

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«ОРЕНБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ДЛЯ ОБУЩАЮЩИХСЯ ПО ОСВОЕНИЮ  
ДИСЦИПЛИНЫ**

**Б1.В.13 Основы биотехнологии переработки  
сельскохозяйственной продукции**

**Направление подготовки : 35.03.07 «Технология производства и переработки сельскохозяйственной продукции»**

**Профиль образовательной программы «Хранение и переработка сельскохозяйственной продукции»**

**Форма обучения очная**

## Содержание

1. КОНСПЕКТ ЛЕКЦИЙ .....	4
1.1 Лекция № 1 .....	4
Тема: «Цели, задачи, основные биологические объекты биотехнологии».....	4
1.2 Лекция № 2 .....	8
Тема: «Методы биотехнологических процессов».....	8
1.3 Лекция № 3 Тема: «Основы молекулярной биотехнологии».....	10
1.4 Лекция № 4Тема: «Микрофлора полуфабрикатов хлебопекарного производства и типы брожения» .....	13
1.5 Лекция №5Тема: «Применение заквасок для хлебобулочных изделий из пшеничной муки» .....	15
1.6 Лекция № 6 Тема: «Приготовление и применение заквасок для хлеба из ржаной и смеси ржаной и пшеничной муки» .....	18
1.7 Лекция № 7 Тема: «Биотехнология кормовых препаратов» .....	19
1.8 Лекция № 8Тема: «Способы культивирования микроорганизмов при переработки растениеводческой продукции».....	21
1.9 Лекция № 9Тема: «Биотехнология переработки молочной сыворотки» .....	23
1.10 Лекция № 10Тема: «Биотехнология кисломолочных продуктов».....	26
2. МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ВЫПОЛНЕНИЮ ЛАБОРАТОРНЫХ РАБОТ .....	29
2.1 Лабораторное работа № 1 Тема: «Растительное сырье, используемое в биотехнологических процессах».....	29
2.2 Лабораторное занятие №2Тема: «Отходы животноводства, используемые в биотехнологических процессах» .....	33
2.3 Лабораторное занятие №3Тема: «Методы, используемые в биотехнологическом производстве» .....	35
2.4 Лабораторное занятие №4Тема: «Химическое консервирование трав» .....	39
2.5 Лабораторное занятие №5Тема: «Химическое консервирование силоса» .....	42
2.6 Лабораторное занятие №6Тема: «Биотехнологические методы приготовления хмельевых дрожжей» .....	46
2.7 Лабораторное занятие № 7Тема: «Влияние температурного режима на развитие дрожжевых клеток».....	47
2.8 Лабораторное занятие №8Тема: «Биотехнологические методы активизации хлебопекарных дрожжей» .....	50

2.9 Лабораторное занятие №9Тема: «Биотехнологические методы приготовления ржаной закваски» .....	52
2.10 Лабораторное занятие№10Тема: «Влияние кислой среды на развитие дрожжевых клеток» .....	55
2.11 Лабораторное занятие№11 Тема: «Биотехнологические процессы квашения груш» .....	57
2.12 Лабораторное занятие №12Тема: «Биотехнологические методы получения пива» .....	58
2.13 Лабораторное занятие№13 Тема: «Биотехнология получения сока с применением ферментов».....	62
2.14 Лабораторное занятие №14 Тема: «Управление покоем и прорастанием клубней картофеля с помощью фиторегуляторов».....	64
2.15 Лабораторное занятие № 15Тема: «Приготовления винных заквасок» .....	65
2.16 Лабораторное занятие № 16 Тема: «Биотехнология кисломолочных напитков» .....	66
2.17 Лабораторное занятие № 17 Тема: «Биотехнологические процессы консервирования огурцов с применением молочной сыворотки».....	68
2.18 Лабораторное занятие № 18 Тема: «Биотехнологические процессы производства творога» .....	69
2.19 Лабораторное занятие № 19 Тема: «Биотехнологические процессы производства сыра» .	72

# **1. КОНСПЕКТ ЛЕКЦИЙ**

## **1.1 Лекция № 1 (2 часа)**

**Тема: «Цели, задачи, основные биологические объекты биотехнологии»**

### **1.1.1 Вопросы лекции:**

1.История возникновения и развития биотехнологии.

1.Биотехнологические процессы.

1.Биологические объекты биотехнологии.

1.Подбор форм микроорганизмов с заданными свойствами

### **1.1.2 Краткое содержание вопросов:**

#### **1. История возникновения и развития биотехнологии.**

История возникновения и развития биотехнологии включает три этапа.

• этап - зарождение биотехнологии с древних времен до конца XVIII в. Археологические раскопки показывают, что ряд биотехнологических процессов зародились в древности. Получение льняного волокна происходит с разрушением пектиновых веществ микроскопическими грибами и бактериями. Иными словами, зарождение биотехнологии тесно связано с сельским хозяйством, переработкой растениеводческой и животноводческой продукции.

• этап (XIX - первая половина XX в.) - становление биотехнологии как науки. Этот этап связан с началом бурного развития биологических наук: генетики, микробиологии, вирусологии, цитологии, физиологии, эмбриологии. На рубеже XIX и XX вв. в ряде стран создаются первые биогазовые установки, в которых отходы животноводства и растениеводства под действием микроорганизмов превращались в биогаз (метан) и удобрение

• этап (с середины 70-х годов XX века) - ознаменовался развитием биотехнологии в различных направлениях с помощью методов генной и клеточной инженерии. Формальной датой рождения современной биотехнологии считается 1972г. когда была создана первая рекомбинантная (гибридная) ДНК, путем встраивания в нее чужеродных генов.

#### **2. Биотехнологические процессы.**

Основная цель биотехнологии - промышленное использование биологических процессов и агентов на основе получения высокоэффективных форм микроорганизмов, культур клеток и тканей растений и животных с заданными свойствами. Биотехнология возникла на стыке биологических, химических и технических наук.

Биотехнологический процесс - включает ряд этапов: подготовку объекта, его культивирование, выделение, очистку, модификацию и использование продуктов.

Первым детально изученным процессом было брожение. Французский ученый Луи Пастер (1822 - 1895) первым показал, что брожение - это жизнь без свободного кислорода или анаэробное дыхание, происходящее при участии дрожжевых грибов. По вопросам бродильного производства - виноделию, пивоварению и получению уксуса - он опубликовал 3 монографии.

Биотехнологические процессы могут быть основаны на периодическом или непрерывном культивировании.

Периодический процесс включает: а) стерилизацию сред, биореакторов и вспомогательного оборудования; б) загрузку аппарата питательной средой; в) внесение посевного материала (клеток, спор); г) рост культуры, который может совпадать во времени со следующим этапом или предшествовать ему; д) синтез целевого продукта; е) отделение и очистку готового продукта. Речь идет о временной последовательности этапов, по окончании последнего этапа проводится мойка биореактора и его подготовка к новому циклу.

Современные периодические процессы основаны на принципе дифференцированных режимов культивирования, который отвечает смене фаз роста культуры. Например, при культивировании актиномицета *Streptomyces nigrifrons* - сверхпродуцента фермента ксилоизомеразы – проводят ступенчатое изменение режима аэрации и перемешивания после 12 часов роста.

Существует также отъемно-доливочное культивирование, когда часть объема из биореактора время от времени изымается при добавлении эквивалентного объема среды. Это приводит к регулярному омолаживанию культуры и к задержке ее перехода к фазе отмирания. Такой режим культивирования в значительной мере уподобляется непрерывному процессу, поэтому называется также полуунпрерывным культивированием.

В непрерывных процессах биообъект постоянно поддерживается в экспоненциальной фазе роста. Обеспечивается непрерывный приток свежей питательной среды в биореактор и отток из него культуральной жидкости, содержащей клетки и продукты их жизнедеятельности. Фундаментальным принципом непрерывных процессов служит равновесие между приростом биомассы за счет деления клеток и их убылью в результате разбавления свежей средой:  $\frac{d}{dt} = D$ , где  $\frac{d}{dt}$  - удельная скорость роста клеток,  $D$  - коэффициент разбавления (скорость убыли концентрации клеток).

Биореактор, работающий в хемостатном режиме культивирования, называют хемостатом. Он включает:

- 1) устройство для вливания питательной среды;
- 2) выпускное приспособление для оттока культуральной жидкости с клетками;
- 3) систему контроля скорости протока.

Во многих странах мира биотехнологии придается первостепенное значение. Это связано с тем, что биотехнология имеет ряд существенных преимуществ перед другими видами технологий, например, химической.

- . Это, прежде всего, низкая энергоемкость. Биотехнологические процессы совершаются при нормальном давлении и температурах 20-40° С.
- . Биотехнологическое производство чаще базируется на использовании стандартного однотипного оборудования. Однотипные ферменты применяются для производства аминокислот, витаминов; ферментов, антибиотиков.
- . Биотехнологические процессы несложно сделать безотходными. Микроорганизмы усваивают самые разнообразные субстраты, поэтому отходы одного какого-то производства можно превращать в ценные продукты с помощью

микроорганизмов в ходе другого производства.

Безотходность биотехнологических производств делает их экологически наиболее чистыми. Экологическая целесообразность биотехнологических производств определяется также возможностью ликвидации с их помощью биологических отходов - побочных продуктов пищевой, деревообрабатывающей, целлюлозно-бумажной промышленности, в сельском и городском хозяйствах.

Исследования в области биотехнологии не требуют крупных капитальных вложений, для их проведения не нужна дорогостоящая аппаратура.

К первоочередным задачам современной биотехнологии относятся - создание и широкое освоение:

- новых биологически активных веществ и лекарственных препаратов для медицины (интерферонов, инсулина, гормонов роста, антител);
- микробиологических средств защиты растений от болезней и вредителей, бактериальных удобрений и регуляторов роста растений, новых высокопродуктивных и устойчивых к неблагоприятным факторам внешней среды гибридов сельскохозяйственных растений, полученных методами генетической и клеточной инженерии;
- ценных кормовых добавок и биологически активных веществ (кормового белка, аминокислот, ферментов, витаминов, кормовых антибиотиков) для повышения продуктивности животноводства;
- новых технологий получения хозяйственно-ценных продуктов для использования в пищевой, химической, микробиологической и других отраслях промышленности;
- технологий глубокой и эффективной переработки сельскохозяйственных, промышленных и бытовых отходов, использования сточных вод и газовоздушных выбросов для получения биогаза и высококачественных удобрений.

### **3. Биологические объекты биотехнологии.**

Главным объектом биотехнологического процесса является клетка. В ней синтезируется целевой продукт. По сути, клетка представляет собой миниатюрный химический завод, где ежеминутно синтезируются сотни сложнейших соединений.

Основа современного биотехнологического производства - синтез различных веществ с помощью клеток микроорганизмов. Клетки высших растений и животных еще не нашли широкого применения, ввиду их высокой требовательности к условиям культивирования.

Начальным этапом биотехнологической разработки является получение чистых культур клеток и тканей. Дальнейшие манипуляции с этими культурами характеризуется единобразием подходов, основанных на классических методах микробиологии. При этом культуры клеток и тканей высших растений и животных уподобляются культурам микроорганизмов.

Эукариоты и прокариоты. Большинство микроорганизмов - одноклеточные существа. Микробная клетка отделена от внешней среды клеточной стенкой, а иногда лишь цитоплазматической мембраной и содержит различные субклеточные структуры. Существует два основных типа клеточного строения, которые отличаются друг от друга рядом фундаментальных признаков. Это эукариотические и прокариотические клетки. Микроорганизмов, имеющих истинное ядро, называют

эукариотами (эу - от греческого - истинный, карио - ядро). Микроорганизмы с примитивным ядерным аппаратом относятся к прокариотам (доя -дерным).

#### **4. Подбор форм микроорганизмов с заданными свойствами**

Подбор необходимых для культивирования форм микроорганизмов с заданными свойствами включает несколько этапов.

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

Получение накопительных культур. Образцы вносят в жидкие питательные среды специального состава, создают благоприятные условия для развития продуцента (температура, РН, источники энергии, углерода, азота и т.д.). Для накопления продуцента холестериноксидазы используют среды с холестерином в качестве единственного источника углерода; углеводородокисляющих микроорганизмов среды с парафинами; продуцентов протеолитических или липолитических ферментов - среды, содержащие белки или липиды.

Выделение чистых культур. На плотные питательные среды засевают образцы проб из накопительных культур. Отдельные клетки микроорганизмов на плотных питательных средах образуют изолированные колонии или клоны, при их пересеве получаются чистые культуры, состоящие из клеток одного вида продуцента.

Другой путь подбора микроорганизмов - из имеющихся коллекций.

Например, продуцентами антибиотиков чаще являются актиномицеты, этанола - дрожжи.

Клон - культура, полученная из одной клетки, чистая культура - совокупность особей одного вида микроорганизмов, штаммы - культуры, выделенные из различных природных сред или из одной среды в разное время.

Определение способности синтезировать целевой продукт - главный критерий при отборе продуцентов. Микроорганизмы должны соответствовать следующим требованиям:

обладать высокой скоростью роста;

использовать для жизнедеятельности дешевые субстраты;

быть устойчивыми к заражению посторонней микрофлорой.

Одноклеточные организмы характеризуются более высокими скоростями синтетических процессов, чем высшие растения и животные. Так, корова массой 500 кг в течение одних суток синтезирует около 0,5 кг белка. Такое же количество белка за одни сутки можно получить с помощью 5 г дрожжей. Интерес представляют фотосинтезирующие микроорганизмы, использующие энергию света, способные к усвоению атмосферного азота. Выгодны термофильные микроорганизмы. Их использование снижает дополнительные затраты на стерилизацию промышленного оборудования. Скорость роста и обмен веществ у этих организ-

МОВ в 1,5-2 раза выше, чем у мезофилов. Синтезирующие ими ферменты устойчивы к нагреванию, действию кислот, органических растворителей.

## **1.2 Лекция № 2 (2 часа)**

### **Тема: «Методы биотехнологических процессов»**

#### **1.2.1 Вопросы лекции:**

1. Генетическая инженерия.
2. Методы хранения посевного материала.
3. Выделение целевого продукта.
4. Концентрирование, обезвоживание, модификация и стабилизация продукта.

#### **1.2.1 Краткое содержание вопросов:**

##### **1. Генетическая инженерия.**

Генетическая инженерия - направленная модификация биообъектов в результате введения искусственно созданных генетических программ.

Уровни генетической инженерии:

генная - прямое манипулирование рекомбинантными ДНК, включающими отдельные гены;

хромосомная - манипулирование с группами генов или отдельными хромосомами;

геномная (клеточная) - перенос всего или большей части генетического материала от одной клетки к другой (клеточная инженерия). В современном понимании генетическая инженерия включает технологию рекомбинантных ДНК.

Работа в области генетической инженерии включает 4 этапа: 1) получение нужного гена; 2) встраивание его в вектор, способный к репликации; 3) введение гена с помощью вектора в организм; 4) питание и селекция клеток, которые приобрели желаемый ген.

##### **2. Методы хранения посевного материала.**

При промышленном культивировании клеток в биореакторах идет процесс постепенного вытеснения менее приспособленных форм более приспособленными, часто менее продуктивными по отношению к вырабатываемым веществам. Он получил название автоселекции. В связи с этим встает проблема длительного хранения клеток без утраты ценных свойств. Это возможно, если резко затормозить все протекающие в них жизненные процессы. Существуют следующие методы хранения.

Люофильное высушивание (обезвоживание после замораживания при температуре -40-60°C и ниже). Применяется в отношении продуцентов антибиотиков.

Высушивание на воздухе в стерильной среде (на почве, бумаге, дисках агар-агара и т.д.).

Сохранение спор (пригоден для спорообразующих бактерий рода *Bacillus*).

Криоконсервация - глубокое замораживание клеток с их последующим хранением в жидком азоте (- 196°C) или в парах азота (- 155°C).

Значительные трудности представляет поддержание сред, оборудования, воздуха в стерильном состоянии. Это необходимо для исключения попадания в биоректоры посторонних микроорганизмов.

Клетки лучше сохраняют свои свойства при создании щадящих условий в биореакторе, приближенных к условиям в лабораторном культиваторе.

### **3. Выделение целевого продукта.**

Первым этапом на пути к очистке целевого продукта является отделение биомассы от культуральной жидкости - сепарация.

Виды сепарации:

1. Флотация. Если клетки продуцента в биореакторе из-за низкой смачиваемости накапливаются в поверхностных слоях жидкости, то жидкость предварительно вспенивают, затем отделяют ее верхний слой с клетками. Флотаторы различных конструкций сжимают, откачивают или соскрывают пену, состоящую из пузырьков газа с прилипшими к ним клетками. Флотацию широко используют как первый этап отделения дрожжевой массы для осветления культуральной жидкости.

Фильтрация - задержание биомассы на пористой фильтрующей перегородке. Применяют фильтры однократного или многократно использования: барабанные, дисковые, ленточные, тарельчатые, карусельные, вакуум-фильтры, фильтр-пресссы различных конструкций, мембранные фильтры. Диаметр пор может превышать размеры клеток. Иногда биомассу сдувают с поверхности фильтра сжатым воздухом или срезают специальным ножом.

Центрифugирование - осаждение взвешенных в жидкости частиц с применением центробежной силы. Требует более дорогостоящего оборудования, чем фильтрование. Поэтому оно оправдывает себя, если: а) суспензия фильтруется медленно; б) поставлена задача максимального освобождения культуральной жидкости от содержащихся частиц; в) необходимо наладить непрерывный процесс сепарации в условиях, когда фильтры рассчитаны только на периодическое действие.

3. Адсорбция - частный случай экстракции, при котором экстрагирующим веществом из жидкой или газовой фазы является твердое тело. Хорошими адсорбентами являются древесный уголь, глины с развитой пористой поверхностью. Путем адсорбции из культуральной жидкости выделяют антибиотики и витамины. К современным методам разделения веществ, основанным на принципах экстракции и адсорбции, относятся хроматография, электрофорез, изотахофорез, электрофокусировка. При хроматографии разделяемая смесь вводится в контакт с подвижной (растворитель) и неподвижной (бумага, твердый адсорбент) фазой.

### **4. Концентрирование, обезвоживание, модификация и стабилизация продукта.**

Концентрирование продукта проводят методами обратного осмоса, ультрафильтрации, выпаривания. Если мембрана пропускает воду, задерживая растворенные в ней вещества, речь идет об осмосе. Прямой осмос - диффузия

вещества через мембрану, разделяющую раствор и растворитель. Раствор помещают в мешок из полупроницаемого материала, а мешок погружают в сосуд с растворителем. За счет разности давлений и осмоса происходит концентрирование продукта. Растворитель, поступающий извне, оказывает на мешок давление, называемое осмотическим. Если к раствору приложить внешнее давление, превышающее осмотическое, то растворитель вытекает через полупроницаемую мембрану против градиента концентрации растворенного вещества, т.е. происходит дальнейшее концентрирование раствора. Подобный процесс представляет собой обратный осмос, используемый как метод концентрирования продукта. Ультрафильтрация - отделение веществ с помощью мембранных фильтров. Применяется для концентрирования таких малостабильных продуктов, как молочная и глютаминовая кислоты, некоторые антибиотики и ферменты. Наиболее древний метод - выпаривание.

### **1.3 Лекция № 3 (2 часа)**

#### **Тема: «Основы молекулярной биотехнологии»**

##### **1.3.1 Вопросы лекции:**

1. Ферменты генетической инженерии
2. Конструирование рекомбинантных ДНК
3. Идентификация и выделение последовательностей генов

##### **1.3.2 Краткое содержание вопросов**

###### **1.Ферменты генетической инженерии**

###### **Основные группы ферментов**

Генетическая инженерия - потомок молекулярной генетики. Если с клетками и клеточными органеллами мы подчас можем работать микроманипуляторами, то никакие, даже самые мелкие микрохирургические инструменты не помогут при работе с макромолекулами ДНК и РНК. Ферменты издавна работают в клетке, выполняя работы по репликации (удвоению) ДНК при делении клетки, reparации повреждений (восстановлению целостности молекулы), в процессах считывания и переноса генетической информации из клетки в клетку или в пределах клетки. Задача генного инженера - подобрать фермент, который выполнил бы поставленные задачи, то есть смог бы работать с определенным участком нуклеиновой кислоты. Следует отметить, что ферменты, применяемые в генной инженерии, лишены видовой специфичности, поэтому экспериментатор может сочетать в единое целое фрагменты ДНК любого происхождения в избранной им последовательности. Это позволяет генной инженерии преодолевать установленные природой видовые барьеры и осуществлять межвидовое скрещивание. Ферменты, применяемые при конструировании рекомбинантных ДНК, можно разделить на несколько групп:

- ферменты, с помощью которых получают фрагменты ДНК (рестриктазы);
- ферменты, синтезирующие ДНК на матрице ДНК (полимеразы) или РНК (обратные транскриптазы);
- ферменты, соединяющие фрагменты ДНК (лигазы);

- ферменты, позволяющие осуществить изменение структуры концов фрагментов ДНК.

### Рестриктазы

Рестриктазы (рестрирующие эндонуклеазы, эндонуклеазы рестрикции) - это ферменты, узнающие и атакующие определенные последовательности нуклеотидов в молекуле ДНК (сайты рестрикции).

Фермент состоит из мономерной полипептидной цепи с молекулярной массой 103 кДа и имеет 3-х доменную структуру. Каждый домен обладает своей ферментативной активностью: 5' - 3' полимеразной, 3' - 5' экзонуклеазной, 5' - 3' экзонуклеазной. 1. 5'—3' полимеразная активность. Для реакции необходимо наличие одноцепочечной ДНК-матрицы и комплементарного участку этой цепи фрагмента — праймера (затравки) с 3'-ОН концом. 2. 3'- 5' экзонуклеазная активность. Гидролизует одноцепочечную или двухцепочечную ДНК с 3'-ОН конца. 3'—5' нуклеаза расщепляет диэфирную связь только в неспаренных участках ДНК. Известно, что при полимеразной реакции с определенной частотой возможно включение в растущую цепь некомплементарного нуклеотида. Однако полимераза не может присоединять нуклеотид к неправильно спаренному концу, образовавшемуся при ее участии. На помощь приходит 3'—5' экзонуклеаза, убирающая ошибочный нуклеотид, на место которого затем присоединяется правильный нуклеотид-предшественник. 3'—5' экзонуклеолитическая активность проявляется в направлении, обратном синтезу ДНК. Таким образом, 3'—5' экзонуклеазная активность ДНК-полимеразы играет важную роль в точности полимеризации, направляемой матрицей. Эффективность, или число оборотов, данной экзонуклеазы в оптимальных условиях составляет 2% от числа оборотов субъединицы с полимеразной активностью.

