більш довершений ніж поверхневий, оскільки легко піддається механізації та автоматизації.

Весь процес відбувається в строго асептичних умовах. Технологічні схеми при глибинному культивуванні майже не відрізняються одна від одної, незалежно від складу середовища і продуцента (рис.2.)

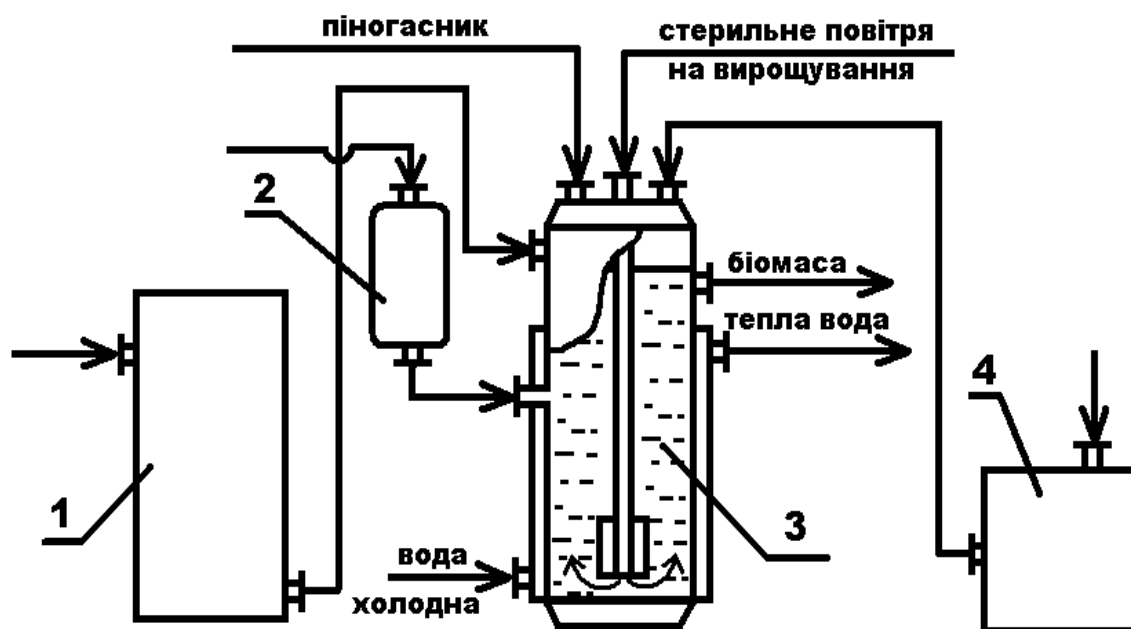


Рис.2-Принципова технологічна схема культивування мікроорганізмів глибинним способом: 1 - збірник субстрату; 2 - малий ферментер (чиста культура); 3 - головний біореактор; 4 - збірник розчину допоміжних речовин.

**Одержання посівного матеріалу.** Для засіву поживного середовища посівний матеріал готують також глибинним способом, як правило поступово підвищуючи масову частку продуцента за схемою:



Об'єм посівного матеріалу залежить від фізіологічних особливостей продуцента. Він різко зростає до 5-20 %, якщо продуцент розмножується тільки вегетативно, і скорочується до 1 %, якщо проходить активне спороношення. Загальний об'єм посівного інокулятора складає до 10% від об'єму головного ферментера.

Суттєвий вплив на хід культивування має вік посівного матеріалу. При використанні надто молодого культури процес затягується, а стара призводить до нерациональної асиміляції субстрату. Приклад такого впливу на продукування ферментів культурою *Asp. oryzae* 8F<sub>1</sub> показано на рис. 3.

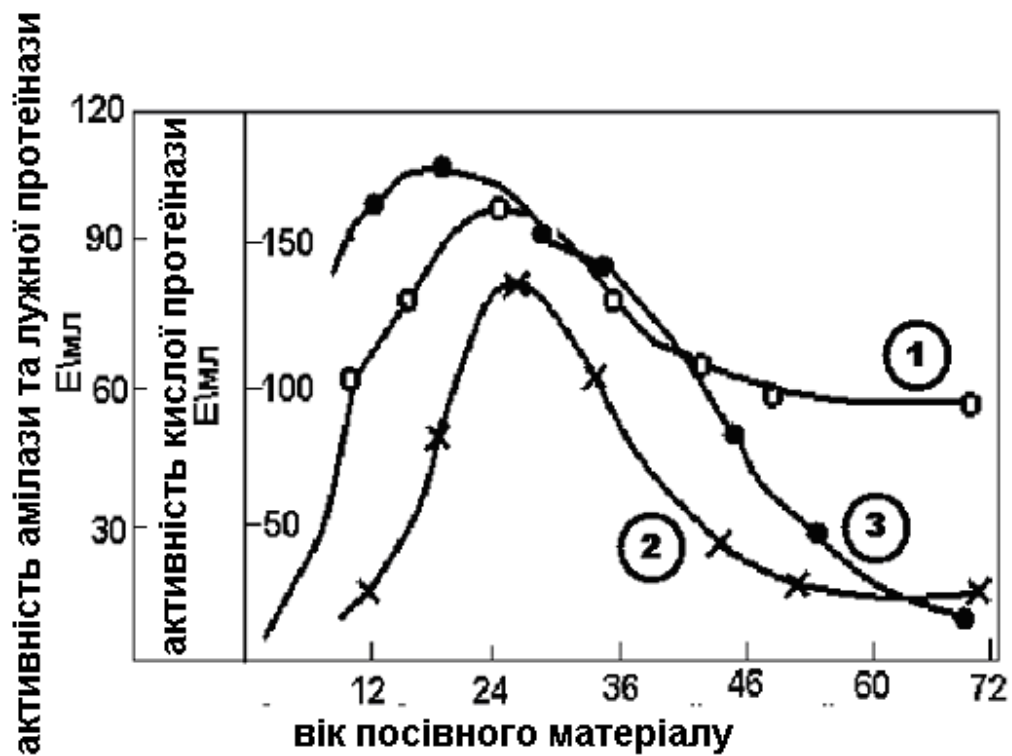


Рис.3 - Вплив віку посівного матеріалу на біосинтез ферментів при глибинному культивуванні *Asp. oryzae* 8F<sub>1</sub> (5% посівного матеріалу): 1-амілаза; 2 – основна протеїназа; 3- кисла протеїназа.

**Стерилізація поживних середовищ** для глибинного культивування відбувається двома способами – відділенням мікроорганізмів від середовища або знищенням їх безпосередньо у середовищі. Перспективнішим є перший спосіб, оскільки під час другого способу (стерилізація за допомогою високої температури) згубний фактор впливає одночасно і на компоненти поживного середовища.

Перший спосіб стерилізації проводять за допомогою напівпроникних мембран у процесі мікрофільтрації.

Поживні середовища можуть стерилізуватись у головному ферментері, де вони нагріваються до температури стерилізації, витримуються при цій температурі певний час і охолоджуються до температури культивування. Або ж у нагрівальній колонці (див.рис.1.) гострою парою нагріваються до 120-140°C, певний час перебувають в витримувачі, холодильнику і вже тоді подаються у головний ферментер через апарати і комунікації, які попередньо простерилізовані текучою парою. У лабораторних умовах поживні середовища стерилізують у автоклавах. Окремо від середовища, стерилізують піногасник та усі корегуючі розчини.

### ***Очистка повітря до і після аерації***

Атмосферне повітря, яке подається на стадії культивування у головний ферментер містить частинки пилу органічної та неорганічної природи, краплини води та мікроорганізми до  $10^9$  часток на  $1\text{м}^3$ . Його стерильність досягається фільтруванням через об'ємні волокнисті фільтри. Іноді необхідна подвійна очистка. При культивуванні ферментних препаратів, повітря проходить очистку ще раз на індивідуальних фільтрах безпосередньо перед введенням у посівні та головні ферментери.

Щоб не забруднювати навколишнє середовище мікроорганізмами які культивуються, на труби, які відводять газовий потік від головного ферментера встановлюють фільтри або системи фільтрів.

### ***Особливості росту і розвитку мікроорганізмів***

При глибинному культивуванні мікроорганізмів розрізняють два способи ведення цього процесу: періодичний і безперервний. При періодичному способі культивування поживне середовище засівається посівною культурою продуцента, де, при певних умовах, мікроорганізми проходять через всі стадії росту і розвитку популяції. Коли процес культивування закінчується, то ферментер звільняють і цикл повторюється. Такий спосіб називають "закритою системою", оскільки компоненти поживного середовища не вводяться під час вирощування культури у ферментер і не виводяться з нього. Швидкість росту біомаси завжди знижується до нуля або через відсутність компонентів поживного середовища, або через накопичення продуктів метаболізу.

При періодичному способі глибинного культивування популяція – мікроорганізмів проходить 7 стадій (фаз) росту рис.4. Іноді криву росту числа клітин  $N$  дають у логарифмічній залежності від часу  $\lg N=f(i)$

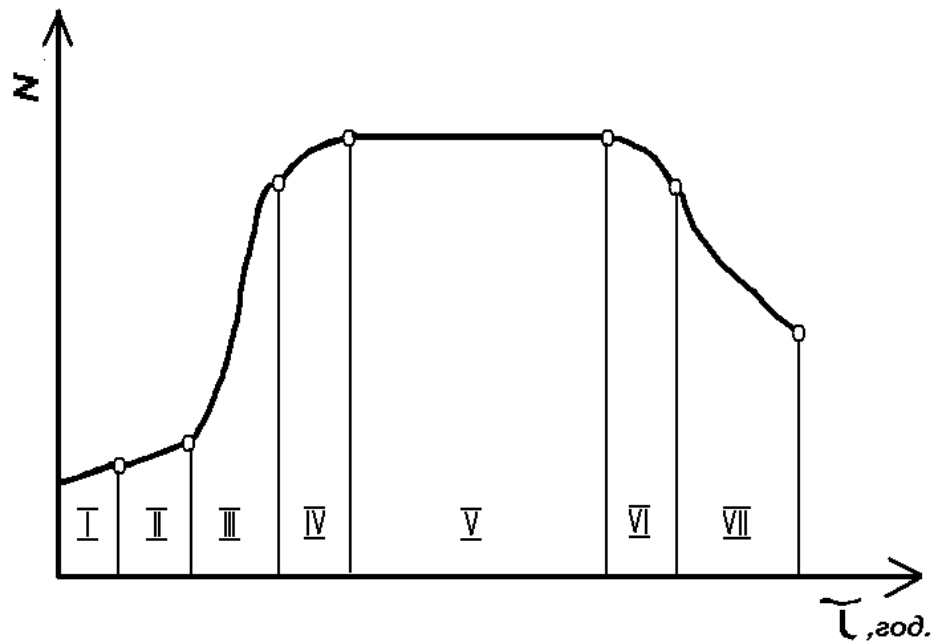


Рис.4 - Крива росту мікроорганізмів

I фазу називають лаг-фазою, або фазою адаптації культури до середовища. Час адаптації залежить від фізіологічних особливостей організму, складу поживного середовища та умов культивування.

II – фаза прискорення росту, характеризується початком поділу клітин, збільшенням загальної маси популяції, підвищенням швидкості росту.

III – фаза найбільш активного росту числа клітин. III називають експоненціальною фазою, або логарифмічною. Середовище починає збіднюватись внаслідок катаболічних і анаболічних процесів клітин. Деякі метаболіти можуть пригнічувати ріст культури – продуцента. Виникає і просторова пригніченість. Клітини заважають одна одній, зменшується поверхня їх контакту з поживним середовищем. Швидкість росту знижується й наступає IV фаза.

IV – фаза пригнічення росту.

V – фаза стаціонарного росту. Маса і кількість усіх живих клітин досягають свого максимуму. У якийсь момент ця рівновага порушується кількість відмерлих клітин стає більшою за кількість нових, наступає VI – фаза прискорення відмирання.

VII – фаза відмирання, характеризується відмиранням і автолізом мікроорганізмів. Маса живих клітин значно зменшується.

Якщо на виробництві поставлена мета одержання біомаси, то при періодичному вирощуванні доцільно вести процес до переходу росту культури у стаціонарну фазу. Якщо одержують продукт метаболізму, то кінець процесу визначається екстремумом у накопиченні потрібного метаболіта, а він може співпадати з логарифмічною фазою, стаціонарною фазою або з фазою відмирання.

При безперервному способі вирощування культура підтримується постійно у відповідній фазі росту. Якщо метою виробництва є одержання біомаси продуцента, процес ведуть у логарифмічній фазі, коли мікроорганізм здатен забезпечити максимальну швидкість росту популяції. Такий процес може відбуватися у одному апараті, за умови постійного притоку збалансованого за складом середовища і відтоку готової культури. При встановленні такого режиму на протязі всього часу культивування параметри процесу підтримуються постійними.

Якщо ж метою культивування мікроорганізмів є одержання метаболитів, вихід якого у середовище або накопичення всередині клітини не співпадає з логарифмічною фазою росту, то використовується безперервний спосіб вирощування у двох або кількох послідовно з'єднаних апаратах, що дозволяє розділити процес на кілька стадій. При такому способі безперервного культивування в перший апарат подається поживне середовище, а тільки із останнього відбирається готовий продукт. У кожному з апаратів параметри процесу будуть постійними, але будуть відрізнятися з переходом із апарату в апарат.

Культивування мікроорганізмів в значній мірі залежить від параметрів ведення процесу – температури, рН середовища, концентрації основного компонента середовища рослинних та мінеральних речовин.

Високі концентрації поживних речовин на перших етапах можуть затримувати ріст біомаси продуцента. Тому часто свіже поживне середовище, або деякі його компоненти, вводять у ферментер поступово у фазі активного росту. Це можна проілюструвати біосинтезом  $\beta$ -глюконази продуцентом *Bac. Subtilis* – 402 (рис.5.)