### Обратная транскриптаза

Обратная транскриптаза используется для транскрипции м-РНК в комплементарную цепь ДНК. При изучении ретровирусов, геном которых представлен молекулами одноцепочечной РНК, было обнаружено, что в процессе внутриклеточного развития ретровирус проходит стадию интеграции своего генома в виде двухцепочечной ДНК в хромосомы клетки-хозяина.

Обратная транскриптаза обладает, по крайней мере, тремя ферментативными активностями:

- 1) ДНК-полимеразной, использующей в качестве матрицы как РНК, так и ДНК;
- 2) активностью РНКазы Н, гидролизующей РНК в составе гибрида РНК—ДНК, но не одно- или двухцепочечную РНК;
- 3) ДНК-эндонуклеазной активностью.

Первые две активности необходимы для синтеза вирусной ДНК, а эндонуклеаза, по-видимому, важна для интеграции вирусной ДНК в геном клетки-хозяина. Очищенная обратная транскриптаза синтезирует ДНК как на РНК-, так и на ДНК-матрицах. Чтобы начать синтез, ревертазе, как и другим полимеразам, необходим короткий двухцепочечный участок (праймер). Праймером может служить одноцепочечный сегмент как РНК, так и ДНК, которые в процессе реакции оказываются ковалентно связанными с новосинтезированной цепью ДНК. Обратную транскриптазу преимущественно используют для транскрипции матричной РНК в комплементарную ДНК (кДНК). Реакцию обратной транскрипции проводят в специально подобранных

условиях с использованием сильных ингибиторов РНКазной активности. При этом удается получать полноразмерные ДНК-копии целевых молекул РНК. В качестве праймера при обратной транскрипции поли (A)-содержащих мРНК используют олиго (dT), а для молекул РНК, не имеющих 3'-поли (A) концов, — химически синтезированные олигонуклеотиды, комплементарные 3'-концу изучаемой РНК. После синтеза на мРНК комплементарной цепи ДНК и разрушения РНК (обычно применяют обработку щелочью) осуществляют синтез второй цепи ДНК. При этом используют способность ревертазы образовывать на 3'-концах одноцепочных кДНК самокомплементарные шпильки, которые могут выполнять функции праймера. Матрицей служит первая цепь кДНК. Данная реакция может катализироваться как ревертазой, так и ДНК-полимеразой I E. coli. Показано, что сочетание этих двух ферментов позволяет повысить выход полноценных двухцепочных молекул кДНК. По окончании синтеза первая и вторая цепи кДНК остаются ковалентно связанными петлей шпильки, служившей праймером при синтезе второй цепи. Эту петлю расщепляют эндонуклеазой S1, специфически разрушающей одноцепочные участки нуклеиновых кислот. Образующиеся при этом концы не всегда оказываются тупыми, и для повышения эффективности последующего клонирования их репарируют до тупых с помощью фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I E. coli. Полученную двухцепочечную кДНК можно затем встраивать в клонирующие векторы, размножать в составе гибридных молекул ДНК и использовать для дальнейших исследований.

## **2. Конструирование рекомбинантных ДНК**

При конструировании рекомбинантных молекул обычно используют сложные смеси потенциальных вставок, и в результате образуется целый набор клонов, из которого путем скрининга и отбора получают нужные рекомбинантные молекулы. Скрининг и отбор можно значительно упростить, если обогатить исходную смесь нужным сегментом; в этом случае для выявления искомого рекомбинанта приходится проверять значительно меньше рекомбинантных клонов. С одной стороны, для конструирования рекомбинантных ДНК можно использовать очищенные фрагменты ДНК, а с другой - само молекулярное клонирование является наиболее простым и эффективным способом очистки фрагментов. Клонирование представляет собой также наиболее эффективный способ получения большинства фрагментов геномной ДНК в значительных количествах. Существует три источника вставок для клонирования:

- 1) геномная ДНК, фрагментированная либо с помощью рестриктирующих эндонуклеаз, либо физическими методами, например с помощью ультразвука;
- 2) синтетические фрагменты ДНК, полученные химическим или ферментативным методом либо путем объединения этих двух методов;
- 3) сегменты ДНК, полученные с помощью ферментативного копирования РНК-матрицы *in vitro*. При расщеплении ДНК эндонуклеазами часто образуются фрагменты, способные к непосредственному лигированию с подходящими липкими или тупыми концами вектора. В других случаях соответствующие концы присоединяют к фрагментам перед лигированием.

### **б. Вставки геномной ДНК**

## **3. Идентификация и выделение последовательностей генов**

Эндонуклеазное расщепление. Наиболее прямой способ получения вставок состоит в расщеплении суммарной геномной ДНК какого-либо организма или вируса с помощью рестриктирующей эндонуклеазы. Метод отличается высокой воспроизводимостью:

специфический фермент разрезает данную ДНК с образованием уникального набора фрагментов. Если при эндонуклеазном расщеплении образуются липкие концы, соответствующие концам векторной молекулы, то клонирование осуществляют сразу или после обогащения популяции фрагментами для получения нужной вставки. Обогащение смеси нужными фрагментами.

Гибридизация меченого зонда с фрагментами ДНК, находящимися в геле, происходит очень неэффективно. Поэтому перед отжигом фрагменты переносят из геля на более подходящую твердую подложку, обычно на нитроцеллюлозный фильтр или нейлон. Сначала гель обрабатывают щелочью, чтобы произошла денатурация ДНК. Затем на него накладывают твердую подложку и пропускают через гель буферный раствор. В результате фрагменты ДНК переходят на подложку с сохранением их взаимного расположения. Далее инкубируют подложку в растворе, содержащем  $^{32}\text{P}$ -зонд, при такой ионной силе и температуре, которые обеспечивают образование водородных связей между зондом и комплементарным фрагментом ДНК. Чувствительность метода зависит от удельной радиоактивности зонда и позволяет зарегистрировать фрагменты, когда их количество измеряется пикограммами. Например,  $^{32}\text{P}$ -меченные зонды, полученные с помощью ник-трансляции, имеют удельную радиоактивность более 100 имп. /мин на 1 пг, что достаточно для визуализации радиоавтографов.

#### **1.4 Лекция № 4 (2 часа)**

**Тема: «Микрофлора полуфабрикатов хлебопекарного производства и типы брожения»**

##### **1.4.1 Вопросы лекции:**

1. Дрожжи хлебопекарные
2. Спиртовое брожение
3. Молочно-кислое брожение

##### **1.4.2 Краткое содержание вопросов:**

###### **1. Дрожжи хлебопекарные**

Дрожжи применяемые в хлебопекарном производстве, относятся к виду *Saccharomyces cerevisiae*. Они играют основную роль по распространенности, скорости размножения и интенсивности брожения.

Это крупноклеточные овальные дрожжи, адаптированные к повышенной кислотности теста и к его кислотнообразующей микрофлоре.

Дрожжи сбраживают глюкозу, фруктозу, сахарозу, мультозу, простые декстрины, не сбраживают лактозу, крахмал, клетчатку. Они усваивают этиловый спирт, молочную кислоту, уксусную кислоту.

Дрожжевая клетка состоит из оболочки, цитоплазматической мембранны и цитоплазмы. Размер клетки составляет в средней 8-10 мкм.

Оболочка представляет собой плотную, прочную и эластичную структуру, способную обеспечивать постоянство формы клетки и выдерживать значительное осмотическое давление (до 2 МПа).

Цитоплазма - сложная по составу коллоидная система. В цитоплазме протекают важнейшие реакции биосинтеза и хранится генетическая информация. В ней расположены органоиды (митохондрии, рибосомы, ядро, эндоплазматический ретикулум и аппарат Гольджи) и вакуоли (одна, реже две). Митохондрии представляют собой сферические или удлиненные внутриклеточные органеллы содержащие ферментные системы, главным образом переноса электронов. В функции митохондрий входят окислительные реакции, являющиеся источником энергии, перенос электронов по цепи реакций синтеза АТФ, синтез части митохондриальных белков. Рибосомы - ультрамикроскопические гранулы в виде неправильных шариков, состоящих из белка и РНК. В рибосомах осуществляется синтез белков и ферментов. Ядро имеет форму круглого и овального пузырька, окруженного оболочкой. Главная функция ядра - хранение и передача генетической информации при делении клетки.

## 2. Спиртовое брожение

Одним из факторов влияющих на ход технологического процесса и качество продукции является исходная биологическая активность дрожжей и способность их адаптироваться к анаэробным условиям жизнедеятельности в полуфабрикатах хлебопекарного производства. От этих факторов зависит их бродильная активность, углеводный и азотный обмен, образование ферментов. Условия культивирования биомассы *Saccharomyces cerevisiae* на дрожжевых заводах способствуют образованию в дрожжах активного фермента амилазного комплекса, а также фермента . В зависимости от условий культивирования дрожжевые клетки сахаромицетов получают необходимую для жизнедеятельности энергию за счет образования углеводов или за счет окисления последних.

Процесс сбраживания углеводов в отсутствии кислорода с образованием конечных продуктов — этанола и диоксида углерода — осуществляется через целый ряд промежуточных продуктов с участием многочисленных ферментов в соответствии с циклом Кребса.

1. На первой стадии этого процесса осуществляется образование фосфорных эфиров сахаров. Происходит фосфорилирование глюкозы с участием аденоцистрифосфорной кислоты (АТФ) катализируемое ферментом глюкокиназой.
2. Образовавшийся глюкозо-6-фосфат подвергается изомеризации, превращаясь под действием фермента глюкозофосфатизомеразы во фруктозо-6-фосфат.
3. Фруктозо-6-фосфат подвергается дальнейшему фосфорилированию за счет аденоцистрифосфорной кислоты с участием фермента фософруктокиназы, в результате образуется фруктозо-1,6-дифосфат.

Этой реакцией заканчивается подготовительная стадия анаэробного и аэробного расщепления сахаров.

4. На этой стадии фруктозо-1,6-дифосфат при участии фермента альдолазы распадается на две молекулы фосфотриоз - фосфоглицериновый альдегид и фосфодиоксиацитон.

5. Фосфотриозы под действием фермента триозофосфатизомеразы изомеризуются причем равновесие устанавливается при содержании 95% фосфоглицеринового альдегида и 5% фосфодиоксиацетона.

6. Фосфоглицериновый альдегид окисляется в 1,3-дифосфоглицериновую кислоту при участии фермента дегидрогеназы фосфоглицеринового альдегида.

7. Образовавшаяся 1,3-гифосфоглицериновая кислота под действием фермента фосфатрансферазы превращается в 3-фосфоглицери новую кислоту;

### **3. Молочно-кислое брожение**

По ферментативной деятельности молочнокислые бактерии разделяют на гомоферментативные и гетероферментативные. При гомоферментативном брожении образуется 85-90% молочной кислоты, при гетероферментативном - около 20-40%. Кроме того, при молочнокислом брожении, помимо молочной кислоты, образуются уксусная кислота, муравьиная кислота, этиловый спирт, диоксид углерода и другие вещества. Молочнокислые бактерии являются факультативными анаэробами. Из углеводов они преимущественно сбраживают гексозы и дисахариды. Гетероферментативные молочнокислые бактерии и некоторые виды, сбраживают пентозы. Согласно современным представлениям гомо- и гетероферментативные молочнокислые бактерии отличаются по механизму сбраживания углеводов. Гомоферментативные виды содержат фермент альдолазу, но лишены пентозофосфокетолазы. В связи с этим молочно-кислое брожение у них протекает как гликолиз.

У гетероферментативных культур нет альдолазы и триозофосфатизомеразы, но есть пентозофосфокетолаза, поэтому расщепление углеводов происходит исключительно по пентозофосфатному пути. Гомоферментативное молочно-кислое брожение происходит по гликолитической схеме Эмбдена — Мейергофа. Гетероферментативное сбраживание глюкозы молочнокислыми бактериями происходит другим путем - пентозофосфатным. Способность сбраживать пентозы наряду с глюкозой также отличает эти бактерии.

#### **1.5 Лекция №5 (2 часа)**

**Тема: «Применение заквасок для хлебобулочных изделий из пшеничной муки»**

##### **1.5.1 Вопросы лекции:**

1. Приготовление комплексной заварки
2. Ацидофильные закваски
3. Мезофильные дрожжевые закваски

##### **1.5.2 Краткое содержание вопросов:**

###### **1. Приготовление комплексной заварки.**

Основу пропионовокислая закваска составляет штамм ВКМ-103. Данная закваска разработана для получения наиболее эффективного биотехнологического средства предотвращения картофельной болезни хлеба и его плесневения. Пропионовая и муравьиная кислоты, синтезируемые этим штаммом, оказывают максимальное ингибирующее действие на развитие споровых бактерий, подавляя флавиновые ферменты дыхательного цикла. Кроме того, эта культура в процессе

метаболизма накапливает значительные количества витамина В12, уровень которого можно регулировать путем введения в среду солей кобальта. Этот витамин участвует в процессе кроветворения, поэтому применение данной закваски имеет двойное значение: для предотвращения развития в хлебе микробиологический инфекции и обогащение его витамином В12 с целью повышения биологической ценности хлеба. Пропионовокислая закваска характеризуется следующими биохимическими и технологическими показателями:

бактерицидная активность	100%
фунгицидная активность	100%
количество клеток	200-250
кислотность	12-14 град

Основу комплексной закваски составляют музейные штаммы трех видов молочнокислых бактерий L. casei-C1, L. brevis-B78, L. fermenti-34, пропионовокислых бактерий *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* BKM-103 и дрожжи *S. cerevisiae* в соотношении 0,5:0,25:0,25:0,02:1. В качестве питательного субстрата для приготовления закваски используется мучная осахаренная заварка, которая готовится из пшеничной муки первого сорта при соотношении муки : вода =1:3.

Комплексная закваска обладает антибиотической активностью к спороносным бактериям и плесеням. Биохимические и технологические характеристики комплексной закваски следующие:

мальтазная активность	антибиотическая активность
— по отношению к спорообразующим бактериям	полное подавление в течение 48 ч
— по отношению к плесеням	подавление в течение 72 ч
подъемная сила	15-20
кислотность	8-12

При непрерывном ведении комплексной закваски в течение 3 недель получены стабильные показатели геометрической закваски.

Комплексная закваска является разнообразной по химическому составу, в ней обнаружено 20 летучих компонентов. Среди них преобладающими являются 3-метилбутанол (22,99%), эфир муравьиной кислоты (18,52%), 1-метилокси-2-пропанол (17,24%), уксусная кислота (7,02%).

## 2. Ацидофильная закваска

Ацидофильная закваска состоит из музейной культуры

L. sidophilus-146 и штамма дрожжей «Рязанские-17», адаптированного к высоким температурам (40-45° С) на основе рязанской расы.

Ацидофильная закваска характеризуется устойчивостью к повышению температуры, имеет следующие биохимические и технологические показатели. В ацидофильной закваске обнаружен высокий уровень аминокислот: содержание лизина составляет 1585 мг/100 г, лейцина - 1275 мг/100 г, валина - 510 мг/100 г. В

ацидофильной закваске идентифицированы следующие летучие вещества: 3-метилбутанол, уксусная кислота, 1-метил-пропанол, пропионовая кислота и др. Применение ацидофильной закваски эффективно для улучшения качества изделий с крепкой клейковиной, при ускоренных технологиях

приготовления теста, а также при выработке батонов и сдобных изделий с высоким содержанием сахара и жира.

### **3. Мезофильные дрожжевые закваски**

Мезофильная дрожжевая и дрожжевая закваски

Для создания дрожжевых заквасок в регионах с низкими значениями среднегодовых температур (взамен жидких дрожжей) проведены исследования по селекции молочнокислых бактерий, способных развиваться-

ся при температуре 25-28° С. Исследованиям была подвергнута вся группа мезофильных бактерий из музея ГосНИИХП. После предварительных испытаний были отобраны штаммы *L. casei*-СГ, *L. plantarum*-А63, *L. brevis* В-5, *L. brevis* В78. На основе осахаренной заварки и каждого выбранного штамма бактерий была приготовлена закваска, которая инкубировалась непрерывно в течение недели при низких температурах.

Заквашенная каждым из испытанных штаммов и их смесью мучная питательная среда была использована для выращивания дрожжевой культуры *S. cerevisiae* штамм «Фр-3», выделенный из инстантных дрожжей и устойчивый к низким температурам. Оценку качества полученных мезофильных жидких дрожжей проводили по технологическим показателям и стабильности в процессе длительного возобновления при пониженных температурах. Все варианты мезофильных жидких дрожжей были использованы при приготовлении формового и подового хлеба из муки пшеничной высшего, 1 и 2 сортов. При проведении исследований определены такие показатели: такие показатели, как интенсивность газообразований в тесте. Пробы хлеба оценивались по удельному объему, пористости, структурно-механическим свойствам.

На основании полученных результатов была отобрана смесь микроорганизмов *L. casei*-С1, *L. plantarum*-АГ3 и дрожжей штамма «Фр-3». При использовании перечисленных культур достигались наилучшие технологические показатели в мезофильной дрожжевой закваске:

Подъемная сила 12-18 мин

кислотность 10-12 град

количество дрожжевых клеток 30-35

количество клеток молочнокислых бактерий       $120-130 \times 10^9/\text{г}$

## **1.6 Лекция № 6 (2 часа)**

**Тема: «Приготовление и применение заквасок для хлеба из ржаной и смеси ржаной и пшеничной муки»**

### **1.6.1 Вопросы лекции:**

1. Применение чистых культур микроорганизмов
2. Процессы протекающие при брожении ржаных полуфабрикатов
3. Способы направленного регулирования биохимических процессов в ржаных полуфабрикатах

### **1.6.2 Краткое содержание вопросов:**

#### **1. Применение чистых культур микроорганизмов**

В хлебопекарной промышленности, перерабатывающей нестерильное сырье особое значение имеет использование чистых культур. В результате многолетнего практического опыта производства заквасок сформулирована задача применения чистых культур в качестве источника стабильной микрофлоры полуфабрикатов.

Чистой культурой называется совокупность микроорганизмов, выращенных из одной клетки и не содержащих посторонних микроорганизмов. Технически чистые культуры - культуры, содержащие незначительные примеси других микроорганизмов.

Чистые культуры дрожжей и молочнокислых бактерий широко используются в ряде отраслей пищевой промышленности, в том числе и хлебопекарной отрасли.

Преимущества применения чистых культур молочнокислых бактерий заключается в следующем:

- чистые культуры создают возможность использования определенных видов и цистаммов микроорганизмов, создания оптимальных

условий их жизнедеятельности в средах, достижения максимального эффекта качества готового продукта;

- используя специфические свойства отдельных штаммов молочно-кислых бактерий, в частности, их способность к кислотообразованию и синтезу побочных продуктов их жизнедеятельности, можно

путем комбинации этих бактерий, получать продукты разнообразного вкуса, поскольку этот показатель качества определяется под-

бором видов чистых культур микроорганизмов;

- чистые культуры обеспечивают приготовление заквасок высокого качества в наиболее короткий период времени и гарантируют подавление посторонней микрофлоры муки;

- чистые культуры дают возможность повышать выход продукции за счет более экономного использования муки в процессе брожения;
- с применением чистых культур дрожжей и молочнокислых бактерий создаются возможности направленного управления технологическим процессом.

## **2. Процессы протекающие при брожении ржаных полуфабрикатов**

Процессы, протекающие при брожении ржаных полуфабрикатов

Сложный состав микрофлоры заквасок и теста обуславливает сложные биохимические и микробиологические процессы, протекающие при приготовлении ржаного теста.

Важнейшим фактором, определяющим ход биохимических процессов в ржаной закваске и тесте, является видовой состав микрофлоры и его изменение в зависимости от условий внешней среды.

## **3. Способы направленного регулирования биохимических процессов в ржаных полуфабрикатах.**

Основным способом регулирования биохимических процессов в ржаных полуфабрикатах является подбор вида и характеристик микрофлоры заквасок. Кроме того, неоднородность качества зерна ржи определяет различие в свойствах муки из него и необходимость корректировки хлебопекарных свойств муки для улучшения качества хлеба.

Для обеспечения нормальной жизнедеятельности микрофлоры ржаных заквасок необходима полноценная питательная среда и оптимальные условия приготовления.

### **1.7 Лекция № 7 (2 часа).**

#### **Тема: «Биотехнология кормовых препаратов»**

##### **1.7.1 Вопросы лекции.**

- 1.Получение кормовых белков
- 2.Производство незаменимых аминокислот
3. Кормовые липиды

##### **1.7.2 Краткое содержание вопросов:**

###### **1.Получение кормовых белков.**

Технологическая схема получения кормовой биомассы

Технология белковых веществ мало зависит от типа используемого сырья. Технологическая блок-схема получения кормовой биомассы состоит из нескольких отделений (рис. 9). Всякое производство требует наличия нормативного и аварийного запаса исходных и вспомогательных веществ, обеспечивающих его нормальную эксплуатацию, в том числе и при временных перебоях и поставках

Простейший аппарат должен иметь: 1) емкость с большим рабочим объемом для роста микроорганизмов; 2) системы ввода и вывода жидкостных и газовых потоков; 3)систему перемешивания, обеспечивающую полное смешение по жидкой фазе и

усиливающую массо- и теплопередачу при определенной турбулентности потока; 4)систему диспергирования газовой фазы в ферментере, необходимую для ускорения массопередачи из газовой фазы в жидкую; 5)теплообменные устройства, позволяющие быстро отводить теплоту из зоны реакции.

В промышленности применяют несколько типов ферментеров, с учетом используемого сырья (жидкое, газообразное, водорастворимое), количества получаемой биомассы и разных технологических схем:

1) батарея параллельно работающих ферментеров. Обеспечивает большую производительность завода. Используется моносубстрат;

батарея последовательно работающих ферментеров. Используется сложный субстрат, все компоненты его потребляются штаммом-продуцентом наиболее полно; батарея последовательно работающих ферментеров с дополнительной промежуточной подачей питательной среды (с подпиткой). Высокая концентрация субстрата ингибирует или угнетает рост и развитие микробной популяции, а малая концентрация не позволяет достигнуть экономически оправданной концентрации биомассы в отходящей на стадию сгущения суспензии; батарея последовательно работающих ферментеров с рециркуляцией части суспензии микроорганизмов, используется в случае применения сложного трудноутилизируемого субстрата, когда микроорганизмам требуется длительное время адаптации к одному или нескольким компонентам сырья. Введение уже адаптированных к сырью клеток сокращает время пребывания микроорганизмов в ферментере, увеличивает скорость протока и повышает степень утилизации субстрата; батарея последовательно соединенных ферментеров с подпиткой и рециркуляцией суспензии микроорганизмов. Наиболее полная утилизация многокомпонентного трудноусвояемого субстрата, ингибирующего в высоких концентрациях микробные клетки.

## **2.Производство незаменимых аминокислот**

Первичные метаболиты - это низкомолекулярные соединения, необходимые для роста микробов. Наиболее важными для промышленности являются аминокислоты, органические кислоты, пуриновые и пиридиновые нуклеотиды, растворители и витамины. Микробные клетки, как и клетки других живых существ, не производят избытка первичных метаболитов, что было бы расточительно и уменьшало способность к выживанию. Но существуют и микробные штаммы с нарушениями регуляции синтеза этих метаболитов, которые и служат исходными штаммами для промышленных процессов. Многие аминокислоты и нуклеотиды производятся в процессе ферментаций, осуществляемых ауксотрофами (т.е. микробами, нуждающимися для воспроизведения в факторах роста), у которых нарушены процессы регуляции синтеза ферментов. Штаммы *Brevibacterium flavum* и *Corynebacterium glutamicum* превращают более трети Сахаров, содержащихся в культуральной среде, в лизин. Получается не менее 75 г лизина на 1 л среды. Лизин - конечный продукт разветвленного метаболического пути, который также ведет к синтезу метионина и треонина. Из 20 аминокислот, составляющих белки, восемь не могут синтезироваться в организме человека. Эти незаменимые аминокислоты должны содержаться в пище. Особенно важны метионин и лизин. Метионин производится синтетически, тогда как 80 % лизина - биосинтетически. Микробиологическим синтезом можно получить биологически активные изомеры (L-аминокислот), в то время как при химическом синтезе получаются равные количества обоих изомеров. Поскольку их трудно разделить, половина продукции оказывается биологически бесполезной. Глутаминовая кислота, которая в виде натриевой соли применяется в

качестве специи, синтезируется исключительно культурами *Corynebacterium glutamicum* и *Brevibacterium flavidum*. Субстратом для этих видов ферментации служит глюкоза. Но в конце 1960-х гг. использовали н-парафины из-за их избытка и дешевизны. Еще одним потенциальным субстратом, не столь дорогим, как глюкоза, является уксусная кислота. Основным субстратом для производства лизина и глутаминовой кислоты служит патока (меласса) отход производства сахара. Когда *Corynebacterium glutamicum* растет в среде с меньшей, чем оптимальная, концентрацией биотина, нарушается синтез мембранных фосфолипидов, в результате глутамат натрия проходит через мембрану и накапливается в среде. То же происходит при добавлении к культуральной среде пенициллина: этот антибиотик подавляет синтез клеточной стенки и тем самым способствует выделению аминокислот.

Промышленное производство аминокислот, особенно лизина и метионина, будет развиваться не только для питания людей, но и для получения добавок в комбикорм скота. Растет также спрос на глицин, аланин и цистеин: первые две аминокислоты используются как приправы, третья - для создания пористой структуры хлеба. Аминокислоты используются также для лечения заболеваний желудка и печени, чем также объясняется повышенный спрос на них.

### **3. Кормовые липиды**

По данным ряда специалистов мировой дефицит белка к концу XX века составит в 30 - 35 млн. т. Основным путем снижения и ликвидации этого дефицита является производство биомассы с помощью микробного биосинтеза, имеющее следующие преимущества перед другими источниками белковых веществ. Микроорганизмы обладают высокой скоростью накопления биомассы, которая в 500 - 5000 раз выше, чем у растений или животных; микробные клетки способны накапливать очень большое количество белка (дрожжи - до 60%, бактерии - до 75% по массе); в микробиологическом производстве за счет высокой специфичности микроорганизмов отсутствует многостадийность; сам процесс биосинтеза протекает в мягких условиях при температуре 30 - 45 С, pH 3-6 и давлении ~ 0,1 Мпа, менее трудоемок по сравнению с получением сельскохозяйственной продукции и органическим синтезом белков

#### **1.8 Лекция № 8 (2 часа).**

**Тема: «Способы культивирования микроорганизмов при переработки растениеводческой продукции»**

##### **1.8.1 Вопросы лекции:**

1. Глубинный метод культивирования продуцентов ферментов
2. Поверхностный метод культивирования продуцентов ферментов

##### **1.8.2 Краткое содержание вопросов**

##### **1. Глубинный метод культивирования продуцентов ферментов**

Глубинный метод культивирования заключается в выращивании микроорганизмов в жидкой питательной среде. Он технически более совершенен, чем поверхностный, так как легко поддается механизации и автоматизации. Весь процесс должен проводиться в строго асептических условиях, что с одной стороны, является преимуществом метода, а с другой - составляет наибольшую техническую трудность, т.к. нарушение асептики часто приводит к прекращению образования ферmenta.

Концентрация фермента в среде при глубинном культивировании обычно значительно ниже, чем в водных экстрактах поверхностной культуры. Фильтраты культуральных жидкостей содержат не более 3% сухих веществ. Это вызывает необходимость предварительного концентрирования фильтратов перед тем, как выделять ферменты любым методом. Технологические схемы при глубинном способе культивирования почти не отличаются одна от другой, независимо от среды и продуцента. Исключение представляют те редкие случаи культивирования анаэробных микроорганизмов, в которых опускается стадия подготовки воздуха. Способы культивирования микроорганизмов Методы приготовления питательных сред различны и зависят от состава компонентов. Для некоторых требуется предварительная обработка: измельчение, отваривание, экстрагирование, гидролитическое расщепление. Затем готовые к растворению компоненты подают при постоянном перемешивании через дозирующие устройства в емкость для приготовления среды. Необходимо соблюдать последовательность введения в смесь отдельных компонентов. Емкости и аппараты для предварительной обработки и смешивания компонентов изготавливают из нержавеющей стали или с антикоррозионным покрытием. Передачу жидких потоков осуществляют насосами, самотеком или продавливанием сжатым воздухом. В отделении приготовления сред должны быть смесители с мешалками и барботерами, теплообменники, дозаторы, размельчители, экстракторы, варочные котлы, аппараты для ферментативного гидролиза. Стерилизация питательных сред. Эта подготовительная операция осуществляется двумя способами - отделением микроорганизмов от среды или уничтожением их в среде.

Перспективнее первый способ, поскольку при любом методе уничтожения микроорганизмов происходит воздействие «губительного» фактора и на компоненты питательной среды. Первый способ проводят с помощью полупроницаемых мембран в процессе микрофильтрации. Возможно применение стерилизующих микрофильтрационных патронов. Второй метод стерилизации на производстве осуществляют с помощью высоких температур. Чем выше температура, тем скорее происходит отмирание микроорганизмов. Экспозиция зависит от уровня обсемененности объекта. Чем больше микроорганизмов в обрабатываемом объеме, тем больше особей выживает за данное время в выбранных условиях стерилизации.

Стерилизацию питательных сред можно производить периодически и непрерывно. Основными элементами любого ферmentера являются перемешивающие и аэрирующие устройства. Они создают большую поверхность фазового контакта газ - жидкость. Воздух подают в аппарат через барботеры или форсунки. Для перемешивания используют сложные мешалки. Важнейшим условием эффективной работы ферментеров является контроль и автоматическое поддержание оптимального уровня основных параметров процесса. Ведется непрерывное автоматическое определение содержащихся в среде углеводов, количество образовавшихся метаболитов и концентрации клеток.

## **2. Поверхностный метод культивирования продуцентов ферментов**

Культура растет на поверхности твердой увлажненной питательной среды. Мицелий полностью обволакивает и прочно скрепляет твердые частицы, клетки получают питание за счет содержащихся в этих средах веществ и используют для дыхания кислород воздуха, поэтому для их нормального обеспечения кислородом приходится применять рыхлые по своей структуре среды с небольшой высотой слоя. Недостатком метода является необходимость больших площадей для выращивания. Выращивание производственной культуры происходит обычно в неасептических условиях. Однако среда и кюветы должны быть надежно стерилизованы. Перед новой

загрузкой должны дезинфицироваться растильные камеры, а также все мелкое оборудование и инвентарь. Главное преимущество поверхностного метода - более высокая конечная концентрация фермента на единицу массы среды. Например, для осахаривания 100 кг крахмала в спиртовом производстве требуется 5 кг поверхностной культуры плесневых грибов или около 100 кг культуральной жидкости. Поверхностные культуры можно быстро и легко высушить, их легко перевести в товарную форму и транспортировать. Меньше потребность электроэнергии по сравнению с глубинным методом. Посевной материал. Может быть в виде культуры, выращенной на твердой питательной среде, спорового материала или мицелиальной массы продуцента, выращенной глубинным методом. Посевную культуру получают выращиванием микроорганизмов во все возрастающем количестве в 3 или 4 этапа.

## **1.9 Лекция № 9 (2 часа)**

### **Тема: «Биотехнология переработки молочной сыворотки»**

#### **1.9.1 Вопросы лекции:**

1. Общая характеристика микрофлоры молочной сыворотки
2. Переработка молочной сыворотки на основе брожения лактозы
3. Переработка молочной сыворотки на основе окисления лактозы

#### **1.9.2 Краткое содержание вопросов:**

##### **1. Общая характеристика микрофлоры молочной сыворотки**

Молочная сыворотка характеризуется как полноценная среда, содержащая все необходимые элементы питания для различных микроорганизмов. Не случайно в молочной сыворотке чрезвычайно быстро развиваются различные группы микроорганизмов, происхождение которых связано как с остаточной термостойкой и термофильной микрофлорой пастеризованного молока, так и с культурной микрофлорой заквасок, используемых при производстве белковых продуктов. Ниже приведены наиболее часто встречающиеся в молочной сыворотке представители остаточной микрофлоры пастеризованного молока. Среди микрофлоры, остающейся после пастеризации, имеются представители как споровой, так и неспоровой групп микроорганизмов, а также виды, неспособные использовать лактозу в качестве источника углеродногопитания и энергии. Большинство термостойких бактерий являются мезофильными, обладающими высокой теплостойкостью. Они не развиваются при температурах пастеризации, но многие клетки в культуре их способны сохранять свою жизнеспособность на протяжении всего процесса пастеризации. Когда температура среды снова понижается, они возобновляют свой рост

##### **2. Переработка молочной сыворотки на основе брожения лактозы.**

###### **1. Состав и свойства МС**

Традиционные способы разделения молока, основанные на биотехнологии (закваски, ферменты) и использовании химических реагентов (кислоты, щелочи, соли), обеспечивают получение подсырной (сладкой), творожной (кислой) и казеиновой сыворотки. Степень перехода основных компонентов молока в МС определяется главным образом их размерами. Состав и свойства молочной сыворотки обусловлены видом ОП (творога, сыра, казеина и т.д.) и особенностями технологии его получения, а

также аппаратурным оформлением процесса (Храмцов, 1990). Состав подсырной сыворотки зависит от вида вырабатываемого сыра и его жирности; творожной - от способа производства творога и его жирности; казеиновой - от вида вырабатываемого казеина. Производство сладкой сыворотки является относительно легким процессом, тогда как для переработки кислой требуется значительно больше оборудования и стадий (Шевелев, 2005). Нетрадиционные способы разделения молока, разработанные в последнее время (молекулярно-ситовая фильтрация, термодинамическое выделение белков молока биополимерами), дают ультрафильтрат и бесказеиновую фазу. Различные виды МС отличаются содержанием лактозы, белков, пептидов, аминокислот, витаминов, поэтому представляют собой разную среду для молочнокислых бактерий (Шуляк, 2005). Количество жира в МС зависит от его количества в исходном сырье и технологии выработки ОП. Жир в МС диспергирован больше, чем в молоке, что положительно влияет на биохимические процессы, происходящие в организме человека и животных. Минеральный состав МС разнообразен. В нем переходят практически все соли и микроэлементы молока, а также соли, вводимые при выработке ОП, и соединения с поверхности оборудования. В МС переходят водо- и жирорастворимые витамины молока. Из органических кислот обнаружены молочная, лимонная, нуклеиновая и летучие жирные кислоты - уксусная, муравьиная, пропионовая, масляная. Жир МС тонкодиспергирован, что обуславливает его полное усвоение стенками желудка. МС - низкокалорийный продукт. При хранении состав и свойства МС изменяются. Этому способствует действие молочнокислых бактерий в процессе производства, обсеменение микрофлорой.

Существуют несколько способов переработки МС:

- тепловые,
- центробежные,
- консервирование,
- биологические,
- мембранные (Храмцов, 2004).

2.1 Термальные методы Термальные методы используются для охлаждения МС с целью сохранения ее качества при временном хранении, подогрева - с целью пастеризации, выделения сывороточных белков, проведения некоторых других технологических операций (Храмцов, 2004).

2.2 Охлаждение Охлаждение предотвращает развитие нежелательных микробиологических процессов при временном хранении сырья и продуктов. В частности, в случаях, когда их переработка, использование или реализация задерживаются. Охлаждение необходимо проводить немедленно после получения МС или ее сепарирования, не допуская обсеменения посторонней микрофлорой. Наилучшие результаты дает охлаждение в сочетании с предварительной пастеризацией (Храмцов, 2004).

2.3 Пастеризация Процесс пастеризации МС в большинстве случаев обусловлен необходимостью подавить развитие нежелательной микрофлоры. Источниками микрофлоры могут быть специально вводимые закваски при производстве ОП; возможно также обсеменение посторонней микрофлорой при сборе и хранении МС.

2.4 Центробежные методы Центробежные методы (сепарирование, центрифугирование) используются для выделения из МС жира, казеиновой пыли,

коагулированных сывороточных белков, отделения кристаллов сахара, некоторых других технологических процессов.

2.5 Консервирование Для сохранения первоначальных свойств МС и некоторых полуфабрикатов помимо пастеризации и охлаждения могут применяться различные способы консервирования. Консервирование - такая обработка МС, в результате которой продукты сохраняются длительное время без порчи (без разложения белков, жиров, углеводов и др. компонентов). Важно также наиболее полно сохранить основные свойства продукта (вкус, внешний вид, биологическую и пищевую ценность) при наименьших затратах. В основе консервирования - прекращение жизнедеятельности МО, которые могут вызвать порчу продуктов, или прекращение биохимических процессов, происходящих в продуктах под влиянием ферментов, а также торможение окислительно-восстановительных реакций. Для консервирования МС применяются способы:— введение консервантов (сорбиновая кислота, свекловичный сахар, формалин, перекись водорода, поваренная соль);

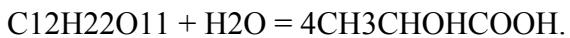
— сгущение и сушка (консервирование за счет повышения осмотического давления и накопления молочной кислоты);

— различные сочетания (консерванты+сгущение, сгущение+охлаждение, консерванты+сгущение+охлаждение, пастеризация+сгущение+охлаждение).

Применение их определяется назначением продукта, возможностями предприятия и экономическими соображениями (Храмцов, 2004).

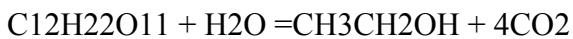
2.6 Биологические методы Биологическая обработка МС повышает ее питательную ценность за счет обогащения полезными веществами, а также получения ряда специфических продуктов. Основные направления биологической обработки: синтез белковых веществ дрожжами, использующими лактозу; гидролиз лактозы ферментами до более сладких моноз; микробный синтез витаминов, жира, ферментов и АБ; переработка лактозы в молочную кислоту и этиловый спирт; расщепление молочных белков до свободных аминокислот.

3. Обработка МО Использование МО - один из основных методов обогащения молочного сырья, в том числе и МС, белком. На этом методе основано производство широкого ассортимента продуктов и полуфабрикатов для пищевых (напитки, сыворотка для хлебопекарной и кондитерской промышленности), кормовых (сыворотка обогащенная, закваски для силосования кормов,) и технических (этиловый спирт, молочная кислота, столовый уксус, лизин и др.) целей. Для этого в МС после предварительной обработки вносят различные закваски, которые готовят на чистых культурах определенных видов МО (молочнокислых, уксуснокислых бактерий, дрожжей). В результате молочнокислого брожения происходит расщепление лактозы до глюкозы и галактозы и далее до молочной кислоты:



лактоза молочная кислота

Параллельно с молочнокислым брожением, как правило, протекают побочные процессы, которые обусловливают накопление продуктов распада лактозы - летучих кислот, спиртов, диацетила. Брожение прекращается самопроизвольно, когда МО расщепляют лишь часть (20%) лактозы, поскольку образующаяся молочная кислота губительно действует на их развитие. Получение этилового спирта из МС основано на сбраживании лактозы специальными видами дрожжей до спирта и углекислоты:



лактоза спирт этиловый Считается, что на спирт расходуется до 95% молочного сахара, а 5% идет на образование массы дрожжевых клеток и побочных продуктов спиртового брожения.

### **3. Переработка молочной сыворотки на основе окисления лактозы**

Суть технологии состоит в том, что исходную МС очищают от белков, вносят дрожжи и ведут процесс брожения при 33-34°C в течение 48-72 ч. Затем дрожжи отделяют от бражки (например, центрифугированием), а последнюю подвергают дистилляции. Выход спирта в условиях промышленного производства составляет 84%. Побочными продуктами процесса получения спирта являются сывороточные белки, которые могут использоваться на пищевые цели, а также послеспиртовая бражка, которая может использоваться на корм сельскохозяйственным животным. Наиболее приемлемый процент белка в МС - дрожжи, использующие для питания лактозу. Дрожжевая сыворотка по содержанию белка превосходит исходную. Кроме дрожжей, микробный белок на МС синтезируют плесени. При этом сыворотку целесообразно обогащать солями марганца или цинка и вносить азотсодержащие соединения. Также для улучшения культивирования плесени вносят бактерии E. coli. Обогащенная микробным белком и витаминами МС является основой био-ЗЦМ для телят. Для дрожжевания применяют свежую творожную или подсырную сыворотку, из которой удалены белки. Процесс ферментации осуществляется в аппаратах с мешалкой при постоянном поступлении воздуха до полного использования лактозы. Далее - температурная обработка для инактивации живых клеток, сгущение до 40% сухого вещества.

Для очистки перед дрожжеванием сыворотку нагревают (90°C) в сочетании с кислотной коагуляцией (соляная или молочная кислота) для подсырной и раскислением (водный раствор аммиака) для творожной сыворотки. Для интенсификации накопления биомассы вводят минеральные вещества. 3.1 Обработка ферментными препаратами

#### **1.10 Лекция № 10 (2 часа)**

#### **Тема: «Биотехнология кисломолочных продуктов»**

##### **1.10.1 Вопросы лекции:**

1. Биотехнологические основы производства кисломолочных напитков
2. Биотехнологические основы производства творога
3. Биотехнологические основы производства сметаны

##### **1.10.2 Краткое содержание вопросов**

#### **1. Биотехнологические основы производства кисломолочных напитков**

Основной процесс, определяющий консистенцию всех кисломолочных напитков, — гелеобразование. Сгустки этих продуктов различные: в одних случаях сгусток плотный (колючийся), в других — ровный и нежный (сметанообразный) или хлопьевидный и т. д. При формировании структуры сгустков продуктов в основном образуются необратимо разрушающиеся связи, тиксотропно-обратимых связей в них мало, поэтому столь важно вести технологический процесс при таких режимах, которые бы обеспечивали минимальное

отделение от сгустка сыворотки. В первую очередь это относится к режимам пастеризации, гомогенизации и сквашивания молока.

Освежающий, слегка острый вкус кумысу и кефиру придают этиловый спирт и углекислый газ. Содержание спирта в напитках определяется видом дрожжей, температурой и продолжительностью созревания. В кумысе оно составляет 1—3%, в кефире — 0,01—0,03%. Для них также характерен распад белков (протеолиз), поэтому освобождающиеся аминокислоты и пептиды могут принимать участие в формировании вкуса этих продуктов.

## **2. Биотехнологические основы производства творога**

Главными процессами, определяющими качество творога, являются коагуляция казеина и обработка (обезвоживание) образующегося сгустка. Для выработки продукта стандартной влажности и консистенции необходимо получить плотный (прочный) белковый сгусток с необратимо разрушающимися связями, способствующими его синерезису. Характер и степень обезвоживания сгустка определяются температурой пастеризации молока, способом свертывания белков, температурой и продолжительностью сквашивания, кислотностью сгустка во время обработки, дозой вносимого хлорида кальция и др. При выработке творога для лучшего отделения сыворотки и уменьшения потерь белка с ней наиболее целесообразно пастеризовать молоко при 78—80°C с выдержкой в течение 10—20 с. Вопрос о целесообразности применения гомогенизации молока при производстве творога еще не решен (гомогенизация приводит к замедлению синерезиса). Выяснено, что при выработке жирного творога из гомогенизированного молока уменьшаются потери жира с сывороткой, но получается дряблый сгусток, плохо выделяющий сыворотку, что затрудняет его обработку.

## **3. Биотехнологические основы производства сметаны**

В образовании структуры продукта участвуют молочный жир и белки. Главную роль играет жир, который в результате отвердевания и кристаллизации повышает прочность структуры и вязкость сметаны. Дополнительно структуру стабилизируют образующиеся во время охлаждения жировые скопления. Казеин и сывороточные белки, находящиеся в плазме сметаны и на оболочках жировых шариков, благодаря своей способности связывать влагу также улучшают консистенцию продукта. Таким образом, при производстве сметаны протекают не только процессы брожения молочного сахара и коагуляции казеина, зависящие от режимов пастеризации, гомогенизации и сквашивания сливок, но и процессы формирования и упрочнения структуры жировой фазы, определяемые режимами гомогенизации и скоростью охлаждения продукта. При выработке сметаны для получения нужной вязкости продукта и уменьшения степени выделения сыворотки сливки следует пастеризовать при высоких температурах (85—95°C с выдержкой в течение 15—20 с и более). Данный режим пастеризации способствует также образованию сульфгидридных групп, придающих сметане специфический привкус (привкус пастеризации), и гарантирует полное разрушение липазы, которая может вызвать пороки вкуса сметаны при хранении.

**ТВОРОГ** Главными процессами, определяющими качество творога, являются коагуляция казеина и обработка (обезвоживание) образующегося сгустка. Для выработки продукта стандартной влажности и консистенции в изоэлектрической точке казеина при рН 4,6—4,7 для кислотного и при рН 4,7—5 для кислотно-сычужного сгустков. Нарастание кислотности при выдержке разрезанного сгустка, а также его нагревание при отваривании ускоряют выделение сыворотки. Наиболее интенсивный синерезис сгустка наблюдается

при рН 4,2—4,3, дальнейшее повышение кислотности замедляет отделение сыворотки. Уплотнению кислотно-сычужного сгустка и выпрессовыванию из него влаги способствует добавленный к молоку хлорид кальция. Его действие усиливается с увеличением дозы (табл. 23), однако вносить более 600 г CaCl<sub>2</sub> нецелесообразно, так как сгусток образуется слишком быстро и при низкой кислотности, а творог приобретает невыраженный вкус и резинистую консистенцию. Кисломолочные вкус и запах творога, как и вкус и запах простокваса, формируются в период сквашивания молока. Они определяются составом бактериальной закваски и продолжительностью сквашивания. В твороге, наряду с молочной кислотой, диацетилом и ацетальде-гидом, активно накапливаются летучие кислоты (укусная, пропионовая и др.), а также свободные аминокислоты. Большинство пороков вкуса и запаха данных продуктов имеет технологическое или бактериальное происхождение и лишь часть — биохимическое. К порокам вкуса биохимического происхождения можно отнести прогорклый и салистый вкус. Они характерны главным образом для сметаны и жирного творога. *Прогорклый вкус* развивается при хранении продуктов, обусловлен распадом жира под действием липаз, выделяемых плесневыми грибами. *Салистый вкус* появляется при длительном хранении сметаны. Он вызывается окислительной порчей жира. Развитие порока ускоряют воздействие света и наличие металлов (меди, железа).