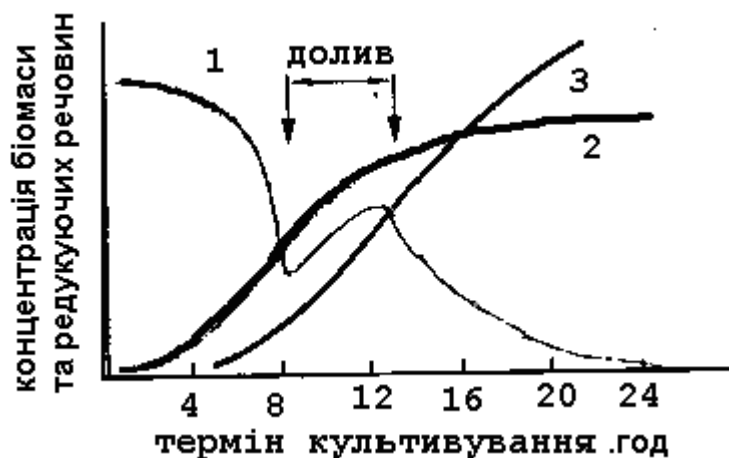


Рис.5 - Накопичення  $\beta$ -глюконази і асиміляція субстрату *Bac. Subtilis*

Зміни та коливання температури і рН середовища можуть не тільки позначатися на швидкості накопичення біомаси продуцентів, а й їх метаболитів – ферментів, органічних кислот, окремих амінокислот тощо. Глибинне культивування відбувається у трифазній системі:

рідина – тверда фаза (клітини) – газ. В такій системі ускладнюються процеси масообміну, тому на біотехнологічних виробництвах культивування відбувається в герметичних циліндричних апаратах з еліптичними кришками та дном об'ємом від 100 до 250 м<sup>3</sup> з нержавіючої сталі. Обов'язковими елементами будь-якого ферментера є перемішуючі та аеруючі пристрої.

## Лабораторна робота №6

### Вирощування молочнокислих мікроорганізмів

#### Загальні відомості

Прикладом глибинного методу культивування є культивування молочнокислих мікроорганізмів, пробіотичні властивості яких дуже широко використовуються для виробництва продуктів функціонального та оздоровчого профілактичного призначення.

Пробіотичні кисломолочні продукти при систематичному споживанні у адекватних кількостях мають здатність підсилювати імунітет, оптимізувати кишечну мікрофлору, проявляють антимікробний ефект до патогенних мікробів, проявляють виражений лікувально-профілактичний ефект при виразковій хворобі шлунку, етіологічно пов'язаній з *Helico bacter pylori*, запобігають розвитку карієсу, зумовленого впливом гнилісних бактерій.

Для виготовлення кисломолочних продуктів на основі молока, які мають пробіотичний ефект, використовують переважно штами, які належать до роду *Lactobacillys*, *Bifidobacterium* і *Enterococcus*.

Ферментні системи цих мікроорганізмів розщиплюють білки натурального молока до більш дрібних фрагментів і накопичують вільні амінокислоти (метіонін, лізин, лейцин, треонін, фенілаланін).

У продуктах отриманих за допомогою ферментації молока (йогурти, кефіри, сир та вироби з сиру, напої із сироватки та пахти, заморожені десерти та ін.) знаходяться не тільки живі бактерії, а і їх метаболіти - молочна кислота та інші органічні сполуки.

Перетворення цукру молочнокислими бактеріями до (переважно) молочної кислоти дістало назву молочнокислого бродіння. Збудники цього процесу – молочнокислі бактерії – дуже поширені в природі. Їх можна знайти скрізь: у повітрі, воді, ґрунті, на поверхні овочів, фруктів, і насамперед, у молоці, кишечнику людини і тварин тощо.

Молочнокислі бактерії мають кулясту і паличкоподібну форми, не утворюють спор, нерухливі, грам позитивні, факультативні анаероби. За характером бродіння їх поділяють на дві групи: гомоферментативні, що утворюють тільки

молочну кислоту та гетероферментативні, які утворюють низку інших продуктів: оцтову і янтарну кислоти, спирт, CO<sub>2</sub> тощо. Сумарне рівняння гомоферментативного бродіння має такий вигляд:



Загальну схему гетероферментативного молочнокислого бродіння можна подати таким сумарним рівнянням:



Молочнокисле бродіння є основною таких важливих виробництв, як переробка молока на кисломолочні продукти, сир і масло, випікання кислого чорного хліба, квашення овочів, силосування кормів, виготовлення деяких сортів ковбас тощо.

**Матеріали та обладнання:** 1) молоко пастеризоване ; 2) огірковий розсіл; 3) 5 % -й розчин KMnO<sub>4</sub>; 4) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 5) аміачний розчин AgNO<sub>3</sub>; 6) 1 % -й розчин фенолу; 7) FeCl<sub>3</sub>; 8) фільтрувальний папір. Інше обладнання; 9) пробірки; 10) ватні пробки; 11) чисті культури молочно-кислих бактерій.

**Проведення роботи.** Для вивчення молочнокислого бродіння найкраще використовувати молоко, молочнокислі продукти, огірковий або капустианий розсіл. Щоб провести дослід з молоком треба спочатку визначити його вихідну кислотність. Для цього в конічну колбу об'ємом 50-100 см<sup>3</sup> наливають 10 см<sup>3</sup> молока, додають 20 см<sup>3</sup> дистильованої води і титрують 0,1 н розчином NaOH у присутності індикатора фенолфталеїну до появи рожевого забарвлення. Кислотність визначають у градусах Тернера (умовна одиниця, яка відповідає масовій частці 0,1 н NaOH у см<sup>3</sup>, витраченого на нейтралізацію 100 см<sup>3</sup> молока).

**Приклад.** На титрування 10 см<sup>3</sup> молока пішло 4 см<sup>3</sup> 0,1 н розчину NaOH. У цьому випадку вихідна кислотність молока в градусах Тернера становитиме

4 см<sup>3</sup> NaOH – 10 см<sup>3</sup> молока,

$$x = 4 \times 100/10 = 40^\circ \text{ Тернера.}$$

x см<sup>3</sup> NaOH – 100 см<sup>3</sup> молока,

Кислотність свіжого молока не повинна перевищувати 22.

Після визначення кислотності пастеризоване молоко розливають по 10 см<sup>3</sup> у 7 пробірок. У першій пробірці молоко кип'ятять, а в інші вносять по 2-3 петлі музейної культури молочнокислих бактерій. Колби закривають ватою ставлять у термостат при температурі 30<sup>0</sup> С на 7 діб. Через кожну добу виймають з термостата по 1 пробірці і зберігають під морозильною камерою у холодильнику. Через тиждень виймають останню, всі пробірки вивчають і записують спостереження.

У кип'яченому молоці бродіння не відбувається, тому що внаслідок кип'ятіння молочнокислі бактерії вбиті, а залишилися тільки спори маслянокислих ба-



ктерій, що витримали температуру кипіння. За час інкубації ці спори проростають, відбувається маслянокисле бродіння і утворюється масляна кислота. Остання також реагує з казеїнатом кальцію, в результаті чого випадає казеїнова кислота, що піддається процесу пептонізації з утворенням неприємного запаху масляної кислоти.

У кожній з 6 пробірок підраховують кількість молочно-кислих бактерій.

**Метод підрахунку клітин у камері.** Для визначення числа мікроорганізмів використовують рахункові камери різних систем: Тома-Цейса, Бюркера, Горяєва, Предтеченського, Резенталя.

Рахункова камера Горяєва- це товсте предметне скло, розділене чотирма прорізами на три поперечно розташовані площадки. Центральна площадка подовжнім прорізом поділяється навпіл. На кожній половинці вигравірувана сітка. Бічні площадки розташовані на 0,1 мм вище центральної (глибина камери) і служать для притирання покривного скла.

Сітка камери Горяєва розділена на 225 великих квадратів (15 рядів по 15 квадратів у ряді). Площа великого квадрата дорівнює  $1/25 \text{ мм}^2$  і розділена на 16 малих квадратів. Сторона малого квадрата дорівнює  $1/20 \text{ мм}$ , площа- $1/400 \text{ мм}^2$ , об'єм при глибині  $1/10 \text{ мм}$ - $1/4000 \text{ мм}^3$ . Частина великих квадратів розграфлена вертикально і горизонтально, а частина не розграфлена (рис.6).

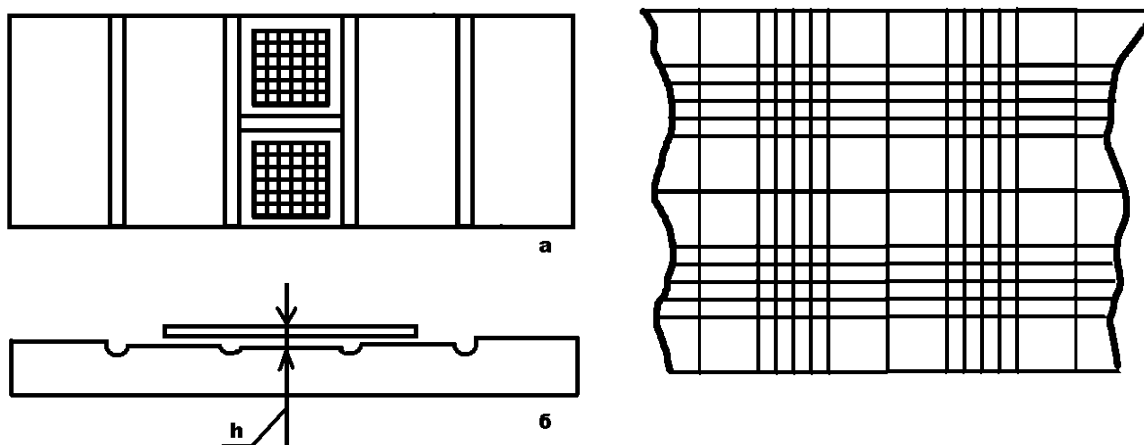


Рис.6 - Камера Горяєва

Камеру і спеціальне шліфоване покривне скло добре промивають і просушують. На поверхню сіток наносять по невеликій крапельці приготованого розведення і накривають покривним склом. Рідина під покривним склом повинна розтікатися по всій сітці рівномірно, без пухирців. Для того, щоб об'єм рідини точно відповідав розрахунковому об'єму камери, покривне скло притирають до бічних площадок камери до появи так званих Ньютонових кілець. Можна спочатку притерти покривне скло, потім за допомогою піпетки заповнити камеру суспензією мікроорганізмів. Підрахунок клітин роблять через 3-5 хв після заповнення каме-

ри, щоб клітини осіли і були видні в одній площині. Рухливі форми мікроорганізмів перед нанесенням на сітку варто убити нагріванням чи додати 0,5% формаліну.

Камеру розміщують на предметному столику мікроскопа і розглядають спочатку під об'єктивом 8х, потім 40х. Клітини підраховують у 5 (можна 10) великих квадратах по кутах сітки й у центрі. Враховують усі клітини, що знаходяться всередині квадрата і межових лініях, якщо вони більше чим наполовину лежать усередині квадрата. Клітини пересічені межевою лінією навпіл, рахують тільки на двох з чотирьох сторін квадрата; клітини, розташовані поза квадратом, не враховують.

Число клітин у 1 см<sup>3</sup>

$$x = (\alpha \cdot 4000 \text{ b/c}) \cdot 1000$$

де –  $\alpha$  – сума клітин, підрахована в 5 (чи 10) великих квадратах сітки;  $b$  – розведення вихідного субстрату;  $c$  – кількість малих квадратів, у яких виконувався підрахунок.

Число молочно-кислих від 10<sup>5</sup> до 10<sup>7</sup> клітин в 1 см<sup>3</sup>.

Після підрахунку клітин будують графік залежності “час вирощування – кількість клітин”.

Число дріжджових клітин у 1 см<sup>3</sup> поживного середовища може коливатися в межах від 90 до 120 млн.

У рідкій дріжджовій заквасці повинно міститися (у млн/г): дріжджів 200-240, молочнокислих бактерій 215-220.

Для мікроскопічного вивчення молочнокислих бактерій виготовляють препарати з кислого молока. На стерильне предметне скло бактеріологічною петлею або Пастерівською піпеткою наносять молочну сироватку. Виготовлений мазок висушують і фіксують сумішшю спирту з ефіром (1:1). Цю суміш доцільно наносити кілька разів і витримувати протягом 1 хв. При такій фіксації не тільки вбиваються і прикріплюються до скла бактерії, але й водночас, що дуже важливо, видаляється жир, який заважає мікроскопуванню бактерій. Потім препарат фарбують метиленовим синім або карболовим фуксином протягом 2-3 хв., промивають дистильованою водою, висушують і вивчають під мікроскопом з імерсійною системою.

На препаратах виявляють молочні стрептококи *Streptococcus lactis*, довгі паличкоподібні бактерії *Lactobacillus bulgaricus*, *L. Acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum*. Якщо препарат виготовлений з плівки, що утворилася на поверхні молока або огіркового розсолу, то на ньому добре видно великі клітини молочної цвілі *Oidium lactis* (рис. 7.). Замальовують препарати. Записують морфологічні ознаки.

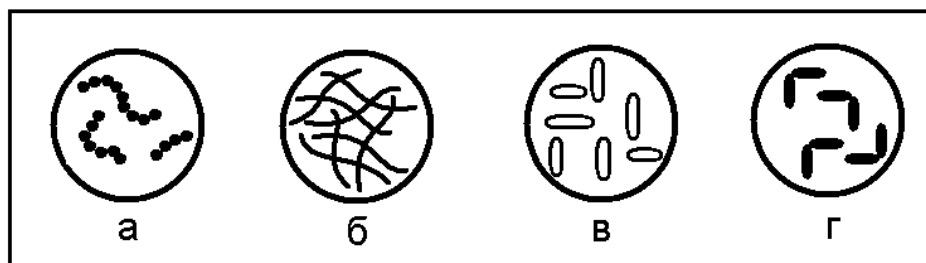


Рис.7- збудники молочнокислого бродіння

У фільтраті кожної з 6 пробірок (згусток фільтрують через паперові фільтри) визначають кислотність. Для цього 5 мл фільтрату титрують 0,1Н NaOH у прис. 0,1% - ного розчину фенолфталеїну. Розраховують кислотність молока у градусах Тарнера. Будують графік у системі координат “час вирощування – кислотність”

Присутність молочної кислоти виявляють за допомогою реакції з тіофеном. Для цього вносять у пробірку 2 см<sup>3</sup> фільтрату молочнокислого продукту, додають 5 см<sup>3</sup> концентрованої сірчаної кислоти і 0,5 см<sup>3</sup> насиченого розчину сульфїту міді. Суміш збовтують і нагрівають на водяній бані 5 хв. При температурі 100<sup>0</sup> С. Після цього суміш охолоджують і додають кілька крапель 0,2 % - го спиртового розчину тіофену. При наявності у фільтраті молочної кислоти виникає вишнево-червоне забарвлення.