Окончание процесса сквашивания устанавливают по виду и кислотности сгустка. Кислотность должна составлять 55—60°Т (рН 5,05—5,15) при кислотно-сычужном и 70—80°Т (рН 4,5—4,7) при кислотном способах. Образующийся в процессе сквашивания плотный сгусток самопроизвольно сжимается и выделяет сыворотку

## **2. МЕТОДИЧЕСКИЕ МАТЕРИАЛЫ ПО ВЫПОЛНЕНИЮ ЛАБОРАТОРНЫХ РАБОТ**

### **2.1 Лабораторное работа № 1 (2 часа)**

**Тема: «Растительное сырье, используемое в биотехнологических процессах»**

**2.1.1 Цель работы:** Изучить растительное сырье, используемое в биотехнологических процессах

**2.1.2 Задачи работы:** описать растительное сырье и отходы консервной промышленности, используемые в биотехнологических процессах переработки и хранения сельскохозяйственной продукции

**2.1.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

1. лупы
2. растительное сырье

**2.1.4 Описание (ход) работы**

#### **1. Растительное сырье**

Растительное сырье - древесные отходы лесного хозяйства и побочные продукты земледелия, составляют традиционную углеводную базу для биотехнологических процессов.

Ежегодная фотосинтезирующая производительность зеленых растений и микроорганизмов составляет  $11,5 \times 10^9$  т сухой биомассы.

Составными частями растительной массы являются углеводы в виде целлюлозы, гемицеллюлозы, пентозанов, крахмала, Сахаров, пектина, а также масла, жиры, воски, нуклеиновые кислоты, лигнин, хитин, смолы, белковые вещества, витамины, соли и т.д. Древесное сырье. Представляет собой многолетние растительные ткани, содержащие целлюлозу, лигнин, пентозаны, гемицеллюлозы и др. вещества, образующие клеточный матрикс.

Целлюлоза - наиболее важный субстрат для получения белка. Растительные, особенно древесные отходы содержат около 5% целлюлозы, что в мировом масштабе превышает 2 млн. т. в год. Это весьма перспективное сырье, но микробная клетка способна утилизировать только продукт деградации целлюлозы - глюкозу или пентозы и органические кислоты, образующиеся при гидролизе гемицеллюлозных субстратов и пентозанов. Поэтому древесное сырье подвергают предварительной обработке: измельчают и гидролизуют. Полисахариды древесины при высоких температурах в присутствии кислот или щелочей переходят в низкомолекулярные усвояемые микроорганизмами соединения, но процесс требует значительных энергетических затрат и ведет к образованию нежелательных побочных продуктов. Кроме того, древесина - продукт дефицитный, так как в мире ее больше используется, чем воссоздается.

Растительные отходы сельского хозяйства. Кукурузная кочерыжка, подсолнечная лузга, рисовая и хлопковая шелуха, солома, стебли хлопчатника (гузапай) и др.

Хлопковая шелуха представляет собой твердую оболочку семян хлопчатника, покрытую короткими волокнами хлопка. Это отход хлопкоочистительных и

маслобойных заводов. Состав хлопковой шелухи зависит от сорта хлопчатника. Она содержит 36-48% целлюлозы, 20-31% - лигнина и 21-28% пентозанов.

Средний выход шелухи при шелушении хлопковых семян 31,4% их массы, что составляет в нашей стране 1,2 млн. т в год. При получении кормовых дрожжей хлопковую шелуху гидролизуют кислотой. Выход РВ (редуцирующих веществ) при гидролизе хлопковой шелухи 65-67% (в том числе пентоз 22-23%, гексоз - 37-39%). Обычно хлопковую шелуху перерабатывают по комплексной схеме, используя пентозы для производства ксилитана, а гексозы - для переработки дрожжей. Из 1 т сухой хлопковой шелухи получают (в кг): фурфурола - 70-80, кормовых дрожжей 80-110, кристаллической ксилозы ~ 70, жидкого диоксида углерода 28-38, лигниновых брикетов 20%-ной влажности 300-320, а также 60-80 л этанола в пересчете на 100%-ный спирт. На гидролизных заводах перерабатывают 250 тыс. т в год.

Кукурузная кочерыжка - это стержень, остающийся после отделения кукурузных зерен от початков. Выход кочерыжки - 25-35% массы початков. Состав стержней (в % к массе стержней): вода 8, сырой протеин 2,8, сырой жир 0,7, безазотистые экстрактивные вещества 54,7, сырая клетчатка 32,8, зола 1.

По кормовой ценности перемолотые стержни могут быть приравнены к сену или яровой соломе. Но в чистом виде для корма они не используются: в них мало белка, витаминов, минеральных веществ, особенно кальция, фосфора, йода и кобальта. Кукурузная кочерыжка - это сырье для получения кормовых дрожжей на гидролизных заводах. Выход РВ составляет 79-85% (пентоз 35-39, гексоз 41-43).

Подсолнечная лузга - отход при производстве масла из семян подсолнечника. Выход ее составляет 30-40% массы семян подсолнечная лузга содержит 1,4% богатого углеродом пигмента фитомелана, 23,6-28 пентозанов, 52-66 клетчатки, 24,8-29,6 лигнина, 31-42,4% целлюлозы и является ценным сырьем для получения кормовых дрожжей, гидролизного спирта, фурфурола и других продуктов. Для выращивания кормовых дрожжей используют пентозо-гексозные гидролизаты лузги после удаления из них фурфурола. На 1 т кормовых дрожжей расходуется 6,7 т лузги, выход дрожжей составляет около 150 кг.

Рисовая шелуха - сырье для гидролизного производства и получения кормовых дрожжей. Она содержит 18% легко-, 29% трудногидролизуемых полисахаридов. Общий выход РВ 50-58%.

Гуза-пай (стебли хлопчатника), так же как камыш и солома служит сырьем для гидролизного производства. Общий выход РВ при гидролизе гузы-пая составляет 65 %.

Верховой малоразложившийся торф также используется в качестве сырья для производства кормовых дрожжей. Его состав близок к составу растений. Это сходство тем больше, чем меньше степень разложения торфа. Верховой торф со степенью разложения 15-20% содержит 25-27% легко- и 9-13% трудногидролизуемых полисахаридов, 0,7-0,4% азотсодержащих соединений, основная часть которых входит в состав гуминовых веществ, 7-10% аминокислот.

Морские водоросли в Японии предложено использовать комплексно. При кислотном гидролизе водорослей образуются альгиновая кислота, витамины, пигменты и белки, на гидролизатах возможно культивирование микроорганизмов - продуцентов белка. При обработке щелочью и  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  получают маннит, йод, калий, фукоидин. Сами водоросли после промывки и сушки могут служить для пищевых целей или основой питательной среды для микроорганизмов - продуцентов

белка. Отходы этих процессов используют для получения метана, а вторичные отходы - как удобрение при выращивании морских растений, чем замыкается цикл.

## **2. Промышленные отходы**

Отходы пивоварения - хороший, но небольшой источник углеводов: пивная дробина, солодовые ростки, отходы подработки несоложенного ячменя. Для получения кормовых дрожжей эти отходы гидролизуют и вводят в среду в соотношении 8:0,2:0,5 (дробина: ростки: отходы ячменя).

К отходам картофелекрахмального производства, использующимся в качестве сырья для выращивания микроорганизмов, относят клеточный сок картофеля и соковые воды, промывные воды после гидросмыыва крахмала и мезги.

Клеточный сок картофеля содержит 6% сухих веществ, его объем доходит до 50% к массе перерабатываемого картофеля и составляет около 1,3 млн. т в год. Клеточный сок картофеля содержит аминокислоты, оксид калия, фосфорную кислоту, соединения кальция и магния. Уровень использования клеточного сока картофеля в настоящее время составляет около 33%.

Картофельная мезга содержит (в % к массе сухих веществ): крахмал 50, клетчатку 25. Растворимые углеводы 2,5, минеральные вещества 6,2, сырой протеин 6 и прочие вещества 10,3. Влаги в мезге 86-87%, что делает ее малотранспортабельной. Концентрация клетчатки и крахмала в этом виде сырья низка, гидролиз его экономически не оправдан. На этом сырье культивируют микроорганизмы, обладающие гидролитическим комплексом ферментов и использующие при росте биополимеры.

## **3. Отходы, не требующие специальных методов обработки.**

К ним относятся меласса, последрожжевая барда спиртовых заводов, молочная сыворотка.

Свекловичная меласса - отход производства сахара из свеклы (выход 3,5- 5% к массе свеклы), богата органическими и минеральными веществами, необходимыми для развития микроорганизмов. Она содержит 45-50% сахарозы, 0,25-2,0 - инвертного сахара, 0,2-3,0% рафинозы. Из азотистых веществ в мелассе содержатся бетаин, пирролидонкарбоновая, глутаминовая, аспарагиновая кислоты, лейцин, изолейцин, аланин, валин, из органических кислот - молочная, муравьиная, уксусная, масляная, лимонная. В малых количествах в ней содержатся кобальт, железо, свинец, бор, цинк, кремний, серебро, йод, марганец, молибден. Свекловичная меласса представляет собой дорогое и дефицитное сырье и в производстве кормовых дрожжей используется редко.

Мелассная барда является отходом производства этанола на мелассе и содержит 6-12% сухих веществ. Это полноценное сырье для производства кормовых дрожжей. В настоящее время для производства кормовых дрожжей используется более 70% первичной послеспиртовой мелассной барды.

Зерновая и картофельная барда - отход спиртового производства. Состав зерновой и картофельной барды различен. Зерновая барда содержит 3,2-4, 1Уо сухих веществ, картофельная - 6,7-8%. В сухих веществах картофельной барды меньше протеина, чем в зерновой (18,7-19,5% против 26,8-27,5), меньше жиров (3,1% против 5,9-7,5). Картофельная барда богаче зерновой по содержанию углеводов (56,2-58,5 % против 40-41,8). Больше в ней и минеральных веществ. Для получения кормовых

дрожжей используется 14,6% получаемой в настоящее время зерно-картофельной барды.

Барда ацетоно-бутилового производства содержит до 0,7-1,0% РВ, азотистые вещества, минеральные соли и стимуляторы роста. В ней присутствует немногого (0,07-0,30 г/л) бутанола, что требует адаптации к нему микроорганизмов.

Молочная сыворотка - сырье для получения белковых препаратов. В сыворотке содержится (в % СВ): лактоза 70-80, белковые вещества 7-15, жир 2-8, минеральные соли 8-10. Кроме того, молочная сыворотка имеет в своем составе значительное количество витаминов, гормонов, органических кислот, микро- и ультрамикроэлементов.

#### **4. Отходы консервной промышленности.**

В нашей стране ежегодно в консервы перерабатывается 4 млн. т овощей и плодов. При этом образуется 700-800 тыс. т отходов и вторичных продуктов, которые могут использоваться в качестве сырья при приготовлении питательных сред для производства кормовых дрожжей. Отходы отличаются по химическому составу не только в зависимости от вида сырья, но и от степени зрелости, условий хранения, вида изготавляемой продукции.

Томаты в основном идут на производство концентрированных томатопродуктов и томатного сока. В первом случае общее количество отходов составляет 4-5% к массе сырья. Количество пульпы в отходах составляет 51-78%, семян - 6-14, кожицы - 6-13, сосудистых волокон - 1-3, связанной воды - 8-15%.

При производстве томатного сока отжимают около 65% сока и мякоти к массе сырья. Остальные 35%, идущие в отходы, состоят на 88% из мякоти и сока и на 12% из кожиц и семян. На растворимую часть в отходах приходится 2,5-5%. Рациональным способом хранения и использования отходов томатного производства является их высушивание и получение из них муки.

Отходы переработки зеленого горошка - это ботва и створки. Выход зерен горошка составляет 15-20% скошенной массы. Отходы содержат до 40% безазотистых экстрактивных веществ, до 11% минеральных веществ и другие соединения. Отходы могут использоваться для получения микробных белковых препаратов.

Отходы переработки капусты, моркови, свеклы и других овощей - это ботва, очистки, испорченные овощи и т.п. Ежегодно этих отходов получают около 100 тыс. т. Отходы составляют от массы перерабатываемых овощей (в-%): капуста 22,5, морковь 17-20, свекла 24-29 и т.д. Эти отходы используются для получения микробных белковых препаратов.

Отходы овощесушильного производства подразделяют на твердые и жидкие. К твердым относят мелкие некондиционные клубни картофеля, снятую при очистке кожицу, глазки, мелкие частицы, получаемые при сушке, инспекции и фасовке, к жидким - промывные воды, получаемые при бланшировании, варке и других операциях, а также мезгу. Отходы при переработке картофеля составляют 25-45% всех отходов овощесушильного производства. Это прекрасное сырье для производства белковых препаратов и крахмала.

Отходы переработки плодов состоят из выжимок, получаемых при прессовании, вытсрок, остающихся при варке компотов варенья, джемов и т.д. Эти отходы являются

полноценной средой для выращивания микроорганизмов. При переработке яблок отходы составляют около 30-34%. При приготовлении сока из винограда образуется до 18% виноградных выжимок, состоящих на 43-45% из кожицы с остатками мякоти, на 22-32% из семян и на 24-26% из гребней. Выжимки содержат примерно 5% сахара и используются как компонент питательной среды при производстве кормовых дрожжей.

При выработке соков и компотов из цитрусовых образуется около 60% отходов к общей массе плодов. В них содержится ряд ценных веществ: эфирное масло (1,2%), пектиновых веществ (1,5-2%) и гесперидин (1,2-1,5%).

В США из отходов производства соков из цитрусовых получают эфирные масла и гесперидин. Оставшиеся выжимки измельчают, обрабатывают известью до pH 6, затем аммиаком и прессуют. Фильтрат используют в качестве питательной среды для дрожжей.

Отходы винодельческой промышленности - это гребни, виноградные выжимки, семена, дрожжевые осадки. Смоченные суслом гребни содержат 1- 1,5% сахара, до 2,54% минеральных веществ, азотистые вещества.

Виноградные выжимки содержат 4-10% сахара, азотистые, пектиновые, дубильные вещества, жиры, клетчатку, до 1,2-3,6% минеральных веществ и могут использоваться в составе сред для выращивания дрожжей. Ежегодный объем виноградных выжимок в стране около 2,6 млн. т.

Дрожжевой осадок составляет 3-8% объема вина и содержит (в % на сухое вещество): минеральные вещества 5-10, углеводы 25-50, азот 5-17, белковые вещества 30-75 и жиры 2-5. Из дрожжевого осадка получают этанол, высшие спирты, альдегиды и кормовые дрожжи.

## **2.2 Лабораторное занятие №2 (2 часа)**

**Тема: «Отходы животноводства, используемые в биотехнологических процессах»**

**2.2.1 Цель работы:** Изучить сырье животного происхождения, используемое в биотехнологических процессах

**2.2.2 Задачи работы:** описать сырье животного происхождения, используемое в биотехнологических процессах переработки и хранения сельскохозяйственной продукции

**2.2.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

1. лупы
2. образцы отходы животноводства

**2.2.4 Описание (ход) работы:**

К отходам животноводства относят навоз и стоки животноводческих ферм. Различают подстилочный, твердый навоз (влажность 75-80%); бесподстилочный, который делится на полужидкий (смесь экскрементов с мочой, влажность до 90%) и жидкий - навоз с примесью воды (влажность 90-93%); навозные стоки - навоз, разбавленный водой (влажность более 93%). С выделениями крупного рогатого скота, свиней, кур,

при богатейшем содержании выводится до 30-40% питательных веществ, получаемых животными с кормами. В основном органическое вещество экскрементов представлено структурными веществами с высоким содержанием углерода (целлюлоза, лигнин, пентозаны) (табл. 1):

Таблица 1-Химический состав не разбавленного водой бесподстильочного навоза

Химический состав, %	Эксперименты		
	комплекс на 10 тыс. бычков	комплекс на 2 тыс. коров	комплекс на 108 тыс. голов свиней
Сухое вещество	14,5	10,0	9,8
Азот общий	0,77	0,43	0,72
Фосфор P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	0,44	0,28	0,47
Калий K <sub>2</sub> O	0,76	0,50	0,21
Отношение Р:К при N=1	0,6:1	0,7:1,2	0,7:0,3

В связи с этим отношение С:N в кале довольно велико (18-20:1). Однако в смеси кала и мочи оно уменьшается за счет азота мочи до 5-9,1. В стоках свиноферм велико содержание взвешенного осадка (до 21 г/л), повышена концентрация растворимых веществ (до 5,3 г/л). Эти стоки слабощелочные, они представлены в основном солями калия, азота и кальция. В них мало хлоридов и сульфатов. Состав питательных веществ навоза и стоков зависит от их свежести: с увеличением сроков хранения, например, резко падает содержание азота.

Объем питательных элементов во всех стоках животноводческих ферм нашей страны в год эквивалентен 2,2 млн. т. азота, 1 млн. т. фосфора и 1 млн. т. калия. Это в 4 раза превышает количество загрязнений от сточных вод пищевой промышленности и хозяйственно-бытовых стоков объемом 11,8 млн. м<sup>3</sup> в год. В настоящее время одним из перспективных способов утилизации стоков животноводческих ферм является культивирование микроорганизмов на питательных средах из этих отходов с получением кормовой и технической биомассы.

#### Предварительная обработка сырья

При использовании для приготовления питательных сред большинства перечисленных источников сырья, сульфитных щелоков, различных видов углеводородного сырья необходимо вносить в среду дополнительно микроэлементы, азотное и фосфорное питание, витамины. Для этого используют кукурузный экстракт, дрожжевые автолизаты и гидролизаты, отходы производства витаминов, лимонной кислоты и др. В состав сред вводят минеральные соли, содержащие азот, фосфор, калий, магний и другие элементы. Источником азота в среде может быть аммиак, который поддерживает pH на определенном уровне.

Решающее значение для проведения биотехнологических процессов имеет химический и биологический состав воды. Вода не должна содержать токсических загрязнений, вирусов и спор.

В процессе подготовки питательных сред важное значение имеет смешивание и стабилизация готовой реакционной среды. Подготовка питательных сред сопряжена с использованием различных методов ее обработки: физико-механических (измельчение компонентов, гомогенизация, перемешивание, растворение, фильтрация, тепловая обработка); химических (регулирование окислительно-восстановительного потенциала, pH среды, ионной силы, осмотического давления, гидролиз, нейтрализация); биологических (оценка среды на стерильность, предварительное культивирование на среде, ферментативный гидролиз, изомеризация и т.п.).

Готовые среды могут не требовать стерилизации, и после приготовления на них можно культивировать микроорганизмы. В некоторых случаях питательные среды необходимо стерилизовать, что можно осуществить путем нагрева, озонирования, стерилизующей фильтрации, хлорирования, обработки формалином или облучения.

## **2.3 Лабораторное занятие №3 (2 часа)**

**Тема: «Методы, используемые в биотехнологическом производстве»**

**2.3.1 Цель работы:** Изучить методы, используемые в биотехнологическом производстве

**2.3.2 Задачи работы:** описать методы селекция и генная инженерия, используемое в биотехнологических процессах переработки и хранения сельскохозяйственной продукции.

**2.3.3 Перечень, приборов, оборудования, используемых в лабораторной работе.**

### **2.3.4 Описание (ход) работы**

В биотехнологии выделяют 2 метода:

- 1) Селекция;
- 2) Генная инженерия.

Для получения высокоактивных продуктов используют методы селекции. С помощью селекции получены промышленные штаммы микроорганизмов, синтетическая активность которых превышает активность исходных штаммов в десятки и сотни раз.

Селекция- направленный отбор мутантов (организмов, наследственность которых претерпела скачкообразное изменение). Генеральный путь селекции - переход от простого отбора продуцентов к сознательному конструированию их геномов. На каждом из этапов из популяции микроорганизмов отбираются наиболее высокоэффективные клонны. Таким путем за длительное время были отобраны штаммы пивных, винных, пекарских, уксуснокислых дрожжей, пропионо-вокислых бактерий и др. Применяется ступенчатый отбор: на каждом из этапов из популяции микроорганизмов отбираются наиболее высокоэффективные клонны. Ограниченнность метода селекции, основанного на спонтанных мутациях, связана с их низкой частотой, что значительно затрудняет интенсификацию процесса. Изменения в структуре ДНК происходят редко. Ген должен удвоиться в среднем  $10^6\text{-}10^8$  раз, чтобы возникла мутация. Примером отбора наиболее продуктивных мутантов при культивировании в

непрерывном режиме является отбор дрожжей *Saccharomyces uvarum* по признаку устойчивости к этанолу, продукту жизнедеятельности дрожжей. Новизна этого подхода, открывающего перспективы для повышения устойчивости биообъектов к самым различным факторам - кислотам и щелочам, продуктам метаболизма, ионам тяжелых металлов и др. - в установлении обратной связи между параметром, характеризующим жизнедеятельность культуры, - выделением ею СО<sub>2</sub> и поступлением ингибирующего фактора (в данном случае этанола) в биореактор. При продолжительном (650- часовом) культивировании в такой установке получены мутантные дрожжи, резистентные к ингибирующему действию этанола в концентрациях вплоть до 10%.

К значительному ускорению селекции ведет индуцированный мутагенез - резкое увеличение частоты мутаций биообъекта при искусственном повреждении генома. Мутагенным действием обладают ультрафиолетовое, рентгеновское или у-излучение, некоторые химические соединения, вызывающие изменения первичной структуры ДНК. К числу наиболее известных и используемых мутагенов относятся азотистая кислота, алкилирующие агенты (этилметансульфонат, N- метил-Д-нитро-Д-нитрозогуанидин и другие нитрозамины), акридиновые красители, бромурацил и т.д.

Проводят тотальную проверку (скрининг) полученных клонов. Отобрав наиболее продуктивные клоны, повторяют обработку тем же или другим мутагеном, вновь отбирают наиболее продуктивный вариант и т.д., т.е. речь идет о ступенчатом отборе по интересующему признаку.

Трудоемкость - основной недостаток метода индуцированного мутагенеза и последующего ступенчатого отбора. Недостатком метода является также отсутствие сведений о характере мутаций, исследователь проводит отбор по конечному результату.

### Генетическая инженерия

Генетическая инженерия - направленная модификация биообъектов в результате введения искусственно созданных генетических программ.

#### Уровни генетической инженерии:

генная - прямое манипулирование рекомбинантными ДНК, включающими отдельные гены;

хромосомная - манипулирование с группами генов или отдельными хромосомами;

геномная (клеточная) - перенос всего или большей части генетического материала от одной клетки к другой (клеточная инженерия). В современном понимании генетическая инженерия включает технологию рекомбинантных ДНК.

Работа в области генетической инженерии включает 4 этапа: 1) получение нужного гена; 2) встраивание его в вектор, способный к репликации; 3) введение гена с помощью вектора в организм; 4) питание и селекция клеток, которые приобрели желаемый ген.

Генетическая инженерия высших растений осуществляется на клеточном, тканевом и организменном уровне.

Основой клеточной инженерии является гибридизация соматических клеток - слияние неполовых клеток с образованием единого целого. Слияние клеток может

быть полным или с введением их отдельных частей (митохондрий, хлоро- пластов и т.д.).

Соматическая гибридизация позволяет скрещивать генетически отдаленные организмы. Растительные, грибные и бактериальные клетки перед слиянием освобождают от клеточной стенки и получают протопласты. Затем проводят деполяризацию наружных цитоплазматических мембран переменным электрическим или магнитным полем, используют катионы  $\text{Ca}^{++}$ . Клеточную стенку подвергают ферментативному гидролизу.

### Методы хранения посевного материала

При промышленном культивировании клеток в биореакторах идет процесс постепенного вытеснения менее приспособленных форм более приспособленными, часто менее продуктивными по отношению к вырабатываемым веществам. Он получил название автоселекции. В связи с этим встает проблема длительного хранения клеток без утраты ценных свойств. Это возможно, если резко затормозить все протекающие в них жизненные процессы. Существуют следующие методы хранения.

1. Лиофильное высушивание (обезвоживание после замораживания при температуре  $-40\text{--}60^{\circ}\text{C}$  и ниже). Применяется в отношении продуцентов антибиотиков.
  - а) Высушивание на воздухе в стерильной среде (на почве, бумаге, дисках агар-агара и т.д.).
  - б) Сохранение спор (пригоден для спорообразующих бактерий рода *Bacillus*).
  - в) Криоконсервация - глубокое замораживание клеток с их последующим хранением в жидком азоте ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) или в парах азота ( $-155^{\circ}\text{C}$ ).

Значительные трудности представляет поддержание сред, оборудования, воздуха в стерильном состоянии. Это необходимо для исключения попадания в биоректоры посторонних микроорганизмов.

Клетки лучше сохраняют свои свойства при создании щадящих условий в биореакторе, приближенных к условиям в лабораторном культиваторе.

2. Выделение целевого продукта. Это завершающая стадия биотехнологического процесса. Продукт может накапливаться в клетке или выделяться в культуральную жидкость. Наиболее сложно выделение продукта, накапливающегося в клетках. Для этого клетки необходимо отделить от культуральной жидкости, разрушить, затем целевой продукт очистить от массы компонентов разрушенных клеток.

Первым этапом на пути к очистке целевого продукта является отделение биомассы от культуральной жидкости – сепарация

### Виды сепарации:

1. Флотация. Если клетки продуцента в биореакторе из-за низкой смачиваемости накапливаются в поверхностных слоях жидкости, то жидкость предварительно вспенивают, затем отделяют ее верхний слой с клетками. Флотаторы различных конструкций сцеживают, откачивают или соскребают пену, состоящую из пузырьков газа с прилипшими к ним клетками. Флотацию широко используют как первый этап отделения дрожжевой массы для осветления культуральной жидкости.

2. Фильтрация - задержание биомассы на пористой фильтрующей перегородке. Применяют фильтры однократного или многократно использования: барабанные,

дисковые, ленточные, тарельчатые, карусельные, вакуум-фильтры, фильтр-прессы различных конструкций, мембранные фильтры. Диаметр пор может превышать размеры клеток. Иногда биомассу сдувают с поверхности фильтра сжатым воздухом или срезают специальным ножом.

3. Центрифугирование - осаждение взвешенных в жидкости частиц с применением центробежной силы. Требует более дорогостоящего оборудования, чем фильтрование. Поэтому оно оправдывает себя, если: а) суспензия фильтруется медленно; б) поставлена задача максимального освобождения культуральной жидкости от содержащихся частиц; в) необходимо наладить непрерывный процесс сепарации в условиях, когда фильтры рассчитаны только на периодическое действие.

Центрифугирование и фильтрация иногда реализуются в комбинации, в фильтрационных центрифугах. Перспективны для осаждения биомассы центрифуги-сепараторы, в которых биомасса оседает на стенках вращаемого цилиндра или на тарелках специальной тарельчатой вставки.

Вторым этапом при получении продукта, накапливающегося в клетках, является разрушение клеток, которое проводят физическим, химическим и химико-ферментативным методами.

Физическое разрушение проводят ультразвуком, с помощью вращающихся лопастей или вибраторов, встряхиванием со стеклянными бусами, продавливанием под высоким давлением через узкое отверстие, раздавливанием замороженной массы, растиранием в струнке, осмотическим шоком, замораживанием - оттаиванием, сжатием с последующим резким снижением давления. Этим способам дезинтеграции клеток присуща определенная неизбирательность: обработка может отрицательно влиять на качество получаемого продукта. Физические методы позволяют целенаправленно выделять какую-либо одну фракцию внутриклеточного содержимого.

Химическое и химико-ферментативное разрушение клеток избирательно, не всегда пригодно. Его проводят обработкой клеток толуолом или бутанолом при промышленном получении дрожжевого автолизата и ряда ферментов. Эффективный лизис клеток вызывают антибиотики полимиксины, тироцидины, новобиоцин, нистатин и другие, некоторые поверхностно-активные вещества, а также глицин.

Разрушенные клеточные стенки отделяют методами сепарации. В большинстве биотехнологических процессов клеточные стенки отбрасывают как балласт, но возможно и промышленное получение компонентов клеточных стенок как целевого продукта.

Третий этап - выделение целевого продукта из культуральной жидкости или гомогената разрушенных кислот проводят путем его осаждения, экстракции или адсорбции.

1. Осаждение растворенных веществ возможно физическими (нагревание, охлаждение, разбавление или концентрирование раствора) или химическими методами, переводящими отделяемый продукт в малорастворимое состояние. Так, пенициллин переводят в кристаллический осадок в присутствии соединений калия или натрия. Белки осаждают добавлением сульфата аммония, органических растворителей (этанола, ацетона). Нуклеиновые кислоты осаждают с помощью полииминов,

основные группы которых вступают во взаимодействие с их фосфатными группами. Современной модификацией метода является аффинное осаждение.

2. Экстракция извлечение продукта из твердого (твердожидкофазная) или жидкого (жидко-жидкофазная) образца. К твердо-жидкофазной экстракции относится обливание образца водой с целью извлечения из него растворимых веществ, например солей металлов из руд, подвергнутых бактериальной обработке, или растворимых продуктов из массы субстрата (соломы и т.д.) при твердофазном культивировании. Применяют органические растворители, например, при экстракции клеточной массы ацетоном, переводящим в раствор ряд липидных и белковых компонентов. Жидко-жидкофазная экстракция - добавление органических растворителей для извлечения из культуральной жидкости антибиотиков, витаминов, каротиноидов, липидов, некоторых гидрофобных белков. Витамин В12 экстрагируют фенолом и его производными (крезол, другие алкилфенолы, галогениды). Используют бензиловый спирт, особенно в щелочных условиях. Фосфолипиды извлекают путем экстракции хлороформом.

Полностью избежать нагревания, губительного для многих ценных веществ, позволяют методы холодовой экстракции (криоэкстракции). Она как бы нивелирует различие между твердым субстратом и культуральной жидкостью, поскольку и то и другое находится в замороженном состоянии. Криоэкстракция осуществляется растворителями, кипящими при низких температурах и находящимися при комнатной температуре в газообразном состоянии. Криоэкстракция может использоваться в комбинации с криоконсервацией клеток. Урожай клеток длительное время хранится без потери свойств в условиях глубокого замораживания.

3. Адсорбция - частный случай экстракции, при котором экстрагирующим веществом из жидкой или газовой фазы является твердое тело. Хорошими адсорбентами являются древесный уголь, глины с развитой пористой поверхностью. Путем адсорбции из культуральной жидкости выделяют антибиотики и витамины.

К современным методам разделения веществ, основанным на принципах экстракции и адсорбции, относятся хроматография, электрофорез.

## 2.4 Лабораторное занятие №4 (2 часа)

### Тема: «Химическое консервирование трав»

**2. 4.1 Цель работы:** изучить биотехнологические процессы консервирование трав

**2.4.2 Задачи работы:** законсервировать травы химическими консервантами

**2.4.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

1. стеклянная посуда
2. лабораторные весы
3. полиэтиленовые пакеты

## 4. химические консерванты

### 2.4.4 Описание (ход) работы:

**Химическое консервирование** особенно эффективно в периоды с неустойчивой погодой, когда невозможно подвяливать траву на сенаж или высушить на сено. В прокосах и валках трава выщелачивается дождями, теряет защитные свойства и поражается плесенью. Уложенная до дождя в траншею и еще не изолированная от доступа воздуха, подвяленная масса самосогревается и становится непригодной к скармливанию

Химическое консервирование основано на бактерицидном и фунгицидном действии химических препаратов, угнетении и инактивации микрофлоры, что предотвращает самосогревание и плесневение корма. Добавка к массе влажностью 30—35% пропионовой кислоты (1—2%) предотвращает плесневение корма. Применяют смесь пропионовой (80%) и уксусной (20%) кислот, безводный аммиак, пропионовокислый аммоний, муравьиную и другие летучие низкомолекулярные органические кислоты.

В обычных условиях органические кислоты — прозрачные, легкоподвижные жидкости, хорошо растворимы в воде. Наибольшей летучестью обладает муравьиная кислота: скорость ее испарения превышает скорость испарения уксусной кислоты в 5 и пропионовой — в 18 раз. При разделении летучесть кислот снижается.

Измельчение влажного сена и обработка его пропионовой кислотой оказывают положительное влияние на переваримость питательных веществ. По сравнению с прессованным сеном полевой сушки переваримость повысилась: сухого вещества — от 53,8 до 57,4—61,6%, протеина — от 56,7 до 60,1—63,5%. Питательность 1 кг сухого вещества составила: прессованного сена —0,58 корм, ед., измельченного с дозой кислоты 10 кг/т—0,62, с дозой 15 кг/т — 0,69 корм. Ед При укладке сена в стога и скирды в хорошую и в неблагоприятную погоду его следует подсыпывать. Такое сено скот поедает особенно охотно. Для подсыпывания сено укладывают примерно 50—70-сантиметровыми слоями и каждый слой посыпают солью. На 1 т сена требуется 4—5 кг соли.

Стога и скирды ставят на сухих возвышенных местах. Площадку для них очищают и дезинфицируют хлорной известью, затем кладут настил из жердей, вершинника, бурьяна и т. д. Стога и скирды следует метать из однородного сена, укладывая лучшую его часть в середину.

### Химические консерванты

Основная составляющая химических консервантов - это органические кислоты. Они широко используются при консервирующей обработке кормов и в качестве подкислителей в составе комбикормов.

Антисептические свойства различных кислот несколько отличаются по отношению к бактериям и грибам. Муравьиная кислота: снижает pH корма снижает буферную емкость корма эффективна против дрожжей и бактерий, особенно против сальмонелл, но менее активна против плесениснижает pH в желудке улучшает усвоение азота, кальция и фосфора обладает антимикробным действием Пропионовая кислота: подобно муравьиной кислоте подавляет рост плесневых грибов, дрожжевых клеток, но менее эффективна против бактерий снижает буферную емкость кормов улучшает вкусовые качества корма используется как консервантприменение

пропионовой кислоты регламентировано во всех странах стимулирует молокоотдачу Бензойная кислота эффективна против дрожжей и бактерий и менее эффективна против плесеней Молочная кислота эффективна против сальмонелл и E.Coli улучшает вкусовые качества выделяется лактобактериями в естественных условиях в желудке обладает пробиотическими свойствами, обладает антисептическим эффектом используется как консервант снижает буферную емкость кормов.

## Ход работы

Для химического консервирования зеленых кормов по данному способу применяют жидкые органические кислоты: пропионовую, муравьиную и уксусную. Эти препараты и продукты их распада в готовом корме не оказывают отрицательного влияния на состояние здоровья животных и производимую ими продукцию. Указанные кислоты относятся к летучим жирным кислотам, которые присутствуют в любом случае в силосе, сенаже и др. кормах, получаемых путем сбраживания. Кроме того, они вырабатываются в поджелудочных железах животных и являются нормальными промежуточными продуктами обмена веществ их организме. Кормовые культуры, предназначенные для химического консервирования, убирают в сроки, когда растения могут обеспечить получение кормов, наиболее богатых витаминами. Для многолетних трав оптимальным сроком уборки является фаза бутонизации, многолетние злаковые культуры убирают в конце фазы выхода в трубку, но не позже колошения. Это позволяет получить высококачественный корм питательностью 0,90-0,95 кормовых единиц в 1 кг сухого вещества при содержании 120-150 г переваримого протеина на кормовую единицу.

Однолетние бобовые травы и их смеси со злаковыми убирают в фазу зеленой спелости зерна в одном-двух нижних ярусах бобов. Более ранняя уборка приводит к недобору питательных веществ и снижению качества корма. Технология химического консервирования зеленой массы не отличается от обычного ее силосования. Травы измельчают, степень измельчения растений определяется их влажностью. Растения влажностью 70% и ниже измельчают на отрезки 1-3 см. Если же в них содержится свыше 70% воды, измельчение должно быть более крупным - 4-5 см. Мелкое измельчение растений такой влажности способствует увеличению вытекания сока, что приводит к повышению потерь. При использовании на силос избыточно влажной растительной массы (более 80%), приемы ее подготовки должны быть направлены на максимальное сокращение соковыделения. При обильном вытекании сока консервирующее действие пропионовой, муравьиной и уксусной кислот снижается. Это объясняется удалением препаратов с вытекающим соком, в котором они хорошо растворяются. Кроме увеличения потерь, утечка сока связана с загрязнением окружающей среды и ухудшением условий работы на силосовании. Поэтому для консервирования в хозяйствах области в основном используют травы влажностью 75-80%, что позволяет избежать потерь сока. При консервировании кукурузы и других культур влажностью 80% и выше добавляют сухую измельченную солому в количестве 10-15% к весу зеленой массы. Непременным условием получения высококачественного корма с минимальными потерями питательных веществ является быстрая изоляция массы от доступа воздуха. Поэтому траншеи должны заполняться не более 4-5 дней. Массу сгребают у торца траншеи, а затем разравнивают бульдозером и интенсивно уплотняют, особенно у стен. После укладки массы слоем не более 40 см ее обрабатывают раствором одной из кислот. Так же последовательно обрабатывают каждый следующий слой массы. Измельченные травы укладывают в полиэтиленовые пакеты вносят консерванты. Согласно таблицы 1 рассчитать норму консерванта на 5кг зеленой массы растений В зависимости от вида зеленых растений химические консерванты вносятся в следующих количествах (на каждую тонну зеленой масс

Таблица 1 Нормы расхода кислот для силосования

Наименование кислот	Единица измерения	Растения		
		несилосующиеся	трудно- силосующиеся	легко- силосующиеся
Пропионовая	л	5	4	3
Муравьиная	л	5	4	3
Уксусная	л	-	5	5

Перед внесением в массу кислоты разбавляют водой в соотношении 1:2 или 1:3, в умеренную погоду 1:4 и 1:5 в жаркую - для устранения запаха и образования паров кислот. Бак той или иной машины сначала заполняют водой, точно замеряя ее количество. Затем вливают в воду строго определенное количество одной из кислот. Можно для консервирования кормов использовать смеси кислот, которые приготавливаются согласно рекомендациям Всесоюзного института кормов им. Вильямса. Препарат ВИК-1 (муравьиная кислота - 27%, уксусная - 27%, пропионовая - 26%, вода - 20%) применяют для консервирования зеленой массы трудно- и легкосилосующихся растений. Для консервирования несилосующихся растений применяется препарат ВИК-2 (муравьиная кислота - 80%, пропионовая - 9%, вода - 11%). Применение указанных смесей позволяет существенно усилить консервирующее действие кислот. Способ химического консервирования повышает питательную ценность кормов в 1,3-1,5 раза.

Масса, смоченная жидкими органическими кислотами, теряет упругость и лучше уплотняется. Тщательная изоляция измельченного корма от воздуха обязательна. Полиэтиленовые пакеты плотно закрывают, изолируя доступ воздуха.

## 2.5 Лабораторное занятие №5 (2 часа)

### Тема: «Химическое консервирование силоса»

**2.5.1 Цель работы:** освоить методику биологического консервирования кукурузного силоса

**2.5.2 Задачи работы:** Законсервировать в полиэтиленовые пакеты кукурузный силос с использованием биологический консервант «Битасил»,

### 2.5.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. стеклянная посуда
2. лабораторные весы
3. полиэтиленовые пакеты
4. биологический консервант «Битасил»
5. разделочные доски
6. секаторы

#### **2.5.4 Описание (ход) работы:**

Силосование — один из распространённых и надёжных способов биологического консервирования корма. В сравнении с другими способами он меньше зависит от погоды и при использовании высокопроизводительной техники позволяет проводить заготовку силоса в сжатые сроки с минимальным набором машин, что положительно сказывается на качестве корма. Силос имеет целый ряд хозяйственных полезных признаков: как сочный вид корма он повышает аппетит животных, улучшает пищеварение, обеспечивает потребность в витаминах и минеральных веществах. Основной силосной культурой во многих природно-климатических зонах страны является кукуруза

#### **Биохимические процессы, протекающие при заготовке кукурузного силоса**

Силосование является биологическим способом консервирования кормов, при котором используются процессы превращения растительных веществ, протекающие в природе спонтанно. Консервирующий эффект достигается при условии достаточного обеспечения силосуемой массы молочной кислотой, которая образуется в результате жизнедеятельности молочнокислых бактерий из легко растворимых углеводов, содержащихся в силосуемом корме, и герметизации. Он обусловлен снижением pH в силосуемом сырье, другие процессы превращения веществ, происходящие при анаэробных условиях, в значительной степени подавляются. Важной предпосылкой для ускоренного протекания молочнокислого брожения является достаточное число бактерий и быстрое создание анаэробных условий.

#### **Полезные микроорганизмы**

Молочнокислое брожение — единственный желаемый процесс разложения веществ в корме, так как при этом молочнокислые бактерии превращают растительные сахара очень быстро и с наименьшими потерями энергии в молочную кислоту. Все другие процессы обмена веществ связаны с большими потерями и поэтому не желательны.

Преимущества молочнокислого брожения при силосовании состоят в следующем:

- сама молочная кислота является ценным питательным веществом для животных;
- молочная кислота, как средство консервирования, подавляет другие процессы разложения, как например, расщепление протеина;
- не при каком другом брожении pH не снижается так быстро, как при молочнокислом брожении;
- за исключением дрожжей в процессе консервирования нейтрализуется деятельность всех других микроорганизмов;
- углеводы, а это клетчатка (целлюлоза), крахмал, а также протеины и витамины не разлагаются;

Силосование основано на двух процессах:

- прекращение аэробного разложения веществ в результате хранения корма без доступа воздуха, чем подавляется развитие вредных микроорганизмов, которые требуют для своего роста и развития кислород;
- регулирование анаэробного разложения веществ быстрым снижением pH за счет молочнокислого брожения;

Желательным типом молочнокислого брожения является гомоферментативное брожение, так как оно даёт больший выход молочной кислоты. Чем лучше условия для жизнедеятельности, тем больше доля гомоферментативного молочнокислого брожения.

### **Вредные организмы**

На молочнокислое брожение и на успех силосования отрицательно влияет ряд микроорганизмов. К таким организмам относятся аэробные спорообразующие виды, в основном рода *Bacillus*. Нежелательными микроорганизмами при силосовании являются факультативно анаэробные бактерии *Coli-Aerogenes*- группы. Со старением травостоев растёт заселение исходного растительного материала этими бактериями, особенно при поздних укосах, возрастаёт опасность высвобождения эндотоксинов. Они бурно развиваются непосредственно после закладки силоса и являются опасными конкурентами молочнокислых бактерий. Сбраживание сахара бактериями происходит по типу уксуснокислого брожения. Большое количество уксусной кислоты вызывает специфический запах силоса и снижает его поедаемость.

Очень вредной группой микроорганизмов при силосовании являются облигатно анаэробные спорообразующие маслянокислые бактерии рода *Clostridium*, которые обычно попадают в силосуемый корм в виде спор. Основным продуктом маслянокислого брожения является масляная кислота. Маслянокислое брожение вызывает потери энергии до 20%. Особая опасность активности этих бактерий состоит в том, что они могут разложить уже образовавшуюся молочную кислоту. В результате этого процесса снова повышается pH и начинается порча силоса. Кроме этого, такой силос плохо поедается животными. Среди клостридий, кроме сбраживающих углеводы, есть виды, которые сбраживают протеин или оба вещества. Маслянокислые бактерии являются теплолюбивыми и при температурах 30-40°C активность их обмена веществ очень высока. Их чувствительность к кислотности тем выше, чем ниже влажность среды. Из этого следует, что их чувствительность к кислотности растёт с повышением сухого вещества в силосуемом сырье. В силосах с сильным развитием маслянокислого брожения и связанным с этим повышением pH хорошие условия для своего развития находят гнилостные бактерии родов *Pseudomonas* и *Alcaligene*. Эти бактерии разлагают протеин. Оптимум кислотности для развития гнилостных процессов находится в нейтральной и слабощелочной среде. Поэтому гнилостные бактерии играют роль только в плохо сбраживаемом силосе. Аэробные плесневые грибы, прежде всего родов *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor* и *Monascus* вызывают плесневение поверхности силоса при доступе воздуха. Грибы разлагают молочную кислоту, углеводы и протеин. Плесневение является индикатором доступа воздуха в силос. Плесневелый корм негоден для кормления, так как он может содержать очень ядовитые микотоксины. Отрицательно на силосование и силос действуют дрожжи. При анаэробных условиях они досбраживают углеводы. При доступе кислорода дрожжи в состоянии переключить обмен веществ на дыхание. Дрожжи сбраживают оставшийся после молочнокислого брожения сахар в спирт.