## Лабораторна робота №7

### Культивування дріжджових клітин на солодовому суслі

#### Загальні відомості

Дріжджі належать до факультативних анаеробів. Широкий спектр фізіологічних, біологічних і біохімічних особливостей дозволяють використовувати ці мікроорганізми у багатьох біотехнологічних виробництвах вина, спирту, пива, кормових дріжджів, біологічно - активних сполук, хлібопекарстві та інших галузях. Культивування може відбуватися як глибинним так і поверхневим способом. Як приклад глибинного вирощування дріжджів *Sacharomycetes cerevisial* можна розглянути у лабораторних умовах накопичення дріжджової біомаси на солодовому суслі. У цій же роботі, студент знайомиться з методами виділення біомаси – центрифугуванням та фільтрацією.

**Матеріали та обладнання:**Пробірки, колби, лабораторна центрифуга, термостат, солодове сусло, ватні пробки, лабораторні аналітичні ваги, фільтрувальний папір, засівна музейна культура дріжджів.

### **Хід роботи**

У 7 пробірок вносять по 10 см<sup>3</sup> стерильного солодового сусла. Пробірки нумерують і у 6 з них вносять засівну музейну культуру дріжджів (по 2-3 петлі). У 7 пробірку – культуру не вносять. Пробірки закривають ватними пробками і кладуть у термостат, де виставлена  $t = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Через кожну добу виймають по одній пробірці і кладуть у холодильник. Через тиждень, на слідуючому лабораторному занятті виймають останню, всі пробірки оглядають, роблять запис огляду. Вміст пробірок переносять у центрифужні пробірки і відокремлюють біомасу від культуральної рідини при обертах центрифуги 5000 об/хв. на протязі 10 хв. Змивають надосадову рідину, а біомасу зважують спочатку на лабораторних, а потім на аналітичних вагах. Інженери надають для цього 6 абсолютно – сухих бюксів з відомою вагою. Після зважування біомаси будують графік у координатах "біомаса – час вирощування". Роблять висновок про хід та фази глибинного культивування.

Біомасу можна відділити від культуральної рідини фільтруванням через паперовий фільтр. Паперові фільтри готують інженери, та надають для роботи (фільтри абсолютно сухі з відомою вагою). Фільтрують культуральну рідину 6 пробірок з внесеною засівною культурою у однакових умовах за часом фільтрування (20 хв.) і зважують на лабораторних вагах. Будують такий же графік і роблять висновок.

### **Поверхнєве культивування мікроорганізмів**

При поверхневому культивуванні культура росте на поверхні зволоженого поживного середовища. Міцелій повністю обплутує та скріплює тверді часточки середовища. Клітина продуцента отримує енергію за рахунок компонентів, які містяться в поживному середовищі і для дихання використовує кисень. Для нормального забезпечення подібних середовищ киснем доводиться використовувати рихлі за своєю структурою, середовища з невеликою товщиною шару. Це призводить до необхідності мати велику поверхню контакту рихлого середовища з повітрям і, при відсутності механізації, надає всьому процесу неінтенсивний характер, вимагає великих затрат ручної праці.

Вирощування в умовах виробництва відбувається, як правило, в неасептичних умовах. Однак, як поживне середовище, так і кювети (спеціалізовані лотки для вирощування) мають бути надійно простерилізовані.

Поверхневий метод має і переваги:

- більш висока концентрація продуцента на одиницю маси середовища;
- потребує менших затрат електроенергії.

**Посівний матеріал** . Вихідну музейну культуру, яка знаходиться на щільному поживному середовищі пересівають спочатку на 1-1,5 г зволжених стерильних висівок у пробірку. Вирощування проводять у термостаті до рясного спороутворювання. Другий етап відбувається на тому ж середовищі і при тих же умовах, але в колбах, які містять до 100г рихлого середовища.. На третьому етапі також у колбах, але вже на 500г середовища.

На останньому, четвертому, вирощування ведуть у посівних кюветах, якщо матеріал потрібен у вигляді культури, або відділяють від конідій основну масу міцелію і субстрату на спеціальному вібросепараторі.

Можна продовжити термін зберігання посівного матеріалу, якщо спороносна культуру підсушити до вологості 10-12% і зберігати у спеціальній тарі.

**Приготування поживних середовищ**. Основою майже усіх твердих середовищ є пшеничні висівки. Для підвищення вмісту білків до висівок додають буряковий жом, як джерело пектину та целюлози, соєвий шрот, як джерело білків, соєве борошно для індукції ліпази, пивну дробину та інші матеріали.

Додаткове введення до висівок рослинних відходів - вівсяних або рисових лусочок, соломи, кукурудзяних осередків покращують структуру середовища і полегшують доступ повітря.

**Стерилізація поживних середовищ і засів**. Поживні середовища готують в спеціальних апаратах або безпосередньо в стерилізаторі. Спочатку змішують необхідні компоненти, потім зволожують, підкислюють соляною кислотою, додають мінеральні джерела азоту і фосфору.

Стерилізацію ведуть гострою парою в циліндричних апаратах при постійному перемішуванні. Час витримки середовища при температурі стерилізації (105-140<sup>0</sup>С) більший ніж для рідин, так як важко забезпечити повне прогрівання. Тривалість стерилізації складає 60-90 хв.

Основним елементом у стерилізаторах є перемішувачий пристрій (мішалки, шнеки, конвейери, лопатки), які активно перемішують матеріал всередині стерилізатора (рис.8)

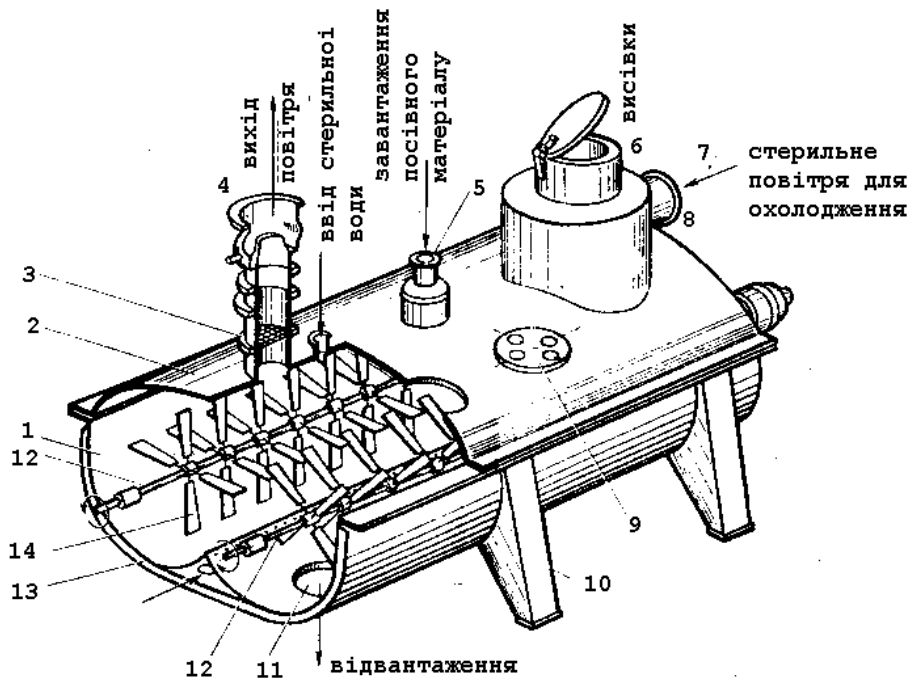


Рис.8 - Стерилізатор твердого сипучого середовища з мішалкою:

1-корпус; 2-кришка; 3-затримуюча сітка; 4-штуцер виводу відпрацьованого повітря; 5-штуцер завантаження посівного матеріалу; 6-люк для завантаження висівок; 7-штуцер вводу повітря для охолодження; 8-торцева кришка; 9-люк; 10-опора; 11-штуцер відвантаження; 12-вал мішалки; 13-нагрівальна рубашка; 14-лопасті.

При стерилізації середовища охолоджується до 38-40<sup>0</sup>С і в апарат вводиться посівна культура – продуцента 0.5-1% від маси середовища, старанно перемішується.

Засіяна культура поступає із стерилізатора на спеціальний стіл і рівномірним шаром (вручну) на кювети. Потім кювети встановлюють на етажерки, які відразу ж виставляються у спеціальні камери для вирощування.

**Культивування.** Процес культивування, наприклад грибної поверхневої культури, триває 36-48 г. Весь цикл росту можна розділити на три періоди:

- на протязі перших 10-12 годин відбувається набухання конідій та їх пророщування; у цей період температура не повинна бути нижча 28<sup>0</sup>С;
- в наступні 14-18 годин відбувається швидкий ріст міцелію, його можна спостерігати у вигляді пухнастого нальоту сіро-білого кольору. Клітини споживають основну масу поживних речовин, енергійно дихають і виділяють велику кількість тепла, яке необхідно відводити;

- третій період триває 12-18 год. процеси обміну ослаблені, тепла виділяється менше, але утворення ферментів чи інших цільових продуктів ще проходить у більшості видів грибів-продуцентів, відбувається утворення конідій.

У різні періоди росту параметри розвитку культури відрізняються.

**Енергетика процесу поверхневого культивування.** Співвідношення розходів субстрату, який іде на конструктивний та енергетичний обмін, приблизно такий же, як і при глибинному культивуванні. Сумарне виділення тепла на протязі всього циклу рідко перевищує 4000-4200 кДж на 1 кг поживного середовища. На рис.9 представлена динаміка тепловиділення для деяких культур.



Рис.9 - Динаміка питомого тепловиділення у процесі поверхневого культивування плісневих грибів:

1 – *Asp. niger*; 2- *Asp. oryzae*; 3- *Asp. awamori*

**Вологість поживного середовища.** При низькій вологості мікроорганізми потрапляють у несприятливі умови та виявляють здатність до спороутворення, що і використовують під час одержання посівного матеріалу. Для продукування більшості ферментів оптимальною є вологість 55-70% . Надмірне зволоження може зруйнувати рихлу структуру середовища, у результаті чого знижується проникнення повітря, сповільнюється біосинтез.

Вище названі параметри і визначають режим аерації культури. Повітря необхідне аеробним продуцентам для конструктивного і енергетичного обміну, а крім того для відведення тепла, яке виділяється при культивуванні.

У другому періоді росту всередину ростильної камери подають до 60 об'ємів повітря на об'єм камери за 1 год., при цьому відносна вологість не має перевищувати 100%.

Повітря, яке подається у камеру використовується багаторазово, до 90% повертається на рециркуляцію, проходить через охолоджувач і використовується повторно. Відпрацьоване повітря очищується на фільтрах і викидається в атмосферу.

Вирощування культур поверхневим методом відбувається у кюветах, виготовлених із оцинкованої жести з перфорованим днищем. Їх розмір 600 x 800 x 30 мм, перфорація у вигляді щілин 2x20 мм. Загружені кювети розміщують на етажерках з великим нахилом через кожні 10-12 см. Багаторусні, рухомі етажерки встановлюють у камери для вирощування, які мають розміри 2x10x2 м. На кюветах кожної камери можна розмістити до 700 кг середовища. Собівартість продукції при такому вирощуванні дуже висока через велику частку ручної роботи.

Більш вигідним є спосіб вирощування у вертикальних касетах. Камера для вирощування розділена перфорованими перегородками між якими вкладається касети шириною 55x70 мм. Щілини між касетами виконують роль повітряних каналів. Товщина шару середовища збільшується у 2-2,5 рази (рис.10).

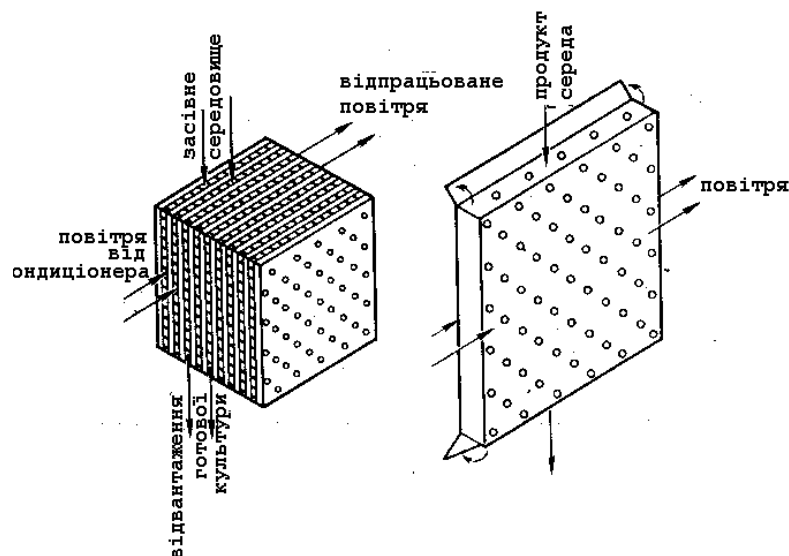


Рис.10 - Ростильна камера з вертикальними касетами

Для поверхневого культивування у виробничих умовах використовують також колонні апарати об'ємної аерації (рис.8).

Апарат розділений по висоті на секції перфорованими пластинами. Пластини закріплені на поворотних осях. Поживне середовище подається через загрузочний люк. Режим перегрузки середовища зверху до низу можна виконувати автоматично поворотом тарілок на 90°. Повітря подається під кожну секцію. Тепло відводиться за допомогою охолоджуючої води через кожух. Діаметр колони 3.2 м. У такій колоні можна вирощувати до 1 т культури за добу.