**Предпосылками для оптимального молочнокислого брожения являются:**

- необходимая минимальная концентрация сбраживаемых углеводов (моносахаридов) в силосуемом сырье;
- анаэробные условия;
- температура от 15 до 30° С.

**Протекание брожения в процессе силосования зависит от условий брожения. К ним относятся:**

- химический состав исходного растительного материала и пригодность кормовых растений к силосованию;
- эпифитная микрофлора на растительном материале;
- температура брожения;
- герметизация силосохранилища.
- Так как микроорганизмы, встречающиеся на силосном материале и образующиеся в процессе силосования, предъявляют разные требования к внешней среде, в процессе силосования можно целенаправленно способствовать размножению молочнокислых бактерий и подавлять в большей мере развитие вредных микроорганизмов. В последние годы возрос интерес к применению бактериальных заквасок для консервирования зелёной массы. Они применяются для стимулирования молочнокислого брожения в силосной массе. Внесение в силосуемое сырьё молочнокислых бактерий считается одним из способов обеспечения правильного регулирования изменений происходящих в корме. Под их влиянием в первые часы созревания силоса начинается молочнокислое брожение, в результате которого происходит быстрое подкисление корма и подавляется жизнедеятельность бактерий рода Clostridium, которые вызывают распад белка с образованием масляной кислоты и ядовитых биогенных аминов-триптамина, гистамина, путресцина и кадаверина. Основная причина заготовки силоса низкого качества — высокая влажность силосуемого сырья (80% и более) в период уборки.

### **Ход работы**

Влажность кукурузы в фазе восковой спелости зерна соответствует оптимальным ее значениям при силосовании — 60-70%. Из массы влажностью 70% и ниже не вытекает сок при ее силосовании в траншеях и создаются более благоприятные условия для развития молочнокислых бактерий. Уже при влажности 70% замедляется деятельность маслянокислых и гнилостных бактерий, которые вызывают порчу силоса — чем ниже влажность, тем в большей мере снижается интенсивность развития этих бактерий. Ориентировочно, процент влаги в корме можно определить так: мелкоизмельчённую массу (5-15мм) сжимают в кулаке в течение 20-30 секунд, затем быстро разжимают. Если комок сохраняет форму, и при сжатии выделилась жидкость, влажность более 75%. Если комок сохраняет форму, но влаги выделилось мало — 60-70%. Если комок распадается быстро — менее 60%. Таким образом, по всем полезным хозяйственным показателям силосование кукурузы в фазе восковой спелости зерна, бесспорно, имеет большое преимущество. Возделывание раннеспелых гибридов кукурузы с коротким вегетационным периодом является также одним из решающих условий повышения качества силоса и его продуктивного действия.

Растения кукурузы в фазе восковой спелости зерна измельчают секаторами на разделочных досках .определить влажность измельченных растений. Готовят рабочий раствор из расчёта 5 литров консерванта «Битасил» развести в 170 литрах воды, расход 1,7л на 1тонну силосной массы. Пересчет делают на 5 кг зеленой массы кукурузы согласно данным таблицы 1

Таблица 1— Приготовление рабочего раствора для обработки силосной массы

Влажность сырья, %	Оптимальная длина резки, см	Приготовление рабочего раствора для обработки силосной массы, количество литров на 100 тонн		Расход рабочего раствора на 1 тонну силосуемой массы
		биологический консервант «Битасил», л	Вода (чистая, не хлорированная), л	
65	1-2	5	500	5
70	1-2	5	450	4,5
75	2-4	5	400	4,0

в траншее

Измельченную массу укладывают в полиэтиленовые пакеты и вносят закваску. В поверхностные слои закваску вносят в большем количестве. Пакеты герметически закрывают.

## 2.6 Лабораторное занятие №6 (2 часа)

### Тема: «Биотехнологические методы приготовления хмелевых дрожжей»

**2.6.1 Цель работы:** Изучить биотехнологические методы приготовления хмелевых дрожжей

**2.6.2 Задачи работы:** Приготовить хмелевые дрожжи и закваску

**2.6.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

1. химическая посуда
2. лабораторные весы
3. килограмм-полтора картошки
4. сухие шишки хмеля
5. сахар

## **6. мука пшеничная**

### **2.6.4 Описание (ход) работы:**

Прессованные дрожжи представляют собой выращенные в особых условиях дрожжевые клетки, выделенные из среды, в которой они размножались. В соответствии с ГОСТ 171 влажность их составляет до 75 %, поэтому они являются скоропортящимся продуктом и требуют хранения при температуре 0...4° С в течение не более 12 суток. Важным показателем качества дрожжей является их подъемная сила, или быстрота подъема теста, характеризующая способность дрожжей разрыхлять тесто. Хорошие дрожжи поднимают тесто за 60...65 мин.

Хмелевые дрожжи используются в отечественном хлебопечении в качестве биологического разрыхлителя при производстве хлеба из пшеничной муки, смеси пшеничной и ржаной муки, полностью приготовляемого на хмелевых дрожжах или смеси их с прессованными.

Хмелевые дрожжи являются также одним из средств предупреждения картофельной болезни хлеба

### **Ход работы**

Приготовление хмелевых дрожжей Три литра воды и горсть хмеля закипятить и процедить. Килограмм-полтора картошки очистить, помыть и потереть на мелкой тёрке. В хмелевой отвар всыпать стакан сахара и стакан соли. Всё соединить с тертым картофелем и всю эту массу закипятить, дать ей остывть до тёплого и заквасить старой закваской (или на первый раз дрожжами - любыми, лишь бы они действовали). Поставить в тёплое место (посуда должна быть большой, не меньше ведра). Часов через 8-10 вся эта масса начнёт очень сильно «кипеть». И это будет продолжаться сутки. Кончится «кипение» - дрожжи готовы. Уложите их в стеклянную (желательно) посуду и храните в холодильнике. Они будут действовать до полугода. А потом лучше сварить новые, заквашивать этими, оставшимися.

### **Приготовление закваски**

1 стакан сухих шишечек хмеля заливаем 2 стаканами воды и кипятим час-полтора (до уменьшения объема жидкости вдвое). Затем процеживаем, остужаем и добавляем, перемешивая, 1 столовую ложку сахара (или меда) и муки до густоты сметаны. Накрываем посуду с закваской, но не герметично. Например, можно затянуть пищевой пленкой и в ней проделать пару дырочек для вентиляции. Ставим полученный сосуд в теплое место на 8 - 10 часов. Лучше за закваской следить, а то она легко может "убежать", если место, в котором она будет стоять, окажется достаточно теплым. Когда закваска готова, она вся в мелких пузырьках и можно делать из нее опару.

## **2.7 Лабораторное занятие № 7 (2 часа)**

### **Тема: «Влияние температурного режима на развитие дрожжевых клеток»**

**2.7.1 Цель работы:** Изучить влияние температурного режима на развитие дрожжевых клеток

**2.7.2 Задачи работы:** Вывить коэффициент размножения сахаромицетов при различных температурных режимах

**2.7.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

1. химическая посуда
2. лабораторные весы
3. дрожжи
4. соль
5. лупы

**2.7.4 Описание (ход) работы:**

Дрожжи — это одноклеточные микроорганизмы, относящиеся к классу грибов сахаромицетов. Дрожжевые клетки имеют шаровидную или овальную форму и содержат 75 % влаги. Сухое вещество клетки состоит в основном из белков (44—67%), минеральных веществ (6—8%), углеводов (до 30%). Основные углеводы дрожжей — гликоген и трегалоза — являются источником энергетических процессов в клетке. Установлено, что дрожжи с большим количеством запасных углеводов могут длительное время сохранять свое качество. В дрожжах содержится трипептид, глютатион, активирующий протеолиз. Дрожжи содержат также разнообразные витамины и ферменты.

Ферменты, присутствующие в дрожжах, способствуют протеканию всех жизненных функций их, в том числе процессов дыхания, размножения, построения органов клетки.

В дрожжах действует ряд ферментативных комплексов, из которых главным является зимазный, или так называемая зимаза. При помощи зимазы дрожжи сбраживают сахар, т. е. превращают его в спирт и углекислый газ. При этом дрожжевые клетки получают энергию, необходимую для своей жизнедеятельности. При отсутствии кислорода (в анаэробных условиях) ферменты дрожжей вызывают спиртовое брожение сахара. Это сложный многоступенчатый процесс, который проходит одиннадцать стадий с участием многочисленных ферментов и фосфорной кислоты. На последней стадии процесса брожения сахара образуются углекислый газ и этиловый (винный) спирт. В тесте и других полуфабрикатах хлебопекарного производства кислорода очень мало, поэтому дрожжи вызывают процесс спиртового брожения. Образовавшийся в результате брожения углекислый газ разрыхляет тесто и обеспечивает необходимую пористость изделий. В присутствии кислорода (в аэробных условиях) в питательной среде дрожжи разлагают сахар с образованием воды и углекислого газа. При этом энергии выделяется в 23 раза больше, чем при спиртовом брожении, поэтому в присутствии кислорода дрожжевые клетки интенсивно размножаются.

Для нормальной жизнедеятельности дрожжей необходимы жидккая среда, содержащая питательные вещества, температурные условия.

Жидкая среда для развития дрожжей должна содержать сахар, азотистые соединения, минеральные соединения, витамины. Хлебопекарные дрожжи усваивают глюкозу, галактозу, сахарозу, рафинозу, мальтозу. Сложные сахара (сахароза, мальтоза) под действием ферментов, дрожжей предварительно превращаются в

простые. Из азотистых соединений дрожжи лучше всего усваивают продукты гидролиза белка (аминокислоты, полипептиды), а также минеральные соли, содержащие азот, например сернокислый аммоний.

Большое значение для жизнедеятельности дрожжей имеют температурные условия. Для размножения дрожжей наиболее благоприятна температура 25 — 28 °С. Спиртовое брожение идет наиболее активно при температуре 30—35 °С.

При температуре 45—50 °С и выше дрожжевые клетки погибают. Низкая температура тормозит жизнедеятельность дрожжей, дрожжи впадают в состояние анабиоза (скрытая жизнедеятельность), в котором могут сохраняться долго без порчи.

Замороженные дрожжи после медленного оттаивания при температуре 6—8°С сохраняют свои свойства. Дрожжи живут и размножаются в широких температурных пределах, но для нормальной их жизнедеятельности необходима температура 29—30°С. При очень высокой или очень низкой температуре жизнедеятельность дрожжей ослабляется или прекращается. Максимальная температура для развития дрожжей 38°С, минимальная —5°С; при температуре 50°С дрожжи погибают. Оптимальные температуры для развития и проявления максимальной бродильной активности не всегда совпадают.

Дрожжи, выращенные при температуре, например, 17—22°С, имеют большую бродильную энергию. Сбраживание мелассного сусла при температурах выше 30°С отрицательно отражается на выходе и качестве дрожжей, выделяемых из зрелой бражки и используемых в качестве хлебопекарных. Ферментативная активность, подъемная сила и стойкость таких дрожжей при хранении поникаются, поэтому рекомендуется следующий температурный режим выращивания дрожжей и сбраживания мелассного сусла: в дрожжегенераторах 28—29°С, в двух головных бродильных аппаратах 30—31°С и в концевых аппаратах 28—29°С. Сусло из крахмалсодержащего сырья сбраживают при температуре 28—32°С. При повышении температуры дикие дрожжи и бактерии размножаются значительно быстрее сахаромицетов. Если при температуре 32°С коэффициент размножения диких дрожжей в 2—3 раза больше коэффициента размножения сахаромицетов, то при 38°С — уже в 6—8 раз больше.

**Ход работы**, Отвешивают на технических весах 5±0,01 г прессованных дрожжей и 160 мл 2,5%-ного раствора чистой поваренной соли-первый вариант опыта), далее в раствор добавляют 15г сахара.

Содержимое помещают в химические прозрачные стаканы размешивают до исчезновения комочеков. Оставляют при температуре 18°С на 20-30минут (контрольный)

Второй вариант опыта. Готовят питательную среду аналогично контрольному варианту и оставляю в термостате при температуре 23°С на 20-30минут

Третий вариант опыта. Готовят питательную среду аналогично контрольному варианту и оставляю в термостате при температуре 28°С на 20-30минут

Четвертый вариант опыта. Готовят питательную среду аналогично контрольному варианту и оставляют в термостате при температуре 32°С на 20-30минут

Пятый вариант опыта. Готовят питательную среду аналогично контрольному варианту и оставляют в термостате при температуре 38°C на 20-30 минут

По истечении времени дают оценку коэффициента размножения сахаромицетов. Результаты записывают в тетрадь, делают выводы.

## **2.8 Лабораторное занятие №7 (2 часа)**

**Тема: «Биотехнологические методы активизации хлебопекарных дрожжей»**

**2.8.1 Цель работы:** Изучить биотехнологические методы активизации хлебопекарных дрожжей

**2.8.2 Задачи работы:** Провести активизацию хлебопекарных дрожжей сахарным раствором различной концентрации

**2.8.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

1. химическая посуда
2. лабораторные весы
3. дрожжи
4. сахар

**2.8.4 Описание (ход) работы:**

Сущность процесса активации хлебопекарных дрожжей заключается в использовании дополнительной стадии технологического процесса – фазы активации, где хлебопекарные дрожжи помещаются в специально приготовленную питательную смесь. Продолжительность активации дрожжей зависит от способа приготовления теста и составляет для безопасного способа 2-3 часа, а для опарного – 1 час.

Теоретическое объяснение процесса активации дрожжей заключается в том, что при использовании фазы активации создаются более благоприятные условия для дрожжевой клетки. Дрожжевые клетки в фазе активации из состояния покоя переходят в активное состояние, переключается с дыхательного на бродильный способ жизнедеятельности. Для повышения биологической активности микроорганизмов предложены различные физико-химические способы повышения активности микроорганизмов: магнитные, термические электрохимические, ИК- способы, способы обработки лазерным облучением и др.

При производстве прессованных дрожжей дрожжевые клетки выращивают в условиях усиленной аэрации питательной среды, поэтому внутренняя структура и связанный с нею ферментативный комплекс дрожжей приспособлены в основном к аэробным условиям культивирования. Брожения почти не происходит. В опаре или тесте дрожжи попадают в условия, близкие к анаэробным, и поэтому "переключаются" с дыхания на брожение. Внутренняя структура клетки при этом существенно перестраивается. Ферментативный комплекс также изменяется, приспосабливаясь к новым условиям существования. Процесс переключения дрожжевых клеток

дыхательного типа на бродильныш требует определенного времени и соответствующих условий. Для ускорения брожения опары и теста такое переключение целесообразно проводить предварительно в небольшом количестве питательной среды, оптимальной по своему составу для данного процесса. В этой предварительной фазе, предшествующей фазе приготовления опары или безопарного теста, происходит активация прессованных дрожжей с точки зрения их способности вызывать брожение. Процесс предварительной активации включает приготовление в этой среде прессованных дрожжей и выдерживание их в этой среде - фазе активации.

Цель предварительной активации прессованных дрожжей состоит в уменьшении их дозировки, сокращении продолжительности брожения теста и расстойки тестовых заготовок. Применение предварительной активации прессованных дрожжей способствует экономии дрожжей, улучшению качества хлеба.

### **Ход работы**

Хлебопекарные дрожжи обладают и бродильной активностью, но чтобы направить использование углеводов субстрата только на образование биомассы, спиртовое брожение ограничивают всеми доступными средствами. Это достигается интенсивной аэрацией среды, а также поддержанием низкой концентрации сахара в ней (0,5—1,5%). При высокой концентрации сахаров наблюдается катаболитная репрессия ферментов цикла Кребса и переключение энергетического метаболизма преимущественно на брожение. Для предварительной активации прессованных дрожжей необходимо приготовить питательную среду и равномерное распределение в этой среде дрожжей в фазу активации. Работу выполняют в шести вариантах

Для этого отвешивают на технических весах  $5\pm0,01$  г прессованных дрожжей и 160 мл 2,5%-ного раствора чистой поваренной соли-первый вариант опыта (контрольный)

Второй вариант опыта берут  $5\pm0,01$  г прессованных дрожжей и 60 мл 2,5%-ного раствора чистой поваренной соли и 100мл 0,5 %-ногораствара сахара

Третий вариант опыта берут  $5\pm0,01$  г прессованных дрожжей и 60 мл 2,5%-ного раствора чистой поваренной соли и 100мл 0,7 %-ногораствара сахара

Четвертый вариант опыта берут  $5\pm0,01$  г прессованных дрожжей и 60 мл 2,5%-ного раствора чистой поваренной соли и 100мл 1,0 %-ногораствара сахара

Пятый вариант опыта берут  $5\pm0,01$  г прессованных дрожжей и 60 мл 2,5%-ного раствора чистой поваренной соли и 100мл 1,3 %-ногораствара сахара

Шестой вариант опыта берут  $5\pm0,01$  г прессованных дрожжей и 60 мл 2,5%-ного раствора чистой поваренной соли и 100мл 1,5%-ногораствара сахара

Содержимое помещают в химические прозрачные стаканы размешивают до исчезновения комочеков. Оставляют при комнатной температуре на 20-30минут.По истечении времени дают оценку по развитию дрожжевых клеток по вариантам.

Результаты записывают в тетрадь , делают выводы.

## **2.9 Лабораторное занятие №8 (2 часа)**

**Тема: «Биотехнологические методы приготовления ржаной закваски»**

**2.9.1 Цель работы:** Изучить биотехнологические методы приготовления ржаной закваски

**2.9.2 Задачи работы:** Приготовить ржаную закваску

**2.9.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

1. химическая посуда
2. лабораторные весы
3. дрожжи
4. соль
5. лупы
6. ржаная закваска

**2.9.4 Описание (ход) работы:**

Закваска - это тесто, оставшееся от предыдущего приготовления хлеба. Если вместо дрожжей взять кусок такой закваски и поставить на ней тесто, то хлеб получается более кислый, чем на дрожжах. Чем это объясняется? На этот вопрос можно ответить, если закваску исследовать под микроскопом. Оказывается, что кроме дрожжевых клеточек (дрожжей) в закваске имеются и другие микрорганизмы (бактерии), которые попадают в закваску из воздуха, а так же с мукой. Эти микроорганизмы в закваске, а затем и в тесте, разлагая некоторые питательные вещества муки, образуют различные кислоты, а поэтому их называют кислотообразующими бактериями. В хорошей закваске, кроме дрожжей, имеются молочнокислые бактерии, которые образуют молочную кислоту из виноградного сахара (глюкоза).

Качество ржаного хлеба, особенно в отношении вкуса, зависит от качества закваски. Закваска недоброкачественная - с большим содержанием кислот и незначительным количеством дрожжевых клеточек, даст хлеб с плохим вкусом и с низкой пористостью.

Для того, чтобы приготовить хорошую закваску, нужно во время ее брожения создать соответствующие температурные условия (26 - 27 С) и вести систематический лабораторный контроль за ее состоянием.

### **Ход работы**

Вывести закваску можно различными способами. Наиболее простым способом, без применения дрожжей, будет следующий. Берется ржаная мука и смешивается с водой (на 100 частей муки 70 частей воды). Получается тесто, температура которого не должна превышать 27 - 28 С. После некоторого времени стояния это тесто самопроизвольно подвергнется брожению (спонтанное брожение). Такое тесто несколько раз освежается мукой и водой, и в результате этого получается закваска, в которой будут присутствовать и дрожжи, и молочнокислые бактерии, внесенные с мукой и попавшие из воздуха.

Но приготовленная таким образом закваска не всегда бывает хорошей и, кроме того, требуется много времени, чтобы ее получить. Поэтому на хлебозаводах закваску выводят с применением прессованных дрожжей.

Выведение закваски с применением прессованных дрожжей, в свое время, на хлебозаводах производится через несколько опар и тест.

Примерная рецептура следующая:

Опара №1.

Мука	18 кг
Вода	26 л
<u>Дрожжи</u>	1 кг
Температура начальная	27 С
<u>Кислотность</u> конечная	3 Н
Продолжительность брожения, около	3 час

Тесто №1

Ставится на всей опаре № 1

Мука	21 кг
<u>Кислотность</u> конечная	3 Н
Продолжительность брожения, около	2 часа

Опара № 2.

Ставится на всем 1-ом тесте

Мука	45 кг
Вода	90 л
<u>Дрожжи</u>	1 кг
Температура начальная	27 С
<u>Кислотность</u> конечная	4 Н

Продолжительность брожения, около	4 ч. 45 мин.
-----------------------------------	--------------

Тесто № 2

Ставится на всей 2-ой опаре

Мука	95 кг
Кислотность конечная	6 Н
Продолжительность брожения, около	2,5 час.

Опара № 3.

Тесто № 2	45 кг
Мука	85 кг
Вода	140 л
Температура начальная	27 С
Кислотность конечная	4 Н
Продолжительность брожения, около	3 час.

Тесто № 3

Ставится на всей 3-ей опаре

Мука	100 кг
Кислотность конечная	7 Н
Продолжительность брожения, около	2 час.

"Американка"

Тесто № 3	70 кг
Мука	185 кг
Вода	140 л
<u>Дрожжи</u>	1 кг

Температура начальная	27 С
Кислотность конечная	9 Н
Продолжительность брожения	3 час.

В лабораторных условиях уменьшить массу сырья

Дальнейшее ведение закваски на хлебозаводе зависит от вырабатываемого им сорта ржаного хлеба.

При выпечке столового ржаного хлеба дальнейшее ведение закваски производится по рецептуре "американки", каждый раз с прибавлением дрожжей. При выпечке кислого ржаного хлеба приготовление закваски ведется различными способами, но без прибавления дрожжей.

При выведении новой закваски на хлебозаводах надо проводить несколько "американок" прежде, чем пускать новую закваску в производство. Это необходимо для соответствующего кислотонакопления в новой закваске. Хлеб приготовленный на молодой закваске, может оказаться непропеченым, а также слегка горьким.

При замесе первых тест на новой закваске можно добавлять небольшое количество старой закваски или теста. Так как на новой закваске тесто идет быстрее обычного, необходимо это учесть при определении времени расстойки. При работе на люлечных печах и с жестким кольцевым конвейером (система инженера Марсакова) необходимо на первых порах тесто делать с несколько пониженной температурой или более крутое (второе менее желательно) с тем, чтобы тесто не перестоялось на расстойке и не получился бы брак хлеба.