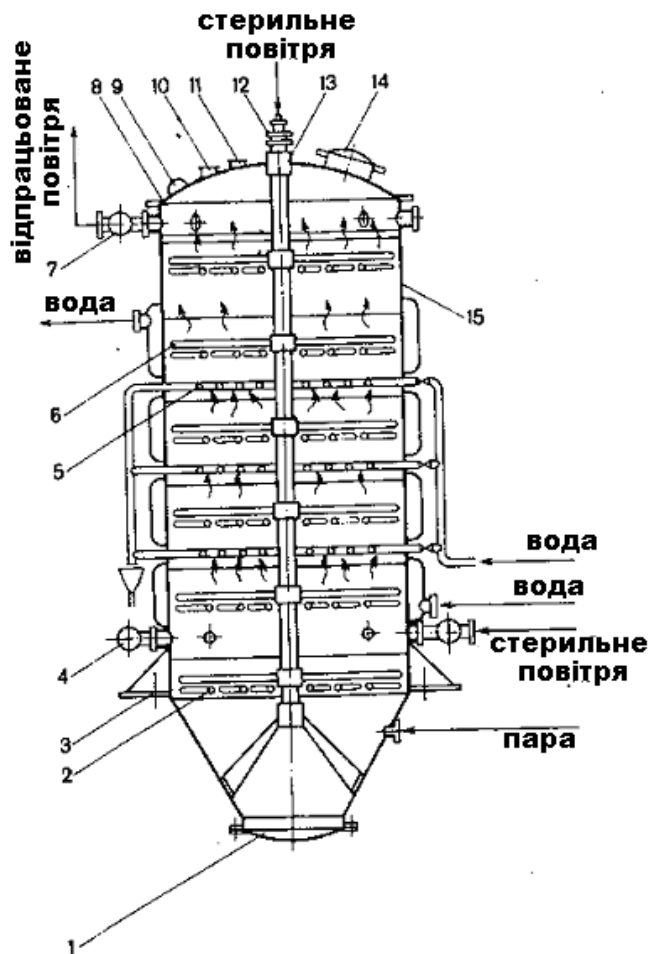


Рис. 11- Колонний апарат з об'ємною аерацією для вирощування поверхневої культури:

1-люк для відвантажування; 2-вал секції; 3-опора; 4- колектор підводу стерильного повітря; 5- охолоджуючий змійовик; 6-лопасті вала; 7-колектор відводу відпрацьованого повітря; 8-кришка; 9-манометр; 10-штуцер; 11-патрубок для повітря; 12-шестерня приводу вала; 13-вал; 14-люк для завантажування; 15-корпус.

### **Подрібнення та сушіння культури**

Вирощена у нерухомому шарі поживного середовища культура виглядає як корж із розбухлих часточок середовища, тісно зв'язаних між собою міцелієм. Тому, для подальшого використання, масу треба подрібнити до гранул розміром 5-6 мм. Цю операцію здійснюють за допомогою різних типів подрібнювачів: дезінтеграторів, барабанно-зубчатих, ударних, шпеккових і молоткових.

Культури з високою вологістю висушують до 10-12% разом з середовищем при температурі яка не перевищує 40<sup>0</sup>С. Потім подрібнюють і вже у такому вигляді упаковують в крафтмішки, на етикетці вказують назву препарату та активність (якщо це фермент). Якщо необхідно очистити культуру (а це трудоємкий і дорогий процес), то на виробництвах використовують різні технологічні стадії очистки препаратів, однак схема їх зводиться до:

- звільнення від розчинених речовин
- звільнення від супутніх речовин
- фракціонування, як правило, хроматографічними методами

Для цього застосовують екстракцію, фільтрування, кристалізацію, ультрафільтрацію, висаджування органічними розчинниками, висолювання, сорбційну очистку та інші фізико-хімічні методи. Дуже часто препарати які одержували таким чином, можуть втрачати до 10-12% активності.

У лабораторних умовах поверхнєве вирощування культур-продуцентів біологічно-активних сполуках відбувається у пробірках або колбах у термостаті.

## **Лабораторна робота № 8**

### **Поверхнєве культивування мікробних клітин**

#### **Загальні відомості**

Поверхнєвий спосіб вирощування мікроорганізмів з економічної точки зору менш вигідний ніж глибинний.

Одержання біоглобально-активних речовин (амінокислот, ферментів тощо) таким методом енерговитрат, використанням ручної праці. Однак потреба в цих речовинах обумовлює його існування у біотехнологічних виробництвах. Поверхнєве культивування передбачає утворення багатофазних культурально-субстрактних комплексів з твердими та сипучими поживними середовищами, з яких важко, з технологічної точки зору вилучити кінцевий продукт сорбент та структуроутворювач поживного середовища для культивування мікроорганізмів найчастіше використовують відходи переробки сільськогосподарських злакових рослин.

Біологічними агентами для такого середовища можуть виступати аеробні та факультативно-анаеробні мікроорганізми. Найчастіше використовуються у промислових масштабах мікроміцети, менш частіше бактерії.

#### **Матеріали та обладнання:**

Скляні колби об'ємом 250см<sup>3</sup>, солодове сусло, форфорові ступки, центрифуга, мікроскопи, скальця, мікробіологічні фарбники, фільтрувальний папір, кизельгур, водяна баня, термометри, марля.

Вирощування маточної та засівної культури дріжджів.

Готують поживне середовище для вирощування дріжджової культури. До 50г пшеничних або житніх висівок додають 20-30г солодового або іншого середовища суслу яке приготували на попередньому занятті. Для надання пористої структури додають 3-5г кизельгуру. Перемішують та переносять у дві скляні колби об'ємом 250см<sup>3</sup> прогрівають на киплячій водяній бані 20 хв. Після стереліза-

ції і охолодження до температури 30<sup>0</sup>С, у колби вносять маточну культуру дріжджів з розрахунку 1 % до загального об'єму середовища. Колби закривають марлевими пробками і ставлять на вирощування у термостат на 2-4 доби при температурі 30<sup>0</sup>С. Для стимуляції спороутворення.

На слідуючому занятті у колби наливають по 100см<sup>3</sup> теплої водопровідної води, подрібнюють шматочки утвореної маси за допомогою скляної палички, перемішують 5 хвилин потім фільтрують через складчатий паперовий фільтр у сухі склянки. Краплину фільтрату наносять на предметне скло. Готують препарат-мазок та забарвлюють за грамом. Вивчають морфологію клітини зі спорою. У 5 полях зору підраховують кількість спор та загальну кількість клітин. Розраховують відсоток дріжджових клітин зі спорою.

Враховуючи, що товарні свіжі дріжджі містять до кількох мільйонів клітин у 1г, розраховують масову частку клітин здатних до зберігання. Для порівняння студентам пропонують ознайомитися з морфологією дріжджових клітин, які зберігалися на сипучому поживному середовищі (кукурудзяна крупа) на протязі року. Пробу готують аналогічно. Готують препарат-мазок. Фарбують за грамом. Підраховують та порівнюють кількість спор. Роблять висновок .

## ДОСЛІДЖЕННЯ ГОТОВОЇ ПРОДУКЦІЇ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ВИРОБНИЦТВ

### Лабораторна робота №9

#### Визначення якісного складу пресованих дріжджів. *Sacharomyces cerevisiae*

##### Загальні відомості

Одним із завдань мікробіологічного контролю на біотехнологічних виробництвах є виявлення сторонніх та шкідливих мікроорганізмів, що інфікують сировину, напівфабрикати та готову продукцію. Регулярні мікробіологічні дослідження на протязі всього технологічного процесу дозволяють виявити джерело підвищеного обсіменіння та своєчасно їх знешкодити.

Оскільки визначення виду мікроорганізмів – складний і тривалий процес, то при вивченні якісного складу мікрофлори готової продукції зазвичай визначають характерні групи мікробів-шкідників, які розвиваються разом з мікроорганізмами – продуцентами, наприклад з дріжджами або молочнокислими бактеріями. Основним прийомом для цього є використання елективних середовищ, на яких виростають тільки певні фізіологічні групи мікроорганізмів.

**Виявлення диких дріжджів** полягає у їх здатності засвоювати лізин як єдине джерело азоту. Проби пресованих дріжджів, закваски, тіста тощо, висівають на агаризоване синтетичне середовище з лізином. На ньому особливо добре рос-

туть дріжджі роду *Candida*, які найбільш часто зустрічаються як шкідники на харчових підприємствах, які використовують або виробляють сахароміцети. Культурні дріжджі не здатні використовувати лізин, тому вони не ростуть на лізиновмісних середовищах чи утворюють на них крапкові колонії.

**Виявлення термофільної палички *Bacillus coagulans* і бактерій *Leuconostoc*.** Ці мікроорганізми викликають ослизнення молочної сироватки та закваски, кондитерських виробництв тощо. Особливою ознакою *Bacillus coagulans* є наявність зерен волютину в клітинах бактерій. Для виявлення термофільної палички застосовують гідролізоване молоко з агаром.

Лейконосток відносять до стрептококів. На середовищах, багатих лізином, він утворює слизову капсулу, яка складається з декстрину. Як і *Bacillus coagulans*, лейконосток може утворювати слизові згустки в рідких заквасках з заваркою. Лейконосток добре виявляється на агарі з сахарозою, де утворює характерні прозорі краплеподібні колонії.

**Виявлення гнильних бактерій.** Вони є антагоністами у відношенні до молочнокислих бактерій та дріжджів-сахароміцетів. В закваски, тісто гнильні бактерії потрапляють з сировиною (пресовані дріжджі, борошно). Джерелами інфекції можуть слугувати трубопроводи та ділянки, важкодоступні для очищення та миття. Для обліку гнильних бактерій застосовують молочний агар. На цьому середовищі бактерії утворюють в основному білі чи жовтуваті колонії з прозорою зоною розчинених білків молока навкруг них.

**Виявлення спороутворюючих бактерій.** До спороутворюючих бактерій, які є небезпечними шкідниками хлібопекарного, кондитерського та ін. виробництв відносять *Bacillus licheniformis* і *Bacillus subtilis*. Для їх виявлення у сировині та готовій продукції використовують висів зразків на м'ясо-пептонний агар, молочний агар, сусло-агар. Перед висівом проби прогривають при 90-95<sup>0</sup> С протягом 10 хв.

**Матеріали та обладнання:** дріжджі пресовані 1г, колби 100 см<sup>3</sup>, пробірки, чашки Петрі, елективні поживні середовища, та диференційно-діагностичні піпетки, кип'ячена вода, предметні скельця, анілінові барвинки, мікроскопи, термостат та ін.

#### **Хід роботи.**

Якісний склад пресованих дріжджів визначають з допомогою елективних середовищ, на яких специфічно розвиваються певні групи мікроорганізмів. 1г проби дріжджів, узятій з середини бруска, вносять в колбу зі 100см<sup>3</sup> стерильної водопровідної води. Після ретельного розмішування з вихідного розведення (10<sup>2</sup>) роблять ряд послідовних розведень. Для дослідження дріжджового молока беруть вихідну пробу об'ємом 2см<sup>3</sup>. Висів виконують по 0,1см<sup>3</sup> кожного розведення за схемою приведеною на рис. 9.

У доброякісних пресованих дріжджах допускається присутність сторонніх дріжджів не більше 30% ; кислотоутворюючих бактерій- не більше 15-35%; гни-

льних бактерій не повинно бути. При мікроскопуванні дріжджової культури обов'язково оцінюють розмір і однорідність сахаро-міцетових клітин.

Для визначення числа бактерій в пробах, що містять дріжджі, Розма-новою Н.В. запропоновано метод висіву середовища з антибіотиком ністатином. Ністатин пригнічує ріст дріжджів та грибів в концентрації 40-60 од. На 1 см<sup>3</sup> середовища. Водно-спиртовий розчин (1:1) ністатина готують з розрахунком, щоб в 1 см<sup>3</sup> його містилася фунгіцидна концентрація, достатня для пригнічення дріжджів. В стерильні чашки Петрі вносять по 1 см<sup>3</sup> розчину ністатину, заливають розплавлене і охоложене середовище і добре перемішують. Далі всі операції проводять як правило при висіванні проб на щільні поживні середовища.

При дослідженні дріжджів на присутність бактерій *Proteus vulgaris* проводять посів краплі 1-го та 2-го розведення в конденсаційну воду скошеного агару.

Через 24-48 год при 37<sup>0</sup>С *Proteus vulgaris* виявляють за тонкою вуаленодібною плівкою, яка піднімається стінкою пробірки.

Товарні пресовані дріжджі є продуктом, що швидко псується. Згідно ДСТУ готові, дріжджі повинні мати сіруватий колір з жовтуватим відтінком, без плям, щільну консистенцію, крихку при розламуванні, специфічний дріжджовий запах, без зайвих сторонніх, властивий пресованим дріжджам смак; вологість – не більше 75%; підйому силу до 70мм – не більше 75 хв; кислотність 100г дріжджів в день не більше 120мг, після 12 діб зберігання при температурі від 0 до 4<sup>0</sup>с – не більше 360мг в перерахунку на оцтову кислоту; стійкість – не менше 48 год при температурі зберігання – 60 – 90 хв, зимазна –50-60 хв при визначенні газометричним методом.

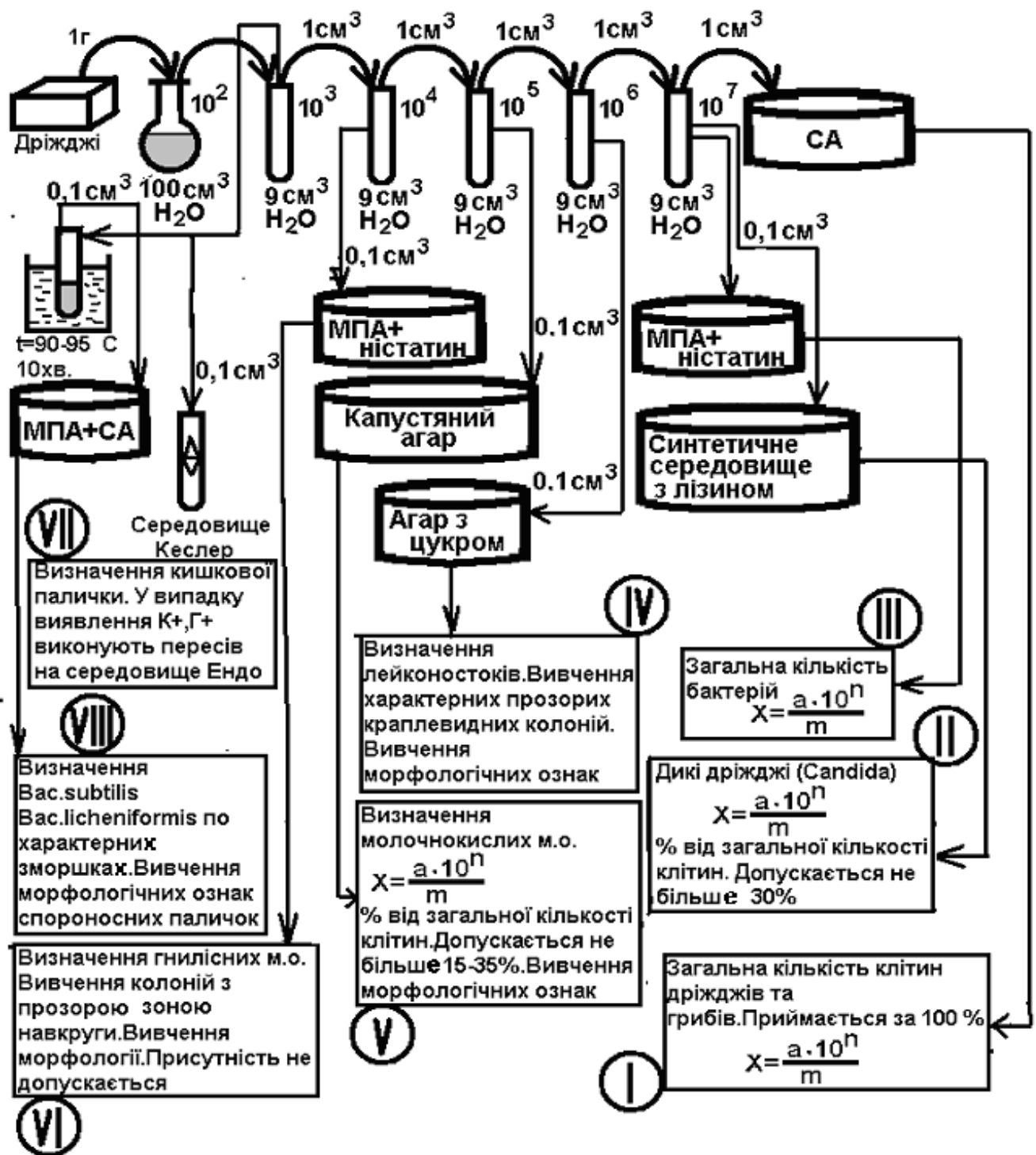


рис.12 - схема аналізу товарних дріжджів

## Лабораторна робота №10

### Отримання про біотичного молочно – кислого продукту у присутності стимуляторів росту.

#### Загальні відомості

Молочнокислі бактерії у зв'язку з унікальними властивостями широко застосовуються у харчовій промисловості для виготовлення молочнокислих продуктів, формування органолептичних і функціонально-технологічних властивостей м'ясопродуктів, а також стимулюють корисну мікробіоту кишківника. Їх називають пробіотиками. Пробиотики – це живі мікроорганізми, що поліпшують здоров'я людини шляхом створення сприятливого для нормальної фізіології балансу мікробіоти в товстому кишківнику.

Найчастіше для виготовлення пробіотиків на основі живих мікроорганізмів використовують наступні види:

*Bacillus subtilis, Bifidobacterium adolescentis, B.bifidum, B.infantis, B.longum, Enterococcus faecalis, E.faecium, Escherichia coli, Lactobacillus acidophilus. L.casei, L.delbruecki subsp ,L. bulgaricus, L.helveticus, L.fermentum, L.lactis, L.rhamnosus , L.salivarius, L.plantarum, Lactococcus, Leuconostoc, Pediococcus, Propionibacterium acnes. Saccharomyces boulardii, Streptococcus cremoris, S.lactis, S.salivarius subsp. thermophilus, Clostridium buturicum*

Серед різних представників нормальної мікробіоти особливе місце займають біфідобактерії та лактобацили. Це класичні пробіотики.

Пробиотики на основі вищевказаних мікроорганізмів можуть містити як представників одного виду бактерій (монобіотиків), так і асоціацію штамів декількох видів мікроорганізмів (асоційовані пробіотики). Пробиотики можуть призначатися широкому колу живих організмів (людині, тваринам, птиці) незалежно від організму – хазяїна з якого було виділено штами про- біотичних бактерій (гетеробіотики). Однак, частіше пробіотики призначаються представникам того виду, який послужив джерелом відповідного штаму (гомопробиотики).

Останнім часом в практику починають входити аутопробиотики – джерелом для створення яких являються штами мікроорганізмів виділені від конкретного індивідуума і спрямовані на корекцію саме його мікроекології.

Пробиотики на основі живих мікроорганізмів можуть застосовуватись не тільки орально, а й ректально.

**Матеріали та обладнання:** 1л знежиреного молока, йогуртові закваски, лактулоза, олія амаранту, харчові волокна, спиртівки, реактиви для забарвлення за Грамом, кристалізатори, предметні та покривні скельця, чашки Петрі, капуста-ний агар, бюретка, колба на 1л, конічні колби, пляшки та пробірки зі стерильною водою, стерильні піпетки на 10см<sup>3</sup> та 1 см<sup>3</sup>, плитка електрична, камери Горяєва, термостат, 0,1 н NaOH, фенол-фталеїн.

### **Хід роботи.**

Знежирене молоко (1л) стерилізують, охолоджують до  $t = 35 - 38^{\circ}\text{C}$ . Відбирають 10 см<sup>3</sup> стерильного молока для встановлення вихідної кислотності.

Кислотність визначають у градусах Тернера (умовна одиниця, яка відповідає масовій частці 0,1 н NaOH у см<sup>3</sup>, витраченого на нейтралізацію 100 см<sup>3</sup> молока).

Визначення кислотності молока

*Кислотність молока* зумовлена вмістом у ньому молочної кислоти, фосфорнокислих та молочнокислих солей, білків тощо. **Кислотність** виражається у *градусах Тернера* і є важливим показником свіжості молока.

*Градус Тернера ( $^{\circ}\text{T}$ )* являє собою кількість мілілітрів 0,1 н розчину лугу, що витрачається на нейтралізацію кислот в 100 см<sup>3</sup> молока.

Для визначення кислотності у конічну колбу піпеткою вносять 10 см<sup>3</sup> молока і додають 10 см<sup>3</sup> дистильованої води та 3 краплі 1 % спиртового розчину фенол-фталеїну. Суміш титрують 0,1 н розчином їдкого натру до появи рожевого забарвлення, яке не зникає протягом однієї хвилини. Кількість 0,1 н розчину їдкого натру, що пішла на нейтралізацію 10 см<sup>3</sup> молока, множать на 10 і таким чином визначають кислотність досліджуваного молока.

Згідно з ДСТУ–2661–94 *кислотність молока 1 сорту повинна становити 16–18 $^{\circ}\text{T}$ , кислотність молока 2 сорту – 19–21 $^{\circ}\text{T}$ , для білкового – до 25 $^{\circ}\text{T}$ .*

До охолодженого молока додають чисту культуру лактобактерій або симбіотичну закваску лакто- та біфідобактерій. Перемішують стерильним шпателем і розливають у 6 стерильних пронумерованих склянок по 150 см<sup>3</sup>. У склянку №1 додають кілька крапель олії амаранту. В склянку №2 додають 1г лактулози. В склянку №3 – 1,5г харчових волокон. Склянки № 4,5,6 – контрольні.

Всі склянки закривають поліетиленовою плівкою, викладають у термостат при  $t = 38^{\circ}\text{C}$  і витримують 6 - 8 годин. Кінець ферментації відмічають з появою згустку. Протягом ферментації, через кожну годину від початку процесу стерильно відбирають проби по 10 см<sup>3</sup> з кожного зразка і визначають кислотність титромет-



ричним методом у градусах Тернера. Паралельно з відбором культуральної рідини із дослідних склянок для визначення кислотності, тією ж стерильною піпеткою відбирають проби для підрахунку і дослідження клітин молочно – кислих бактерій у препаратах мазках та у камері Горяєва (див. лаб. №6). Вивчають співвідношення між симбіотичними культурами за можливості.

Через 6 – 8 годин ферментації склянки з отриманим продуктом №1,2,3,4 переносять у бокс. З кожної склянки відбирають стерильними піпетками на  $1\text{ см}^3$  зразки і роблять ряд десятикратних розведень за схемою (рис.13).

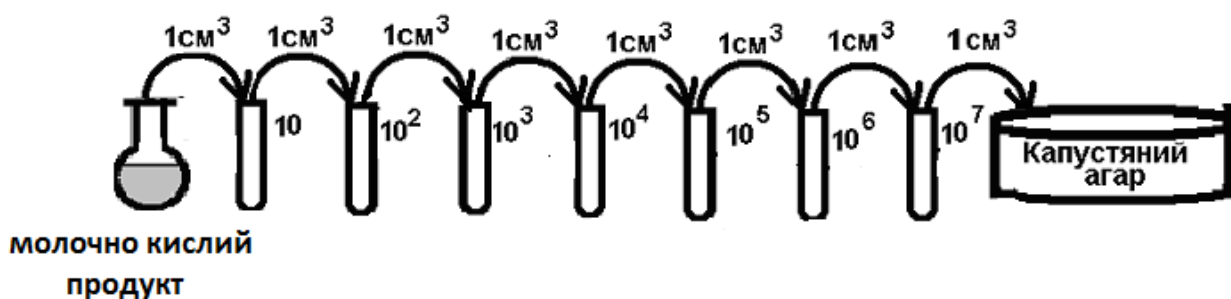


Рис. 13 Схема розведень молочнокислого продукту.

З останніх пробірок з розведенням  $10^7$  по одному  $\text{см}^3$  висівають на 2 чашки Петрі під капустяний агар. Чашки підписують і кладуть у термостат на вирощування при  $t = 37\text{ }^\circ\text{C}$  на три доби. Склянки №5,6 з охолоджують при кімнатній температурі і кладуть у холодильник. Підраховують кількість колоній у двох паралелях, роблять висновок про те, чи досягнуто необхідної кількості пробіотичних мікроорганізмів на 1г молочно-кислого продукту. Готують препарати – мазки з колоній молочно-кислих бактерій на капустяному агарі, порівнюють морфологію бактерій під час ферментації молока у термостаті та вирощених на капустяному агарі.

Порівнюючи результати дослідження, роблять висновок про стимулювання росту, молочнокислих бактерій пребіотиками.

Будують графік зміни кислотностей у процесі вирощування з різними стимуляторами. Перевіряють органолептику в 6,5 склянках.

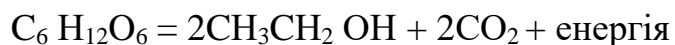
## Лабораторна робота №11

### Отримання спирту при зброджуванні вуглеводів дріжджами.

#### Загальні відомості

Спиртове бродіння - мікробіологічний процес перетворення вуглеводів в спирт і вуглекислий газ. Викликається аскоміцетовими дріжджами роду *Saccharomyces*, деякими бактеріями і окремими представниками мукорових грибів.

Загальне рівняння спиртового бродіння має такий вигляд



#### Матеріали та обладнання:

Колби, пробірки; гумові пробки; водяна баня, лійка, термометри, фільтрувальний папір, газовідвідна трубка, стакан для збору фільтрату, розчин сахарози 10 %, сухарі хлібні, дріжджі пресовані, 10 % розчин NaOH, лакмусовий папір, йод кристалічний, чашки Петрі, спиртівки, реактиви для забарвлення за Грамом, кристалізатори, предметні та покривлі скельця, фуксин.

#### Хід роботи.

Робота виконується у 2 – 3 варіантах з різним вмістом сахарози

##### 1. Збір бродильної установки.

У флакон для зброджування додають 50 (100 або 200) см<sup>3</sup> 10 % розчину сахарози, 5 г сухарів та 1 г дріжджів. Флакон закривають гумовою пробкою ретельно перемішують і закривають металевим ковпачком з газовідвідною трубкою. Вільний кінець газовідвідної трубки опускають у стакан водою та зверху надягають пробірку з водою. Змонтований прилад ставлять у тепле місце ( або підтримують температуру у стакані з водою). Температура 28 – 30 °С, тривалість бродіння 2 – 3 години. Через деякий час з початку зброджування, визначають швидкість заповнення пробірки газом. Процедуру повторюють 3 рази для кожної концентрації вуглеводу. Розраховують середню швидкість заповнення пробірки газом.

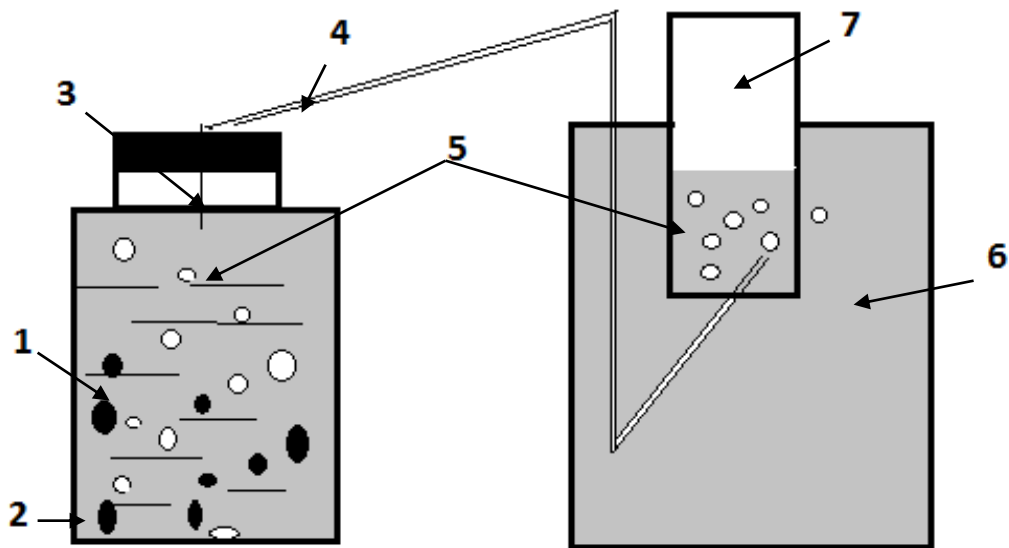
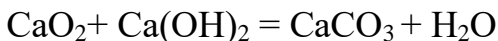


Рис. 14 Прилад для бродіння

1- Ємність для збродження, 2- дріжджі, 3- голка, 4 - газовідвідна трубка, 5 - бульбашки газу, 6 - стакан з водою, 7 – пробірка для збору CO<sub>2</sub>

## 2. Визначення вуглекислого газу.

CO<sub>2</sub> визначають за реакцією з Ca(OH)<sub>2</sub>, в результаті якої утворюється осад карбонату Ca :



У пробірку, заповнену бродильним газом швидко підливають 1-2 10 см<sup>3</sup> розчину гідроокису кальцію. В присутності вуглекислого газу випадає осад.

## 3. Визначення спирту.

Спирт визначають по утворюванню з йодом йодоформу. По закінченню збродження, вміст флакона фільтрують через паперовий фільтр. Відбирають 5 см<sup>3</sup>, фільтрату стерильною піпеткою, переносять його в пробірку і додають розчин 10 % NaOH до слаболужної реакції ( за лакмусовим папером). Пробірку нагрівають на водяній бані до 60 °С та додають 1 – 2 кристала йоду (приблизно 0,1 г ). Пробірку нагрівають до повного розчинення йоду.

Спирт у присутності лужного середовища з йодом дає йодоформ, який визначають за характерним запахом і жовтим осадом, що утворюється при охолодженні.