## **2.10 Лабораторное занятие №10 ( 2 часа)**

**Тема: «Влияние кислой среды на развитие дрожжевых клеток»**

**2.10.1 Цель работы:** Изучить влияние кислой среды на развитие дрожжевых клеток

**2.10.2 Задачи работы:** Выявить коэффициент размножения сахаромицетов при различных температурных режимах

**2.10.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

1. химическая посуда
2. лабораторные весы
3. дрожжи
4. соль
5. лупы
6. сахар

#### **2.10.4 Описание (ход) работы:**

Для нормальной жизнедеятельности дрожжей необходимы жидкая среда, содержащая питательные вещества, соответствующая реакция среды

Реакция среды, в которой находятся дрожжи, должна быть слабокислой. Щелочная среда угнетает дрожжевые клетки. При высокой щелочности дрожжи погибают. На жизнедеятельность дрожжей значительно влияет активная кислотность среды. Водородные ионы изменяют электрический заряд коллоидов плазменной оболочки клеток и в зависимости от концентрации могут увеличивать или уменьшать ее проницаемость для отдельных веществ и ионов. От величины pH зависят скорость поступления питательных веществ в клетку, активность ферментов, образование витаминов. При изменении pH среды изменяется и направление самого брожения. Если pH сдвигается в щелочную сторону, то увеличивается образование глицерина. Дрожжи сохраняют жизнеспособность в пределах pH среды от 2 до 8. Для их выращивания оптимальным является pH 4,8—5. При pH ниже 4,2 дрожжи продолжают развиваться, то как развитие молочнокислых бактерий прекращается. Это свойство дрожжей используют для подавления развития бактерий в инфицированной среде, которую подкисляют до pH 3,8—4 и выдерживают определенное время.

#### **Ход работы**

Отвешивают на технических весах  $5\pm0,01$  г прессованных дрожжей и 160 мл 2,5%-ного раствора чистой поваренной соли-первый вариант опыта . С помощью измерителя pH среды с использованием кислот и щелочи готовят растворы соответствующих концентраций

Первый вариант опыта берут  $5\pm0,01$  г прессованных дрожжей и 60 мл 2,5%-ного раствора чистой поваренной соли и 100мл 0,5 %-ного раствора сахара pH раствора 2,5

Второй вариант опыта берут  $5\pm0,01$  г прессованных дрожжей и 60 мл 2,5%-ного раствора чистой поваренной соли и 100мл 0,5 %-ного раствора сахара pH раствора 3

Третий вариант опыта берут  $5\pm0,01$  г прессованных дрожжей и 60 мл 2,5%-ного раствора чистой поваренной соли и 100мл 0,5 %-ного раствора сахара pH раствора 3,5

Четвертый вариант опыта берут  $5\pm0,01$  г прессованных дрожжей и 60 мл 2,5%-ного раствора чистой поваренной соли и 100мл 0,5 %-ного раствора сахара pH раствора 4

Пятый вариант опыта берут  $5\pm0,01$  г прессованных дрожжей и 60 мл 2,5%-ного раствора чистой поваренной соли и 100мл 0,5 %-ного раствора сахара pH раствора 4,5

Шестой вариант опыта берут  $5\pm0,01$  г прессованных дрожжей и 60 мл 2,5%-ного раствора чистой поваренной соли и 100мл 0,5 %-ного раствора сахара pH раствора 5

Содержимое помещают в химические прозрачные стаканы размешивают до исчезновения комочеков. Оставляют при температуре 18°C на 20-30минут

По истечении времени дают оценку размножения сахаромицетов в зависимости . от pH среды

Результаты записывают в тетрадь , делают выводы.

## **2.11 Лабораторное занятие №11 (2 часа)**

**Тема: «Биотехнологические процессы квашения груш»**

**2.11.1 Цель работы:** Изучить биотехнологические процессы квашения груш

**2.11.2 Задачи работы:** заквасить груши в кадке

**2.11.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

1. кадка или эмалированная посуда
2. ржаная мука
3. соль
4. горчица
5. листья черной смородины

**2.11.4 Описание (ход) работы:**

Квашение груш основано на процессе молочнокислого брожения. Для мочения лучшими считаются груши таких сортов: гданские, трубчевские, сахарные, бессемянные, долговетки и другие. Для квашения непригодны скороспелые с рыхлой мякотью, недостаточно кислые, рассыпчатые, ярко окрашенные с пятнами, нажимами, поврежденные вредителями плоды. Квашение груш состоит из следующих операций. Плоды после съема должны немного пролежать, чтобы имеющейся в них крахмал превратился в сахар. Затем их сортируют по сортам, удаляя при этом непригодные экземпляры. Для мочения хороши мелкие и средние плотные груши.

### **Ход работы**

Плоды моют, укладывают в подготовленную кадку (50-100 л), эмалированную посуду - ведро или кастрюлю цветоложем книзу, перекладывая каждый ряд черносмородиновым листом. Хорошо переложить ряды груш ржаной соломой, а также покрыть ею и верхний слой. Желательно использовать чистую ржаную солому, предварительно обдав ее кипятком. Заполненную грушами кадку заливают суслом, приготовленным следующим образом: 150 г. ржаной муки (или 100 г сухого кваса, или 150 г ржаных сухарей) размешивают в 0,5 л кипяченой воды, доливают 2 л кипятка и накрывают крышкой. Когда сусло остынет, его процеживают и добавляют 2 ст. ложки соли, 1 ст. ложку сухой горчицы и доливают кипяченой остуженной водой до 10 л. Сверху накрывают полотном, на полотно укладывают подгнетный круг с гнетом. В первые 5-6 дней ежедневно проверяют уровень жидкости, следя за тем, чтобы верхний слой груш все время был в растворе. Через 8-10 дней кадку переносят в холодное помещение и хранят при температуре не ниже 0°C. Спустя 40 дней груши готовы к употреблению.

## **2.12 Лабораторное занятие №12 (2 часа)**

**Тема: «Биотехнологические методы получения пива»**

**2.12.1 Цель работы:** Изучить биотехнологические методы получения пива

**2.12.2 Задачи работы:** Научиться получать пиво

**2.12.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

1. Химическая посуда
2. Дестиллятор воды
3. Химические реагенты
4. Солод
5. Электрическая плитка
6. Водяная баня

**2.12.4 Описание (ход) работы:**

Получение алкогольных напитков при помощи различных штаммов микроорганизмов основано на спиртовом брожении, в процессе которого сбраживаемый сахар исходного субстрата (крахмала или фруктового сока) превращается в этанол и дополнительные продукты. Этanol можно использовать как промышленное сырье или топливо. Это справедливо и для других спиртов. Например, глицерин можно получить в одном из вариантов спиртового брожения, или н-бутанол. являющийся конечным продуктом ацетонобутанолового брожения. Согласно археологическим раскопкам, виноделие началось развиваться 5000 лет назад, а уже 6000 лет назад людям было известно о процессах брожения, происходящих в экстрактах зерен хлебных злаков.

**Производство сакэ, или рисовой водки** похоже скорее на пивоварение, чем на виноделие, поскольку сбраживаемым углеводом является крахмал. Крахмал превращается в сбраживаемые сахара под действием *Aspergillus oryzae*, споры которого смешивают с размолотым и сваренным на пару рисом, и инкубируют пять-шесть дней при 35°C. Полученный продукт смешивают с распаренным рисом и засевают штаммом *S. cerevisiae* (мого). Брожение продолжается не менее трех недель. Приготовление сакэ - сложный и трудоемкий процесс, требующий освоения различных способов брожения (в полутвердом и затопленном состоянии) и последовательного регулирования микробных популяций: сначала плесени (*Aspergillus oryzae*), затем бактерий (*Lactobacillus* и *Leuconostoc spp.*) и наконец дрожжей (*S.cerevisiae*). Концентрация спирта перед выходом в торговую сеть доводится обычно до 16 % по объему, однако к концу брожения сакэ содержит не менее 20% спирта. Устойчивость дрожжевых штаммов к таким концентрациям спирта, возможно, связана с гетерогенным характером брожения.

**Спирт.** В отличие от пивоварения для производства спиртов из зерна не нужно кипятить сусло, поэтому, хотя брожение продолжается дольше, зато спирта производится больше. Характер последующей перегонки зависит от вида

алкогольных напитков. Для многих алкогольных напитков ферментируемая жидкость помещается в перегонные кубы вместе с дрожжами; последние наряду с компонентами, экстрагированными из деревянных бочонков, в которых выдерживаются спиртные напитки, придают вкус конечному продукту.

Этиловый спирт получают двумя способами: микробиологическим и химическим. В основе первого способа лежит сбраживание сахара в спирт дрожжами семейства сахаромицетов. Второй способ предусматривает синтез спирта из этилена сернокислотной гидратацией.

Одним из лимитирующих факторов в ферментационном производстве этанола является неспособность микроорганизмов переносить высокие концентрации спирта. Остановка процесса брожения происходит при достижении относительно высокого уровня концентрации спирта.

В связи с ростом цен на нефть ферментационное производство спирта приобретает особое значение. Его использование в качестве топлива учитывает следующие технические и экономические факторы: возможность выращивать «продуцирующие спирт» растения на больших площадях, использование избыточного зерна, совершенствование платежного баланса, ухудшающегося из-за тяжелых нефтяных программ, а также технологический прогресс, в связи с созданием машин, в которых спирт выступает заменителем топлива.

Производство спирта - развитая отрасль промышленности, продолжающаяся развиваться. Ряд задач спиртовой промышленности можно решить путем усовершенствования процессов солодорощения с применением стимуляторов роста, осахаривания с использованием вакуумного осахаривания, производства ферментных препаратов, организации упрощенной технологии их получения с применением более дешевого сырья и более интенсивных методов их выращивания, а также получение концентрированных сухих ферментов с использованием мембранный технологии с ультрафильтрацией.

**Процесс получения спирта из крахмалосодержащего сырья** включает следующие стадии: 1) разваривание и осахаривание разваренной массы ферментными препаратами или солодами; 2) сбраживание осахаренного затора.

На этих этапах ферменты имеют очень большое значение. Применение амилолитических ферментов дает ускорение и углубление осахаривания крахмала, а применение целлюлолитических ферментов позволяет получить из целлюлозы сахара, тем самым увеличивая количество сбраживаемых Сахаров.

Гидролиз крахмала амилолитическими ферментами осуществляется после разрушения клеточных стенок крахмальных зерен, а это можно осуществить только при влаго-тепловой обработке крахмалосодержащего сырья, т.е. при разваривании. Чтобы ускорить процесс разваривания и придать затору более жидкую консистенцию, осуществляют предварительную обработку бактериальными культурами, такими как *Bacillus diastaticus*, *Bac. subtilis* и *Bac. mesentericus*. Они обладают высокой разжижающей и декстринирующей способностью и являются источником термостабильной а-амилазы.

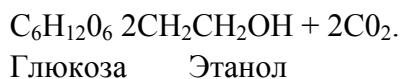
Известно, что многие бактериальные культуры обладают высокой целюлолитической активностью, расщепляя целлюлозу, они дают дисахарид целло-биозу и моносахарид глюкозу.

Активная целлюлаза содержится в проросшем зерне, а также в бактериях и грибах, особенно следует отметить долговые грибы, развивающиеся на древесине. Углеводы, полученные при гидролизе некрахмальных полисахаридов, полностью сбраживаются. Однако ферментативный гидролиз целлюлозосодержащих компонентов сырья применяется редко, что объясняется сложностями при переработке целлюлозы.

В технологии спиртового производства применение целлюлозосодержащих видов растительного сырья открывает перспективу расширения ассортимента сырья, пригодного для выработки этилового спирта и позволяет более полно использовать некрахмалистые полисахариды зерна, являющиеся потенциальными источниками сбраживаемых углеводов, но почти не участвующие в процессе биосинтеза спирта.

Изучение условий действия, а также термо и pH-стабильности ферментов показало, что условиям спиртовой технологии удовлетворяют такие препараты, как целлофторин ГЗХ, целлобранин ГЗХ, целлофоетидин П10Х, целлюлаза 100 Г20Х и др., способные активно и длительно действовать на целлюлозосодержащие субстраты в диапазоне температур 30-60°C и pH 4,5-6,0. Использование этих целлюлолитических ферментов в спиртовой промышленности позволяет расширить диапазон применяемого сырья и снизить потери и отходы производства, имеющие место при неполном гидролизе высокомолекулярных углеводов.

**Традиционное спиртовое брожение.** Этанол получают двумя путями: синтетическим из нефтехимического сырья и биологическим с помощью дрожжей *Saccharomyces cerevivae*. В промышленном производстве бродильные емкости с сахарным раствором при pH 4-5 засевают суспензией дрожжей. Во время фазы роста дрожжей глюкоза сбраживается с образованием этанола и CO<sub>2</sub>. Через 2-3 суток брожение заканчивается и выход этанола составляет 90% теоретически достижимого количества



Путем дистилляции и ректификации этанол выделяют из культуральной жидкости, а ее остаток может быть использован на корм скоту.

При выращивании в анаэробных условиях дрожжи превращают глюкозу в пируват посредством метаболического пути Эмбдена-Мейергофа-Паренса (ЭМП). Однако накапливающийся пируват не может принять участие в цикле трикарбоновых кислот (ЦТК), и образующийся при гликолизе НАДН<sub>2</sub> не окисляется цитохромной системой. В этих условиях пируват декарбоксилируется другим ферментом до ацетальдегида, который восстанавливается в этанол с помощью НАД + H<sub>2</sub>, накапливающегося в ходе гликолиза. Таким образом, НАД регенерируется и может быть повторно использован, что способствует дальнейшему протеканию гликолиза. В ходе превращения глюкозы в этанол путем брожения образуются молекулы АТФ.

Спиртовое брожение происходит и в аэробных условиях. Подавление аэробного дыхания при высокой скорости ее усвоения называется катаболической репрессией, которая влияет не только на образование энергии, но и на уровень интермедианов из ЦТК. В клетках, растущих в условиях брожения, подавлены и ЦТК, и глиоксилатный цикл. При этом необходимые для биосинтеза кислоты цикла ТКК образуются в результате карбоксилирования пирувата. Образование митохондрий оказывается подавленным, снижается уровень ряда митохондриальных ферментов, в том числе цитохромов и некоторых ферментов ЦТК.

Микробиологическим путем получают этиловый ректифицированный спирт, который предназначается для пищевых и медицинских целей. Для этого используют разнообразное растительное сырье: зерна злаковых культур, картофель, свеклу и мелассу. Из непищевого сырья - гидролизатов древесины, соломы, хлопковой шелухи и сульфитных щелоков (отходов сульфитцеллюлозного производства) вырабатывают гидролизный и сульфитный спирты.

Переработка зерна и картофеля осуществляется по однотипной технологии и включает следующие технологические стадии: получение и подготовку осахаривающих материалов; подготовку зерна и картофеля к развариванию; разваривание сырья, осахаривание крахмалсодержащего сырья; культивирование дрожжей; сбраживание сусла; извлечение спирта из бражки, его укрепление и очистку от примесей.

В качестве возбудителей спиртового брожения используют культурные дрожжи, которые должны обладать высокой бродильной активностью, иметь и сохранять анаэробный тип обмена, обладать стойкостью к продуктам обмена, посторонним микроорганизмам и к изменениям состава питательного субстрата. При переработке зерна и картофеля применяют пылевидные дрожжи расы XII, при переработки мелассы - осмофильтальные дрожжи рас В<sub>10</sub>, В, Вх, М5, а также гибридные дрожжи Г-67, Г-73, Г-75, Г-1 12, У-563 и др..

В начале производственного сезона дрожжи получают из чистой культуры. Далее их культивируют по методу естественно-чистой культуры. Дрожжи размножают в дрожжевых аппаратах, оборудованных мешалкой и змеевиком, на сусле концентрацией 17... 18 мас.%. Сусло вначале пастеризуют при 70°C в течение 20 мин, а затем охлаждают до 50°C и подкисляют серной кислотой до pH 3,6. В подкисленное и охлажденное до 25°C сусло засевают 10% засевных дрожжей. Накопление дрожжей при температуре 25...28 С ведут до тех пор, пока концентрация сусла не снизится на 1/3 от первоначальной.

Для размножения дрожжей экономически выгодно использовать часть бродящей массы, взятой из бродильного аппарата через 16... 18 часов после начала брожения. В такой среде еще мало спирта и много питательных веществ. Отъемы бражки подкисляют и оставляют для размножения дрожжей при 28 С. На стадии дрожжегенерирования сбраживается около 30% сахара, содержащегося в сырье. Когда в 1 мл бродящей среды накопится 120 млн. дрожжевых клеток, а содержание сухих веществ сусла снизится до 16... 17% и в сусле накопится 2,5- 3,5 об.% спирта, начинают переток бродящей массы из дрожжегенераторов в первый аппарат бродильной батареи.

При сбраживании сахара диффундируют в дрожжевую клетку, где вовлекаются в цепь ферментативных процессов, конечным результатом которых является образование спирта и диоксида углерода, выбрасываемой дрожжевой клеткой в окружающую среду как продукт ее метаболизма. Ферментативные процессы осуществляются последовательно при участии различных ферментов. Кроме спирта и диоксида углерода при брожении образуются вторичные и побочные продукты. Ко вторичным продуктам относят все вещества, которые образуются в результате сбраживания сахара дрожжами: глицерин, уксусный альдегид, пи-ровиноградную кислоту и др. Побочные продукты образуются не из сахара, а из других веществ, содержащихся в сбраживаемом субстрате. Наиболее важными побочными продуктами являются высшие спирты (сивушное масло), которые образуются

главным образом при размножении дрожжей и являются продуктами взаимодействия различных аминокислот и пировиноградной кислоты.

Брожение осуществляется в ферmentерах емкостью 50...100 м<sup>3</sup>. Съем спирта с 1 м<sup>3</sup> дрожжебродильной аппаратуры составляет всего лишь 2 дал/сут. В зрелых дрожжах содержится 2...3 об.% спирта и 90...100 млн дрожжевых клеток в 1 мл среды. Длительность брожения при температуре бродящей массы 26...30°C составляет 56...60 часов. С целью предупреждения развития инфекции систематически через каждые 2 суток проводят профилактическую стерилизацию бродильных аппаратов от головного к последнему. Зрелая бражка содержит спирта 8...10 об.%, несброженных Сахаров 0,25...0,4 г/мл и нерастворенного крахмала 0,2 г/100 мл, кислотность зрелой бражки 0,5...0,6°.

**Новые тенденции в производстве этанола.** Перед проведением ферментации сырье (сахарный тростник, маниок, сахарная свекла, кукуруза, пшеница, картофель) должно пройти подготовку, в результате которой получают чистый, прозрачный стерильный сахаросодержащий раствор. Далее процесс ферментации осуществляется непрерывно в ферmentерах большого объема до 1000 м<sup>3</sup>). К новым способам и приемам по сравнению с классическим получением пива и вина относятся: использование новых штаммов микроорганизмов, например флокулирующих, крахмало- и пентозопотребляющих дрожжей и бактерии *Zymomonas mobilis*. Эти бактерии были выведены в начале XX века из пальмового вина и мексиканского напитка. Это палочки, которые значительно меньше дрожжевых клеток, способны расти на питательных средах с высокой концентрацией глюкозы и параллельно образовывать этанол. Они растут в 2 раза быстрее, чем дрожжи, скорость образования этанола в 6-7 раз больше, что предположительно объясняется лучшим транспортом питательных веществ к маленьким бактериальным клеткам, чем к большим дрожжевым. Выход этанола на 5% выше, чем у дрожжей, так как эти бактерии тратят меньше сахара для строительства клеточного материала. Бактерии *Z. mobilis* не нуждаются в кислороде для роста, что значительно облегчает ведение процесса образования этанола, а также можно осуществлять как периодическое, так и непрерывное получение этанола.

Новая технология на стадии сбраживания состоит в применении фиксированных микроорганизмов, а также реакторов петлевого типа в непрерывном производстве проведения процесса в аэробных условиях и введении колонн энергетически оптимизированной дистилляции и абсолютирования через теплообмен и ступенчатое давление в колоннах.

## 2.13 Лабораторное занятие №13 (2 часа)

**Тема: «Биотехнология получения сока с применением ферментов»**

**2.13.1 Цель работы:** Изучить биотехнологические методы получения сока с использованием ферментов

**2.13.2 Задачи работы:** Провести осветление сливового сока с использованием пектолитического фермента (П1 Ох и ПОх)

**2.13.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

1. химическая посуда

2. лабораторные весы
3. электрическая соковыжималка

#### **2.13.4 Описание (ход) работы:**

В плодоводческих хозяйствах значительную часть урожая составляет нестандартная продукция - плоды с ушибами, вмятинами, надколами, сильно загрязненная. Внедрение современных способов переработки может дать готовую продукцию высокого качества. Организация переработки сырья в районах его сбора позволяет использовать дополнительные сырьевые ресурсы в результате снижения потерь при транспортировке.. В числе современных технологий переработки плодовой продукции с целью получения соков - применение различных ферментных препаратов, повышающих сокоотдачу перерабатываемого сырья. Обработка ферментными препаратами основана на воздействии пектолитических ферментов на пектиновые вещества, цементирующие отдельные клетки растительной ткани между собой и входящие в состав внешних оболочек клеток. При этом повреждаются белковые мембранны, снижается вязкость сока, облегчается и ускоряется процесс прессования и увеличивается выход продукта (на 5-20%). Наиболее перспективно применение ферментов, действующих на клеточные структуры,держивающие жидкости. Для производства плодово-ягодных соков особенно важны гидролитические ферменты, к которым можно отнести пектиназы. Пектолитические ферменты используются в консервной промышленности для обработки мезги и соков плодов с высоким содержанием пектина. С этой целью употребляются препараты промышленного производства из *Aspergillus foetidus* (пектофоетидин) и *A. awamori* (пектоаваморин). Ферментные препараты имеют вид зернистого порошка светло-коричневого или темно-коричневого цвета, представляют собой очищенную и высушеннную культуральную жидкость, полученную в результате выращивания гриба-продуцента пектиназ. Эти ферменты способствуют увеличению выхода сока за счет мацерирования клеточных стенок и гидролиза пектина. Применение ферментов позволяет повысить выход виноградного сока на 3,5-6,0%, а из таких труднодобывающихся плодов, как слива, алыча, абрикосы, персики - на 25-30%. Ферментные препараты пектиназ (П1 Ох и ПОх) применяются в количестве 0,01-0,1% к массе перерабатываемого сырья .Технологическая схема практически не претерпевает изменений. Добавляется этап инкубирования мезги с определенным значением кислотности в присутствии ферментного препарата. При температуре 40-45°C и pH среды 4,5 время обработки составляет 1,5-3 часа .Соки, обработанные пектолитическими ферментами, быстрее осветляются, лучше фильтруются и легче подвергаются концентрированию, так как пектиновые вещества гидролизованы и не образуют при вакуум-упаривании коллоидов, мешающих приготовлению сиропов .Основным ограничением для использования пектолитических ферментов при получении соков из плодов и вин является накопление в растворе в результате действия пектинэстераз-метилового спирта. Его содержание может достигнуть критических величин, если объект содержит значительное количество пектина, например, при обработке яблочных и персиковых выжимок. Однако это несущественно, если такие соки производятся для переработки на вино .