## 4. Виявлення дріждів

Фільтрат розглядають під мікроскопом у препараті “роздавлена крапля”

1. На чисте предметне скло нанести краплю води.
2. Прожареною і охолодженою петлею взяти досліджуваний матеріал і розподілити його рівномірно в краплі води.
3. На краплю суспензії покласти чисте покривне скло так, щоб під ним не було бульбашок повітря. Надлишок рідини відтягнути смужкою фільтрувального паперу.
4. Розглянути препарат при збільшенні 40х. Якщо препарат розглядають в імерсійній системі, на предметне скло наносять краплю кедрової олії чи гліцерину.

### **5. Визначити інтенсивність бродіння при різноманітних концентраціях вуглеводів.**

Визначити, при якій концентрації вуглеводів середня швидкість заповнення пробірок була мінімальною. Ця концентрація є оптимальною

## **Лабораторна робота № 12**

### **Біотехнологічні основи приготування хліба.**

#### **Загальні відомості**

**Роль мікроорганізмів у бродінні тіста. Основні процеси у пшеничному тісті.** У хлібопекарському виробництві використовують різні штами дріжджів роду *Saccharomyces*. Згідно з філогенетичною класифікацією аскоміцетних дріжджів (2006 р.) цей рід віднесено до родини *Saccharomycetaceae*, порядку *Saccharomycetales*, класу *Saccharomycetes*, підвиду *Saccharomycotina*.

У технологічному процесі приготування хліба першорядну роль відіграють ферментативні перетворення, в яких беруть участь ферменти бродильної мікробіоти напівфабрикатів. Основними збудниками процесів бродіння є хлібопекарські дріжджі та молочнокислі бактерії, життєдіяльність яких забезпечує розпушення тіста, накопичення специфічних речовин, що впливають на смак та аромат готових виробів. Обов'язковою умовою інтенсифікації процесу приготування напівфабрикатів хлібопекарського виробництва та поліпшення якості готової продукції є регулювання життєдіяльності дріжджів та молочнокислих бактерій у заквасках та тісті.

При внесенні в тісто дріжджів відбувається зміщення окисно-відновного потенціалу напівфабрикатів у напрямі підсилення відновних властивостей, що впливає на всі елементи вуглеводно-амілазного та білково-протеїназного комплексів борошна в тісті. Окисно-відновні реакції лежать в основі бродіння, тому від ступеня окиснення середовища залежить характер метаболічних перетворень дріжджів.

Відомо, що визначальним фактором в спрямуванні мікробіологічних процесів у тісті є не титрована, а активна кислотність. Згідно показника рН визначають ступінь готовності напівфабрикатів до подальшої обробки.

Джерелом чистих культур можуть бути як музейні штами, які використовуються в хлібопекарській промисловості, так і культури, що виділяють із виробничих середовищ, заквасок спонтанного походження, а також природних джерел.

**Дріжджі *Saccharomyces* як основна сировина у хлібопеченні.** Клітини *Saccharomyces cerevisiae* овальної форми, розміром 6-8...10-14 мкм, розмножуються брунькуванням або спороутворенням. Із джерел вуглецю, що є в тісті, асимілюють глюкозу, галактозу, фруктозу, сахарозу, мальтозу, зброджують лактозу, пентози, крохмаль і клітковину. Оптимальна температура розвитку *S cerevisiae* – 30 °С, а оптимальне значення рН знаходиться в межах 4,5-5,0.

Виробничі культури дріжджів повинні мати високу питому швидкість росту, що важливо при виготовленні напівфабрикатів багатофазними способами (опарним, з використанням заквасок та ін.), а також високу активність ферментів зимазного комплексу. У виготовленні хлібобулочних виробів використовують різні раси та штами (відрізняються між собою лише другорядними ознаками) дріжджів. Раси мають стійкі другорядні ознаки, а штами - нестійкі (можуть бути втрачені при рості на новому середовищі).

Раси хлібопекарських дріжджів можуть відрізнятися між собою за активністю зброджування цукрів, солестійкістю та ін.

Дріжджі сприяють біологічному розпушенню тіста за рахунок виділення діоксиду вуглецю у процесі спиртового бродіння, наданню тісту певних реологічних властивостей, формуванню смаку та аромату хліба завдяки утворенню етанолу та інших продуктів метаболізму.

**Види заквасок для приготування хліба із пшеничного та житнього борошна.** Крім пресованих дріжджів для виготовлення пшеничного хліба використовують рідкі пшеничні закваски.

*Пшеничні закваски* - напівфабрикати, що отримують шляхом зброджування поживної борошняної суміші кислотоутворюючими, в основному молочнокислими бактеріями.

Перевагами використання пшеничних заквасок є:

- інтенсифікації технологічного процесу;
- попередження інфікування готових хлібобулочних виробів;
- покращення якості, смаку і аромату хліба.
- можливість зменшення кількості дріжджів або повного їх виключення з використання.

Суттєвий недолік рідких пшеничних заквасок полягає у їх нестабільності, здатності швидко переокисити, так як в них ніщо не стримує розвиток молочнокислих бактерій. Тому на сьогодні використання пшеничних заквасок не поширене.

Для виготовлення пшеничних заквасок використовують;

- молочнокислі бактерії (*Lactobacillus plantarum*, *L. brevis*, *L. fermenti*, *L. casei*, *L. delbruckii*, *L. acidophilus*);
- дріжджі (*Saccharomyces cerevisiae*) ;
- пропіоновокислі бактерії.

Створено схеми одержання бездріжджових висококіслотних заквасок, тактих як мезофільна і концентрована.

До складу мезофільної молочнокислої закваски (ММКЗ) входить культура *L. fermenti-27* з оптимальною температурою розвилку 37 °С. Особливістю даного штаму є висока кислотоутворювальна активність у середовищі (фізіологічно активний при рН 3,4- 3,6). Кислотність закваски становить 18-22 град.

ММКЗ використовується для виготовлення пшеничного хліба з борошна будь-якого сорту. Цю закваску вносять у кількості 3-6 % (до маси борошна в тісті) при опарному способі тістоприготування і у кількості 8-10 % - при безопарному. В якості розпушувача використовують пресовані або рідкі дріжджі.

До складу мікробіоти пшеничної концентрованої молочнокислої закваски (КМКЗ) входить суміш культур *Lactobacillus casei-26*, *L. brevis-1*, *L. fermenti-34*, *L. planlaruin-30*. Чисту культуру дріжджів не вносять. Оптимальна температура життєдіяльності молочнокислих бактерій у КМКЗ становить 37-41°С. Закваска має кислотність 14-18 град.

Бездріжджові висококіслотні закваски рекомендовано використовувати як біологічний спосіб пригнічення картопляної хвороби хліба.

*Житня закваска* - це напівфабрикат хлібопекарного виробництва, отриманий шляхом зброджування поживної водоборошняної суміші різними видами молочнокислих бактерій і дріжджів, що використовується при виробництві житнього і житньо-пшеничного хліба.

У хлібопекарському виробництві використовують такі види житніх заквасок: густу, рідку без заварки, рідку з заваркою, концентровану молочнокислу закваску.

В бродінні житніх заквасок приймають участь обидва види дріжджів- сахароміцетів: *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces minor*. Однак, специфічним для житніх заквасок вважають *S. minor*. КМКЗ отримують з використанням лише молочнокислих бактерій.

Найбільш важливим джерелом енергії для молочнокислих бактерій є моно- і дисахариди (глюкоза, фруктоза, галактоза, сахароза, мальтоза). Однак їх вміст у житньому борошні, а відповідно і поживному середовищі рідкої закваски, недостатній. Тому частину борошна заварюють з метою клейстеризації крохмалю і оцукрення власними амілазами. Отже, *заварка* - це водно-борошняна суміш, в якій крохмаль клейстеризується і органічні речовини борошна переходять в оптимальну для засвоєння мікроорганізмами форму. Для накопичення значної кількості цукрів і водорозчинних речовин заварку залишають для оцукрювання на 3-4 год, протягом цього часу заварка також охолоджується. Температура 63-65

°С наприкінці заварювання найбільш сприятлива для гідролітичних процесів, що відбуваються в заварці.

Оклеїстеризований при заварюванні крохмаль легше піддається оцукрюванню, а потім бродінню.

Заварний хліб має виражений аромат, солодкий смак, довго не черствіє і утворює особливо рум'яну скоринку через наявність в ньому підвищеної кількості декстринів та мальтози.

**Технологічні режими приготування хлібобулочних виробів.** Тісто з пшеничного борошна готують *однофазними* (безопарним та прискореними - з активацією дріжджів, з використанням концентрованої молочнокислої закваски (КМКЗ) та двофазним (опарним) способами.

У хлібопекарській промисловості застосовують також інші способи приготування тіста з пшеничного борошна: на рідкому зброженому напівфабрикаті зі скороченим періодом бродіння, на великих густих опарах з інтенсивним замісом тіста та ін. З метою інтенсифікації процесу дозрівання тіста в рецептуру додають, невеликі кількості ферментних препаратів, модифікованого крохмалю, окиснювачів або відновників клейковини, замість частини води вводять молочну сироватку.

*При безопарному способі* всі інгредієнти, що входять в рецептуру тіста, в повному об'ємі вносять одночасно. При цьому після замісу виходить тісто густої консистенції, яке після дозрівання без будь-яких добавок основних інгредієнтів надходить на подальшу обробку.

*Опарний спосіб* приготування тіста проводять в два прийоми: спочатку готують рідке тісто - опару, а потім на опарі замішують тісто нормальної консистенції. В опару вводять 65-75 % всієї необхідної за рецептурою води і 40- 50 % всього борошна. Повністю вносять дріжджі. Сіль, зазвичай, повністю або частково вносять при замішуванні тіста. У зв'язку з тим, що опара має більш рідку консистенцію, дріжджів при цьому способі потрібно приблизно в два рази менше (0,75 %), ніж при безопарному. Термін бродіння опари 3-4,5 год. Замішане на опарі тісто бродить ще 1-1,5 год. Таким чином, загальний термін бродіння тіста при опарному способі значно більший, ніж при безопарному.

Особливості приготування житнього хліба полягають у відсутності в житньому борошні клейковини, наявності пентозанів, які дуже сильно набухають і слизу, часто активної  $\alpha$ -амілази. Здатність білкових речовин значно пептизуватися і переходити у в'язкі колоїдні розчини призводить до того, що приготувати житнє тісто з задовільними пластичними властивостями за 1-2 прийоми не можливо. Тільки багатоступеневе приготування житнього тіста з багаторазовим внесенням в нього свіжих порцій борошна в поєднанні із загальним тривалим терміном бродіння дозволяє підвищити його газотримувальну здатність і формостійкість. Цьому сприяє і накопичення в тісті значної кількості молочної кислоти та підвищення кислотності середовища.

**Матеріали та реактиви:** мікроскопи; предметні та покривні скельця; камера Горяєва, мікробіологічні петлі; спиртівки; крапельниці з дистильованою водою, барвники (метиленовий синій, розчин Люголя), штативи для пробірок, пробірки, стерильні піпетки, бюретка, мірна пробірка або циліндр на 10 см<sup>3</sup>, стакани: для титрування, порцелянові чашки, розчин фенолфталеїну, фенольний реактив, 0,1н NaOH, дріжджі пресовані, дріжджі сухі, закваски для хлібопекарського виробництва.

### **Хід роботи.**

1. Визначити кількість молочнокислих бактерій методом прямого підрахунку кількості клітин на чашках з агаризованим середовищем МРС. Зробити висновки про відповідність кількісного вмісту молочнокислих бактерій у заквасках та молочнокислих продуктах нормованим показникам (КУО в 1 г продукту). Результати представити у вигляді таблиці.

2. Визначити наявність у молочнокислому напої біфідобактерій шляхом аналізу посіву на поживне середовище Блаурока.

3. Провести визначення органолептичної оцінки якості товарних хлібопекарських дріжджів (пресованих, сухих).

4. Визначити мікробіологічну чистоту товарних хлібопекарських дріжджів. У товарних хлібопекарських дріжджах визначити наявність контамінуючої мікробіоти (дріжджів роду *Candida*) методом мікроскопування. Зробити рисунок мікроскопічної картини в зошит.

Виявлення “диких” дріжджів проводять, переважно методом мікробіологічного посіву на агаризоване синтетичне середовище з лізином. Дріжджі роду *Candida* здатні засвоювати лізин як єдине джерело азоту, тому після термостатування чашок з посівами протягом 3 діб за температури 30 °С буде спостерігатися ріст колоній “диких” дріжджів.

Дріжджі роду *Saccharomyces* не здатні використовувати лізин, тому не будуть рости на даному середовищі або утворюватимуть ледь помітні колонії.

5. Визначити віковий стан товарних дріжджів. Порахувати відсоток молодих, зрілих та мертвих клітин, використовуючи камеру Горяєва.

Метод кількісного обліку мікроорганізмів за допомогою лічильних камер має обмежене застосування, зумовлене тим, що у лічильних камерах здійснюється облік всіх клітин (як живих, так і мертвих). Крім того, лічильні камери можуть бути використані лише для підрахунку відносно великих об’єктів - клітин водоростей, дріжджів, спор грибів.

Лічильна камера являє собою товсте предметне скло з нанесеними на ньому поперечними прорізами, що утворюють три поперечно розміщені плоскі площадки (рис 6). Середня площадка поздовжньою прорізною розділена навпіл, причому на кожній половині нанесена квадратна сітка. Дві бокові площадки розмі-



щені на 0.1 мм вище середньої. Ці площадки служать для притирання покривного скельця. Сітка розділена на певну кількість великих і малих квадратів, згрупованих по-різному. Постійною величиною у всіх сітках є малий квадрат, сторона якого дорівнює 1/20 мм, площа - 1/400 мм<sup>2</sup>, а об'єм за висоти камери 1/10 мм - 1/4000 мм<sup>2</sup> або 1/4000000 см<sup>3</sup>. Так званий великий квадрат складається з 16 малих квадратів.

Камера Горяєва має площу 9 мм<sup>2</sup>, об'єм камери становить 9 мм<sup>3</sup>. Камера розбита на 225 великих квадратів (15 рядів по 15 великих квадратів у кожному ряду).

Краплю суспензії наносять на сітку камери і зверху накривають чистим покривним скельцем. Рідина під покривним скельцем повинна рівномірно без бульбашок розподілитися по всій сітці, не виступаючи у жолобок між стінками. Великими пальцями покривне скельце щільно притирають до бокових площадок камери до появи ньютонівських кілець.

Камеру з досліджуванним матеріалом поміщають на предметний столик мікроскопа і мікроскопують з об'єктивом 10-40x (у полі зору повинні бути чітко видні як квадрати, так і мікроорганізми). Підраховують кількість клітин у п'яти великих квадратах (тобто 180 малих), розміщених по діагоналі. Враховують всі клітини, розміщені всередині квадрата і на пограничних лініях, якщо вони більшою частиною лежать всередині квадрата. Клітини, розділені пограничною лінією навпіл, рахують тільки на 2-х з 4-х меж квадрата, а клітини, що лежать більшою частиною поза даним квадратом, не враховують.

Визначають середню кількість клітин в одному квадраті. Припустимо, у п'яти великих квадратах (80 малих) міститься 240 клітин, тоді в одному малому квадраті середня кількість клітин становить 240:80=3. Перерахунок на 1 см<sup>3</sup> суспензії із врахуванням розведення здійснюють за формулою:

$$N = (a \cdot 1000 / hS)K$$

де  $N$  - кількість клітин в 1 см<sup>3</sup> суспензії;  $a$  - середня кількість клітин у малому квадраті;  $h$  - глибина камери, мм;  $S$  - площа малого квадрата, мм<sup>2</sup>;  $K$  - розведення вихідної суспензії; 1000 - коефіцієнт перерахунку мм<sup>2</sup> у см<sup>3</sup> (1 см<sup>3</sup> = 1000 мм<sup>3</sup>).

6. Визначити стан бродильної мікробіоти напівфабрикатів хлібопекарського виробництва одним із непрямих методів (бродильна, мальтазна та зимазна активність дріжджів, осмочутливість дріжджів, активність молочнокислих бактерій)

Для оцінки здатності дріжджів зброджувати цукри тіста визначають їх зимазну і мальтазну активність. Ці показники визначають за швидкістю зброджування дріжджами глюкози і мальтози і виражають терміном (у хвилинах), необхідним для виділення 20 см<sup>3</sup> CO<sub>2</sub> 1 г дріжджів у 4-5 % розчині глюкози (зимазна

активність) або мальтози (мальтазна активність). Якісні дріжджі мають зимазну активність — до 70 хв, мальтазну — не більше 100-110 хв.

Якісні дріжджі повинні мати високу бродильну активність, швидко зброджувати цукри тіста, мати низьку осмочутливість, добре переносити високі концентрації солі та цукру в тісті, мати високу стійкість при зберіганні. Комплексним показником їх якості є підйомна сила

7. Ознайомитися з видовим складом бродильної мікробіоти в напівфабрикатах хлібопекарського виробництва. З цією метою використовують прямі методи визначення.

Для виділення дріжджів використовують поживне середовище - солодове сусло (8 % сухих речовин) з 2 % агару.

Для виділення молочнокислих бактерій – агаризоване солодове сусло (12% сухих речовин).

8. Визначити основні технологічні параметри заквасок для житнього та пшеничного хліба (вологість, титрована кислотність, підйомна сила).

Зробити висновки до лабораторної роботи.

### Лабораторна робота № 13

#### Способи відділення кінцевих продуктів та оцінка концентрації клітин.

#### Загальні відомості

Біотехнологічний процес отримання будь-якого продукту можна схематично представити у вигляді наступних етапів



Рис. 15 – Основні етапи біотехнологічних виробництв

Метою будь-якого біотехнологічного процесу, який використовується в промисловості являється отримання якого-небудь продукту. Кінцевими продуктами біотехнологічних процесів може бути, наприклад, клітинна біомаса (виробництво

кормових дріжджів) білок (виробництво дріжджового і бактерійного білку), продукти життєдіяльності мікроорганізмів (органічні кислоти, антибіотики, біогаз) та інші.

У залежності, що саме є кінцевою метою біотехнологічного процесу для відділення кінцевого продукту використовують різні методи. Для концентрації кінцевого продукту використовують різні фізичні та хімічні властивості часток і молекул (вага, поверхнєве натягіння, розчинність, заряд, температура кипіння, здатність до дифузії, розміри).

Так, для відділення клітин використовують осадження, фільтрацію (у тому числі мембранну), центрифугування, флотацію. Такі методи використовують, наприклад, при розділенні водно-мулової суміші, очищення стічних вод (аеробне і анаеробне), отриманні клітинної біомаси (дріжджі) та ін.

Окрім самих клітин кінцевими продуктами можуть бути внутрішньоклітинні метаболіти або позаклітинні метаболіти, що виділилися в зовнішнє середовище. У будь-якому випадку першим етапом має бути відділення клітин від середовища.

Далі може слідувати руйнування відокремлених клітин (якщо потрібно відділення внутрішньоклітинних продуктів). Клітини можуть бути зруйновані наступними методами:

- фізичними (ультразвуком, заморожуванням - відтаванням, пресуванням, помелом в шарових млинах);
- хімічними (екстракцією, обробкою детергентами, кислотами);
- біологічними (ферментами, фагами, інгібіторами).

Після руйнування клітин або при виділенні продукту з культурального середовища для максимального вилучення продуктів використовуються методи:

- екстрагування (використовуючи властивості гідрофільності і гидрофобності);
- хроматографію (адсорбційна, іонообмінна, гель-хроматографія – речовини розділяються за молекулярною вагою);
- мембранних процесів (ультрафільтрація, зворотний осмос, діаліз);
- кристалізації і осадження;
- висушування (конвективне - в потоці повітря, контактне - з адсорбентом, сушка після заморожування - ліофілізація).

*Фільтрація.* Для отримання бактеріальних клітин з культурального середовища часто використовують два типи фільтрації, осадова і мембранна. Часто для поліпшення відділення клітинної маси від рідини використовують додавання речовин, що збільшують розміри бактерійних агрегатів - флокулянтів (наприклад, поліакриламід).

Для осадової фільтрації використовують високопористі матеріали з глибокими та звивистими порами. Фільтрувальна система складається з підкладки фільтру (фільтрувальний папір або тканина, крупнопористі) і товстого шару філь-

тувального матеріалу (целюлози, діатомового ґрунту і т. п.). При фільтруванні бактерії, у міру їх накопичення, зішкрібають з поверхні фільтру. Такий засіб дозволяє добре очистити фільтрат, але для стерилізації середовищ непридатний, а біомаса часто виявляється забрудненою матеріалом, з якого виготовлено фільтр.

Мембранна фільтрація заснована на затримці бактерій на поверхні фільтру з порами, діаметр яких змінюється у вузьких межах. Вибір мембрани залежить від характеристик культури і, що саме бажають отримати в якості продукту - клітини чи фільтрат. Так, при стерилізації фільтруванням, потрібно використовувати мембрану з діаметром пір менше 0,5 мкм (розміри клітин 1,5-0,5 мкм).

*Центрифугування.* Цей спосіб дає менш повне розділення, ніж фільтрація. Але такий спосіб дає можливість отримати середовище і клітини, незабруднені матеріалом, через який фільтрують. Швидкість осадження в процесі центрифугування залежить від таких чинників, як в'язкість середовища, розмір часток і різниця в щільності між частками і середовищем. Всі типи центрифуг працюють за принципом регульованого прикладання відцентрової сили в роторі, що обертається,

*Оцінка концентрації клітинної біомаси.* Відділення клітин від середовища є також складовою частиною при оцінці концентрації клітин в середовищі. Для підрахунку кількості мікроорганізмів в досліджуваному зразку існує велика кількість методів. Найбільш поширеними методами кількісного обліку мікроорганізмів являються наступні.

1. Методи прямого підрахунку мікроорганізмів (у певному об'ємі проби або в наважці). Методи зводяться до підрахунку кількості клітин мікроорганізмів в певному об'ємі мікробної суспензії безпосередньо під мікроскопом, перераховуючи далі чисельність мікроорганізмів на одиницю ваги або об'єму (вага - для твердих тіл, об'єм - для рідин і газів). Підрахунок клітин ведуть на фіксованих забарвлених мазках (ґрунт, мул, рослини і рослинні залишки), з використанням мембранних фільтрів (вода, повітря), використовуючи світлову або електронну мікроскопію.

2. Кількість мікроорганізмів можна розрахувати за кількістю органічного азоту або вуглецю. Використовується у біотехнології, при культивуванні мікроорганізмів там, де використовують чисті культури.

3. Кількість бактерій можна розрахувати за оптичною щільністю мікробної суспензії. Використовується у біотехнології, при культивуванні мікроорганізмів, в медицині.

4. Метод висівання на щільні поживні середовища (у чашки Петрі). Цим методом враховується не загальна кількість мікроорганізмів в досліджуваному зразку, а чисельність різних фізіологічних груп мікроорганізмів або організмів. Залежно від використовуваного поживного середовища це можуть бути сапрофіти, сульфатредуктори, амоніфікатори, нітрифікатори, денитрифікатори, залізобактерії і т. д. Метод зводиться до приготування розведень проби і посіву розведе-

них зразків на поживні середовища різного складу з подальшою інкубацією посівів і підрахунком колоній, що вирости. Умовно приймається, що з однієї клітини виростає одна колонія.

5. Метод граничних розведень, метод титру. Суть цього методу полягає в наступному. У пробірки або колби з середовищем вносять визначений об'єм, узятий з різних розведень досліджуваної проби. Після інкубації реєструють наявність або відсутність зростання в посівах, результати обробляють статистично за допомогою спеціальних таблиць і розраховують число мікроорганізмів, що містяться в одиниці ваги або об'єму зразка.

Способи оцінки чисельності організмів в середовищі, які застосовуються в промисловості, дозволяють швидко отримати результат. Зазвичай оцінюють концентрацію клітин в середовищі або оптичними методами (легко автоматизувати), або прямим підрахунком під мікроскопом. або ваговим - аналогічно визначенню концентрації зважених речовин в об'ємі (по різниці у вазі між фільтром з осадом і без). Вага може бути сирою або сухою (після сушки зразка) і т. д.

**Матеріали та обладнання:** мембранні фільтри; установка для фільтрації; паперові фільтри; целюлозне волокно; колба Бунзена; воронка Бюхнера; центрифуга з центрифужними пробірками; мірні циліндри на 100 см<sup>3</sup>; склянки об'ємом 250 см<sup>3</sup>; флокулянти (наприклад, розчин поліакриламиду); ваги; зважені бюкси; зразки сумішей (культура дріжджів, змішана культура мікроорганізмів аеробного активного мулу), які розділяються.

### **Хід роботи.**

#### **1. Осадова фільтрація.**

Приєднати воронку до колби Бунзена, з'єднати колбу з водострумним насосом. На воронку покласти великопористий фільтрувальний папір, на нього налити суспензію целюлозного волокна у воді. На фільтрі повинен вийти рівний шар целюлози завтовшки 0,5-1 см. Якщо немає можливості використати целюлозне волокно, то провести фільтрацію через паперовий фільтр. Профільтрувати 250 см<sup>3</sup> суміші, що розділяється. Оцінити (візуально) міру прозорості відфільтрованої рідини. Зішкребти шар обложених (осаджених) клітин, зважити, помістивши у бюкс.

Розрахувати сиру клітинну масу (г/л) = (Вага бюкса з клітинами, г, - вага порожнього бюкса, г) : Об'єм рідини, мл, x 1000 (1000 - перерахунок в г/л).

Оцінити міру забрудненості клітин фільтрувальним матеріалом (візуально).

**2. Зважити мембранний фільтр.** Профільтрувати через мембранний фільтр 50-100 мл суміші. Оцінити міру прозорості фільтрату. Зважити фільтр з осадом.

Розрахувати сиру клітинну масу (г/л) = (Вага фільтру з клітинами, г, - Вага порожнього фільтру, г) : Об'єм рідини x 1000 мл.

3. Провести розділення осадовим фільтруванням, додавши заздалегідь до суміші, що розділяється, поліакриламід (1 мг розчину на 100 см<sup>3</sup> суміші). Концентрацію сирової біомаси розраховувати не треба. Порівняти прозорість фільтрату, швидкість фільтрації з аналогічними без використання поліакриlamіду.

4. Зважити дві центрифужних пробірки. Виміряти об'єм рідини, що поміщається в пробірку. Налити в пробірку суміш, що розділяється. Поставити пробірки в центрифугу. Пробірки мають бути однаково наповненими і попарно урівноваженими. Надіти кришку, загвинтити. Закрити кожух. Виставити час центрифугування. Включити центрифугу.

**Не можна відкривати кришку до повної зупинки центрифуги!**

Розділення центрифугуванням виконується впродовж 5 хвилин в двох варіантах - при швидкості 1000 і 8000 об/хв. Про закінченні процесу візуально оцінити прозорість рідини, злити надосадову рідину. Зважити пробірку з осадом, розрахувати концентрацію біомаси (г/л).

Розрахувати сирину клітинну масу (г/л) = (Вага пробірки з клітинами, г, - вага порожньої пробірки, г) : об'єм рідини, см<sup>3</sup>, x 1000 (1000 - перерахунок в г/л).

Таблиця № 4 - Відділення клітин від субстрату центрифугуванням і фільтрацією

Метод	Оцінка концентрації сирової клітинної біомаси, г/л	Оцінка надосадової рідини	Оцінка осаду, легкості його відділення

**ДОСЛІДЖЕННЯ ФІЗІОЛОГІЧНИХ ОСОБЛИВОСТЕЙ  
ДРІЖДЖІВ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* У ПРОЦЕСІ БРОДІННЯ ПШЕНИЧНО-  
ГО ТІСТА З ДОДАВАННЯМ ОЛІЇ**

**Загальні відомості**

Найбільш тривалою стадією в технологіях виробів з дріжджового тіста є бродіння. На сьогодні застосовують як хімічні так і фізичні методи інтенсифікації процесу дозрівання тіста. До хімічних належать такі, у яких передбачено введення в бродильне середовище речовин, що впливають на активність ферментних систем дріжджової клітини (використання борошняних заварок, соків, зернових екстрактів тощо). Фізичні фактори впливають на морфологічні структури клітин дріжджів і, в першу чергу, на цитоплазматичну мембрану (магнітні струми надвисокої частоти, ультразвук, оптичні промені, підвищена температура). Часто застосовують комбіновані методи впливу.

Тісто з пшеничного борошна готують двома способами – безопарним і опарним. Кожен з методів має свої переваги і недоліки. Перевагою опарного способу є те, що при його використанні якість хліба завжди вища в порівнянні з хлібом безопарного виготовлення. Перевагами безопарного способу є коротший час бродіння, менша витрата сухих речовин борошна, для виготовлення тіста потрібно менше виробничих площ і технологічного обладнання. Однак переваги, пов'язані з кращою якістю опарного хліба, переважають деякі економічні вигоди, які дає безопарний метод.