#### **Ход работы**

Отжать сок из плодов сливы с помощью соковыжималки

1. Контрольный вариант .Сливовый сок 500 мл наливают в химический стакан, пектолитический фермент не добавляют.

2. Вариант. Сливовый сок наливают в химический стакан, добавляют пектолитический препарат (П1 Ох и ПОх) добавляют в виде суспензии в количестве 0,01 % к массе сока из расчета стандартной активности препарата 9 ед/г по пектиназе. Для получения суспензии препарат заливают объемом сока в соотношении 1 : 10, нагретого до 40—45 °C, и настаивают 1 ч для активирования ферментов. Полученную суспензию вносят в сок и выдерживают 1-2 ч при 40—45 °C.

3. Вариант. Сливовый сок наливают в химический стакан, добавляют пектолитический препарат (П1 Ох и ПОх) добавляют в виде суспензии в количестве 0,02 % к массе сока. Готовят раствор аналогично второму варианту.

4. Вариант . Сливовый сок наливают в химический стакан, добавляют пектолитический препарат (П1 Ох и ПОх) добавляют в виде суспензии в количестве 0,03 % к массе сока. Готовят раствор аналогично второму варианту.

Образцы сока по вариантам опыта сравнить по степени осветления.

Сделать выводы

## **2.14 Лабораторное занятие №14 (2 часа)**

**Тема: «Управление покоем и прорастанием клубней картофеля с помощью фиторегуляторов»**

**2.14.1 Цель работы:** Изучить биотехнологические методы управления покоем и прорастанием клубней картофеля с помощью фиторегуляторов

**2.14.2 Задачи работы:** Приготовить растворы гиббереллина и 2-ХЭФК, замочить клубни в растворах, провести учет проросших глазков, определить оптимальные концентрации препаратов для стимулирования состояния покоя и прорастания клубней.

**2.14.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

1. химическая посуда
2. лабораторные весы
3. клубни картофеля
4. ПС, 2-ХЭФК или препараты на ее основе
5. этиловый спирт
6. посуда для приготовления растворов и замачивания клубней
7. термостат
8. бумажные пакеты

**2.14.4 Описание (ход) работы:**

В ряде южных районов возможно выращивание двух урожаев картофеля в год, однако на практике это часто не реализуется. Основной причиной является недостаток

посадочного материала, так как клубни, полученные в прошлом году, трудно сохранить до второго срока посадки, а клубни первого урожая не способны к прорастанию из-за того, что находятся в состоянии глубокого покоя. Для прерывания покоя можно использовать обработку гиббереллином, резко повышая содержание фитогормонов - стимуляторов прорастания. При хранении потери картофеля во многом обусловлены преждевременным выходом клубней из состояния покоя, связанным со снижением уровня ингибитора прорастания -фитогормона абсцизовой кислоты. Обработка клубней перед закладкой на хранение этиленпродуцентами способствует увеличению биосинтеза абсцизовой кислоты, и, следовательно, продлевается покой и улучшается сохранность клубней.

**Ход работы.** Готовят растворы гиббереллина и 2-ХЭФК (концентрацию указывает преподаватель). Замачивают клубни в этих растворах на 10-20 мин, после чего обсушивают фильтровальной бумагой и запаковывают в пакеты, вложив в каждый этикетку с указанием варианта обработки, помещают в термостат при температуре 26-29°C.

Через 7 и 14 суток проводят учет проросших глазков. По этим данным определяют оптимальные концентрации препаратов для стимулирования состояния покоя и прорастания клубней.

## **2.15 Лабораторное занятие № 15 (2 часа)**

**Тема: «Приготовления винных заквасок»**

**2.15.1 Цель работы:** Изучить биотехнологические процессы получения винных заквасок

**2.15.2 Задание:** Приготовить винные закваски

**2.15.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

1. химическая посуда
2. лабораторные весы
3. клубни картофеля
4. ПС
5. 2-ХЭФК или препараты на ее основе
6. этиловый спирт
7. посуда для приготовления растворов и замачивания клубней
8. термостат
9. бумажные пакеты.

**2.15.4 Описание (ход) работы:**

Закваска - продукт скоропортящийся. При комнатной температуре она сохраняет свои качества не более 10 дней. Затем она скисает, и тогда пользоваться ею уже нельзя. В противном случае сусло будет инфицировано, а вино получится низкого качества. Для нормальной жизнедеятельности дрожжей необходим спирт. Однако если его содержание в бродячем вине превышает 15-16 %, то большинство микроорганизмов гибнет. Это является причиной того, что в домашних условиях получить вино крепостью более 15-16 % об. невозможно. Крепкое десертное вино, отвечающее всем требованиям, получается только в результате сбраживания сока на винных дрожжах чистой культуры. Однако приготовить такие дрожжи можно только в специальных условиях в лаборатории. В домашних условиях, как правило, используют так называемые дикие дрожжи, которые находятся на поверхности ягод. Они позволяют накопить около 14-15 % спирта. Начинать приготовление вина следует с приготовления винных дрожжей. Существует несколько способов получения таких дрожжей. Здесь приводятся несколько из них.

### **Ход работы**

1. Для приготовления диких дрожжей примерно за 10 дней до начала изготовления вина надо собрать спелые ягоды малины, белой смородины и клубники. 2 стакана этой смеси следует поместить в бутылку, залить 1 стаканом воды и добавить 100 г сахара. Не рекомендуется собирать ягоды для закваски после сильного дождя. Вода смывает с их поверхности дрожжи, поэтому закваска долго не бродит, а сусло, как правило, начинает плесневеть. Все хорошо взболтать, закупорить пробкой из ваты и поставить в темное место при температуре 22-24 °С. Через 3-4 дня перебродивший сок надо процедить через марлю. Полученный сок - это и будут дикие дрожжи, которые в дальнейшем используются в качестве закваски.

2. Дикая закваска- 2 стакана немытых ягод малины и земляники - помещают в бутылку, добавляя стакан воды и 150 г сахара. Перед этим ягоды обязательно нужно размять. Бутылка закрывается ватным тампоном и ставится в темное место. Через 4 дня содержимое бутылки процеживается через марлю. Срок хранения ограничен 10 днями.

3. Дикая закваска 150 г изюма или свежего немытого винограда (400 г) помещают в бутылку емкостью 0,7 - 0,8 л, заливают водой (3/4 бутылки) и засыпают 50 - 60 г сахара. Через 4 - 5 дней дрожжи готовы. Этот способ наиболее приспособлен для больших городов. Срок хранения дрожжей до 3 месяцев в холодильнике.

## **2.16 Лабораторное занятие № 16**

### **Тема: «Биотехнология кисломолочных напитков»**

**2.16.1 Цель работы:** Изучить биотехнологические методы приготовления кисломолочных напитков

**2.16.2 Задачи работы:** Приготовить сметану

**2.16.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

1. химическая посуда

2. лабораторные весы
3. бюретка
4. электрическая плитка
5. сливки

#### **2.16.4 Описание (ход) работы:**

##### **Общие положения.**

Основной процесс, определяющий консистенцию всех кисломолочных напитков, — гелеобразование. Сгустки этих продуктов различные: в одних случаях сгусток плотный (колючийся), в других — ровный и нежный (сметанообразный) или хлопьевидный и т. д. При формировании структуры сгустков продуктов в основном образуются необратимо разрушающиеся связи, тиксотропно-обратимых связей в них мало, поэтому столь важно вести технологический процесс при таких режимах, которые бы обеспечивали минимальное отделение от сгустка сыворотки. В первую очередь это относится к режимам пастеризации, гомогенизации и сквашивания молока. В образовании структуры продукта участвуют молочный жир и белки. Главную роль играет жир, который в результате отвердевания и кристаллизации повышает прочность структуры и вязкость сметаны. Дополнительно структуру стабилизируют образующиеся во время охлаждения жировые скопления. Казеин и сывороточные белки, находящиеся в плазме сметаны и на оболочках жировых шариков, благодаря своей способности связывать влагу также улучшают консистенцию продукта. Таким образом, при производстве сметаны протекают не только процессы брожения молочного сахара и коагуляции казеина, зависящие от режимов пастеризации, гомогенизации и сквашивания сливок, но и процессы формирования и упрочнения структуры жировой фазы, определяемые режимами гомогенизации и скоростью охлаждения продукта.

##### **Ход работы.**

При выработке сметаны для получения нужной вязкости продукта и уменьшения степени выделения сыворотки сливки следует пастеризовать при высоких температурах (85—95°C с выдержкой в течение 15—20 с и более). Данный режим пастеризации способствует также образованию сульфгидридных групп, придающих сметане специфический привкус (привкус пастеризации), и гарантирует полное разрушение липазы, которая может вызвать пороки вкуса сметаны при хранении. Гомогенизация сливок при производстве сметаны способствует повышению вязкости и пластичности готового продукта, а также ускоряет образование сгустка. В результате гомогенизации увеличивается дисперсность жира с одновременной адсорбцией на поверхности жировых шариков плазменных белков, затрудняющих синерезис сгустка. С повышением давления гомогенизации (до 10 МПа) вязкость сметаны увеличивается. Однако при гомогенизации сливок 30—40%-ной жирности может не хватать оболочечного вещества для образования новых оболочек жировых шариков, что приводит к увеличению количества свободного жира и образованию скоплений жировых шариков (даже наблюдается слияние отдельных шариков с увеличением их диаметра). Чтобы избежать образования в сливках жировых скоплений, следует применять двухступенчатую гомогенизацию (при низком давлении на второй ступени частично разбиваются образовавшиеся агрегаты жировых шариков и белков). При выработке сметаны различных видов окончание процесса сквашивания сливок (который доится 6—16 ч при температуре 26—30°C) определяют по нарастанию кислотности до 55—70°Т. Дальнейшее повышение кислотности (до pH ниже изоэлектрической точки казеина) может привести к перезарядке белка, вследствие чего

структура сгустка .Охлаждение и созревание сметаны осуществляется при 1—8°C в течение 6—48 ч. Продолжительность созревания сметаны зависит от скорости охлаждения продукта, которая определяется видом упаковки. В процессе созревания окончательно формируется и упрочняется структура продукта. Структура сметаны содержит еще небольшое количество тик-сотропных, самопроизвольно восстановливающихся после механического воздействия связей. Поэтому в этот период особенно важно оставить сметану «в покое». Продолжительность охлаждения и созревания сметаны можно сократить, предварительно охладив сливки до 2—6°C перед сквашиванием и выдерживая их при этой температуре 1—3 ч. Для повышения вязкости и улучшения консистенции сметаны пониженной жирности рекомендуется увеличить содержание сухих веществ путем добавления сухого обезжиренного молока, сухого или жидкого казеината натрия и других молочно-белковых концентратов. Например, при выработке сметаны 20%-ной жирности с добавлением 1,8—2% сухого казеината натрия эффективная вязкость увеличивается в несколько раз и превышает вязкость сметаны 30%-ной жирности. Чистые кисломолочные вкус и запах сметаны, а также привкус пастеризации вызывают вещества, образующиеся при пастеризации и сквашивании сливок: сульфидильные группы, диацетил, молочная и уксусная кислоты, ацетальдегид, лактоны и др. Однако главным ароматическим веществом продукта считают диацетил, синтезируемый арома-тобразующими молочнокислыми бактериями, поэтому выраженность вкуса и запаха сметаны зависит от активности бактериальных заквасок, температуры и продолжительности сквашивания сливок

## **2.17 Лабораторное занятие № 17 (2 часа)**

**Тема: «Биотехнологические процессы консервирования огурцов с применением молочной сыворотки»**

**2.17.1 Цель работы:** Изучить биотехнологические методы консервирования огурцов с использованием молочной сыворотки

**2.17.2 Задачи работы:** Законсервировать огурцы с применением молочной сыворотки

**2.17.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

1. химическая посуда
2. лабораторные весы
3. молочная сыворотка
4. стеклянные банки
5. зонтики укропа
6. кусочки корня хрена и листья черной смородины

**2.17.4 Описание (ход) работы:**

В молочной сыворотке много витаминов, минералов, белка и всего 0,2% жира. На 94% сыворотка состоит из воды. Остальные 6% - жизненно важные субстанции: лактоза,

содержание которой в сухом веществе - более 70%, оптимальные по аминокислотному составу белки, полный набор витаминов группы В, кальций и магний, пробиотические бактерии.

Молочная сыворотка очищает кожу, дает легкий лифтинг. Исходя из состава сыворотки, она должна обладать защитным и регенерирующим воздействием на кожу. Помимо этого, она является ингредиентом, безопасность которого проверена столетиями.

### **Ход работы**

Огурцы хорошо вымыть, плотно уложить в подготовленные стеклянные трехлитровые банки вперемешку с зонтиками укропа, кусочками корня хрена и листьями черной смородины, вишни и дуба. Под самую крышку положить лист хрена. После этого залить свежей молочной сывороткой и закатать. Хранить в погребе. Огурцы получаются малосольные. Для приготовления рассола следует взять 1,5 л свежей молочной сыворотки (именно столько надо на трехлитровую байку) и 3 ч. л. с верхом соли.

## **2.18 Лабораторное занятие № 18 (2 часа)**

### **Тема: «Биотехнологические процессы производства творога»**

**2.18.1 Цель работы:** Изучить биотехнологические процессы приготовления творога

**2.18.2 Задачи работы:** Приготовить творог из пастеризованного молока

**2.18.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

1. молоко
2. закваска
3. кастрюли
4. электрические плитки

**2.18.4 Описание (ход) работы:**

### **Общие положения**

Творог — белковый кисло-молочный продукт, изготавляемый сквашиванием культурами молочно-кислых бактерий с применением или без применения молокосвертывающего фермента и хлорида кальция пастеризованного нормализованного цельного или обезжиренного молока (допускается смешивание с пахтой) с последующим удалением из сгустка части сыворотки отпрессовыванием белковой массы. Творог имеет чистые кисло-молочные вкус и запах; для первого сорта допускается слабо выраженный привкус кормов, тары, легкой горечи. Консистенция нежная, однородная; для жирного творога первого сорта допускается несколько рыхлая и мажущаяся, для нежирного — рассыпчатая, с незначительным выделением

сыворотки. Цвет белый, слегка желтоватый, с кремовым оттенком, равномерный по всей массе; для жирного творога первого сорта допускается некоторая неравномерность цвета. Значительное содержание в твороге жира, и особенно полноценных белков, обусловливает его высокую пищевую и биологическую ценность. В твороге содержится значительное количество минеральных веществ (кальция, фосфора, железа, магния и др.), необходимых для нормальной жизнедеятельности сердца, центральной нервной системы, мозга, для костеобразования и обмена веществ в организме. В зависимости от массовой доли жира творог подразделяют на три вида: жирный, полужирный и нежирный. В качестве сырья используют доброкачественное свежее молоко цельное и обезжиренное кислотностью не выше 20 °Т. По жиру молоко нормализуют с учетом содержания в нем белка (по белковому титру), что дает более точные результаты. К творожным изделиям относятся различные творожные массы и сырки, торты, кремы и т. п. Существуют два способа производства творога — традиционный (обычный) и раздельный. Раздельный способ производства творога позволяет ускорить процесс отделения сыворотки и значительно снизить при этом потери.

Сущность раздельного способа заключается в том, что молоко, предназначенное для выработки творога, предварительно сепарируют. Из полученного обезжиренного молока вырабатывают нежирный творог, к которому затем добавляют необходимое количество сливок, повышающих жирность творога до 9 или 18 %. По методу образования сгустка различают два способа производства творога: кислотный и сычужно-кислотный. Первый основывается только на кислотной коагуляции белков путем сквашивания молока молочно-кислыми бактериями с последующим нагреванием сгустка для удаления излишней сыворотки. Таким способом изготавливается творог нежирный и пониженной жирности, так как при нагревании сгустка происходят значительные потери жира в сыворотку.

Кроме того, этот способ обеспечивает выработку нежирного творога более нежной консистенции. Пространственная структура сгустков кислотной коагуляции белков менее прочная, формируется слабыми связями между мелкими частицами казеина и хуже выделяет сыворотку. Поэтому для интенсификации отделения сыворотки требуется подогрев сгустка. При сычужно-кислотном способе свертывания молока сгусток формируется комбинированным воздействием сычужного фермента и молочной кислоты. Под действием сычужного фермента казеин на первой стадии переходит в параказеин, на второй — из параказеина образуется сгусток. Казеин при переходе в параказеин смешает изоэлектрическую точку с pH 4,6 до 5,2. Поэтому образование сгустка под действием сычужного фермента происходит быстрее, при более низкой кислотности, чем при осаждении белков молочной кислотой, полученный сгусток имеет меньшую кислотность, на 2.. .4 ч ускоряется технологический процесс.

При сычужно-кислотной коагуляции кальциевые мостики, образующиеся между крупными частицами, обеспечивают высокую прочность сгустка. Такие сгустки лучше отделяют сыворотку, чем кислотные, так как в них быстрее происходит уплотнение пространственной структуры белка. Поэтому подогрев сгустка для интенсификации отделения сыворотки не требуется. Сычужно-кислотным способом изготавливают жирный и полужирный творог, при котором уменьшается отход жира в сыворотку. При кислотном свертывании кальциевые соли отходят в сыворотку, а при сычужно-кислотном сохраняются в сгустке. Это необходимо учитывать при производстве творога для детей, которым необходим кальций для костеобразования.

### Стадии технологического процесса.

Производство творога традиционным способом включает в себя следующие стадии:

- приемка молока;
- нормализация молока до требуемого состава;
- очистка и пастеризация молока;
- охлаждение молока до температуры заквашивания;
- внесение закваски и сычужного фермента в молоко;
- сквашивание молока;
- разрезка сгустка;
- отделение сыворотки;
- охлаждение творога;
- фасование;
- упаковывание в тару и хранение готовой продукции.

### **Ход работы.**

Хороший творог можно приготовить и в домашних условиях. Для этого нужно соблюдать определенные условия. Молоко, предназначенное для изготовления творога, следует пастеризовать (нагреть до 80°C и выдержать 10—15 мин.) или прокипятить. При этом погибают почти все микроорганизмы, в том числе и вредные. Горячее молоко быстро охлаждают до 32—36°C. Для этого кастрюлю с горячим молоком лучше всего опустить в другую посуду с холодной водой, не допуская ее попадания в молоко. Для более быстрого охлаждения холодную воду несколько раз меняют. Охлажденное молоко заквашивают, вводя закваску тонкой струйкой и хорошо ее перемешивая. Количество закваски должно составлять около 5% к заквашиваемому молоку. Закваской может служить хорошая простокваша или сметана, приготовленная на молочном заводе. (Нельзя использовать для этой цели простоквашу ацидофильную). Заквашенное молоко хорошо перемешивают ложкой, кастрюлю закрывают крышкой и ставят в теплое место до образования сгустка. Сгусток должен быть плотный, на изломе образовывать ровные края и отделять прозрачную зеленоватого цвета сыворотку. При использовании недостаточно сквашенного, слабого сгустка получается творог невысокого качества. Если сгусток переквашен, то творог получается излишне кислым. Из полученного творога удаляется часть сыворотки. Для этого его разрезают на прямоугольные куски, которые переносят на сито или дуршлаг, обработанный кипятком и покрытый сложенной вдвое марлей. Когда прекратится отделение сыворотки, творожную массу охлаждают и, если это необходимо, отпрессовывают. Для этого на творог в марле кладут чистую обработанную кипятком дощечку и на нее помещают груз. Отпрессованный творог переносят в холодное место или холодильник.

## **2.19 Лабораторное занятие № 19**

**Тема: «Биотехнологические процессы производства сыра»**

**2.19.1 Цель работы:** Изучить биотехнологические процессы приготовления сыра

**2.19.2 Задачи работы:** Приготовить адыгейский сыр

**2.19.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

- 1. молоко**
- 2. молочная сыворотка**
- 3. кастрюли**
- 4. электрические плитки**

**2.19.4 Описание (ход) работы:**

### **Общие положения**

Производство сыра, или сыроподеление (сыроварение) - один из древнейших процессов, основанных на ферментации. Сыры бывают самые разнообразные - от мягких до твердых. Мягкие сыры содержат много воды, 50-60%, а твердые - мало, 13-34%. На первом этапе идет подготовка молока (первичная обработка). На втором - готовится культура молочнокислых бактерий. Микроорганизмы подбираются в определенной пропорции, обеспечивающей наилучшее качество. Набор бактерий также зависит от температуры термообработки. Третья стадия - стадия ферментации, - в сыроварении в некоторых случаях происходит в 2 этапа, до и после стадии выделения. Сначала молоко инокулируют определенными штаммами микроорганизмов, приводящими к образованию молочной кислоты, а также добавляют сычужный фермент реннин. Реннин ускоряет превращение жидкого молока в сгусток (створаживание) в несколько раз. Эта реакция активируется молочной кислотой, вырабатываемой бактериями. Функции реннина могут выполнять и другие протеиназы, но реннин также участвует в процессах протеолиза, происходящих в сыре при созревании. После образования сгустка сыворотку отделяют, а полученную творожистую массу подвергают термообработке и прессуют в формах. Далее сгусток солят и ставят на созревание. Иногда полученная масса происходит дополнительную обработку, которая заключается в следующем: заражение спорами голубых плесневых грибов при производстве рокфора; нанесение на поверхность спор белых плесневых грибов при производстве камамбера и бри; нанесение бактерий, необходимых для созревания некоторых сыров. Некоторые сыры после выделения должны подвергнуться дальнейшей ферментации (стадия созревания). Микроорганизмы и ферменты в ходе этого процесса гидролизуют жиры, белки и некоторые другие вещества молодого сыра. В результате их распада образуются вещества, придающие сырам характерный вкус.

### **Ход работы**

Чтобы изготовить 1 кг сыра необходимо 5-6 литров молока. Всё зависит от жирности молока и самое главное, белка содержащегося в нем. Молоко используем домашнее. Изначально адыгейский сыр изготавливается из козьего молока, оно полезное, но не

каждый человек может его воспринимать. Адыгейский сыр изготавливается из молока, сыворотки, и соли , это экологически чистые продукты . Молоко для изготовления сыра требуется свежее, наливаем молоко в казанок, ставим его на огонь, мы должны его довести до кипения, но не в коем случае не кипятить.Сыворотка требуется трехсуточной выдержки , чтоб она была кисловатая для сворачивания молока. Довели молоко до кипения, добавили сыворотку , при этом происходит сварачивание молока в середине получается сырная масса.В конечном итоге промежуток между молоком и казанком занимает только сыворотка, т.е молоко с казанком не соприкасается. Чтобы изготовить 1 кг сыра, требуется 50 минут. Полученную массу мы складываем в друшлак.В течение суток под небольшим прессом стекает сыворотка. Сыр уплотняется и принимает форму, его подсаливают, сначала сверху потом снизу, он имеет свойство хорошо пропитываться.