Інтенсифікація процесу бродіння безопарного тіста із пшеничного борошна за рахунок додавання на початку замісу певної кількості речовини, яка б прискорила процес дозрівання тіста має велике значення для хлібопекарних виробництв. Складниками рослинних олій що входять до багатьох рецептів хліба, є поліненасичені жирні кислоти, вітаміни групи В, Е, стероїди, фітостерини та ін.. В складі масла амаранту, наприклад, присутні рибофлавін, токоферол, тіамин, вітаміни групи Д, провітамін А, хлорофіл, холін, жовчні кислоти, стероїди, фітостерини, поліненасичені жирні кислоти, що містять збалансований комплекс омега-3 та омега-6, сквален. Сквален є компонентом шкіри людини та речовиною наближеною до складу клітин людини, він захоплює кисень та насичує ним тканини та органи шляхом простої хімічної взаємодії з водою в клітинах. Вплив різних рослинних олій на поведінку мікробіоти при процесі дозрівання тіста є метою даної роботи.

**Матеріали та обладнання:** термостат, електронні ваги, стакани, колби зі стерильною водою, піпетки, мікроскопи, предметні, покривні скельця, барвник метиленовій синій, розчин Люголю, зразки дріжджів на різних фізіологічних стадіях розвитку, борошно, цукор, сіль, дріжджі, рослинні олії, масло, 0,1 н NaOH, фенол-фталеїн.

## **Хід роботи.**

За рецептурою здійснюють заміс трьох зразків тіста з пресованими дріжджами, в які була додана олія амаранту, кукурудзяна та соняшникова. Третій зразок – контрольний. Рецепт приготування тіста :

пшеничне борошно – 167 г,

сіть – 2 г,

цукор – 12 г

олія рослинна - 9 см<sup>3</sup>

вода – 110 г (можна використати нежирний кефір і воду у співвідношенні 1 :1 )

Після вимішування зразки кладуть у стакани і розміщують у термостаті при t 37 °С. Через рівні проміжки часу шляхом виконання змивів та приготування препаратів вивчають фізіологічні особливості дріжджів під час бродіння у всіх зразках і спостерігають за розвитком процесу бродіння та дозрівання тіста, контролюють кислотність тіста.

Змиви виконують відбираючи зразки тіста по 5 г, вносять їх у склянку з 100 см<sup>3</sup> стерильної води, перемішують п'ять хвилин. У змивній воді вивчають стан дріжджів - кількість клітин, які брунькуються та мертвих клітин у препараті "роздавлена крапля" (див. лаб. № 15). Кислотність визначають титриметричним методом (див.лаб. №10).

Роблять висновок про те, у якому зразку дріжджі почувалися краще і чи впливає склад олії на процес дозрівання тіста.

## **Лабораторна робота 15**

### **ВИЗНАЧЕННЯ ФІЗІОЛОГІЧНОГО СТАНУ ДРІЖДЖІВ**

**Устаткування і матеріали.** Біологічний мікроскоп, розчин метиленового синього, розчин Люголю, зразки дріжджів на різних фізіологічних стадіях розвитку.

#### **Загальні відомості**

В процесі бродіння сула дріжджі послідовно проходять 6 стадій розвитку:

1. Брунькування (стадія розмноження) (рис. 16).



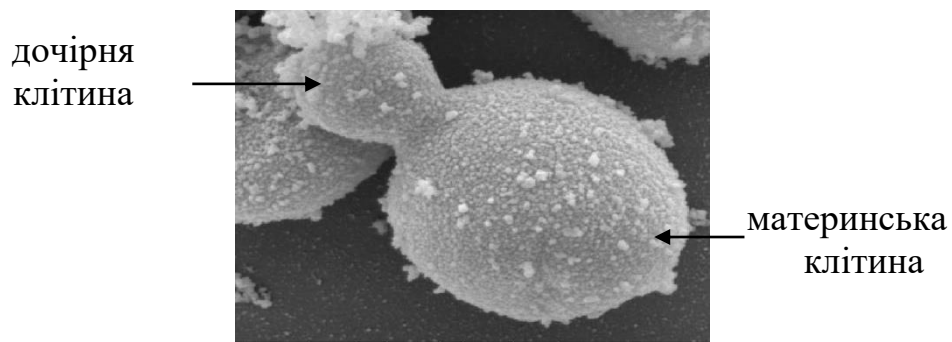


Рис. 16. Брунькування дріжджів

Дочірня клітина менша материнської, від якої вона відбрунькувалася, має однорідну плазму і тонку оболонку, в клітині немає глікогену, тому йодом (розчин Люголя) вона забарвлюється в жовтий колір (відсутня характерна реакція на крохмаль). Після стадії розмноження настає стадія бродіння.

2.Бродіння. Дріжджі переважно одиночні, цитоплазма зерниста, вакуолі дрібні. У клітинах багато глікогену і жиру, йодом клітини забарвлюються в червоно-бурий колір (реакція на крохмаль).

3.Голодування. Стадія починається після зброджування цукру. Дріжджі осідають на дно рідини і починають витрачати глікоген, тому йодом клітини забарвлюються в жовтий колір.

При тривалому зберіганні в осаді без доступу кисню повітря клітини починають відмирати.

4.Відмирання. Клітини деформуються, цитоплазма відстає від оболонки. Оболонка мертвих клітин легко пропускає барвник, тому 1:10000 розчином метиленової сині вони забарвлюються в синій колір.

5. Автоліз (розкладання клітин).

Описані п'ять стадій послідовно змінюють одна одну. За певних умов спостерігаються ще дві стадії розвитку.

6.Стадія спокою (клітини в стані спокою). Наступає, якщо дріжджі довго знаходяться в осаді при доступі кисню повітря. У цій стадії дріжджі живляться органічними кислотами. Вони мають жир, глікоген, щільну оболонку. У стадії спокою дріжджі стійкі до зовнішніх несприятливих умов.

7.Стадія спороутворення настає при різкому переході від хорошого живлення до голодування за умови достатньої вологості і наявності кисню повітря. У клітинах утворюються дві, чотири або вісім спор. До несприятливих умов спори стійкіші, ніж вегетативна клітина.

Для визначення спороутворення дріжджі вирощують на середовищі Гордкової. Потім мікроскопують в препараті "роздавлена крапля" і проводять забарвлення спор.

Метод забарвлення спор дріжджів: фіксований мазок забарвлюють карболовим фуксином Ціля протягом 5-10хв при підігріванні (до появи пари), потім барвник змивають водою і мазок знебарвлюється протягом 1 хвилини солянокислим спиртом), змивають водою і забарвлюють метиленовим синім 3-5хв при нагріванні. Клітини забарвлюються в синій колір, спори – в червоний.

### **Хід роботи**

Готують три пробірки із зависсю дріжджів. В одну з них додають розчин метиленового синього, в другу – розчин Люголю, третя містить вихідну завись.

З кожної пробірки готують препарат у лічильній камері Горяєва: наносять дві-три краплини дріжджової зависі, накривають покривним склом і залишають препарати у спокої, доки дріжджі не осядуть на дно камери.

У препараті з вихідної зависі підраховують загальну кількість клітин, кількість клітин, що брунькуються та розраховують їх кількість (%) від загальної.

В препараті з додаванням метиленового синього розраховують кількість живих (незabarвлених) та мертвих (zabarвлених) клітин.

В препараті з додаванням розчину Люголю підраховують кількість вгодованих клітин, які містять в собі жовті або коричневі утворення з глікогену.

### **Обробка результатів експерименту і оформлення звіту**

У протоколі слід зазначити результати забарвлення дріжджів на різних фізіологічних стадіях розвитку розчином Люголю, метиленовим синім, фуксином Циля. Зробити необхідні зарисовки морфології і відзначити у висновках характерні відмінності кожної фізіологічної стадії.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Теоретичні основи біотехнології [Текст] : навч. посіб. / Л. В. Капрельянц. — Харків : Факт, 2020. — 291 с. : табл., рис. — Бібліогр.: с. 290-291.  
<https://elc.library.onaft.edu.ua/library-w/DocumentDescription?docid=OdONAHNT.1438724>
2. Біотехнологія. Словник термінів [Текст] : навч. посіб. для студентів спец. 162 «Біотехнології та біоінженерія» / Л. В. Капрельянц, Т. О. Велічко, О. О. Килименчук, Л. Г. Пожиткова ; під ред. Л. В. Капрельянца. — Харків : Факт, 2021. — 248 с. — Бібліогр.: с. 243-245.  
<https://elc.library.onaft.edu.ua/library-w/DocumentDescription?docid=OdONAHNT.1654172>
3. Біотехнологія з основами екології [Текст] : навч. посіб. / І. М. Трохимчук, Н. В. Плюта, І. П. Логвиненко, Р. М. Сачук ; Рівен. держ. гуманіт. ун-т. — Київ : Кондор, 2019. — 304 с. : табл., рис. — Бібліогр.: с. 281-286.  
<https://elc.library.onaft.edu.ua/library-w/DocumentDescription?docid=OdONAHNT-cnv.BibRecord.166278>
4. Імобілізовані ферменти і клітини в біотехнології [Текст] : навч. посіб. / Н. М. Грегірчак, М. М. Антонюк, Л. М. Буценко ; Нац. ун-т харч. технологій. — Київ : НУХТ, 2015. — 267 с.  
<https://elc.library.onaft.edu.ua/library-w/DocumentDescription?docid=OdONAHNT-cnv.BibRecord.154582>
5. Загальна біотехнологія [Текст] : підручник / Т. П. Пирог, О. А. Ігнатова ; Нац. ун-т харч. технологій. — Київ : НУХТ, 2009. — 336 с.  
<https://elc.library.ontu.edu.ua/library-w/DocumentDescription?docid=OdONAHNT-cnv.BibRecord.67119>
6. Біотехнологія з основами екології [Текст] : навч. посіб. / І. М. Трохимчук, Н. В. Плюта, І. П. Логвиненко, Р. М. Сачук ; Рівен. держ. гуманіт. ун-т. — Київ : Кондор, 2019. — 304 с. : табл., рис. — Бібліогр.: с. 281-286.  
<https://elc.library.onaft.edu.ua/library-w/DocumentDescription?docid=OdONAHNT-cnv.BibRecord.166278>
7. Імобілізовані ферменти і клітини в біотехнології [Текст] : навч. посіб. / Н. М. Грегірчак, М. М. Антонюк, Л. М. Буценко ; Нац. ун-т харч. технологій. — Київ : НУХТ, 2015. — 267 с.  
<https://elc.library.onaft.edu.ua/library-w/DocumentDescription?docid=OdONAHNT-cnv.BibRecord.154582>
8. Методичні вказівки до виконання лабораторних робіт з дисципліни "Біотехнологія ферментів та лікарських засобів" [Електронний ресурс] : для студентів, які навчаються за навч. планами магістрів спец. 162 "Біотехнологія та біоінженерія" галузі знань 16 "Хімічна та біоінженерія" освіт.-проф. програми "Біотехнологія та біоінженерія" ден. форми навчання / Л. В. Капрельянц, О. О. Килименчук, Т. О. Велічко та ін. ; відп. за вип.

Л. В. Капрельянц ; Каф. біохімії, мікробіології та фізіології харчування. — О-де-са : ОНАХТ, 2020. — Електрон. текст. дані: 62 с.

<https://elc.library.onaft.edu.ua/library-w/DocumentDescription?docid=OdОНАХТ.1409825>

9. Харчова біотехнологія [Текст] : підручник / Т. П. Пирог, М. М. Антонюк, О. І. Скороцька, Н. Ф. Кігель ; Нац. ун-т харч. технологій. — Київ : Вид-во Ліра-К, 2016. — 408 с. : табл., рис. — Бібліогр.: с. 391-401.

## ЗМІСТ

ОСНОВНІ ПРИНЦИПИ ЗДІЙСНЕННЯ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ПРОЦЕСІВ.....	3
СИРОВИНА ДЛЯ ПРОМИСЛОВОЇ БІОТЕХНОЛОГІЇ .....	4
АНАЛІЗ СИРОВИНИ ДЛЯ ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНИХ СЕРЕДОВИЩ.....	5
Лабораторна робота № 1 <b>Визначення крохмалю поляриметричним методом.....</b>	5
Лабораторна робота № 2 <b>Визначення масової частки сухих речовин рефрактометричним методом.....</b>	6
Лабораторна робота № 3 <b>МікрОВизначення моносахаридів за Хагедорном- Ієнсеним.....</b>	9
Лабораторна робота № 4 <b>Ебуліостатичний метод визначення редуруючих речовин Нізовкіна та Ємельянової.....</b>	10
ПОЖИВНІ СЕРЕДОВИЩА ТА ПРИНЦИП ІХ СКЛАДАННЯ.....	13
ПРИГОТУВАННЯ ПОЖИВНИХ СЕРЕДОВИЩ ДЛЯ КУЛЬТИВУВАННЯ МІКРООРГАНІЗМІВ.....	16
Лабораторна робота № 5 <b>Приготування поживного середовища для вирощування дріжджів.....</b>	17
Лабораторна робота № 6 <b>Вирощування молочнокислих мікроорганізмів.....</b>	23
Лабораторна робота № 7 <b>Культивування дріжджових клітин на солодовому суслі.....</b>	27
Лабораторна робота № 8 <b>Поверхневе культивування мікробних клітин .....</b>	34
ДОСЛІДЖЕННЯ ГОТОВОЇ ПРОДУКЦІЇ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ВИРОБНИЦТВ.....	35
Лабораторна робота №9 <b>Визначення якісного складу пресованих дріжджів. <i>Sacharomyces cerevisiae</i>.....</b>	35
Лабораторна робота № 10 <b>Отримання пробіотичного молочно – кислого продукту у присутності стимуляторів росту.....</b>	39.
Лабораторна робота № 11 <b>Отримання спирту при зброджуванні вуглеводів дріжджами.....</b>	42
Лабораторна робота № 12 <b>Біотехнологічні основи приготування хліба.....</b>	44
Лабораторна робота № 13 <b>Способи відділення кінцевих продуктів та оцінка концентрації клітин.....</b>	50
Лабораторна робота № 14 <b>Дослідження фізіологічних особливостей дріжджів <i>Sacchfromyces cerevislae</i> у процесі бордіння пшеничного тіста з додаванням олії .....</b>	55
Лабораторна робота № 15 <b>Визначення фізіологічного стану дріжджів .....</b>	56
ЛІТЕРАТУРА .....	58

